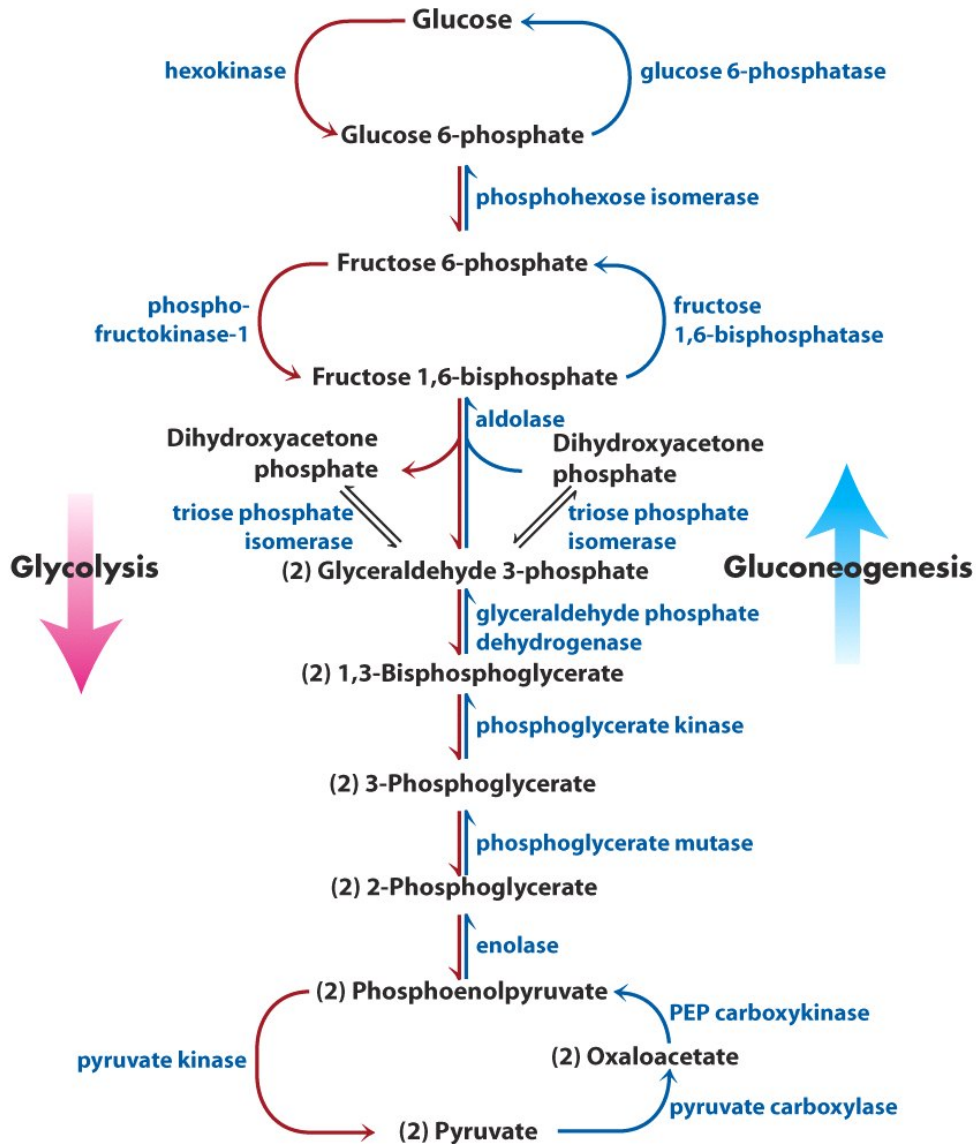


VIE METABOLICHE



Regolazione coordinata di glicolisi e gluconeogenesi



Glicolisi e gluconeogenesi sono regolate in modo reciproco

La regolazione è a livello dei punti di deviazione

In assenza di meccanismi di regolazione, nei tre punti di deviazione della gluconeogenesi il simultaneo funzionamento di entrambe le vie potrebbe dar luogo ad un cosiddetto **CICLO FUTILE** (reazione che disperde energia derivante dall'idrolisi di ATP senza effettuare nessun lavoro metabolico netto)

Es:



Se queste reazioni procedessero contemporaneamente una grande quantità di energia chimica verrebbe dissipata sotto forma di calore.

In condizioni normali, i cicli futili non sono operanti, ma in certi casi possono diventare importanti per produrre calore.

Es: il ciclo futile sopra descritto serve ai bombi durante la stagione fredda per mantenere la temperatura delle ali a 30°C (non possono volare se la temperatura alare non raggiunge i 30°C)

REGOLAZIONE GLICOLISI

I tre punti di controllo della glicolisi sono le reazioni catalizzate da

- Esocinasi
- Fosfofruttochinasi-1
- Piruvato chinasi

Regolazione di esochinasi

L' esochinasi esiste in quattro forme isoenzimatiche (I-IV) codificate da quattro geni diversi e con diversa localizzazione:

Esochinasi del muscolo (isoforme I-III)

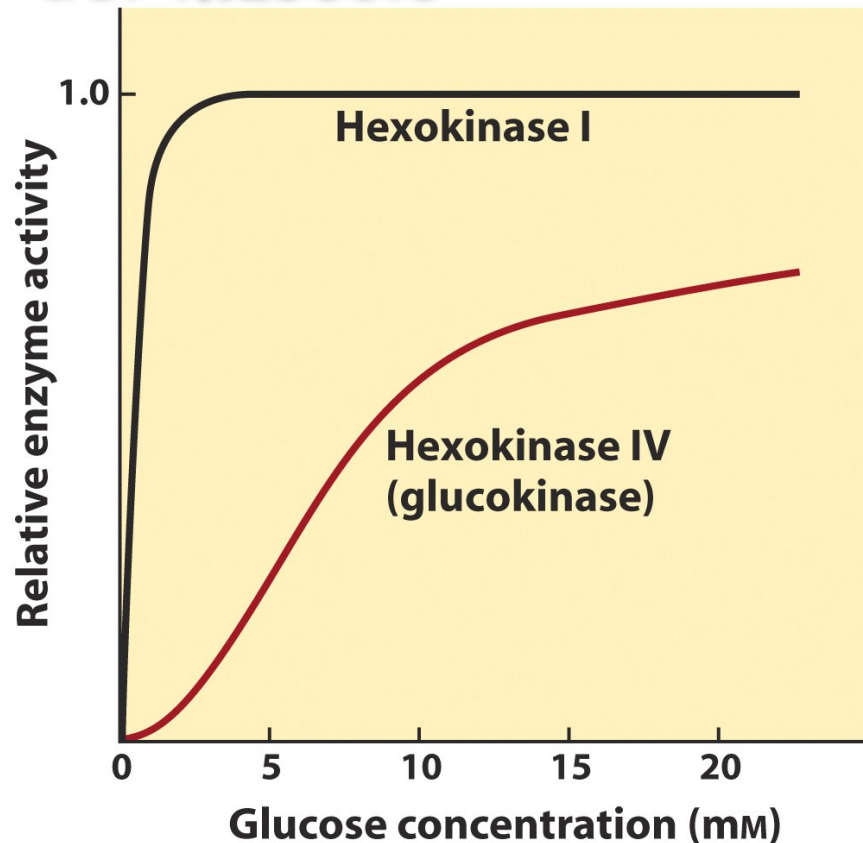
Esochinasi epatica (isoforma IV - glucochinasi)

Le diverse forme della esochinasi presenti nel fegato e nel muscolo riflettono il diverso ruolo che questi organi svolgono nel metabolismo dei carboidrati:

-il muscolo utilizza glucosio per produrre energia: ha bisogno di una fonte di glucosio rapidamente utilizzabile durante l'ossidazione anaerobica in seguito a contrazione muscolare. Produzione rapida di ATP

-il fegato mantiene costante la concentrazione di glucosio ematico, producendo ed esportando glucosio ai diversi tessuti sulla base delle singole necessità, rimuovendo e conservando glucosio come glicogeno quando c'è un apporto eccessivo da parte della dieta

Differenze tra la glucochinasi e le esochinasi del muscolo



1. Caratteristiche cinetiche - affinità per il glucosio

Esochinasi del muscolo:

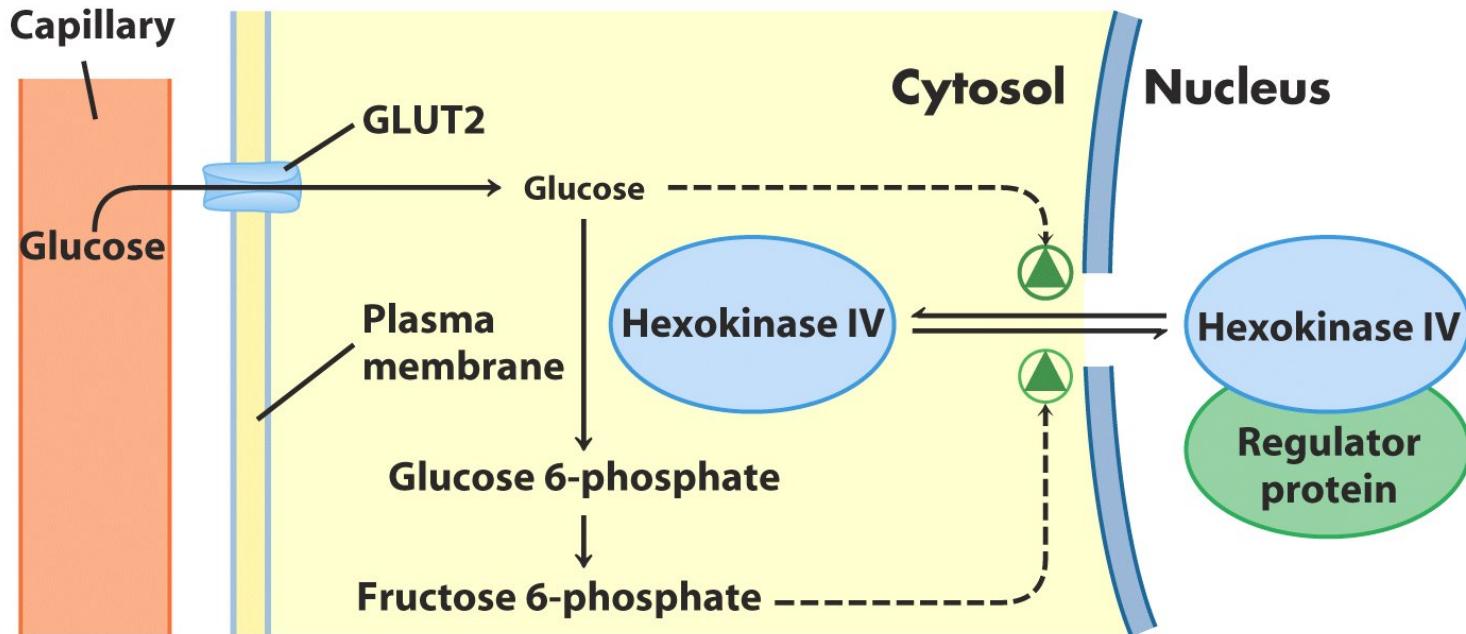
Alta affinità per il glucosio: poiché il glucosio che entra nei miociti dal sangue è sufficiente per saturare l'enzima, questo lavora sempre a velocità massima.

