

## **Il paradosso della piruvato carbossilasi**

Francesco Malatesta

Dipartimento di Scienze Biochimiche “A. Rossi Fanelli”

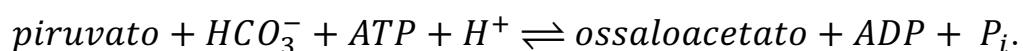
Sapienza Università di Roma

francesco.malatesta@uniroma1.it

Quanto raccontato qui, è nato da una domanda che uno studente mi ha fatto ad una lezione di Biochimica tenuta per gli studenti del Corso di Laurea triennale in Scienze Chimiche presso la Sapienza nell’AA 2022-23. L’argomento di quella lezione era la gluconeogenesi.

La gluconeogenesi, processo biochimico di grande rilevanza, si erge quale via anabolica preposta alla sintesi *ex novo* del glucosio, precipuo carburante cellulare, a partire da precursori non saccaridici. Tale sequenza di reazioni enzimatiche, antitetica alla glicolisi, si dipana attraverso una serie di trasformazioni chimiche di squisita eleganza molecolare. Iniziando dai substrati quali piruvato, lattato, o amminoacidi glucogenici, questo iter metabolico si snoda attraverso compartimenti subcellulari distinti, orchestrando una sinfonia di conversioni che culmina nella genesi dell'esoso tanto ambito. Le tappe cruciali, catalizzate da enzimi di raffinata specificità quali la piruvato carbossilasi e la fosfoenolpiruvato carbossichinasi, procedono con inversioni stereochimiche e fosforilazioni strategiche. L'epilogo di questa odissea biochimica vede l'intervento della glucosio-6-fosfatasi, enzima che, con un gesto catalitico definitivo, libera il glucosio neo-sintetizzato, pronto per assolvere al suo ruolo primario nel panorama energetico cellulare e organismico. Questa via metabolica, regolata con squisita finezza da molteplici effettori allosterici e modificazioni post-traduzionali, si erge a baluardo dell'omeostasi glicemica, plasmando la risposta fisiologica alle fluttuazioni energetiche con ineguagliabile maestria biochimica.

Il primo enzima di questa via biosintetica è la piruvato carbossilasi (PC, una ligasi biotina dipendente, EC 6.4.1.1) che catalizza la seguente reazione:



La PC, che è un enzima tetramerico si trova nella matrice mitocondriale, catalizza detta reazione nelle 2 direzioni ed è costituita da 4 domini (Figura 1): i domini della biotina carbossilasi (BC), della carbossiltransferasi (CT) contenenti i due siti attivi dell'enzima e della proteina portatrice di biotina-carbossile (BCCP), oltre al dominio allosterico che lega l'acetil-CoA attivatore. Nella mia lezione, che vi ricordo essere rivolta agli studenti di Chimica, descrivo nel dettaglio il meccanismo accettato della reazione. Le reazioni di carbossilazione mediate dalla biotina avvengono in 2 fasi, generalmente catalizzate in siti attivi separati BC e CT dell'enzima. Nella prima fase, il bicarbonato viene convertito nella più reattiva  $\text{CO}_2$ , con un intermedio instabile quindi utilizzato per carbossilare la biotina.

