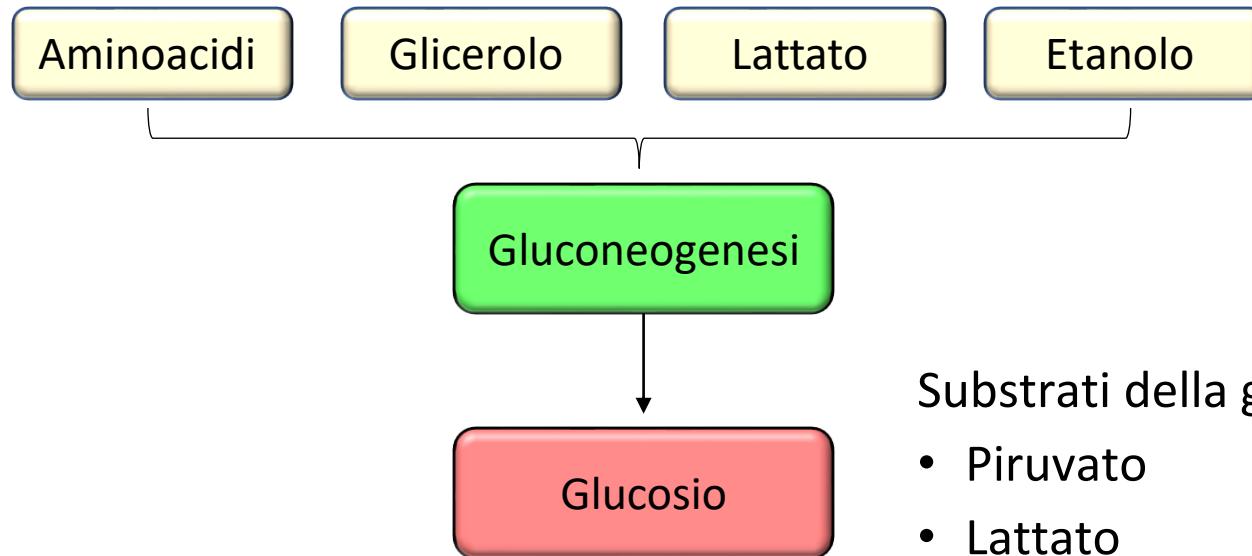




# Gluconeogenesi: sintesi di glucosio da precursori non glucidici



Substrati della gluconeogenesi:

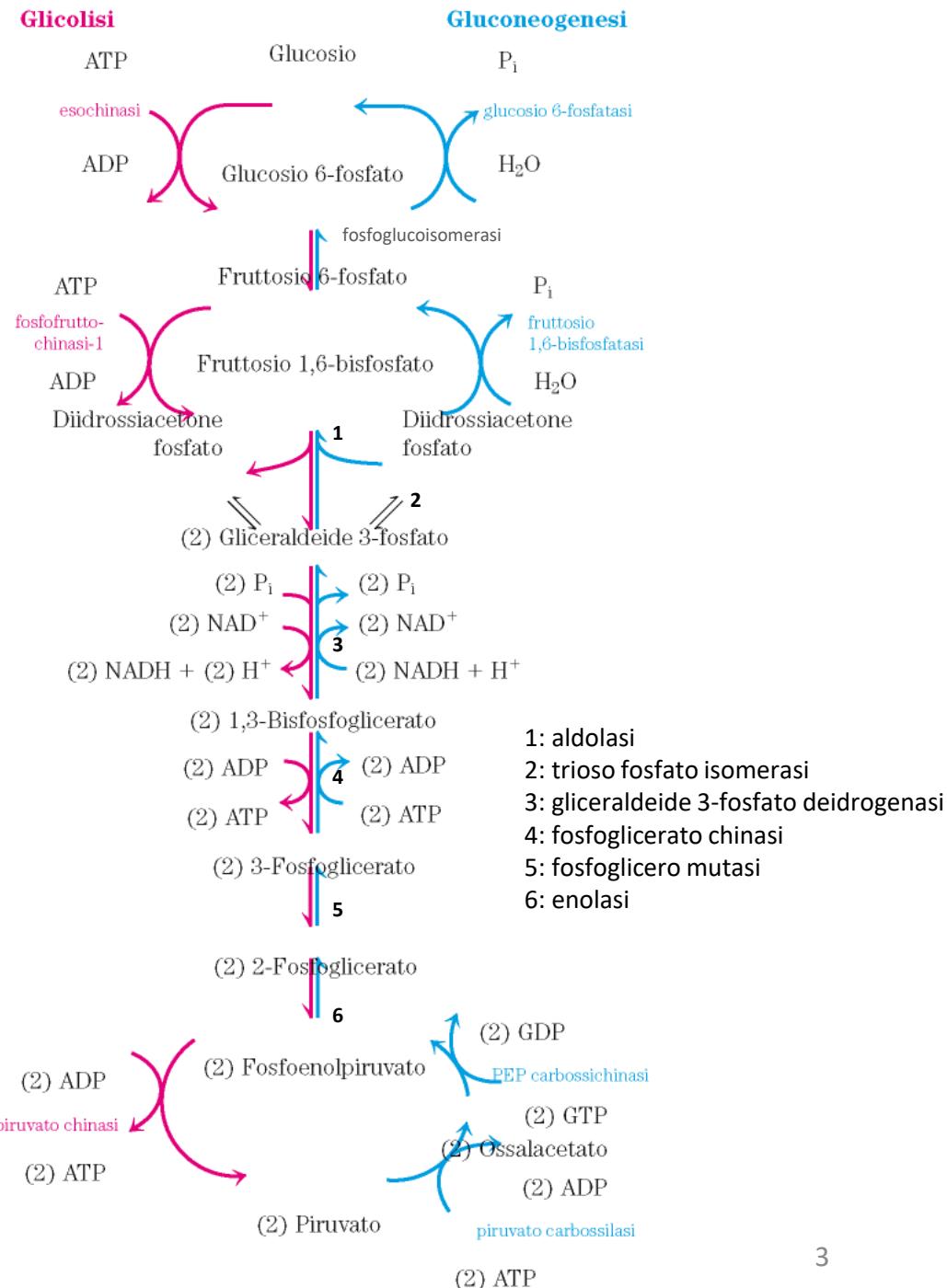
- Piruvato
- Lattato
- Etanolo
- Amminoacidi
- Glicerolo
- Intermedi del ciclo dell'acido citrico e del ciclo del gliossilato

## Confronto tra glicolisi e gluconeogenesi

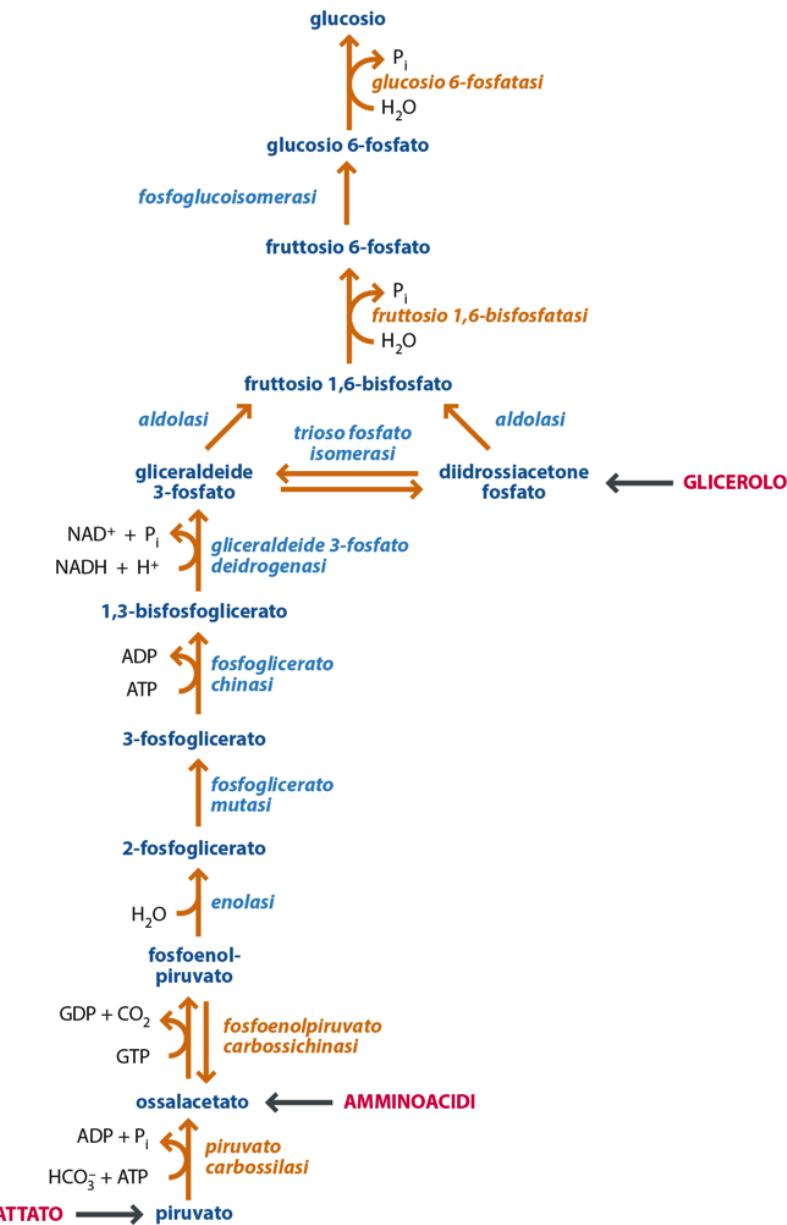
La gluconeogenesi non è l'inverso della glicolisi anche se condividono diverse tappe:

- il glucosio è sintetizzato e non catabolizzato
  - l'ATP è consumato e non prodotto
  - il NADH è ossidato e non ridotto a NADH.