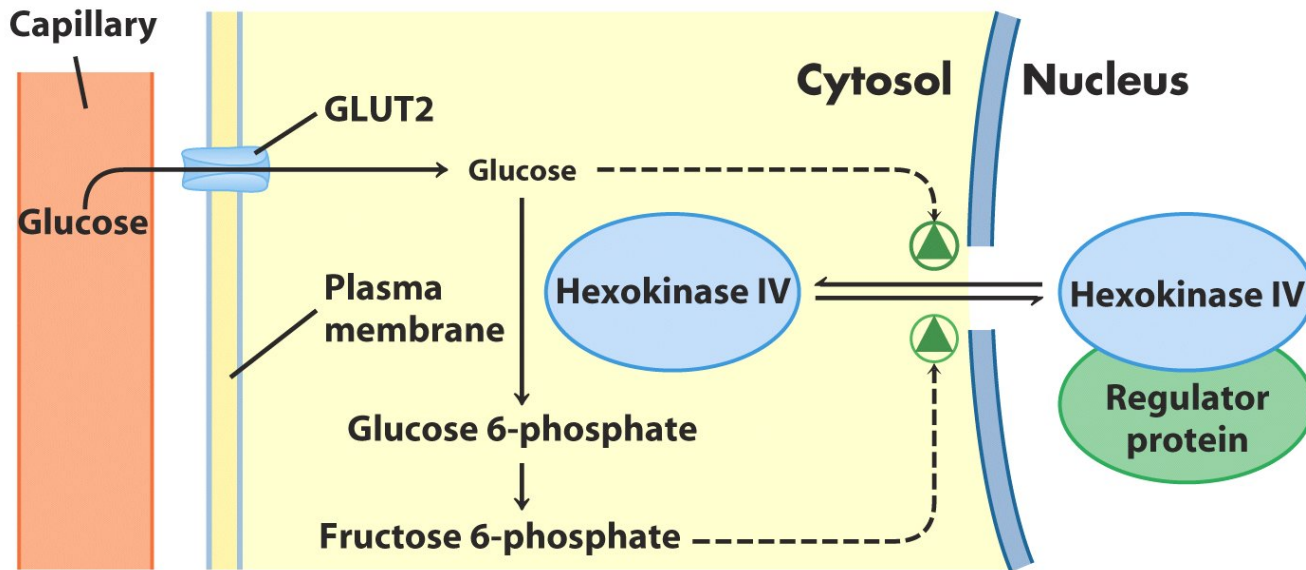
Glucochinasi: Minore affinità per il glucosio. la concentrazione di glucosio in corrispondenza del quale l'enzima è per metà saturato ($K_{0,5}$) è più elevata della concentrazione normale di glucosio nel sangue. Poiché la concentrazione di glucosio negli epatociti viene mantenuta a un livello simile a quello del sangue, l'attività dell'enzima dipende direttamente dai livelli ematici di glucosio

2. Regolazione

Esochinasi del muscolo: inibita allostericamente dal suo prodotto, glucosio-6-fosfato.

Glucocinasi: inibita da una proteina regolatrice specifica del fegato che si lega reversibilmente all'enzima. La formazione del complesso enzima-proteina è regolato allostericamente da fruttosio 6-fosfato (+) e da glucosio (-)





Se la concentrazione ematica di glucosio è alta

(es. dopo un pasto ricco di carboidrati):

il glucosio entra negli epatociti attraverso il trasportatore GLUT2 e attiva l' esochinasi causando la dissociazione dalla proteina regolatrice

Se la concentrazione ematica di glucosio è bassa

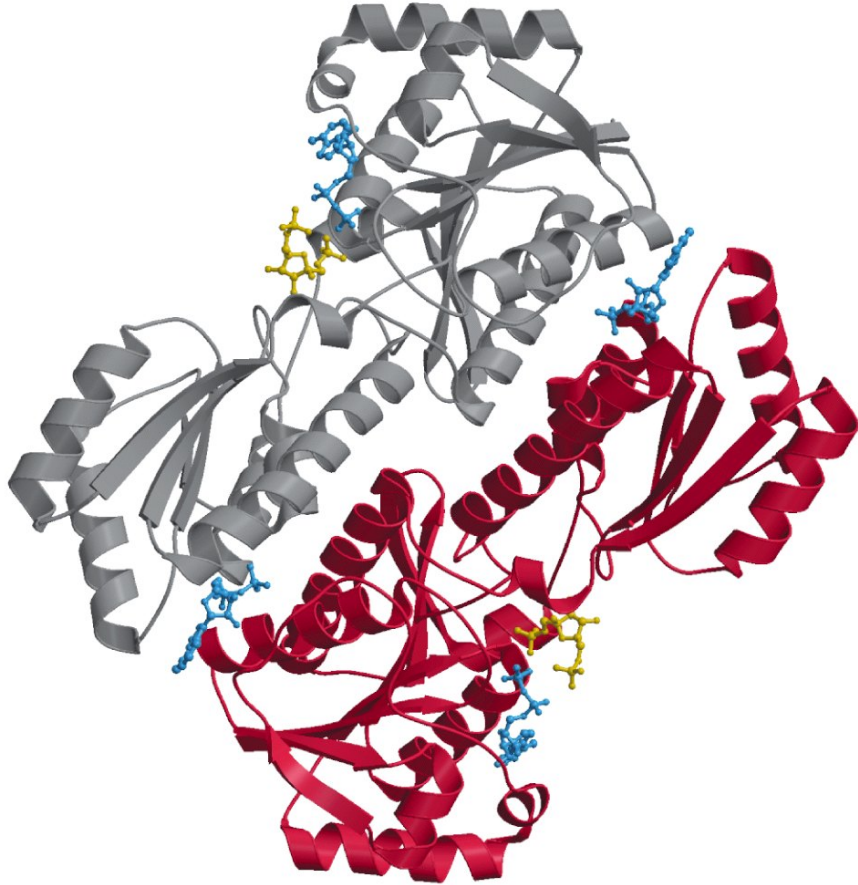
(es. durante un periodo di digiuno):

il fruttosio 6-fosfato favorisce la formazione del complesso enzima-proteina (in questo modo il fegato non sottrae agli altri organi il poco glucosio disponibile)

Meccanismo della proteina regolatrice: la proteina sequestra l' esochinasi IV nel nucleo separandola dagli enzimi glicolitici

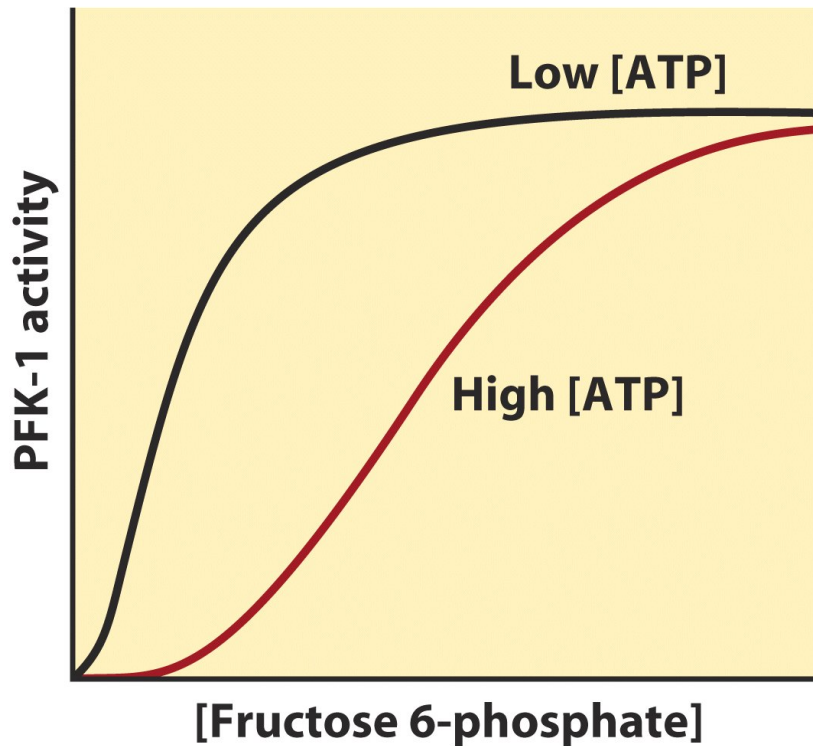
Regolazione di fosfofruttochinasi-1

PFK1 è soggetta ad una complessa regolazione allosterica



PFK1 catalizza la terza reazione della glicolisi, che determina in modo irreversibile l'ingresso del glucosio nella glicolisi (il glucosio 6-fosfato può prendere altre vie diverse dalla glicolisi)

Oltre ai siti di legame per i substrati (fruttosio 1,6-bifosfato, ATP) possiede siti regolatori ai quali si legano attivatori o inibitori allosterici