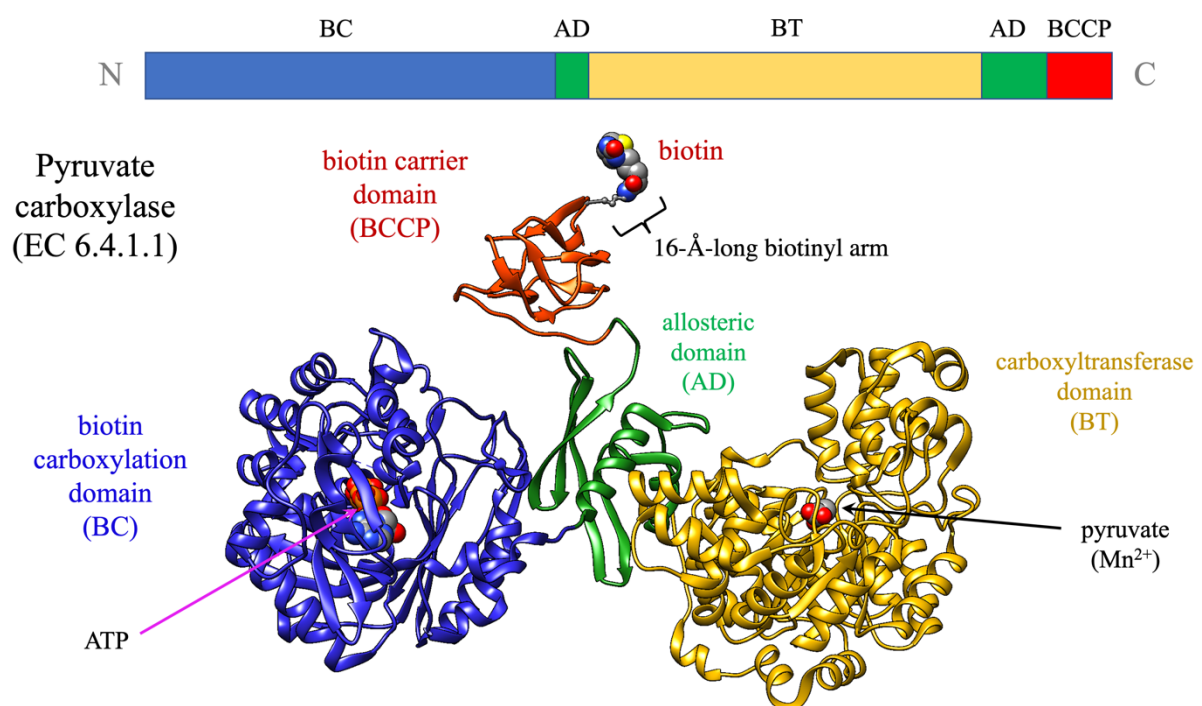


Figura 1. Struttura di PC da *S. aureus*. PDB: 3BG5. Immagine generata con UCSF Chimera e modificata da (2).

La biotina, legata covalentemente ad un residuo di lisina presente nel dominio che trasporta la biotina funge da vettore per il trasporto della  $\text{CO}_2$  da un sito attivo a un altro su un monomero adiacente dell'enzima tetrameric, ovvero dal dominio di carbossilazione della biotina al dominio carbossiltransferasico. Nella seconda fase, catalizzata in questo secondo sito attivo, la  $\text{CO}_2$  reagisce con il piruvato per formare ossalacetato.

Al termine della lezione, uno studente visibilmente timido si avvicina alla cattedra e mi pone una domanda: "Professore, perché la natura ha stabilito che una molecola di ATP debba essere consumata per generare il carbossifosfato, che

poi si decompone in CO<sub>2</sub> e fosfato? Non sarebbe stato più semplice utilizzare direttamente la CO<sub>2</sub>?"

Rifletto un momento prima di rispondere: "Nella matrice mitocondriale, la concentrazione di CO<sub>2</sub> è bassa o trascurabile a causa del pH alcalino (circa 7.8) mantenuto dalle pompe protoniche della catena di trasporto degli elettroni durante la fosforilazione ossidativa. La natura sembra aver risolto questo problema creando una via alternativa per la sintesi in situ della CO<sub>2</sub>." Lo studente, visibilmente soddisfatto dalla spiegazione, mi ringrazia con un sorriso.

Nonostante la soddisfazione dello studente, io non ero completamente appagato dalla mia risposta. Un senso di curiosità e incertezza mi assalì: chi aveva effettivamente dimostrato questa teoria? La biochimica, con la sua vastità e complessità, rende arduo per chiunque possedere una conoscenza completa e approfondita di ogni suo aspetto. Nel corso della mia ricerca, mi sono imbattuto in una sfida ricorrente nel mondo accademico: la difficoltà di rintracciare la fonte originale di un'informazione scientifica. Questo problema, noto come "citazione a catena", si verifica quando gli autori citano lavori che a loro volta rimandano ad altre pubblicazioni, creando un intricato labirinto di riferimenti. Questa pratica, sebbene comune, può rendere estremamente arduo risalire all'origine effettiva di un dato sperimentale o di una scoperta. La situazione è ulteriormente complicata dalla vastità della letteratura scientifica moderna e dalla rapidità con cui nuove ricerche vengono pubblicate.

In un'epoca in cui l'accesso alle informazioni è più ampio che mai, paradossalmente, stabilire con precisione la paternità di un dato sperimentale o di una teoria specifica può rivelarsi un compito sorprendentemente complesso. Questo fenomeno non solo ostacola la verifica delle fonti, ma può anche portare alla propagazione di interpretazioni errate o alla perdita di importanti sfumature presenti nel lavoro originale.