Sette delle dieci reazioni enzimatiche della gluconeogenesi sono reazioni della glicolisi che avvengono nella direzione opposta



# Punti di ingresso dei substrati principali nella gluconeogenesi

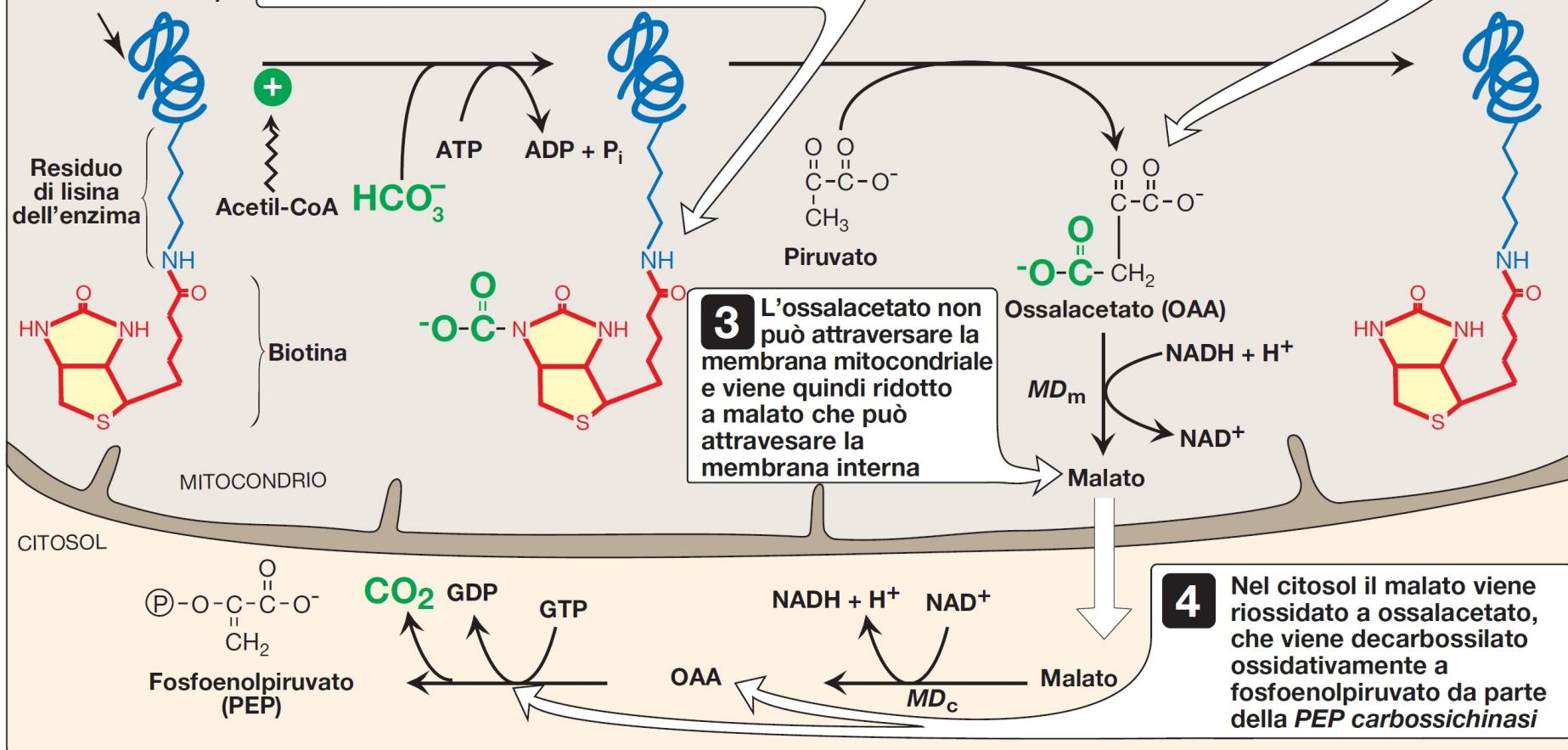


# Sintesi del fosfoenolpiruvato dal piruvato: la PEP carbossichinasi è un enzima citoplasmatico.

Piruvato carbossilasi  
(con una biotina legata covalentemente)

1 Il  $\text{CO}_2$  proveniente dall' $\text{HCO}_3^-$  viene attivato e trasferito dalla *piruvato carbossilasi* al suo gruppo prostetico biotina

2 L'enzima trasferisce poi il  $\text{CO}_2$  al piruvato, producendo l'ossalacetato



Sintesi del PEP nel citosol [nota: questo processo richiede il trasferimento di equivalenti riducenti sotto forma di NADH dal mitocondrio al citosol].  $MD_m$  = malato deidrogenasi mitocondriale;  $MD_c$  = malato deidrogenasi citosolica; GTP e GDP = guanosina tri- e difosfato; ADP = adenosina difosfato.

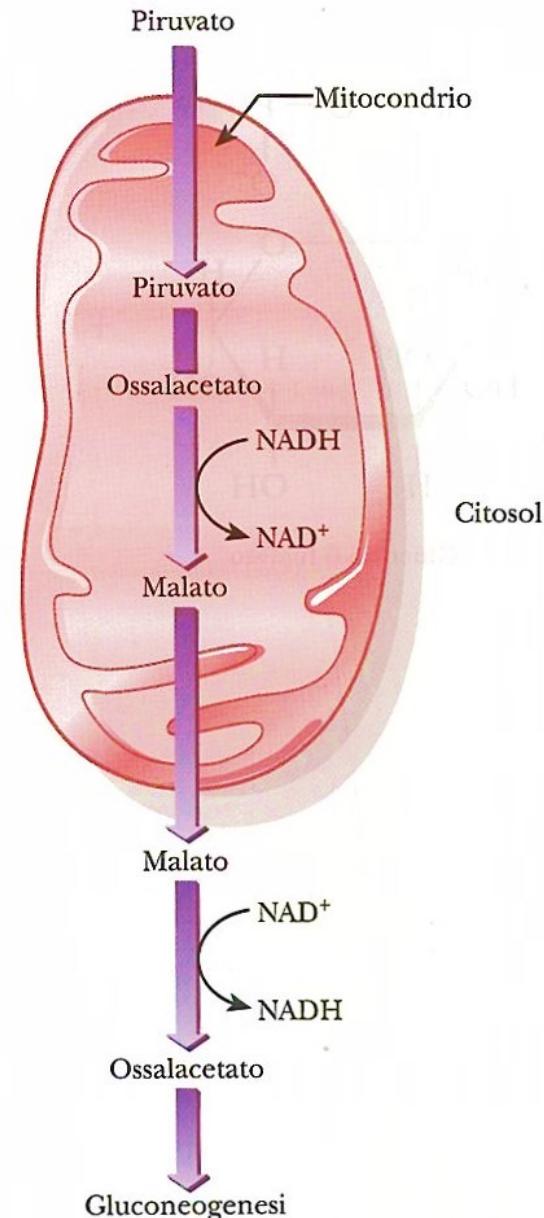
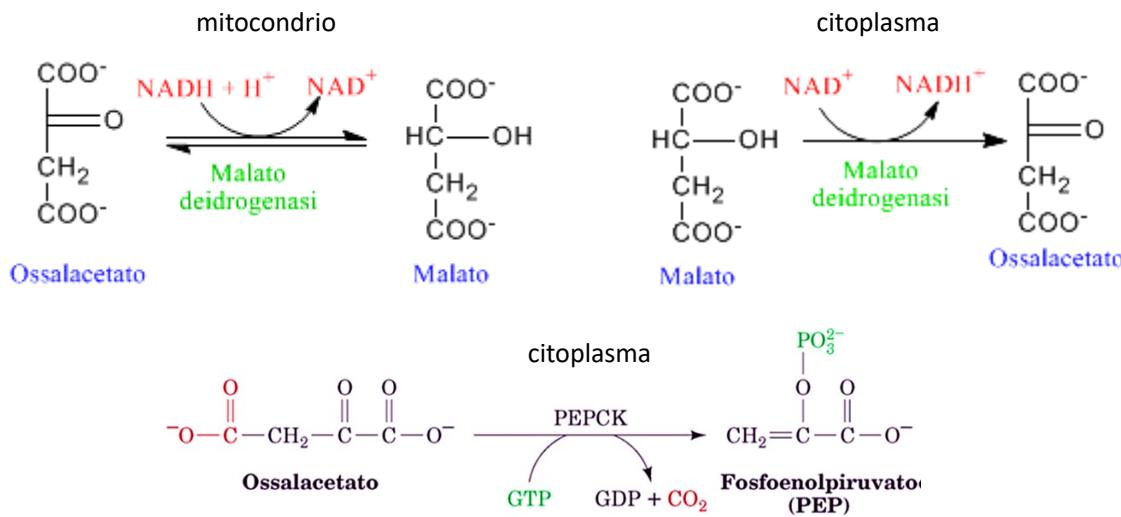
# Le reazioni irreversibili della glicolisi vengono aggirate nelle gluconeogenesi

la membrana mitocondriale non ha trasportatori per l'ossalacetato.

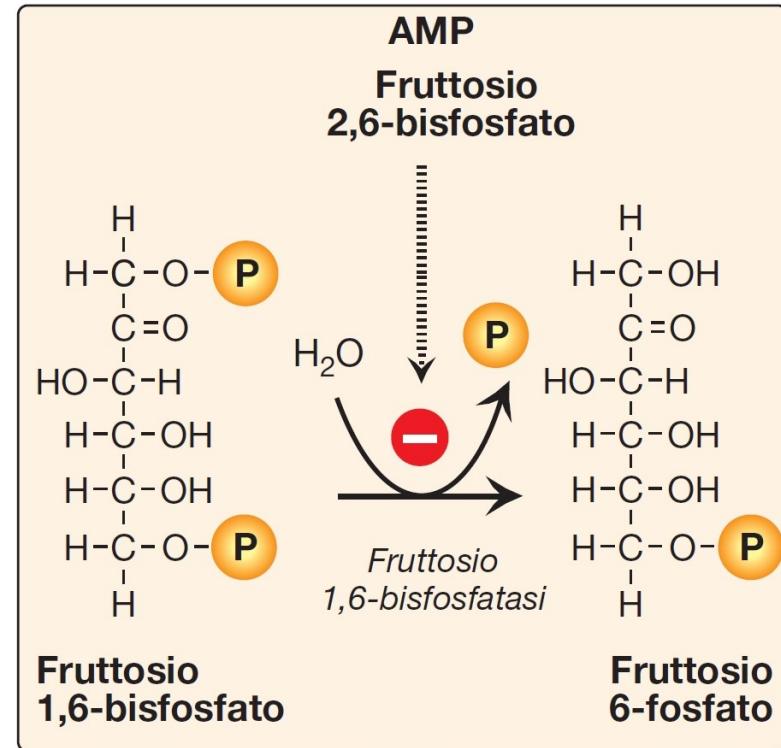
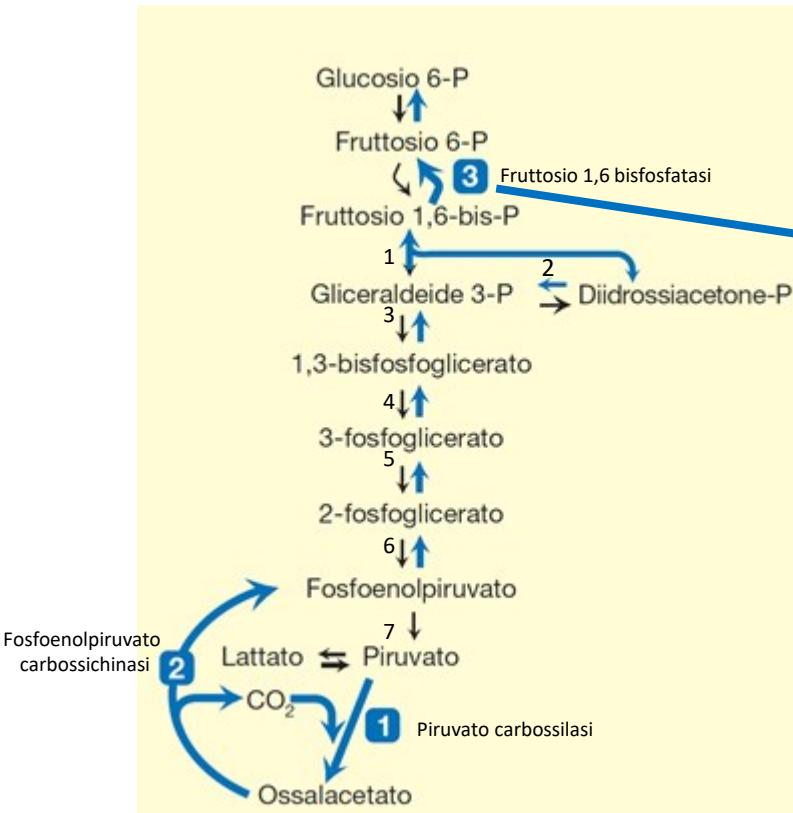
l'ossalacetato formato dal piruvato deve essere ridotto a malato dalla malato deidrogenasi mitocondriale a spese del NADH.