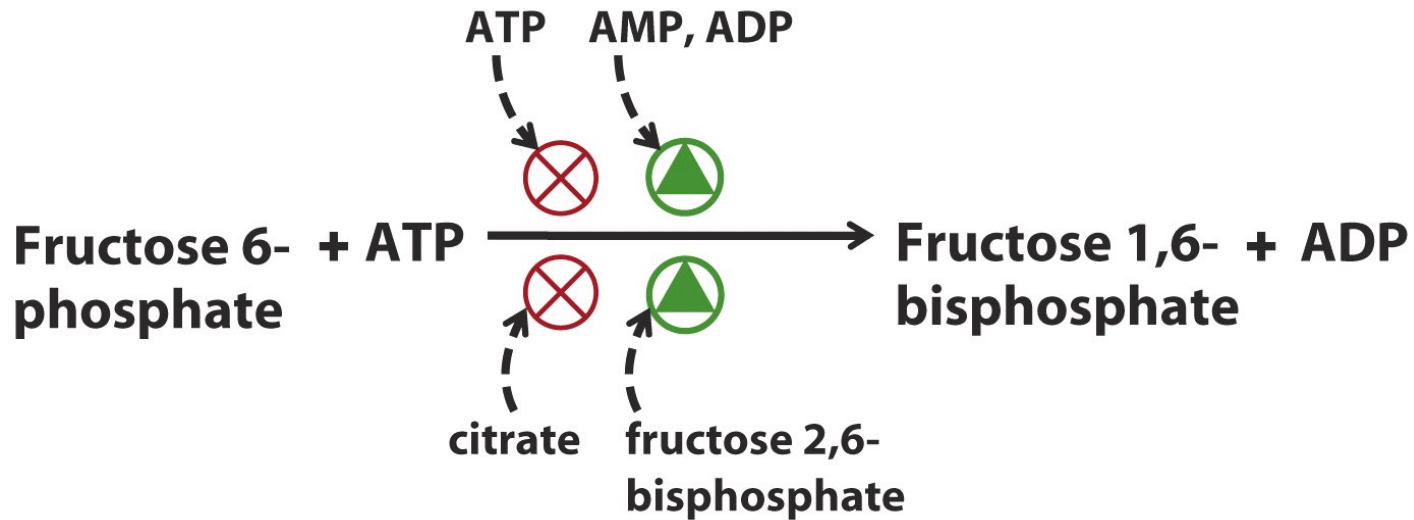
Regolazione allosterica da parte di ATP:

Oltre ad essere un substrato di PFK-1, ATP è uno dei prodotti finali della glicolisi

Bassa [ATP]: basso valore di $K_{0.5}$ per fruttosio 6-fosfato. L'enzima può funzionare a velocità elevata anche in presenza di basse concentrazioni di substrato

Alta [ATP]: aumenta il valore di $K_{0.5}$ per fruttosio 6-fosfato

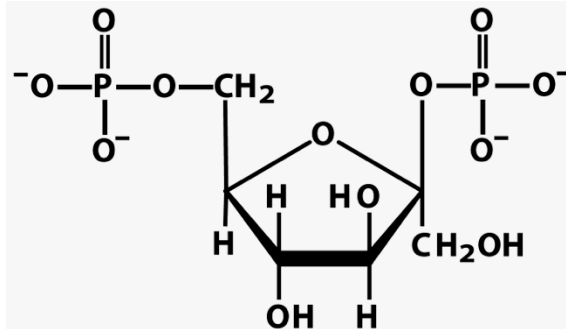
ADP e AMP agiscono allostericamente rimuovendo l'inibizione da parte di ATP



PFK-1 è regolata anche dal citrato, intermedio chiave dell'ossidazione aerobica di piruvato, acidi grassi e amminoacidi. E' un inibitore allosterico di PFK-1.

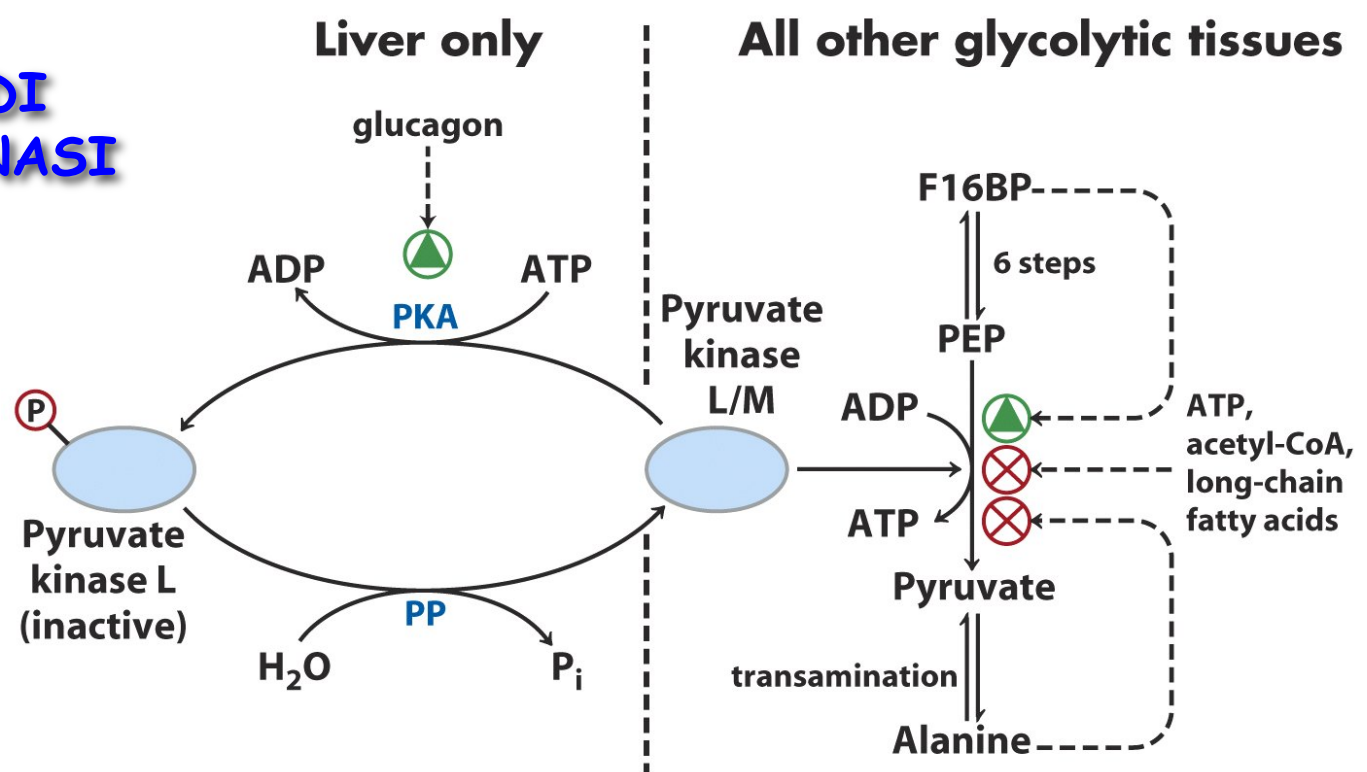
Il citrato si comporta come un messaggero intracellulare: alti livelli intracellulari segnalano che le necessità energetiche sono soddisfatte e rallentano il flusso di glucosio attraverso la glicolisi

Nel fegato, il principale regolatore allosterico di PFK-1 è **fruttosio 2,6-bifosfato** (attiva fortemente l'enzima)
Media la regolazione ormonale di PFK-1
Ruolo chiave nella regolazione coordinata tra glicolisi e gluconeogenesi



Fructose 2,6-bisphosphate

REGOLAZIONE DI PIRUVATO CHINASI

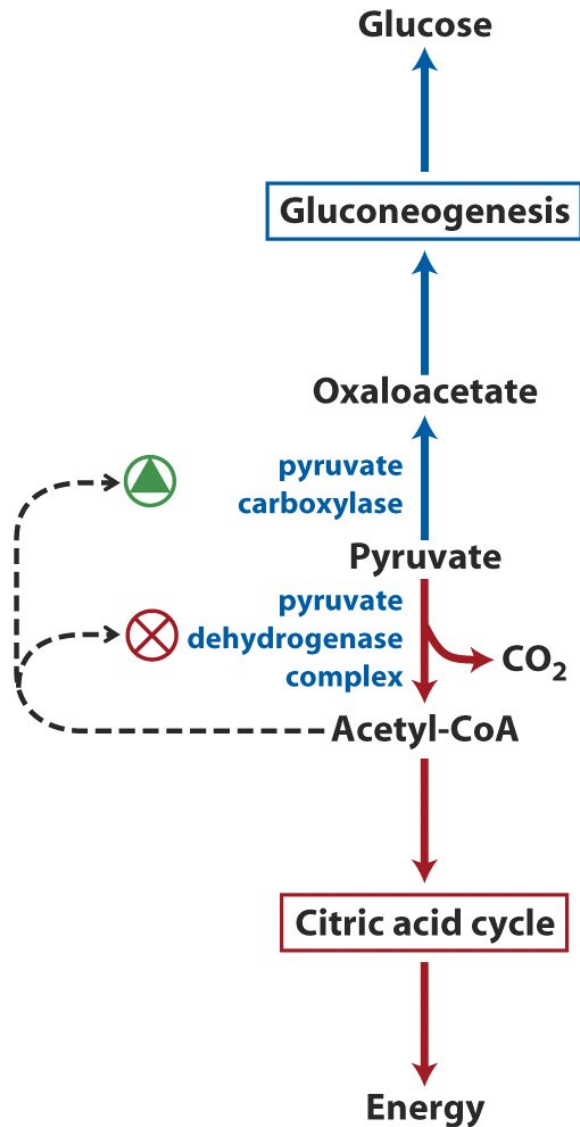


Inibizione allosterica da parte di **ATP**, **acetil Co-A**, **acidi grassi a lunga catena** (segnali di abbondante disponibilità di energia) e **alanina** (sintetizzata dal piruvato in un'unica tappa)

Attivazione da parte di **fruttosio 1,6-bifosfato**

Regolazione ormonale (**glucagone**): solo la forma isoenzimatica del fegato (**L**), e non la forma isoenzimatica del muscolo (**M**)