Decisi di approfondire la questione. Iniziai con una ricerca meticolosa su PubMed, sperando di trovare studi che dimostrassero definitivamente quale fosse il vero substrato della PC. In particolare, cercavo conferme sull'ipotesi che fosse il bicarbonato e non la CO<sub>2</sub>. Tuttavia, nonostante ore di ricerca, non riuscii a trovare una risposta definitiva. Questa iniziale frustrazione, anziché scoraggiarmi, accese ulteriormente la mia curiosità scientifica. Decisi di cambiare strategia: invece di cercare direttamente l'informazione, mi concentrarai sui ricercatori più prominenti studio della PC.

Dopo un'attenta valutazione della letteratura scientifica, un nome emerse come particolarmente rilevante: il Professor Paul Attwood dell'Università dell'Australia

Occidentale a Perth. La sua reputazione nel campo e i suoi contributi significativi allo studio della PC lo rendevano il candidato ideale per rispondere alle mie domande.

Con un misto di trepidazione e speranza, composi un'email dettagliata al Professor Attwood. Nel messaggio, esposi il mio dilemma, spiegai il contesto della domanda dello studente e chiesi chiarimenti sulla natura del substrato della PC.

La risposta del Professor P. Attwood si è rivelata illuminante, fornendomi la chiave per risolvere il mio dilemma bibliografico. Il lavoro che mi ha suggerito (1) era sfuggito alla mia ricerca iniziale per una ragione inaspettata: gli esperimenti cruciali che hanno stabilito il meccanismo attualmente accettato per la sintesi del carbossifosfato non erano stati condotti sulla PC, come avevo erroneamente supposto, bensì sulla propionil-CoA carbossilasi! La PC e la propionil-CoA carbossilasi sono enzimi strutturalmente correlati. Appartengono alla famiglia delle carbossilasi biotina-dipendenti, enzimi che sfruttano la biotina come cofattore per catalizzare reazioni di carbossilazione attraverso un meccanismo cinetico comune. Si veda il riferimento bibliografico (2) per una monografia relativamente recente.

Questo dettaglio apparentemente minore ha avuto un impatto significativo sulla mia capacità di trovare la fonte originale. Lo studio in questione era ingegnosamente progettato: i ricercatori avevano mescolato l'enzima con ATP, bicarbonato marcato con isotopo  $^{18}\text{O}$  e piruvato. L'aspetto rivelatore dell'esperimento era l'incorporazione dell' $^{18}\text{O}$  nel prodotto fosfato (1), come mostrato nella Figura 2.

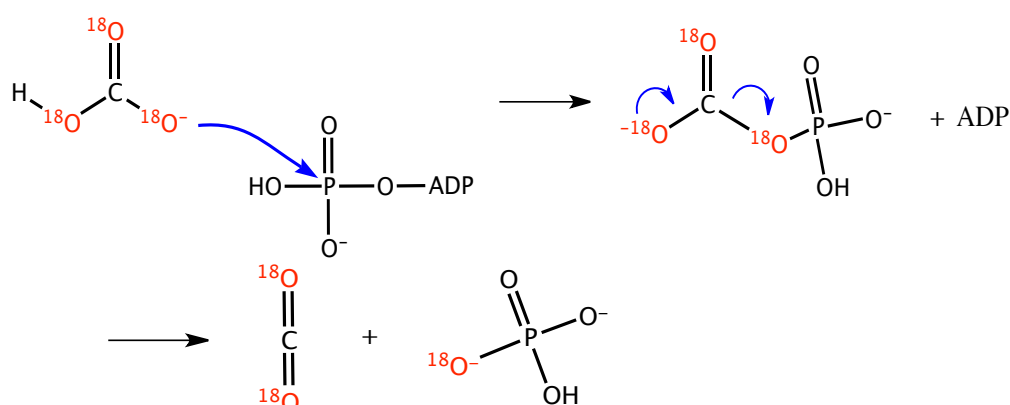
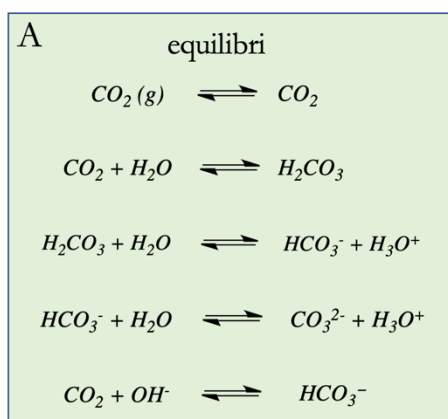