Il malato esce la mitocondrio mediante un trasportatore specifico localizzato sulla membrana mitocondriale interna e nel citosol viene riossidato ad ossalacetato con produzione di NADH citosolico dalla malato deidrogenasi citoplasmatica.

La PEP carbosicchinasi può trasformare l'ossalacetato in fosfoenolpiruvato.



# Conversione del fruttosio 1,6 bisfosfato in fruttosio 6-fosfato:



Defosforilazione del fruttosio 1,6-bisfosfato. AMP = adenosina monofosfato; P = fosfato.

L'enzima fruttosio 1,6 bisfosfatasi aggira la reazione irreversibile catalizzata dalla fosfofruttochinasi 1 nella glicolisi. Questa reazione è un importante sito di regolazione della gluconeogenesi.

- 1: aldolasi
- 2: trioso fosfato isomerasi
- 3: gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi
- 4: fosfoglicerato chinasi
- 5: fosfoglicerato mutasi
- 6: enolasi
- 7: piruvato chinasi

In condizioni di carenza di zuccheri o utilizzo di substrati non fermentabili, il lattato può essere riciclato in glucosio attraverso la gluconeogenesi.

Il percorso segue un ciclo simile al ciclo di Cori negli animali:

Lattato è trasformato in piruvato dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), rigenerando NADH.

Il piruvato è trasformato in ossalacetato dall'enzima piruvato carbossilasi, richiede  $\text{CO}_2$  e ATP.

Ossalacetato è trasformato in fosfoenolpiruvato (PEP) dall'enzima PEP carboschinasina (PEPCK), entra nella gluconeogenesi per formare Glucosio.

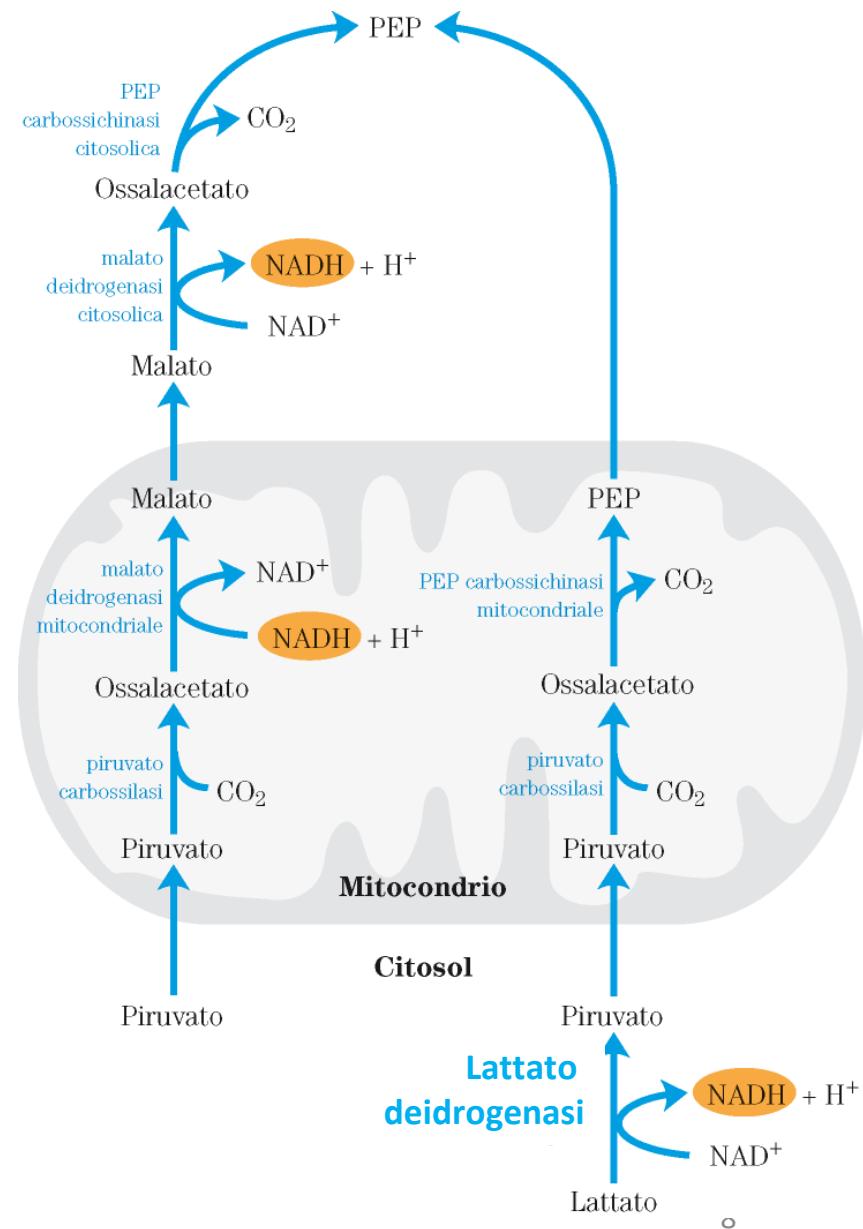
### Ruolo metabolico del lattato nella gluconeogenesi

**Rigenerazione di glucosio:** permette al lievito di mantenere livelli di zuccheri per la biosintesi e la sopravvivenza.

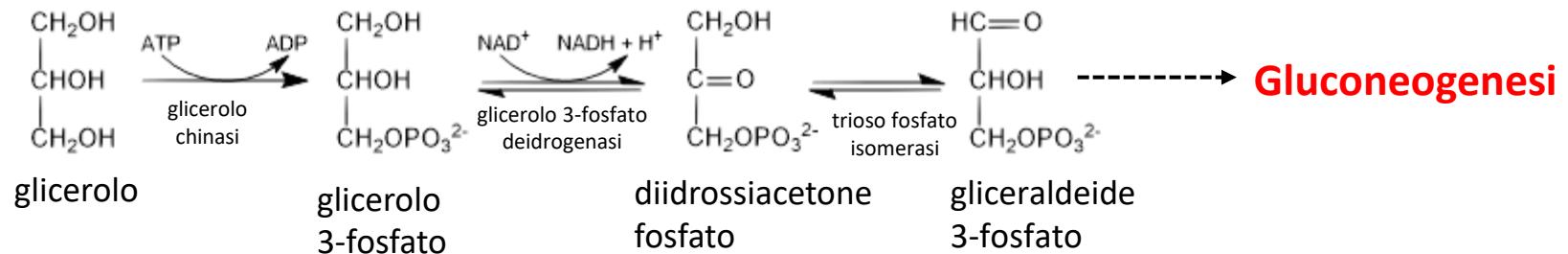
**Bilancio redox:** lattato diventa piruvato con produzione di NADH, utile per altre vie biosintetiche.

**Adattamento metabolico:** consente l'uso di substrati a tre atomi di carbonio (lattato) quando zuccheri fermentabili scarseggiano.

## Il lattato nella gluconeogenesi



# Il glicerolo nella gluconeogenesi



**Glicerolo** deriva dalla degradazione dei lipidi (trigliceridi) o dalla glicolisi come glicerolo-3-fosfato.

Entra come **dihidrossiacetone fosfato (DHAP)** → glyceraldeide-3-fosfato → gluconeogenesi