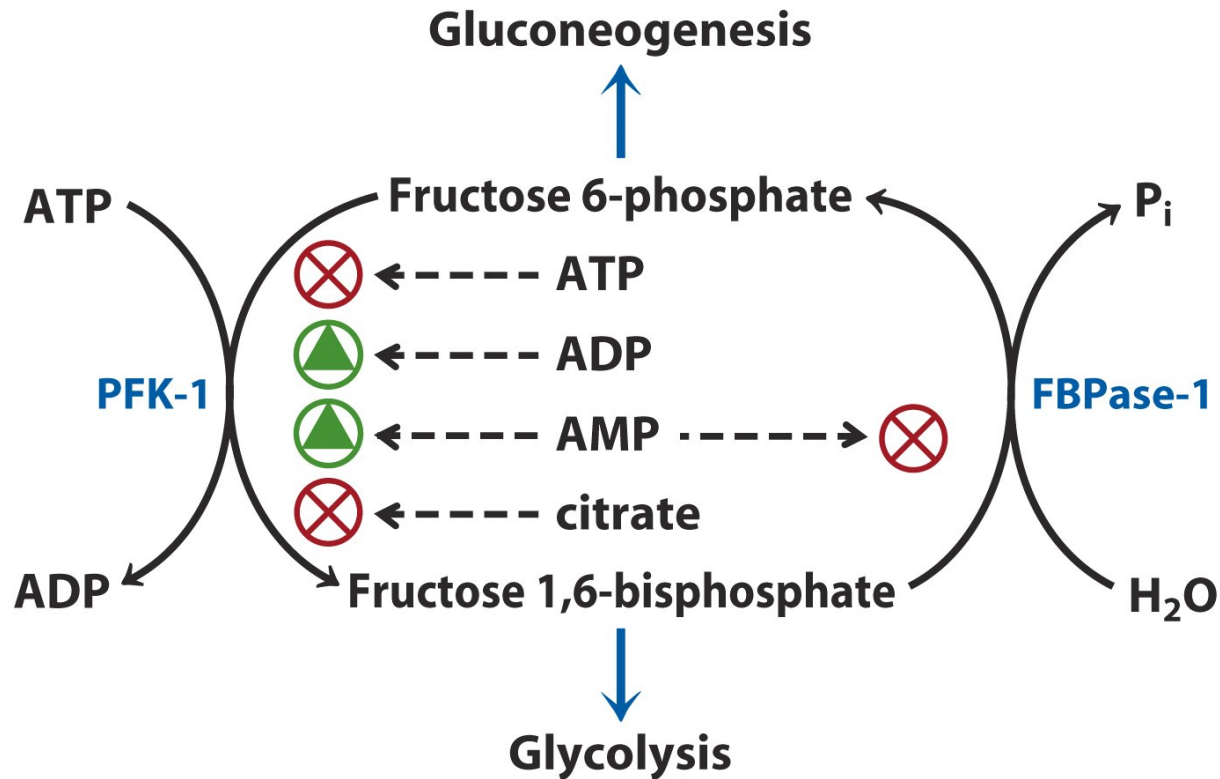
Regolazione della gluconeogenesi



Il primo punto di controllo determina il destino del piruvato nel mitocondrio

Acetil-CoA è un modulatore allosterico positivo per la piruvato carbossilasi e negativo per la piruvato deidrogenasi

Secondo punto di controllo: reazione catalizzata dalla fruttosio 1,6-bisfosfatasi (FBPasi-1)
Fortemente inibito da AMP, che stimola PFK-1



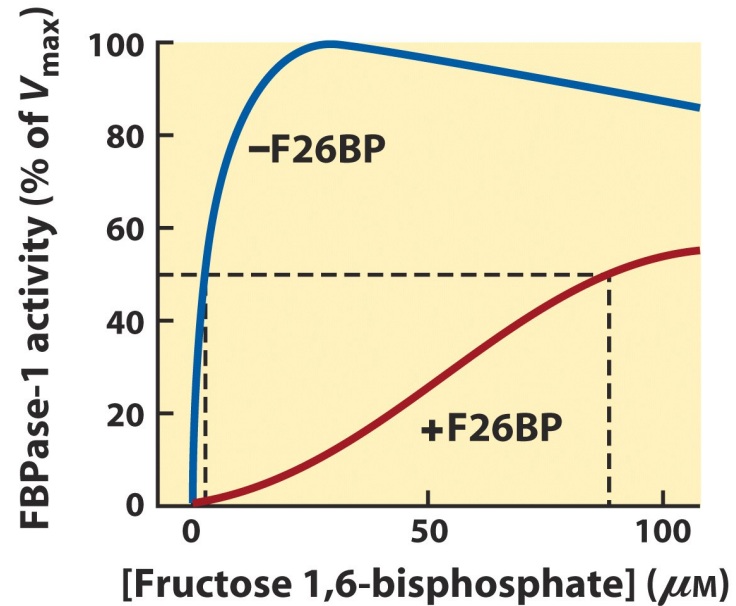
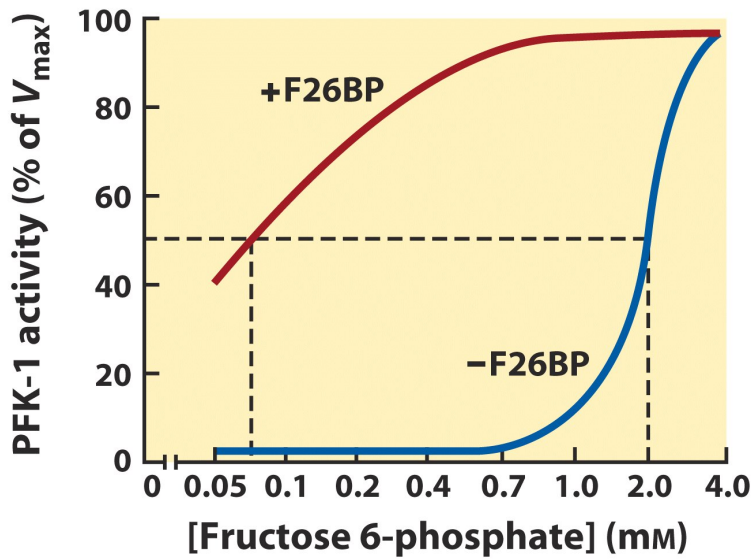
Le due tappe opposte sono regolate in maniera reciproca e coordinata

Ruolo del fruttosio 2,6-bifosfato nella regolazione coordinata di glicolisi e gluconeogenesi

La funzione speciale del fegato nel mantenere costanti i livelli ematici di glucosio richiede un meccanismo di regolazione in grado di coordinare produzione e consumo. Le variazioni della concentrazione ematica di glucosio sono segnali per la produzione di ormoni (insulina e glucagone) in grado di regolare il metabolismo del glucosio

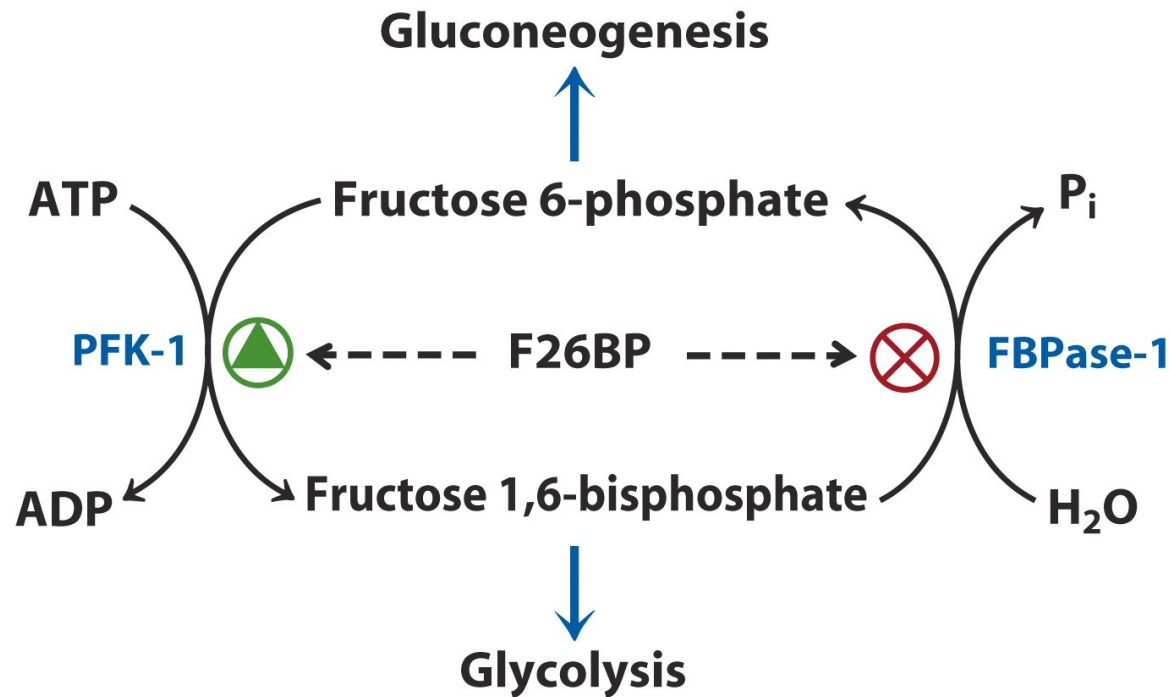
La regolazione ormonale coordinata di glicolisi e gluconeogenesi nelle cellule epatiche è mediata dal **fruttosio 2,6-bifosfato**

Il fruttosio 2,6 bifosfato (F26BP) è un modulatore allosterico della fosfofruttochinasi-1 (PFK-1) e della fruttosio 1,6-bifosfatasi-1 (FBPasi-1)



Il legame di F26BP al suo sito allosterico su PFK-1 aumenta l'affinità dell'enzima per il substrato fruttosio 6-fosfato e diminuisce l'affinità per gli inibitori allosterici ATP e citrato

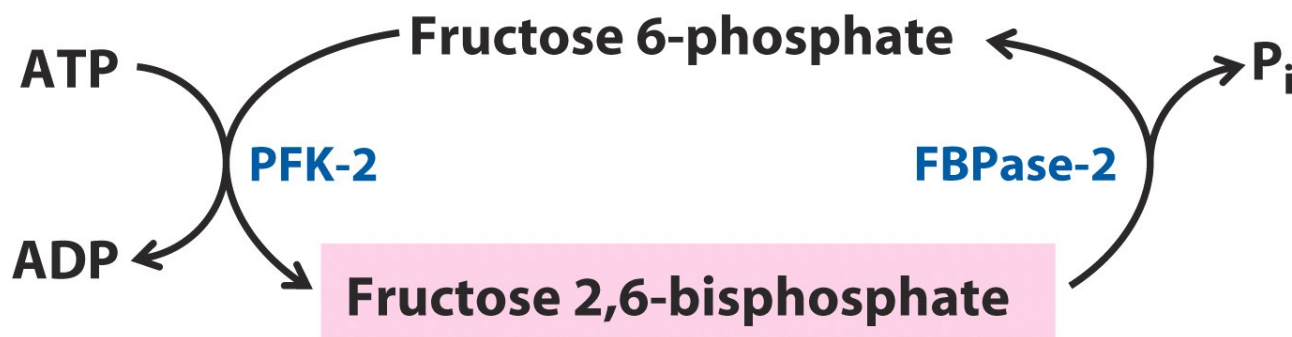
Alle concentrazioni fisiologiche del substrato e dei diversi modulatori positivi e negativi, PFK-1 è praticamente inattiva se è assente F26BP