Figura 2. Produzione in situ di  $\text{C}^{18}\text{O}_2$  da parte della propionil-CoA carbossilasi. Generato il carbossifosfato, un'anidride mista instabile, questa si decompone rapidamente ( $t^{1/2}$  stimato 70 ms, Clymer, T., 2015. Computational Characterization of Carboxyphosphate. Doctoral dissertation, Duquesne University. Retrieved from <https://dsc.duq.edu/etd/75>)

Questa scoperta ha evidenziato non solo la complessità delle vie metaboliche, ma anche l'importanza di ampliare il campo di ricerca quando si indagano meccanismi biochimici. Spesso, infatti, enzimi apparentemente non correlati possono condividere meccanismi simili, e le scoperte in un'area possono illuminare processi in un'altra. Senza il suggerimento del Professor Attwood, questa preziosa informazione sarebbe rimasta nascosta, dimostrando come la comunicazione tra ricercatori possa colmare lacune cruciali nella nostra comprensione.

Per giungere infine a una soluzione esaustiva al problema qui trattato, è necessario dimostrare che la concentrazione di  $CO_2$  all'interno della matrice mitocondriale è trascurabile.

Nella Figura 3A sono illustrati gli equilibri cui è soggetta la  $CO_2$  presente nel nostro organismo, includendo anche la quota prodotta dal ciclo di Krebs. Tali equilibri comprendono: la dissoluzione della  $CO_2$ , la reazione di idratazione catalizzata dall'anidrasi carbonica, la prima e la seconda ionizzazione dell'acido carbonico, nonché la reazione della  $CO_2$  con l'anione idrossido, che diviene predominante a pH superiore a 8.



**B**

$$K_H = \frac{CO_2}{pCO_2} \quad \text{leggi di azione delle masse e conservazione della massa}$$

$$K_{hyd} = \frac{H_2CO_3}{CO_2}$$

$$K_1 = \frac{HCO_3^- \cdot H_3O^+}{H_2CO_3}$$

$$K_2 = \frac{CO_3^{2-} \cdot H_3O^+}{HCO_3^-}$$

$$K_{OH} = \frac{HCO_3^-}{CO_2 \cdot OH^-} = \frac{K_1 K_{hyd}}{K_w}$$

$$c_0 = CO_2 + H_2CO_3 + HCO_3^- + CO_3^{2-}$$

**C**

$$CO_2 = \frac{c_0 10^{-2 pH}}{d} \quad H_2CO_3 = \frac{c_0 K_{hyd} 10^{-2 pH}}{d} \quad HCO_3^- = \frac{c_0 K_1 K_{hyd} 10^{-pH}}{d} \quad CO_3^{2-} = \frac{c_0 K_1 K_2 K_{hyd}}{d}$$

$$d = (1 + K_{hyd})10^{-2 pH} + K_1 K_{hyd} 10^{-pH} + K_1 K_2 K_{hyd}$$

Figura 3. Calcolo delle concentrazioni della  $CO_2$  e delle sue specie ottenute in seguito alla reazione di idratazione e alle successive reazioni di ionizzazione. A. Equilibri coinvolti. B. Corrispondenti leggi di azione delle masse. La concentrazione totale di carbonio  $c_0$  è ottenuta dalla legge di Henry usando l'espressione  $CO_2 = K_H pCO_2$  in cui  $K_H$  e  $pCO_2$  rappresentano rispettivamente la costante di Henry e la pressione parziale di  $CO_2$ . C. Soluzione del sistema di equazioni.

Nella Figura 3B sono indicate le corrispondenti costanti di equilibrio e la legge di conservazione della massa in cui  $c_0$  indica la quantità totale di carbonio presente e distribuito fra le varie forme. Il sistema di equazioni in Figura 3B ha come soluzione le equazioni mostrate in Figura 3C.

Il grafico risultante dalle equazioni presentate nella Figura 3C è illustrato nella Figura 4. L'obiettivo è determinare la concentrazione di  $CO_2$  nel mitocondrio al pH della matrice e a  $37^\circ C$ . Per raggiungere questo scopo, occorre affrontare due questioni principali: a) stimare il pH della matrice mitocondriale, e b) stimare la pressione parziale di  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) all'interno del mitocondrio.