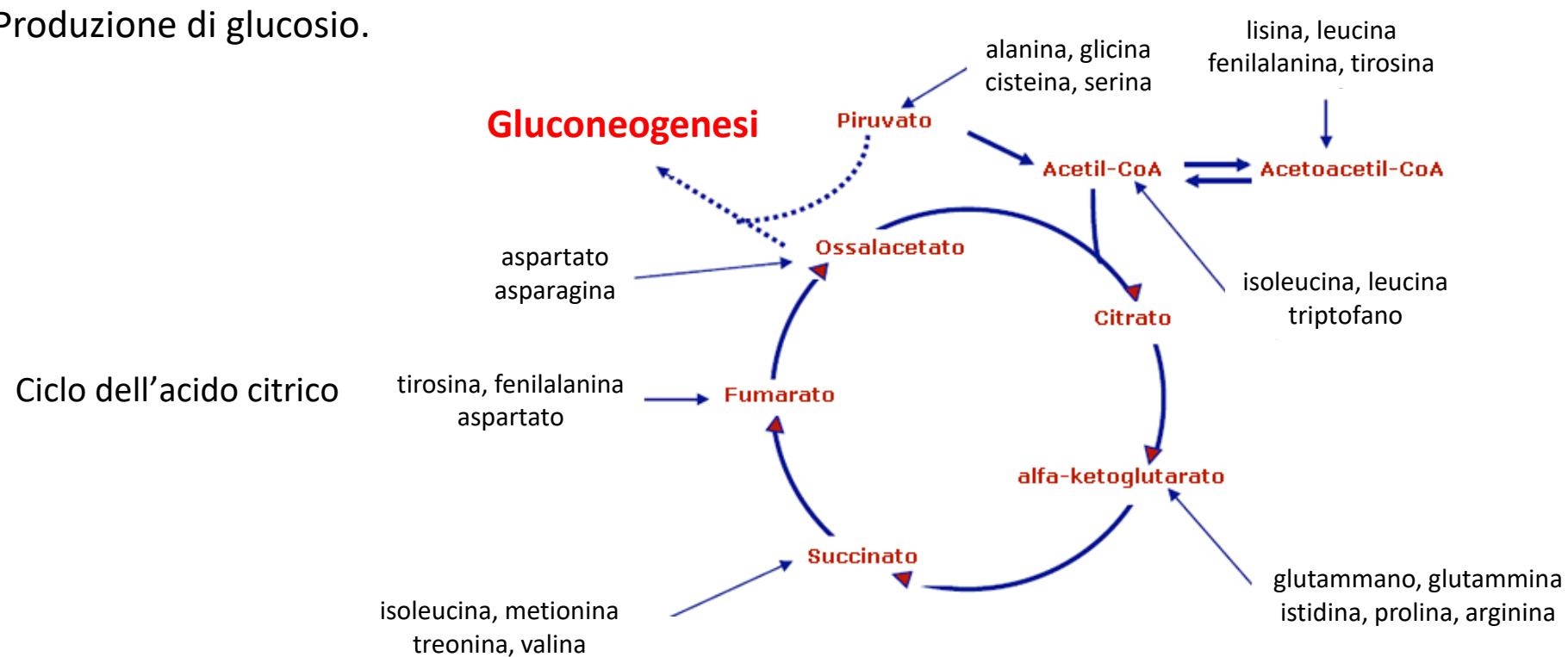
Aminoacidi gluconeogenici nel lievito: alanina, glutammato aspartato, valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina.

L'aminoacido perde il gruppo amminico e diventa un  $\alpha$ -chetoacido.

Ingressa nel ciclo di Krebs come  $\alpha$ -chetoacidi (es.  $\alpha$ -chetoglutarato, ossalacetato, succinato, fumarato).

Produzione di PEP a partire dall'ossalacetato.

Produzione di glucosio.



# L'etanolo nella gluconeogenesi

Il lievito può utilizzare l'etanolo come unica fonte di carbonio in assenza di zuccheri fermentabili.

L'etanolo è una molecola a due atomi di carbonio e non può entrare direttamente nella gluconeogenesi.

Conversione dell'etanolo in intermedi gluconeogenici:

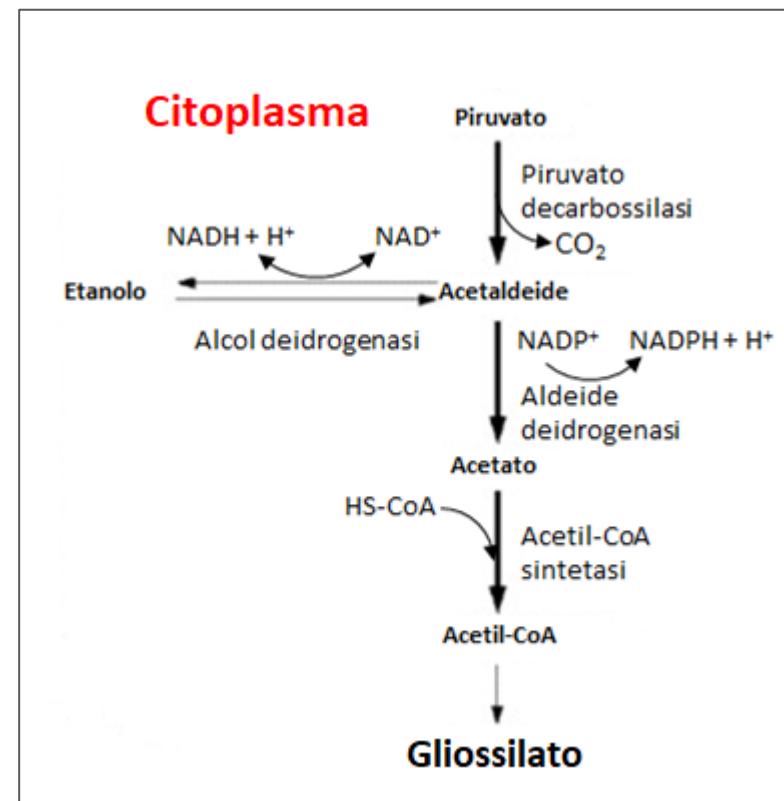
Etanolo  $\rightarrow$  Acetaldeide

Acetaldeide  $\rightarrow$  Acetil-CoA

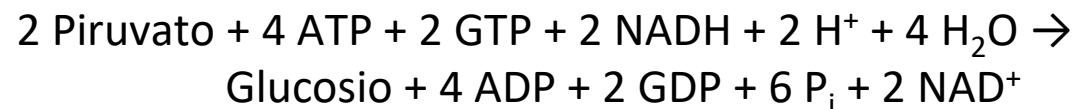
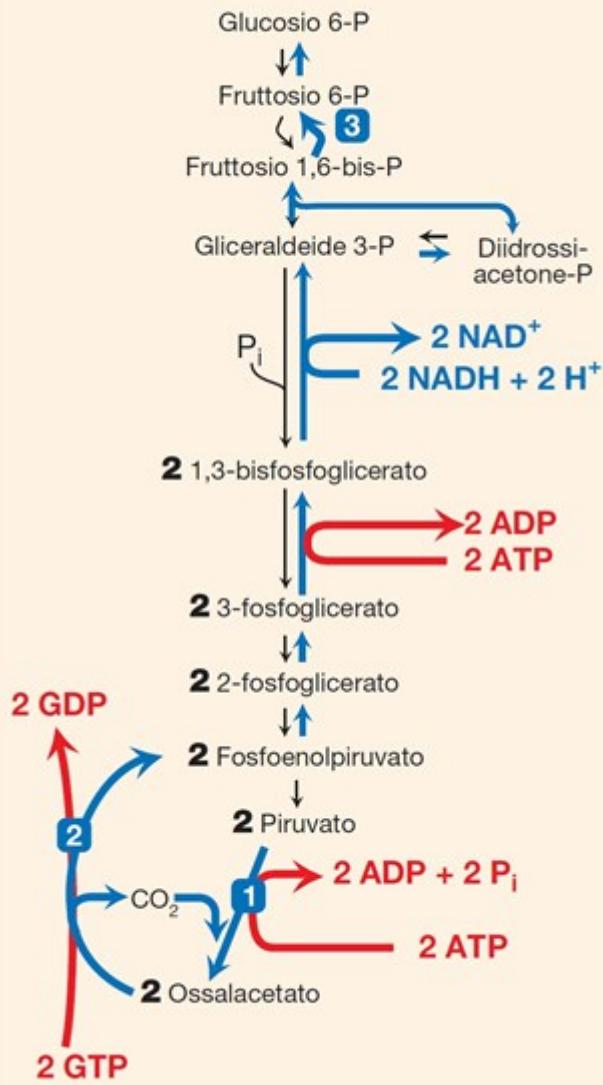
Acetil-CoA  $\rightarrow$  Succinato

Il lievito non può convertire direttamente Acetil-CoA in piruvato/glucosio.

Serve il ciclo del gliossilato, per trasformare l'acetil-CoA in succinato  $\rightarrow$  ossalacetato  $\rightarrow$  PEP  $\rightarrow$  glucosio



## La gluconeogenesi è energeticamente dispendiosa, ma essenziale



- Per ogni molecola di glucosio 6-P formata dal piruvato vengono consumati sei legami fosforici ad alta energia, 4 dell'ATP e due del GTP.
- Sono necessarie anche 2 molecole di NADH per la riduzione di 2 molecole di 1,3 bisfosfoglicerato

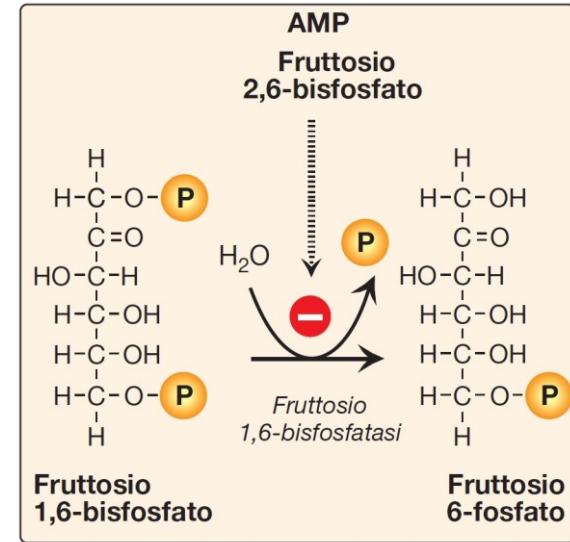
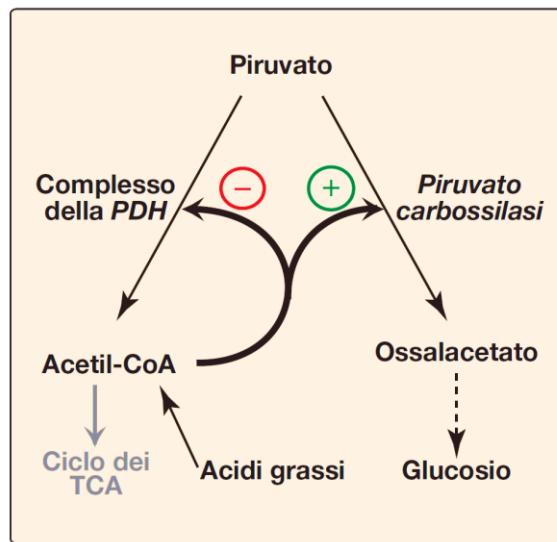
# La glicolisi e la gluconeogenesi sono reciprocamente regolate

---

La regolazione dipende dallo stato energetico della cellula.

- Quando lo **stato energetico è basso** il glucosio è rapidamente degradato per produrre energia necessaria.
- Quando lo **stato energetico è alto** il piruvato e altri metaboliti sono utilizzati per la sintesi del glucosio.
- Nella glicolisi tre enzimi sono regolati e sono quelli che catalizzano le reazioni fortemente esoergoniche: l'esochinasi, la fosfofruttochinasi 1 e la piruvato chinasi.
- Nella gluconeogenesi le tre reazioni sono la glucosio 6 fosfatasi (cellule animali), la fruttosio 1,6 bisfosfatasi e la coppia piruvato carbossilasi – PEP carbossichinasi.