Nel fegato, F26BP attiva PFK-1 e stimola la glicolisi e inibisce FBPasi-1 rallentando la gluconeogenesi

**F26BP non è un intermedio della glicolisi o della gluconeogenesi:
è un modulatore il cui livello intracellulare dipende dalla presenza nel
sangue di glucagone, che viene a sua volta secreto quando i livelli di
glucosio sono bassi**

**La concentrazione intracellulare di F26BP dipende dal bilancio tra velocità
di formazione e velocità di demolizione**



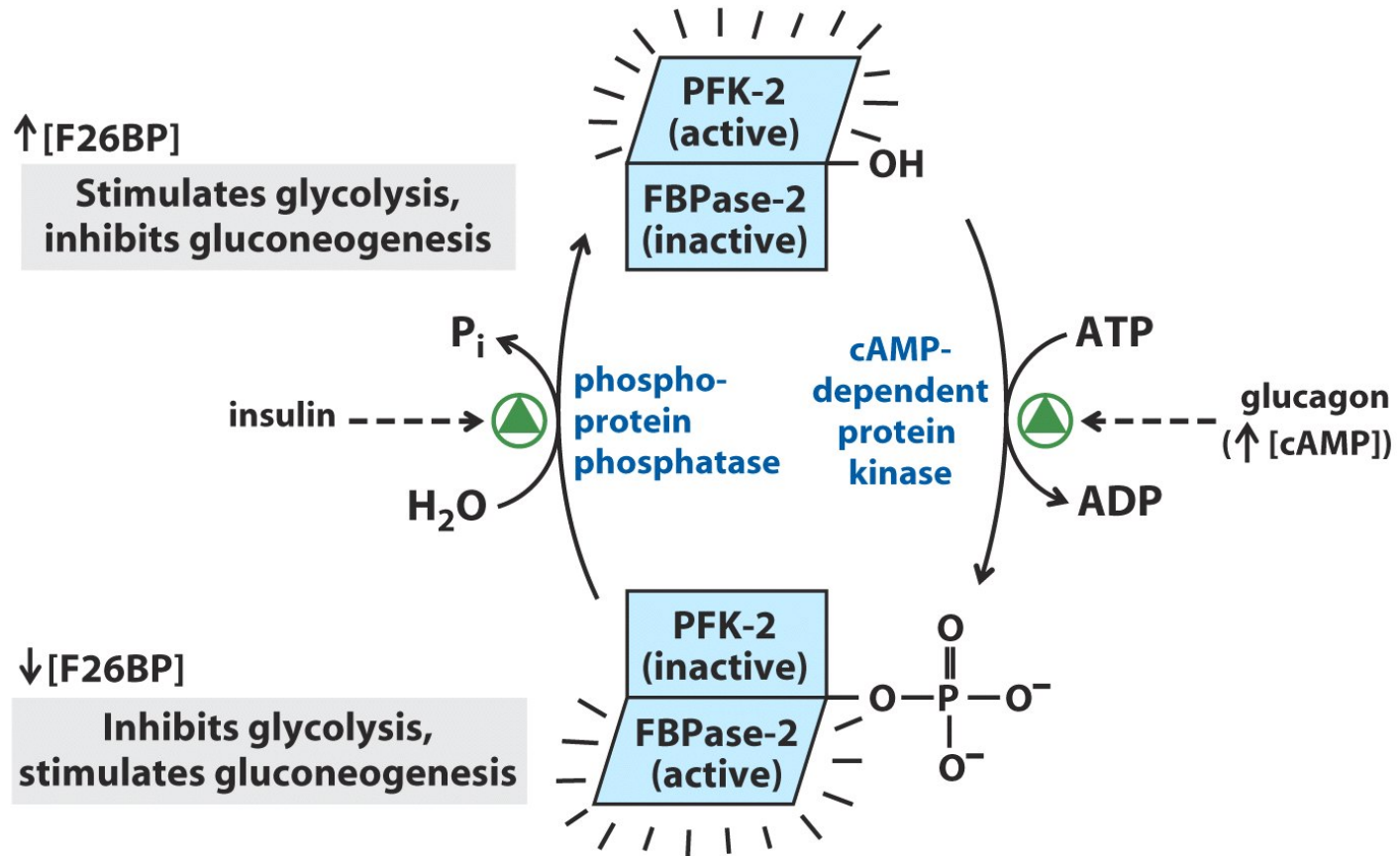
PFK-2: fosfofruttochinasi-2

FBPasi-2: fruttosio 2,6 bifosfatasi-2

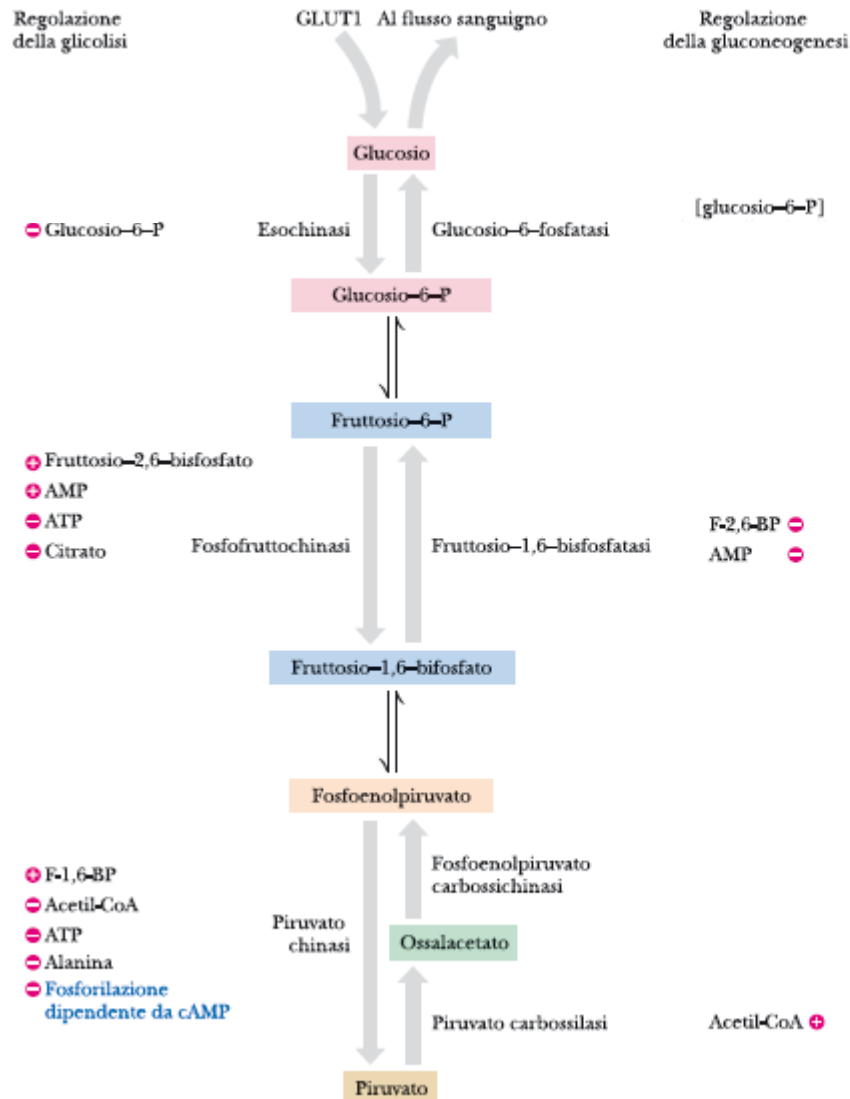
**diversi da PFK-1 e FBPasi-1 che catalizzano la formazione e
demolizione di fruttosio 1,6-bifosfato**

PFK-2 e FBPasi-2 sono due subunità distinte di una stessa proteina bifunzionale

Il bilancio tra le due attività enzimatiche nel fegato sono controllati da glucagone e insulina



Riepilogo principali meccanismi di regolazione di glicolisi e gluconeogenesi



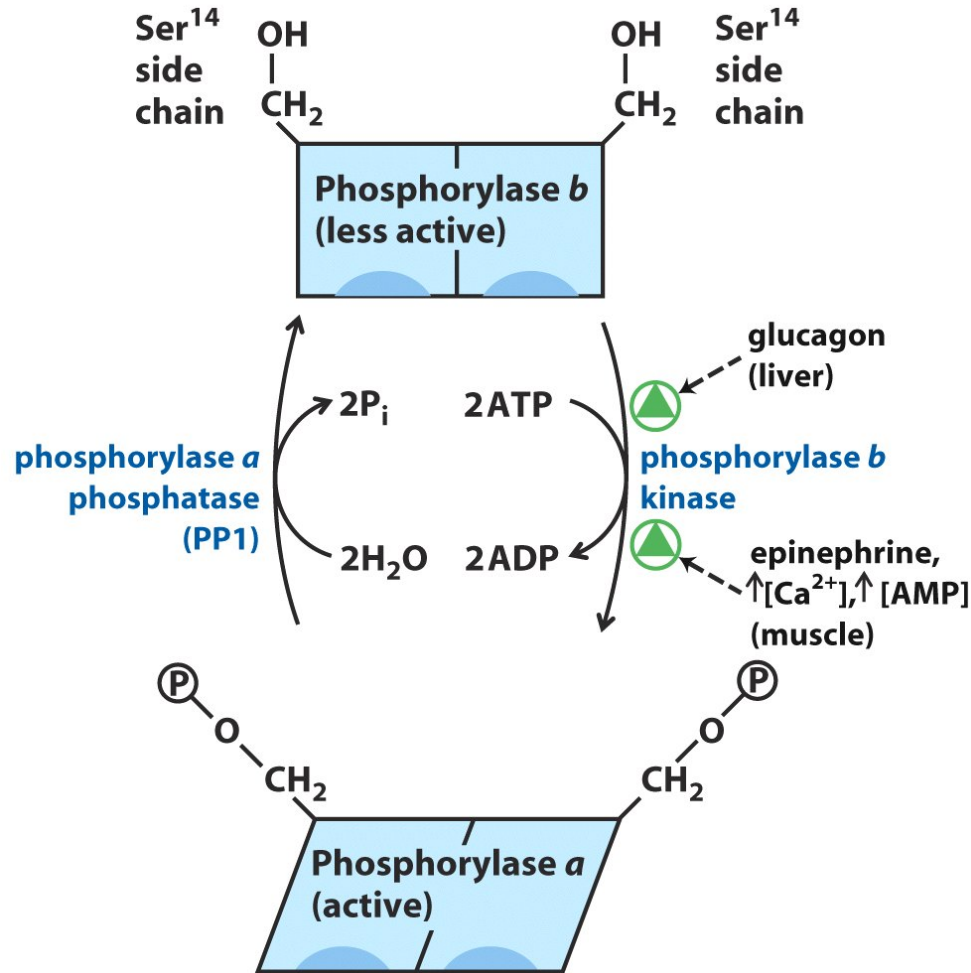
Regolazione coordinata di sintesi e degradazione del glicogeno