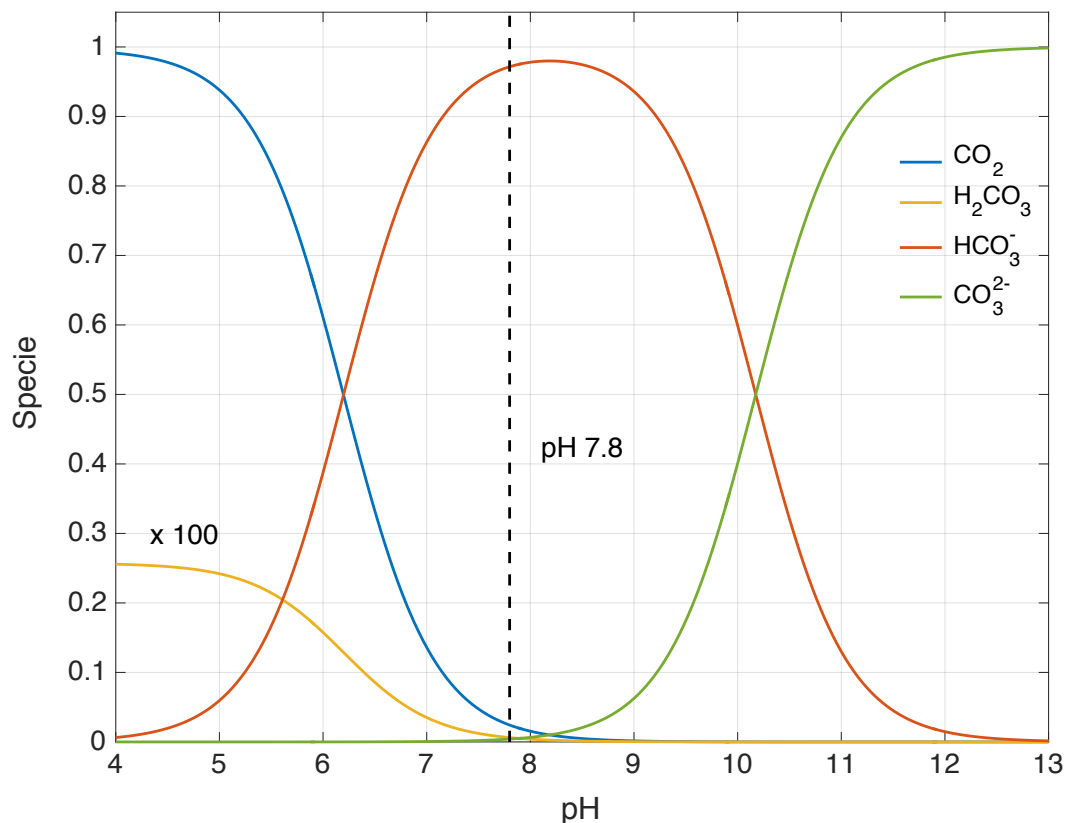


Figure 4. pH dependence of the relative concentration of CO<sub>2</sub> and its derivatives with water at 37°C. The equilibrium constant values used are:  $K_H = 0.0239 \text{ M atm}^{-1}$ ,  $K_{\text{hyd}} = 2.58 \cdot 10^{-3}$ ,  $K_1 = 2.46 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $K_2 = 6.69 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ ,  $K_w = 2.34 \cdot 10^{-14} \text{ M}^2$ .  $p\text{CO}_2 = 69 \text{ torr}$ , which corresponds to a total carbon concentration of 2.17 mM. The concentrations of all species shown in the figure have been normalized to this value. The equilibrium constant values are taken from references (3, 4). The dashed line shows the estimated intramitochondrial pH.

a) Il pH intramitochondriale è stato determinato essere vicino a 7.8 attraverso diverse ricerche che hanno utilizzato vari metodi di misurazione (5-8). Questi studi hanno impiegato tecniche quali sensori di pH codificati geneticamente, varianti di proteine fluorescenti sensibili al pH, e misurazioni dirette in cellule vive. Le ricerche hanno costantemente riportato valori di pH della matrice mitocondriale che vanno da circa 7.5 a 8.0, con molti studi che convergono intorno al valore leggermente alcalino di 7.8. Le misurazioni sono state effettuate sia in cellule a riposo che in condizioni diverse, e i risultati sono stati coerenti nel tempo, dal momento che gli studi coprono un periodo di oltre un decennio. La convergenza di questi risultati, ottenuti con metodi diversi e in tempi diversi, fornisce una base scientifica per affermare che il pH all'interno dei mitocondri sia effettivamente vicino a 7.8.

b) La determinazione della  $p\text{CO}_2$  mitocondriale a 37°C e pH 7.8 richiede un'analisi attenta di diversi fattori e una revisione critica della letteratura scientifica pertinente. I mitocondri, essendo i principali siti di produzione energetica cellulare, presentano generalmente una  $p\text{CO}_2$  più elevata rispetto al citosol, a causa della loro intensa attività metabolica e della conseguente produzione di CO<sub>2</sub>.