Regolazione: in presenza di glucosio segue il flusso verso glicolisi. Solo le fonti non zuccherine (etanolo, glicerolo, lattato) attivano la gluconeogenesi.



## Coordinamento PDH/PC

Alta energia e glucosio disponibile: la PDH è inattiva, la PC è attiva (serve a ricaricare gli intermedi del TCA per le biosintesi).

Bassa energia o solo con substrati non zuccherini: la PDH è attiva, la PC è attiva, si forma piruvato che verrà convertito in ossalacetato e segue il flusso della gluconeogenesi e ciclo del gliossilato.

Il segnale chiave è il rapporto NADH/NAD<sup>+</sup> e la concentrazione di acetil-CoA.

Controllo allosterico dell'enzima Fruttosio 1,6 bisfosfatasi (FBPasi)  
 ATP alto la glicolisi rallentata, la gluconeogenesi è favorita.  
 AMP alto la glicolisi è stimolata, la gluconeogenesi è inibita.  
 Fruttosio-2,6-bisfosfato (F2,6BP):  
 Stimola la PFK-1 della glicolisi e inibisce la FBPasi della gluconeogenesi

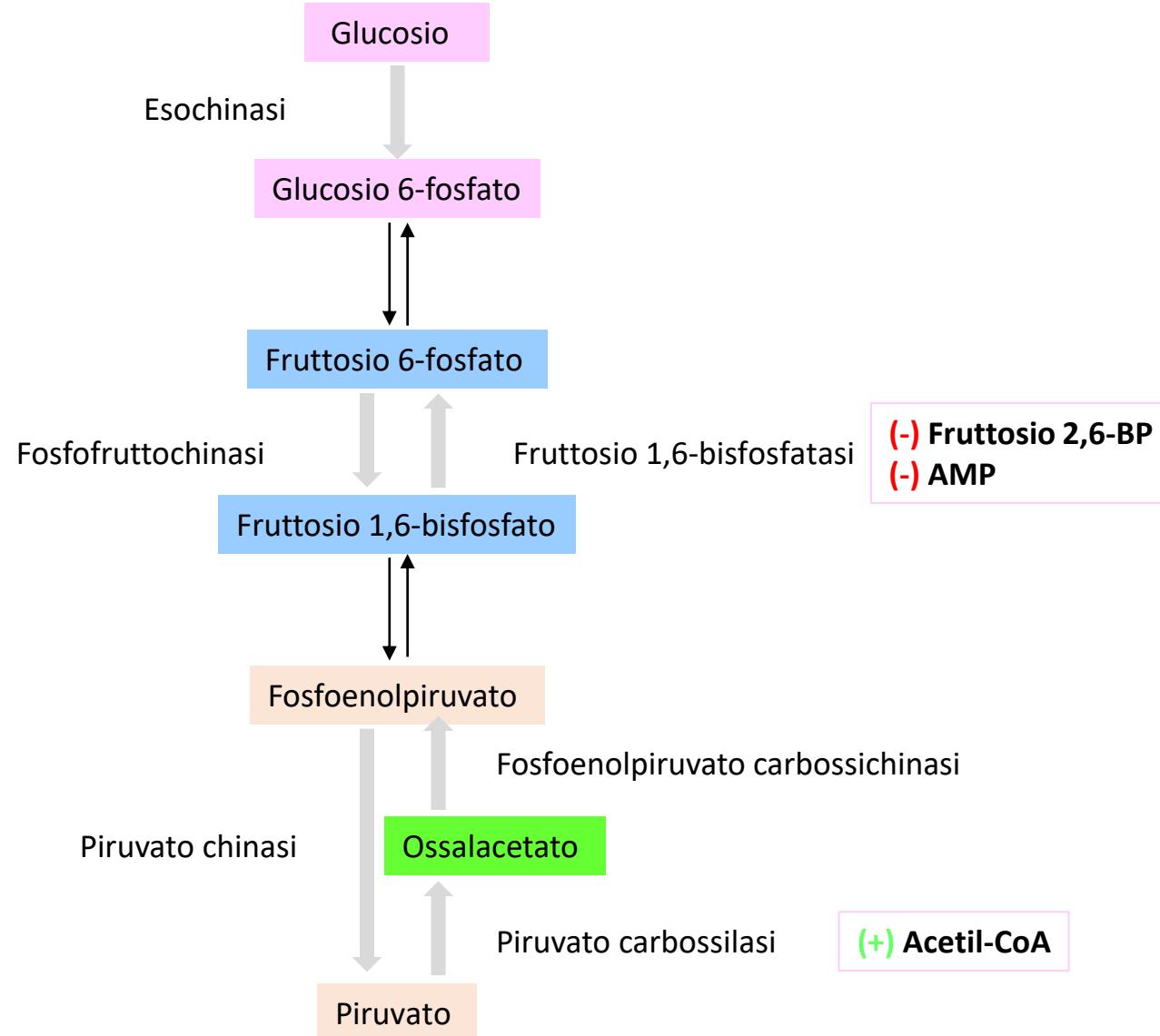
## Regolazione della glicolisi

## Regolazione della gluconeogenesi

(-) Glucosio 6-fosfato

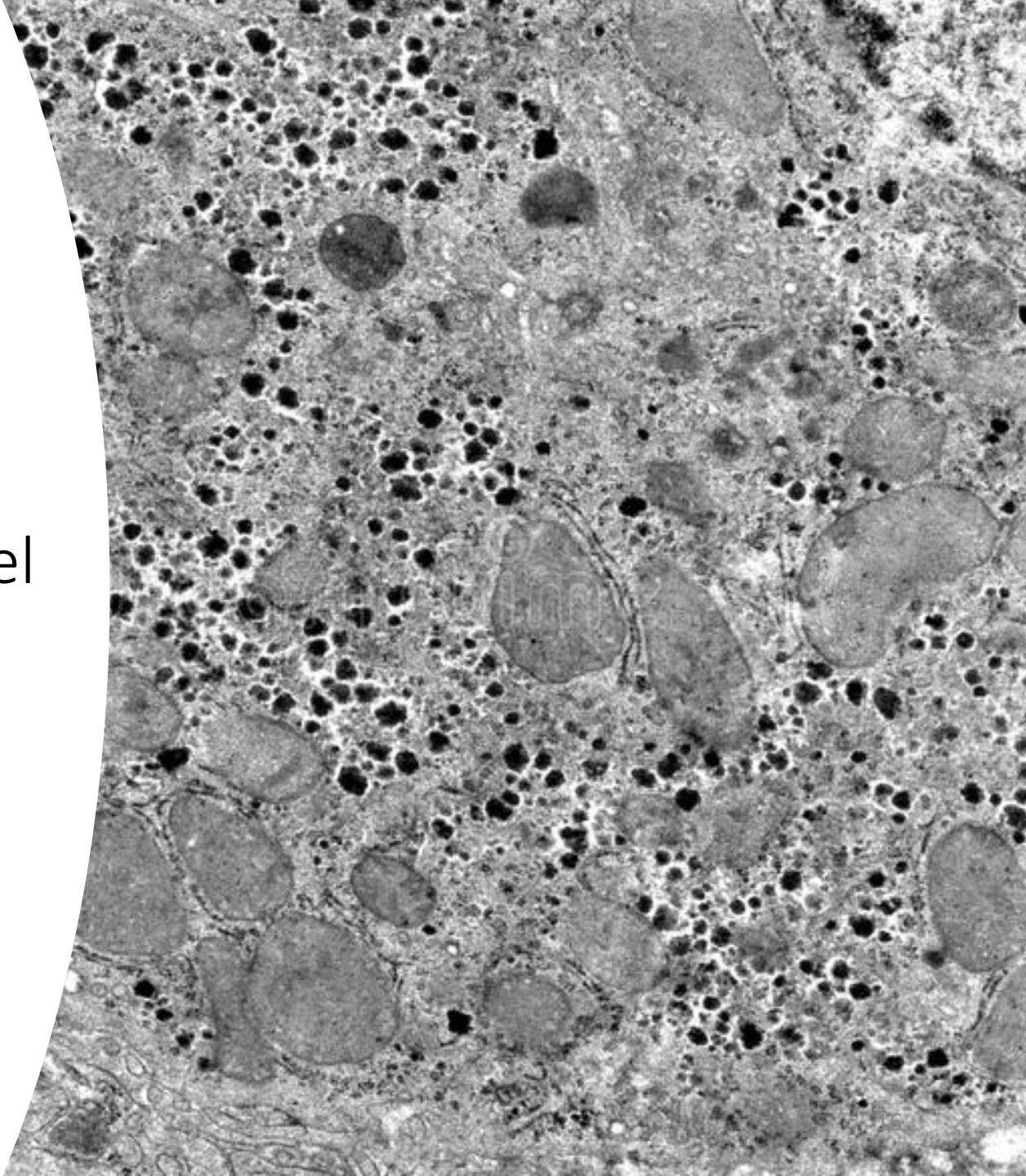
(+) Fruttosio 2,6-bisfosfato  
(+) AMP  
(-) ATP  
(-) Citrato

(+) Fruttosio 1,6 BP  
(-) Acetil-CoA  
(-) ATP  
(-) Alanina  
(-) Fosforilazione  
dipendente da cAMP