La regolazione della glicogeno fosforilasi è stato uno dei primi esempi di regolazione allosterica di un enzima e il primo esempio di un enzima controllato tramite fosforilazione reversibile mediata da ormoni

Uno dei primi enzimi allosterici dei quali è stata determinata la struttura delle due forme attiva e inattiva (diffrazione dei raggi X)

Esempio emblematico di come gli isozimi abbiano spesso ruoli che si adattano alle funzioni del tessuto

Regolazione della glicogeno fosforilasi mediante modificazione covalente

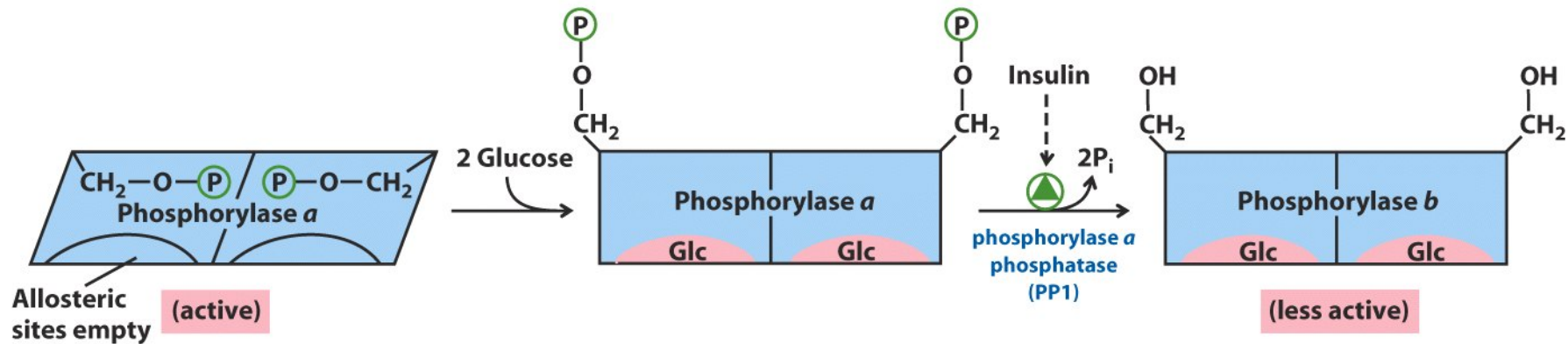


Nel fegato la glicogeno fosforilasi è regolata allostericamente dal glucosio

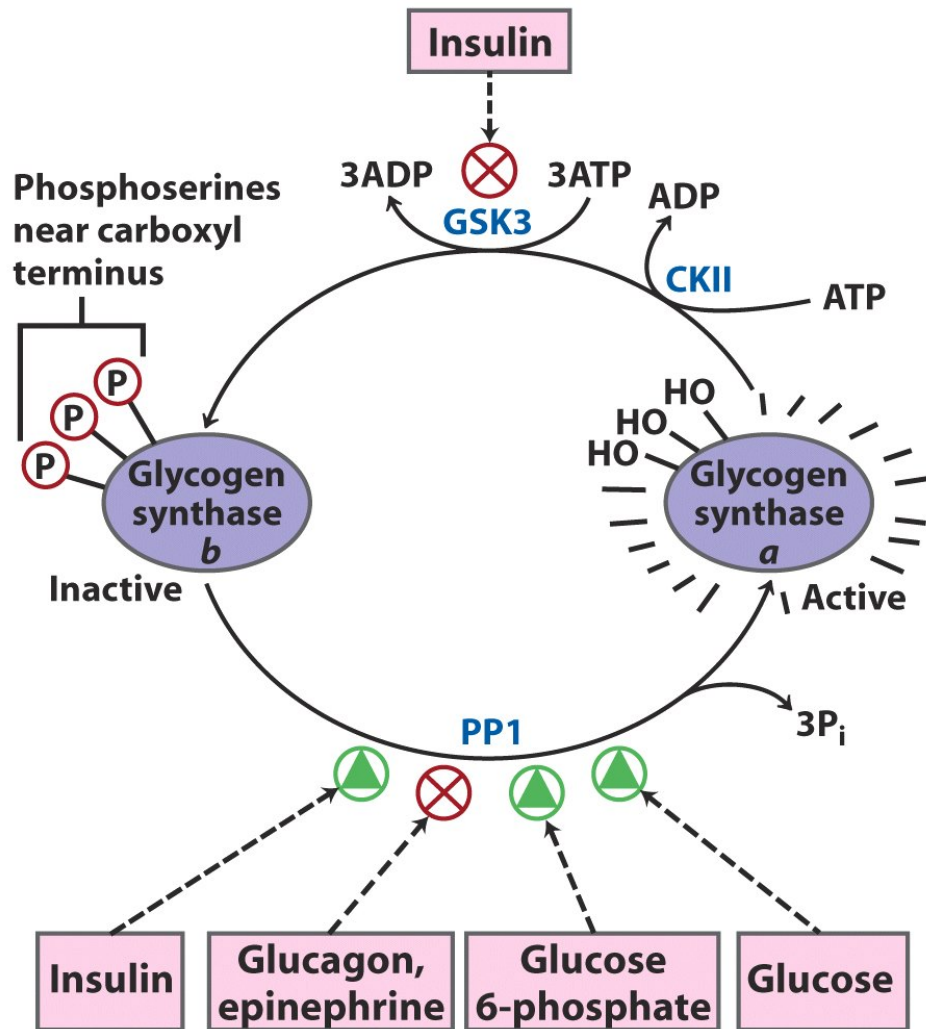
Il legame del glucosio ad un sito allosterico della forma a induce una modificazione conformazionale che espone i residui Ser fosforilati all'azione di PP1

Rallentamento della glicogenolisi in risposta ad alte concentrazioni ematiche di glucosio

L'insulina prodotta in condizioni di alta glicemia produce lo stesso effetto tramite stimolazione di PP1



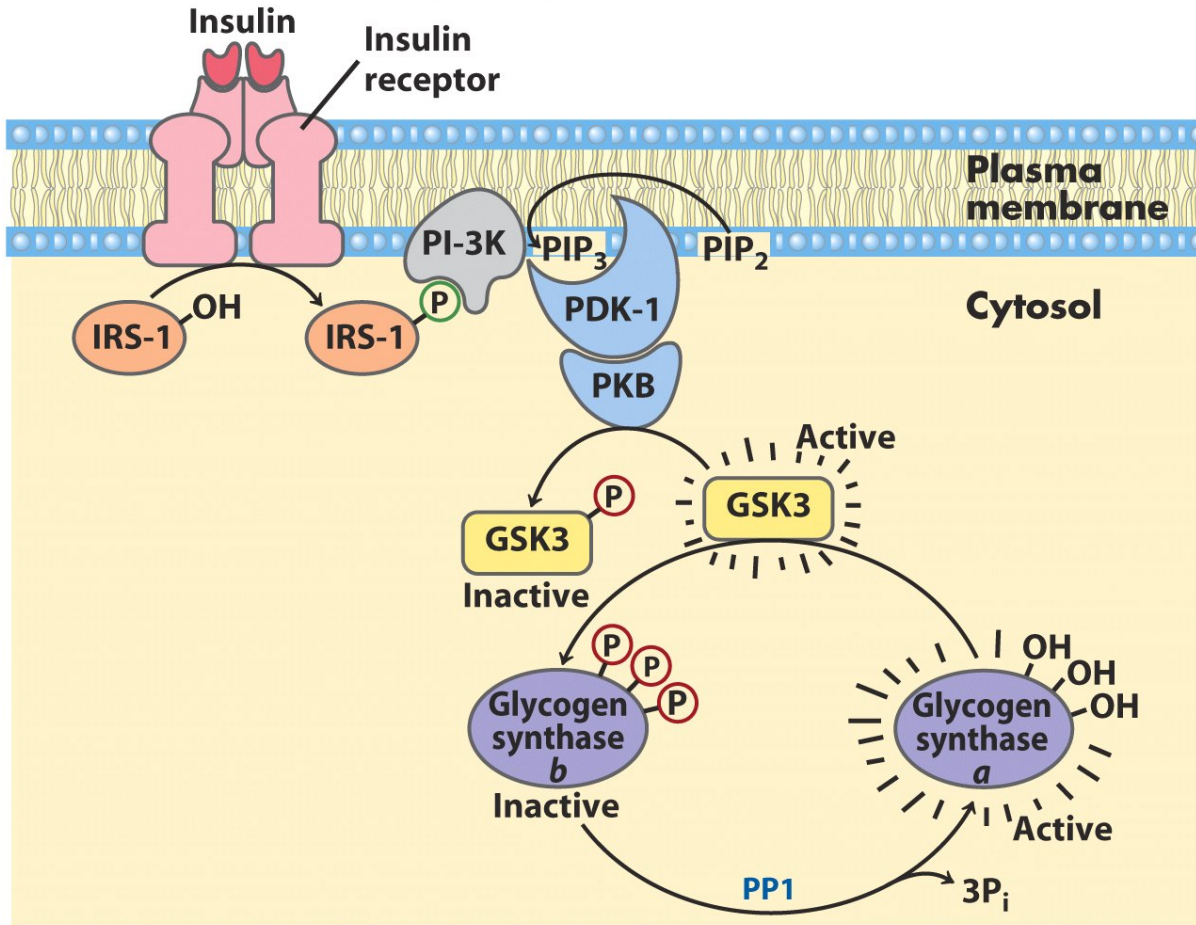
Regolazione della glicogeno sintasi



**GSK3: Glicogeno Sintasi
Chinasi 3**

**PP1: fosfoproteina
fosfatasi 1**

Attivazione di glicogeno sintasi da parte di insulina



1. Legame di Insulina - attivazione del recettore
2. Fosforilazione di IRS-1
3. Attivazione di PI-3K (legame di Tyr-P di IRS-1 al dominio SH2 di PI-3K)
4. Fosforilazione di PIP₂ a PIP₃
5. Legame di PIP₃ a PKB - attivazione di PKB (fosforilazione da parte di PDK-1)
6. Inattivazione di GSK3 (fosforilazione da parte di PKB) - **aumento della sintesi di glicogeno**