Alcune stime suggeriscono che la  $p\text{CO}_2$  intramitochondriale possa essere da 1.5 a 2 volte superiore a quella citosolica (9). Considerando che la  $p\text{CO}_2$  citosolica nelle cellule di mammifero a riposo è stata riportata intorno ai 46 mmHg, si potrebbe ipotizzare una  $p\text{CO}_2$  mitocondriale compresa tra 69 e 92 mmHg. Tuttavia, è fondamentale sottolineare che questi valori sono approssimativi e possono variare significativamente in base al tipo cellulare, allo stato metabolico e ad altri fattori fisiologici. Sulla base di questi dati, è stata elaborata la Figura 4, la quale illustra che, al pH fisiologico di 7.8, la percentuale di CO<sub>2</sub> libera è leggermente superiore al 2.4%. Questa percentuale corrisponde a una concentrazione di circa 53 μM di CO<sub>2</sub> disciolta.

## Conclusioni.

Questa breve indagine ha dimostrato che la piruvato carbossilasi utilizza il bicarbonato come substrato primario, anziché la CO<sub>2</sub> in forma libera. Questo meccanismo si è evoluto in risposta alle specifiche condizioni biochimiche della matrice mitocondriale, dove il pH alcalino favorisce la presenza di bicarbonato rispetto alla CO<sub>2</sub> disciolta.

La natura stessa della ricerca scientifica, nel suo incessante anelito verso una comprensione sempre più raffinata dei fenomeni naturali, trae linfa vitale dal dialogo costruttivo e dallo scambio fecondo di idee tra menti curiose e versate nella materia. Il Lettore che nutra ulteriori perplessità o sia animato dal desiderio di contribuire al perfezionamento di qualsivoglia aspetto di questa succinta ma ponderata indagine, è invitato a dare il proprio prezioso contributo per posta elettronica.

## Ringraziamenti.

Un sentito encomio va rivolto agli Studenti, le cui menti curiose e domande penetranti fungono da catalizzatori intellettuali, stimolando non solo il proprio apprendimento, ma anche quello dei loro mentori!

## Bibliografia

- 1) Kaziro, Y., Hass, L.F., Boyer, P.D., Ochoa, S. (1962). Mechanism of the propionyl carboxylase reaction II. Isotopic exchange and tracer experiments. *J. Biol. Chem.* 237(5), 1460-1468. In questo lavoro si dimostra che il bicarbonato è il vero substrato della propionil-CoA carbossilasi.
- 2) Jitrapakdee, S., St Maurice M., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C., and Attwood, P.V. (2008). *Biochem. J.* 413, 369–387. Una monografia sulla piruvato carbossilasi.
- 3) Harned, H. S., & Davis, R. (1943). The Ionization Constant of Carbonic Acid in Water and the Solubility of Carbon Dioxide in Water and Aqueous Salt Solutions from 0 to 50°. *Journal of the American Chemical Society*, 65(10), 2030-2037.
- 4) Harned, H. S., & Scholes, S. R. (1941). The Ionization Constant of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> from 0 to 50°. *Journal of the American Chemical Society*, 63(6), 1706-1709.



- 5) Santo-Domingo, J., & Demaurex, N. (2012). The renaissance of mitochondrial pH. *Journal of General Physiology*, 139(6), 415-423. Questo articolo discute vari aspetti del pH mitocondriale e riporta che il pH della matrice mitocondriale è tipicamente compreso tra 7.5 e 8.0.
- 6) Poburko, D., Santo-Domingo, J., & Demaurex, N. (2011). Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11672-11684. Questo studio ha misurato il pH della matrice mitocondriale utilizzando un sensore di pH codificato geneticamente e ha trovato valori intorno a 7.6-7.8 nelle cellule a riposo.
- 7) Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., & Tsien, R. Y. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6803-6808. Questo articolo classico ha riportato valori di pH della matrice mitocondriale di circa 8.0 utilizzando varianti di GFP sensibili al pH.
- 8) Casey, J. R., Grinstein, S., & Orlowski, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(1), 50-61. Questo articolo di revisione menziona che il pH della matrice mitocondriale è tipicamente mantenuto intorno a 7.8.
- 9) Arthurs, G.J., & Sudhakar, M. (2005). Carbon dioxide transport. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 5(6), 207-210.