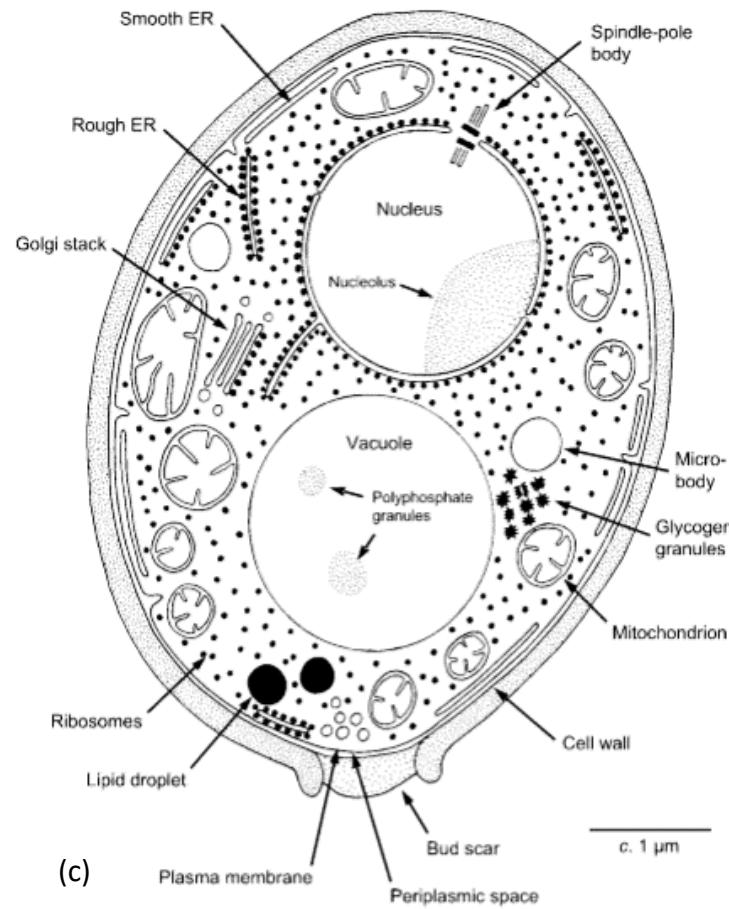
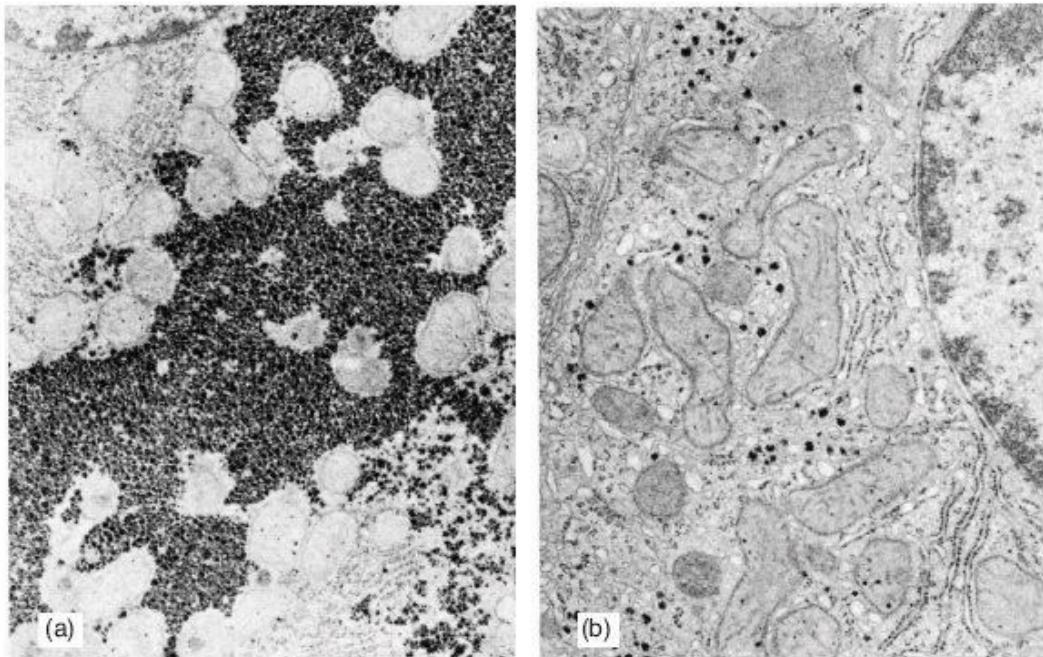


\* Enzima non presente nel lievito

# Metabolismo del Glicogeno



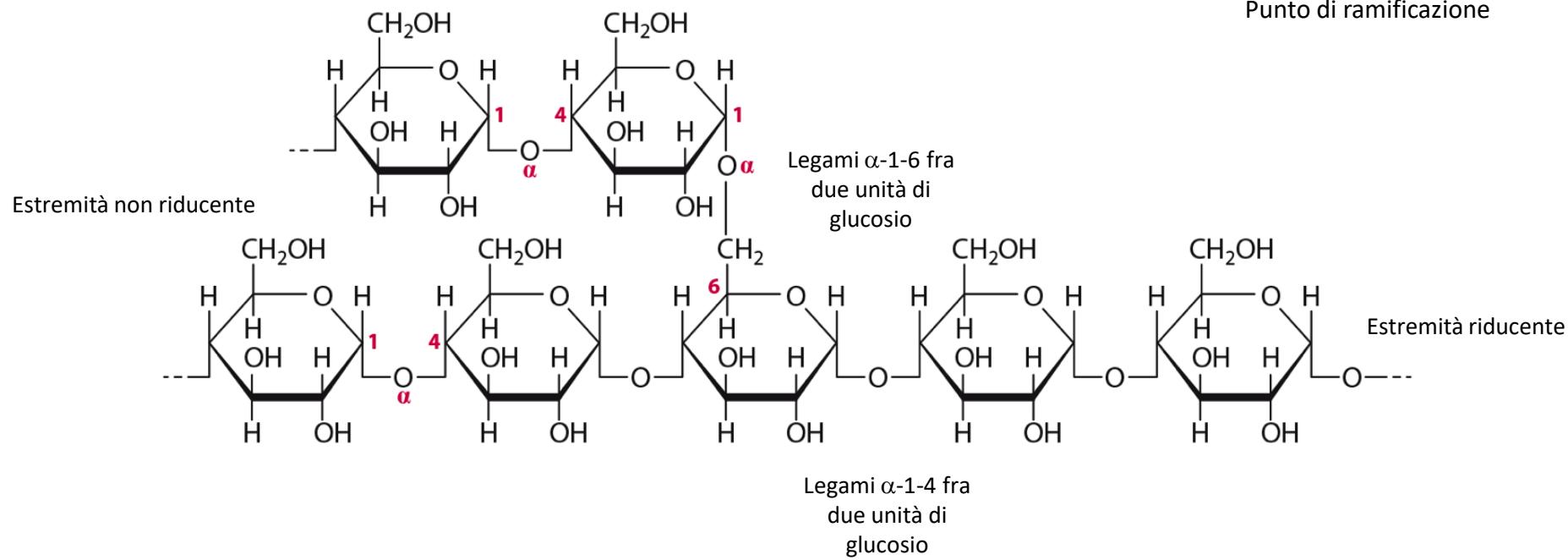
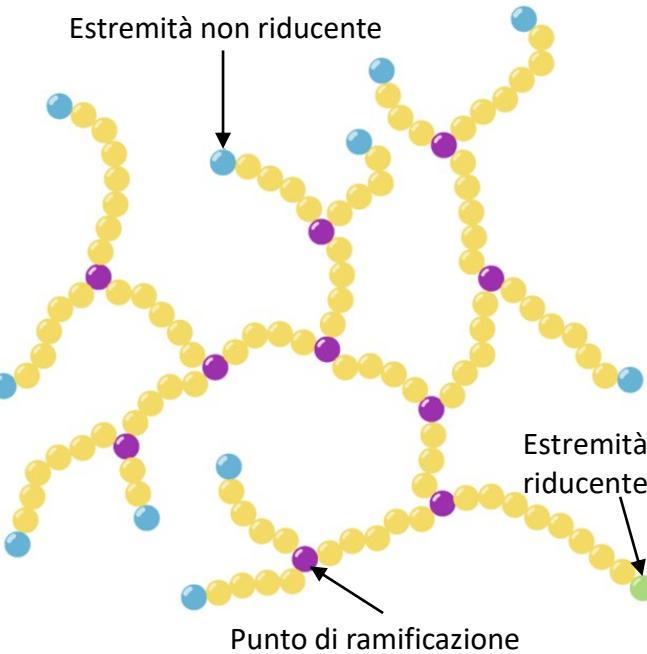
I granuli di glicogeno appaiono come macchie scure nelle fotografie al microscopio elettronico. Contengono gli enzimi che catalizzano la sintesi e la degradazione del glicogeno ed alcuni enzimi che regolano questi processi.



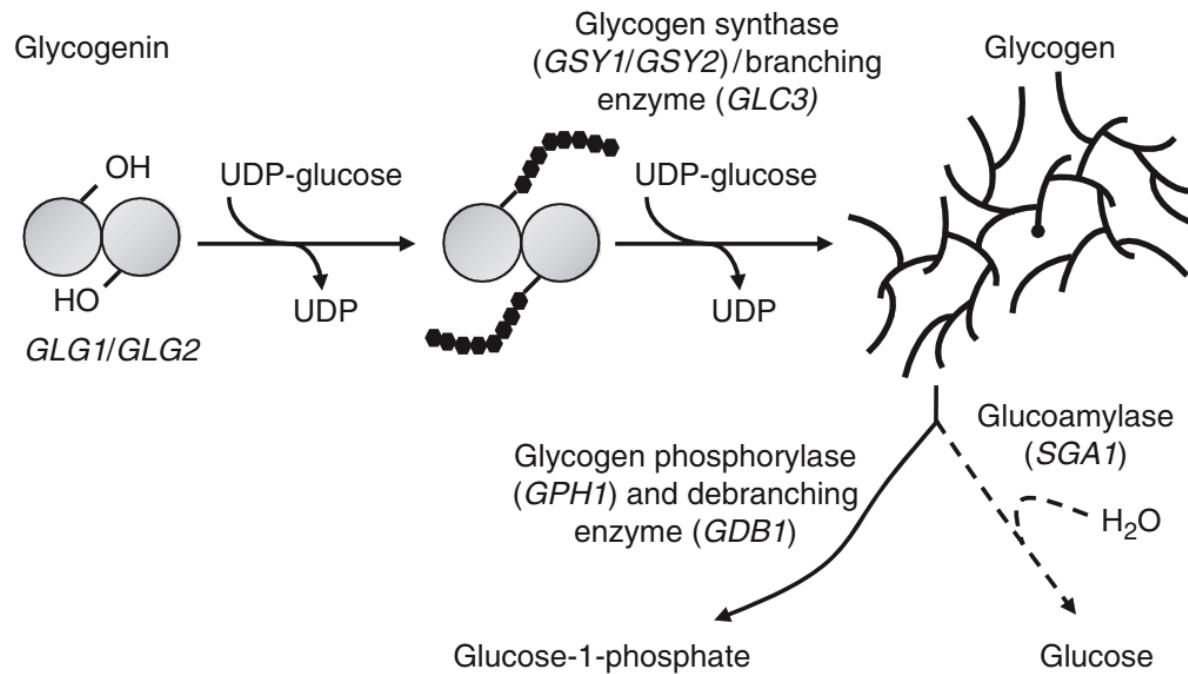
Fotografia al microscopio elettronico mostranti i granuli di glicogeno nel fegato di un ratto ben nutrito (a) e relativa assenza di essi nel fegato di un ratto a digiuno da 24 h (b) (*I Principi di Biochimica di Lehninger*); (c) Visualizzazione delle cellule di lievito mediante microscopia elettronica. Masako Osumi. 2012 *Journal of Electron Microscopy* 61(6): 343–365. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfs082>

**Glicogeno** = polisaccaride ramificato formato da catene  $\alpha$  (1-4) e ramificazioni  $\alpha$  (1-6) che si formano ogni 10 residui di glucosio.