IRS-1: Insulin Receptor Substrate-1

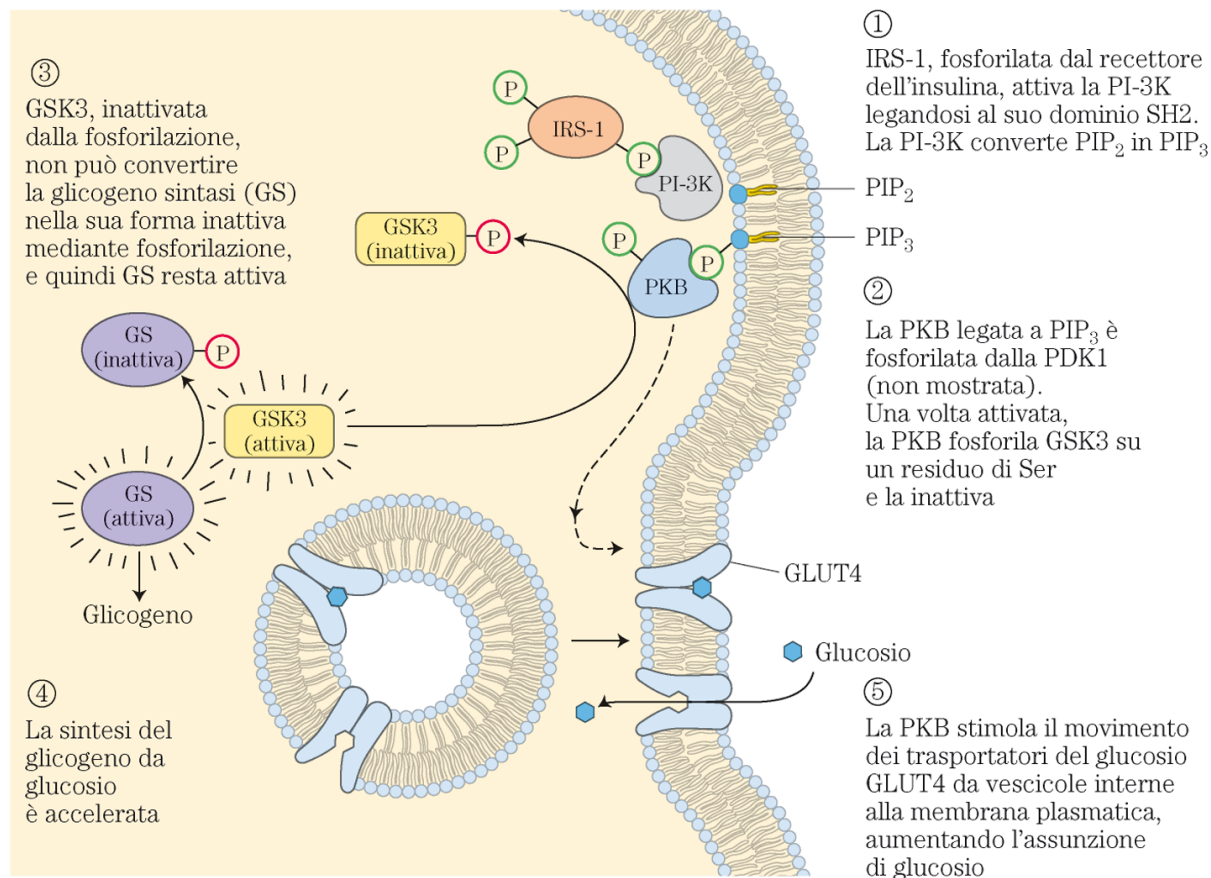
PI-3K: fosfatidilinositolo 3-chinasi

PIP₂: fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato

PIP₃: fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato

GSK3: glicogeno sintasi chinasi 3

PKB attivata stimola anche il movimento dei trasportatori del glucosio (GLUT4) da vescicole interne alla membrana plasmatica con un conseguente **aumento dell'assunzione di glucosio**

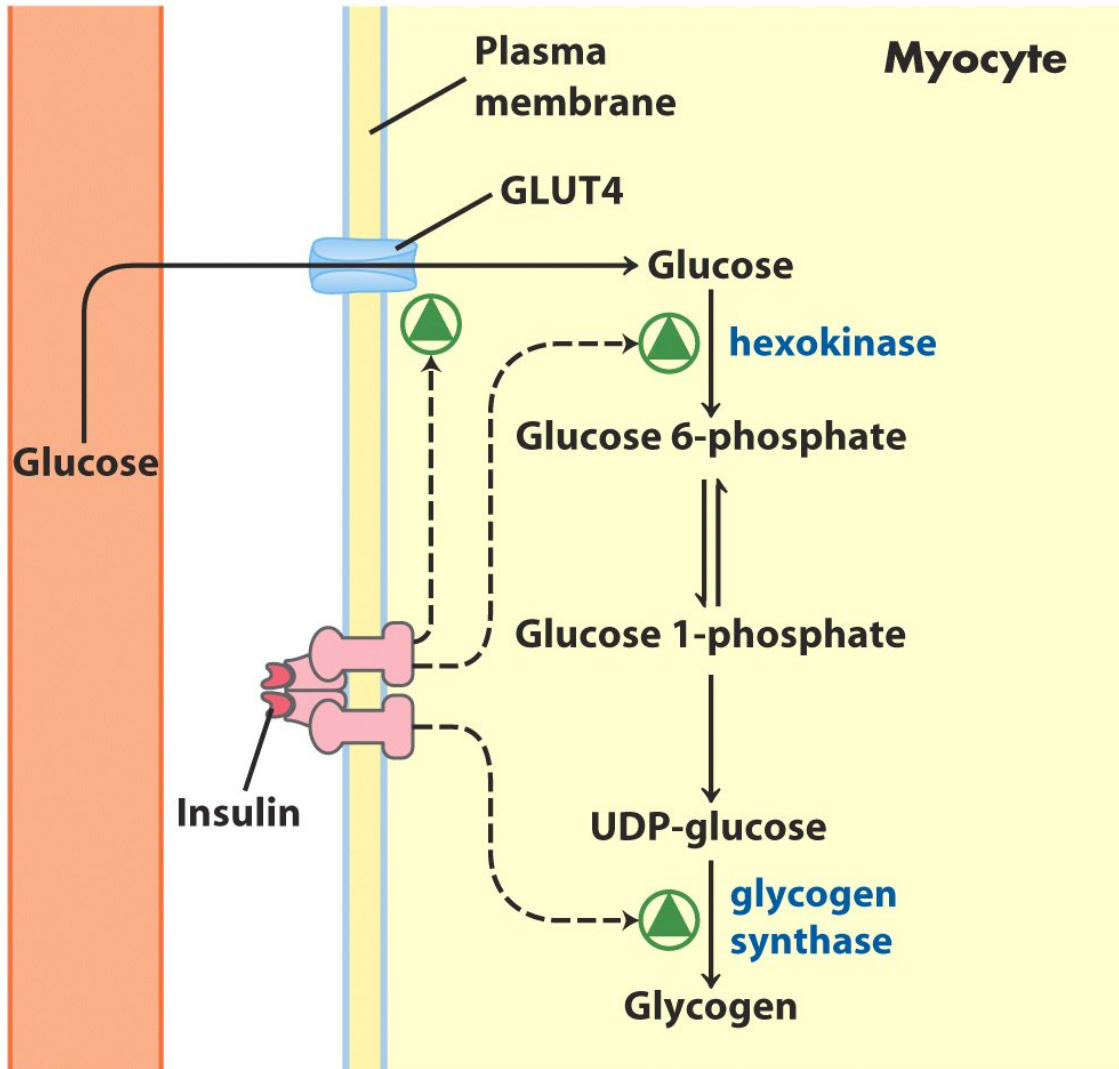


Conseguenze dell'aumento della captazione del glucosio sulla sintesi di glicogeno:

- fornisce il substrato per la sintesi di glicogeno
- fornisce il substrato per la sintesi di glucosio-6-P, attivatore allosterico di glicogeno sintasi e di PP1

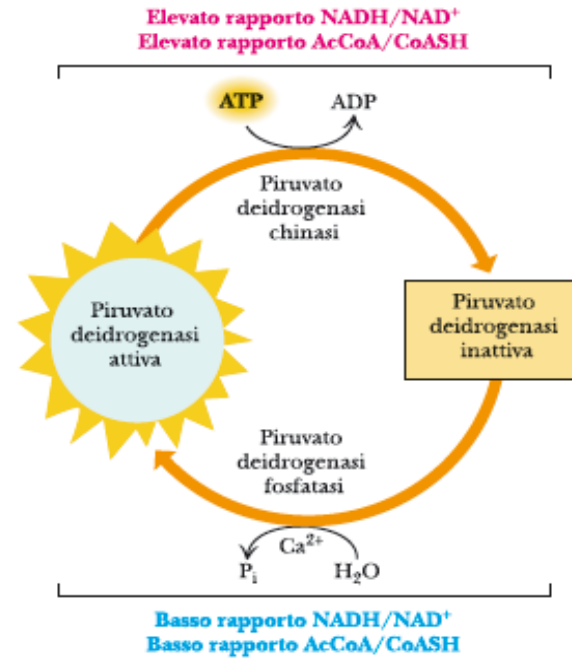
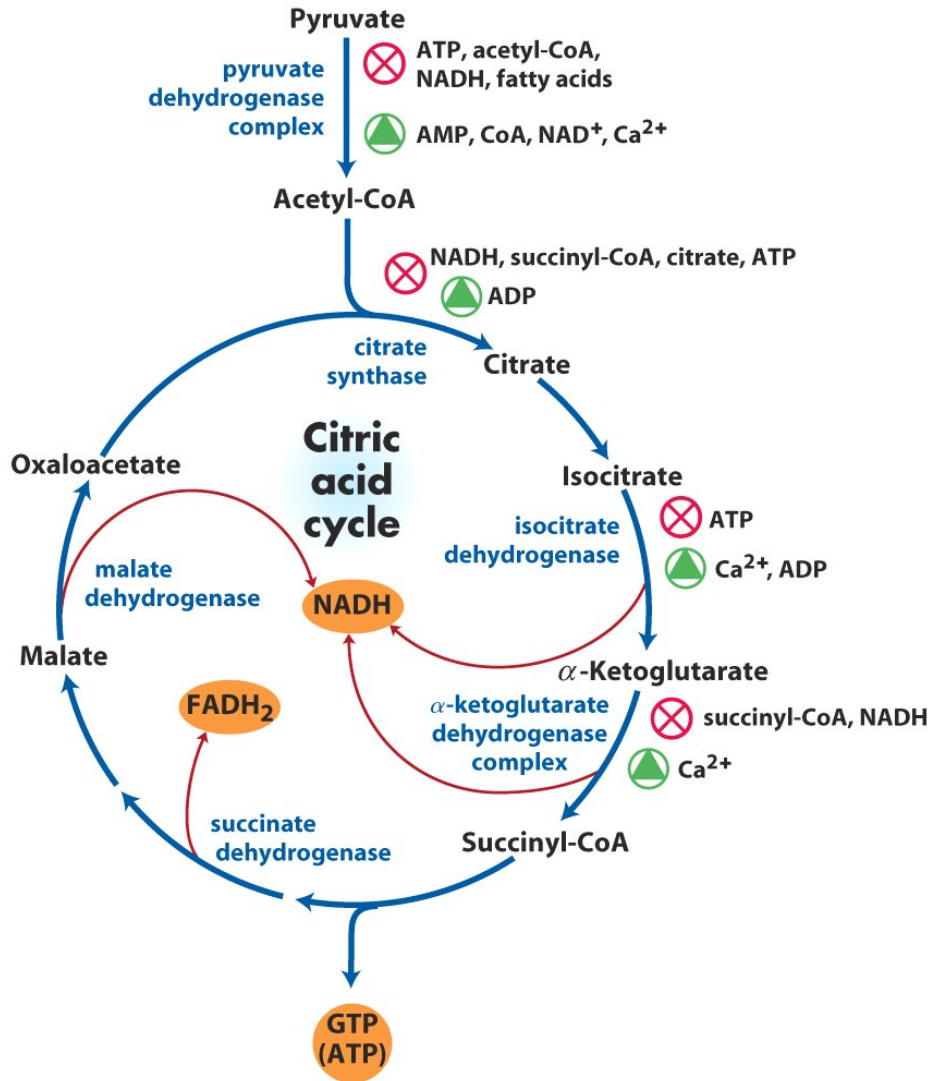
Controllo della sintesi di glicogeno da parte del glucosio ematico mediato da insulina nei miociti

Capillary

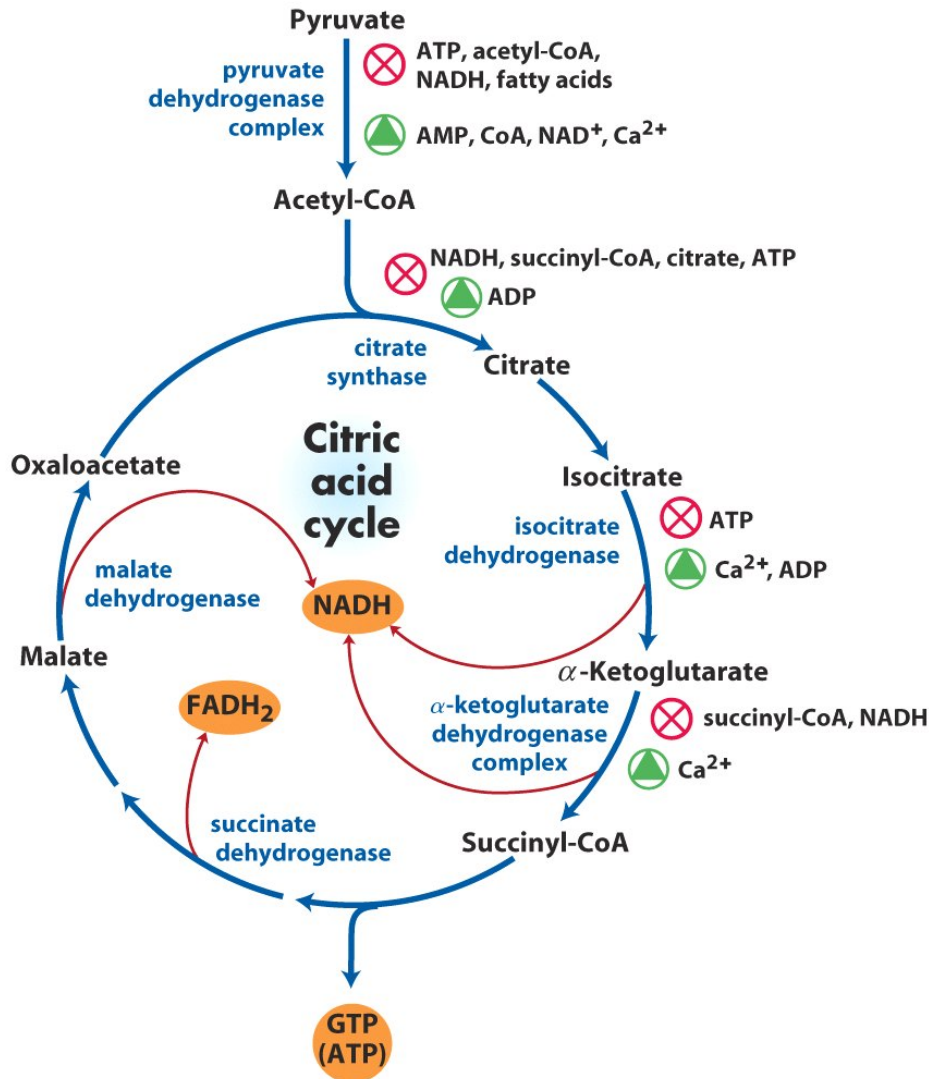


L'insulina regola tre delle cinque tappe
Il flusso in direzione del glicogeno dipende dagli effetti sul trasporto del glucosio e sull'attività dell'esochinasi e in misura minore sull'attività della glicogeno sintasi

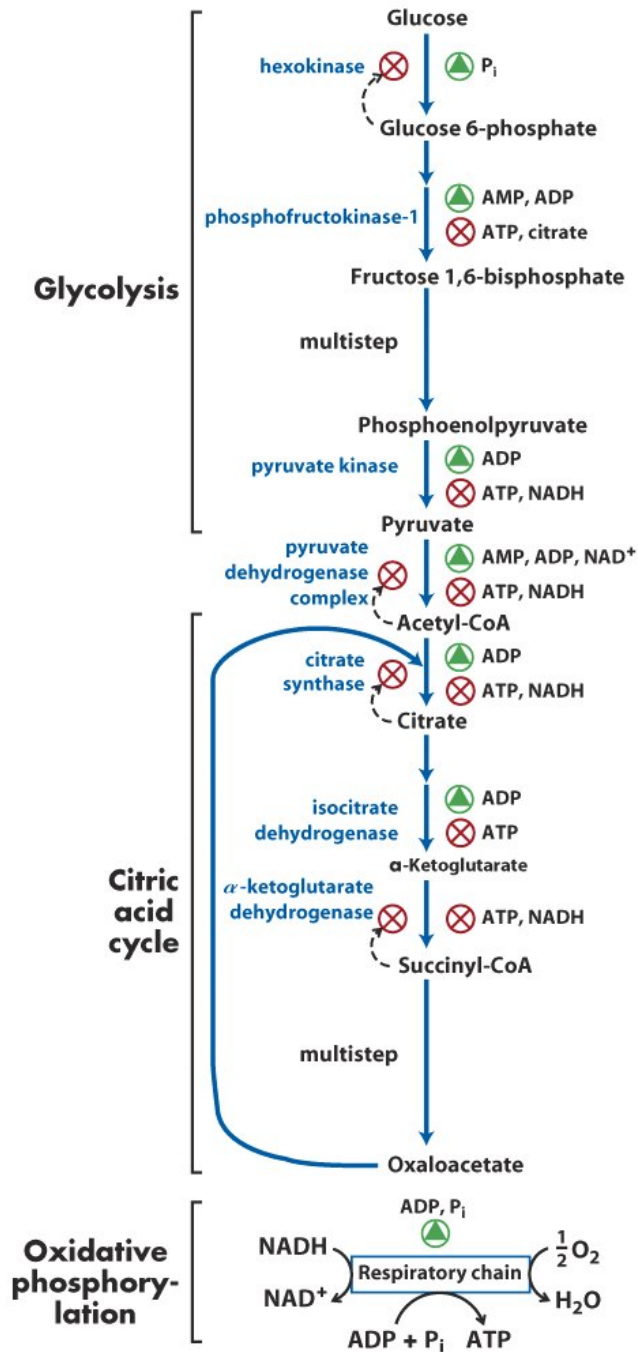
Regolazione del ciclo dell'acido citrico



Regolazione del ciclo dell'acido citrico



Le tre reazioni con valori molto negativi di ΔG sono i siti di regolazione del ciclo



Le vie che producono ATP sono regolate in modo coordinato

Alcune considerazioni generali:

- Nel fegato, il principale regolatore allosterico di PFK-1 è fruttosio 2,6-bifosfato che media la regolazione ormonale di PFK-1
- L'isoforma L (epatica), ma non l'isoforma M (muscolare), della piruvato chinasi è regolato anche da ormoni
- L'isoforma epatica della glicogeno fosforilasi è un sensore del glucosio
- L'isoforma epatica della PP1 è un sensore del glucosio-6-fosfato

Differente regolazione a livello di fegato e muscolo scheletrico correlata con la diversa funzione dei due organi

Inoltre:

Il metabolismo dei carboidrati è coordinato dall'azione combinata di segnali allosterici e ormonali

Principio generale: i due sistemi di regolazione hanno tempi diversi

-tutti i tipi di regolazione enzimatica da parte di metaboliti sono innescati da modificazioni che avvengono all'interno della cellula e sono mediati da meccanismi allosterici molto rapidi (millisecondi) e immediatamente reversibili

- i processi di regolazione da parte di ormoni vengono innescati dall'esterno della cellula; i segnali ormonali determinano modificazioni covalenti (fosforilazione o defosforilazione) di proteine bersaglio all'interno della cellula. Queste modificazioni avvengono in tempi più lunghi (secondi o minuti)