La struttura del glicogeno è ottimizzata per la capacità di immagazzinare e rilasciare energia rapidamente e per tempi il più lunghi possibili.



Nel lievito la sintesi del glicogeno richiede le attività della glicogenina, della glicogeno sintasi e dell'enzima ramificante. Sia la glicogenina che la glicogeno sintasi utilizzano l'UDP-glucosio come donatore di glucosio, quindi il primo passo per la sintesi del glicogeno è la formazione dell'UDP-glucosio.

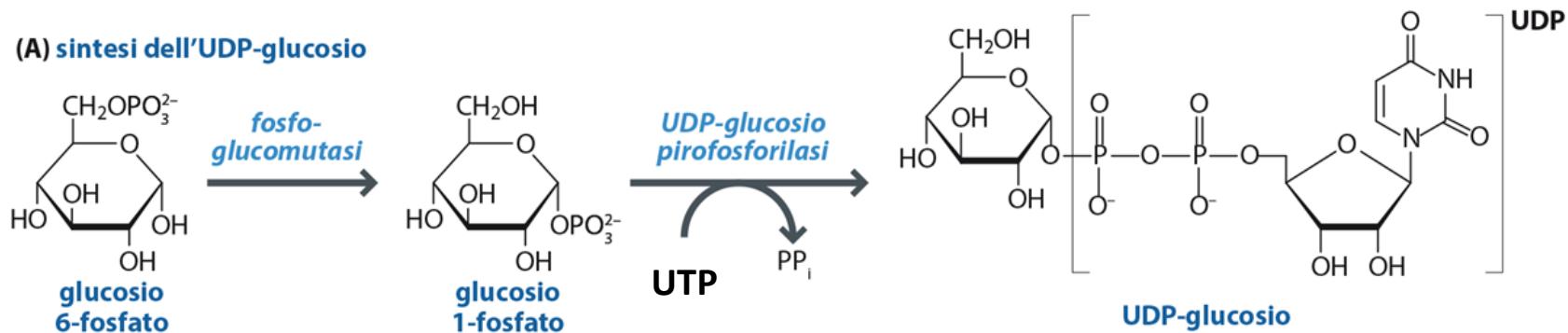


**Fig. 1.** Schematic representation of the pathways of glycogen synthesis and degradation in yeast. The initiator protein, glycogenin, attaches a glucose residue from UDPG to a tyrosine residue within its own sequence. Glycogenin then adds additional glucose residues, in  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage, forming a short oligosaccharide. This oligosaccharide serves as a primer for glycogen synthase, which catalyzes bulk glycogen synthesis by processively adding additional glucose residues in  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage. The branching enzyme introduces the  $\alpha$ -1,6-branch points characteristic of glycogen. Degradation occurs via the concerted action of glycogen phosphorylase, which releases glucose as glucose-1-phosphate from linear  $\alpha$ -1,4-linked glucose chains, and the debranching enzyme, which eliminates the  $\alpha$ -1,6-branch points. Alternatively, glycogen can be hydrolyzed in the vacuole by a glucoamylase activity, generating free glucose.

Il glicogeno viene sintetizzato e degradato da vie diverse

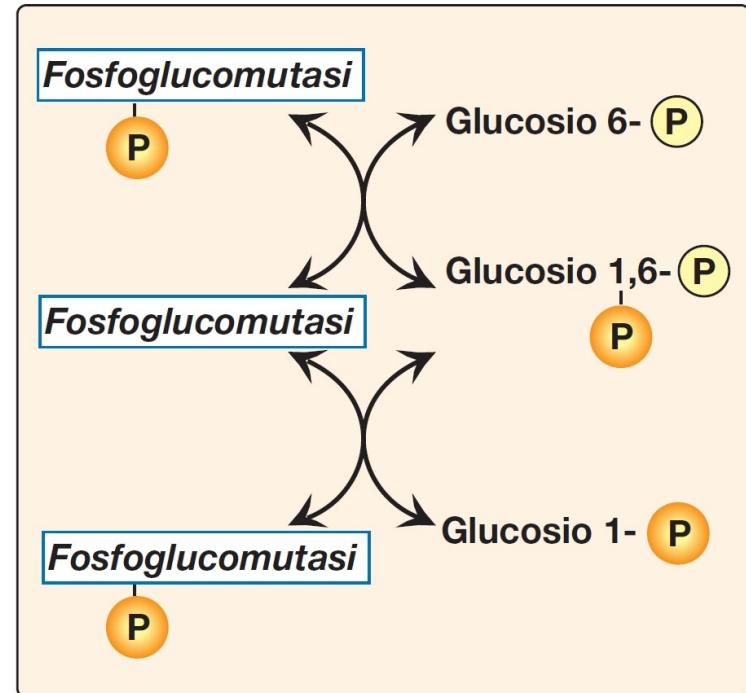
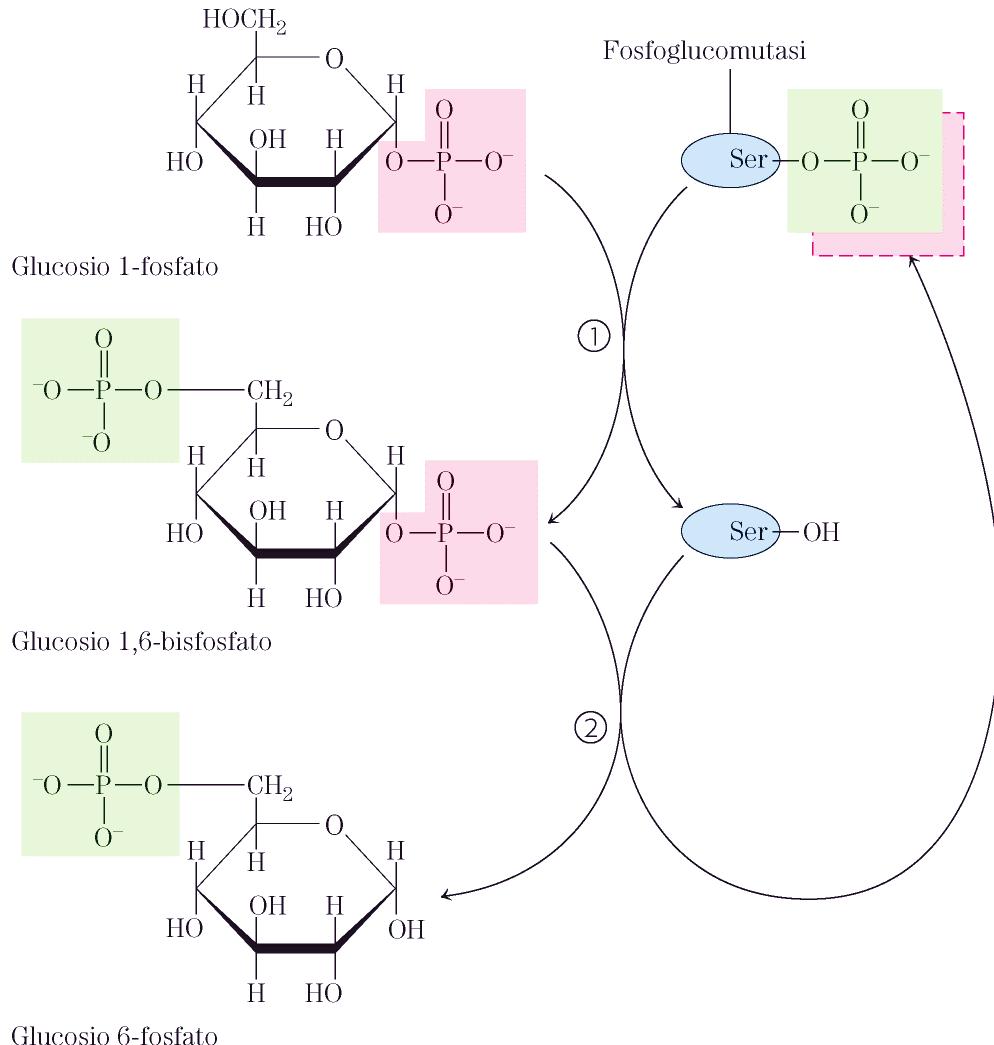
Sintesi: glicogeno<sub>n</sub> + UDP-glucosio  $\longrightarrow$  glicogeno<sub>n+1</sub> + UDP

Degradazione: glicogeno<sub>n+1</sub> + P<sub>i</sub>  $\longrightarrow$  glicogeno<sub>n</sub> + glucosio 1-fosfato



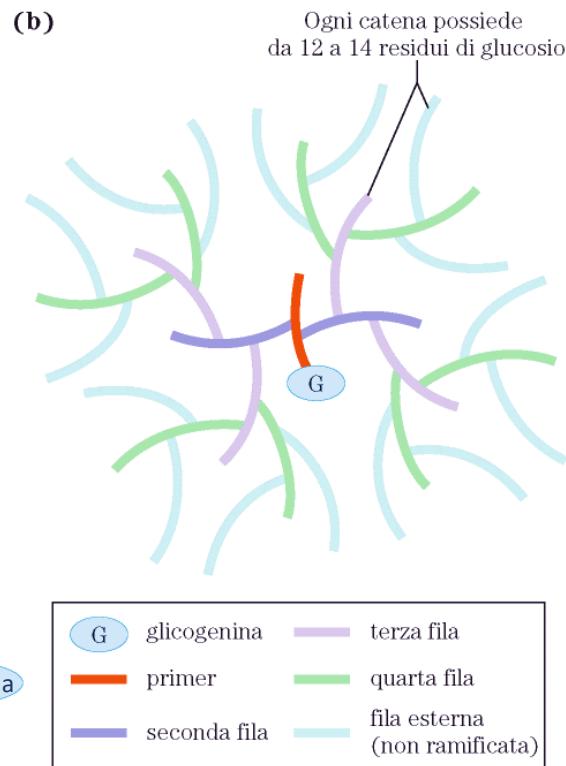
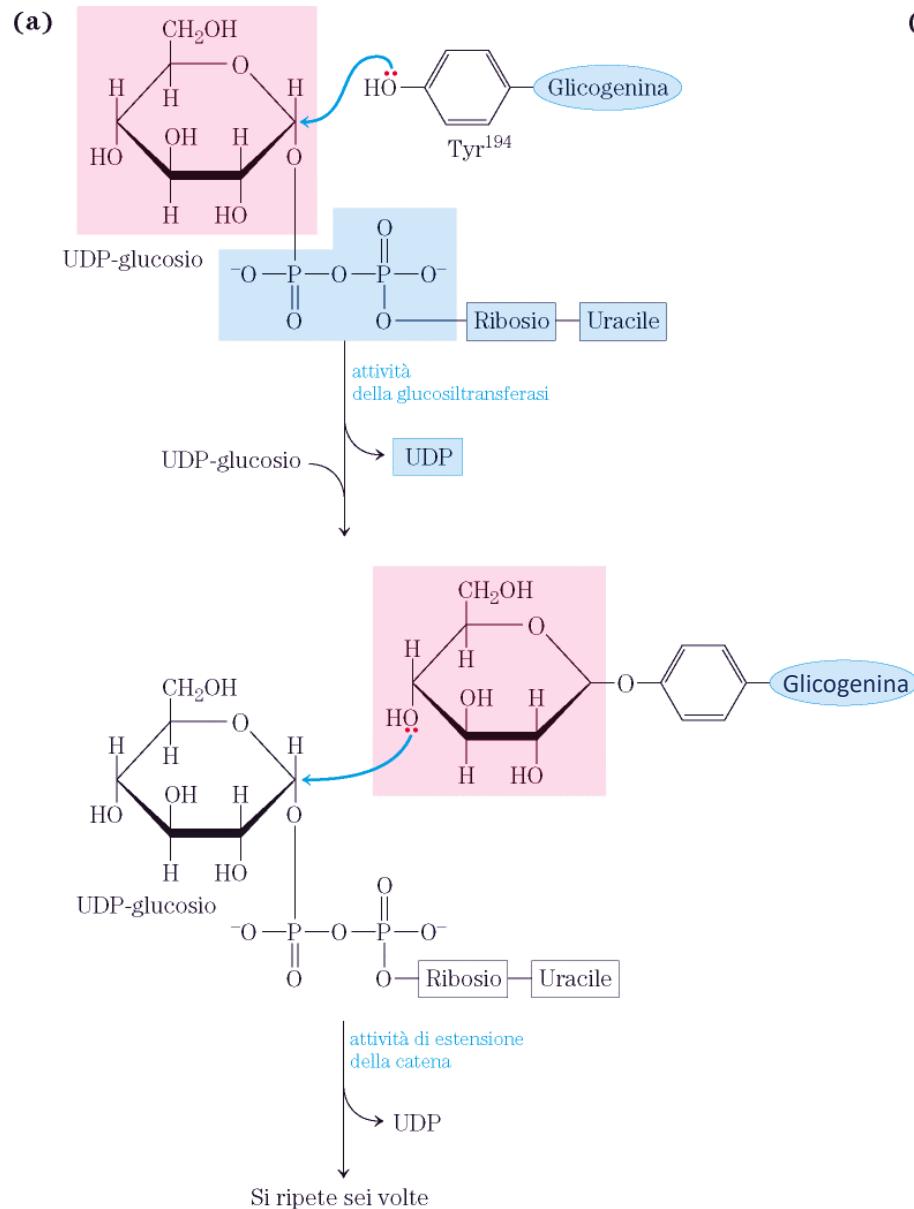
Nella sintesi del glicogeno il donatore di residui glucosidici è l'uridina difosfato glucosio (UDP-glucosio) che rappresenta una forma attivata di glucosio nella sintesi di glicogeno

# La fosfoglucomutasi converte il glucosio 1-fosfato in glucosio 6-fosfato

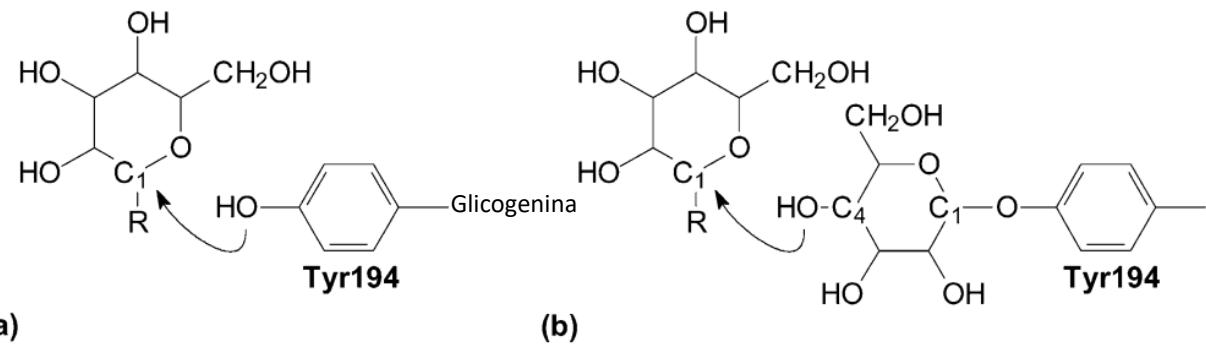


Interconversione fra glucosio 6-fosfato e glucosio 1-fosfato catalizzata dalla *fosfoglucomutasi*. **P** e **P** = fosfato.

## La glicogenina e la struttura della particella di glicogeno

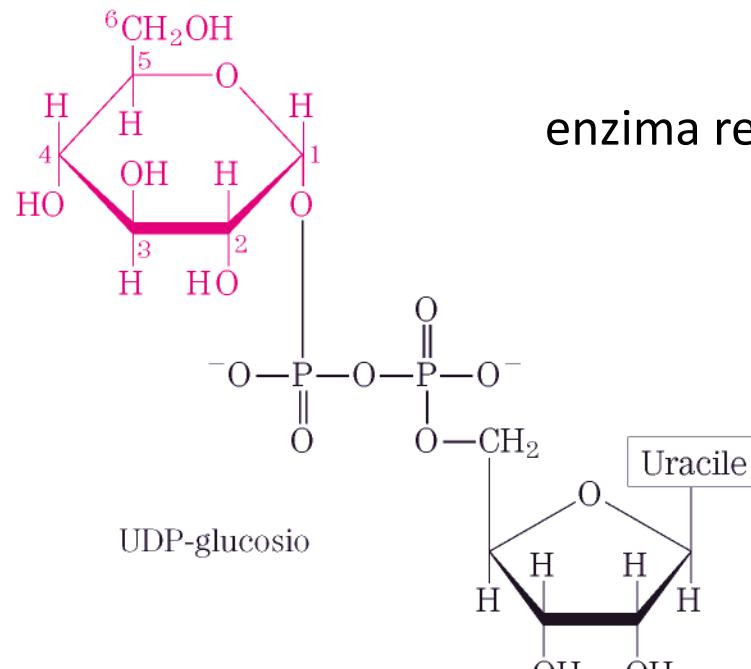


Trasferimento di un residuo di glucosio dall'UDP glucosio al gruppo OH della Tyr 194 con la formazione del legame glucosio 1-O-tirosile e la successiva formazione del legame  $\alpha$ -1,4-glicosidici.

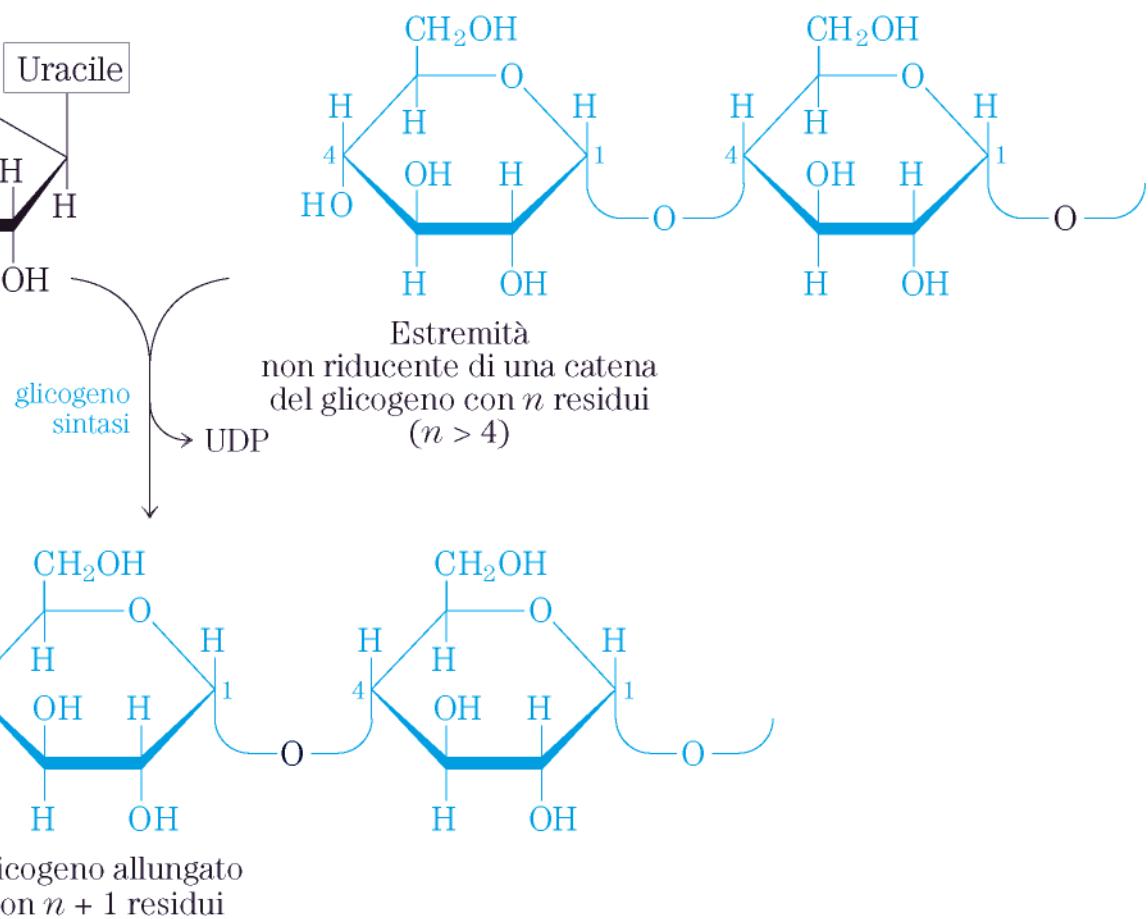


**Figure 1.** The two chemically distinct reactions catalyzed by glycogenin. (a) The initial glucosylation of the hydroxyl group of Tyr194 resulting in the formation of a glucose 1-O-tyrosyl linkage. (b) The subsequent glucosylation of the C4'-hydroxyl group of the terminal glucose on the nascent glycogen polymer resulting in the formation of  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkages.

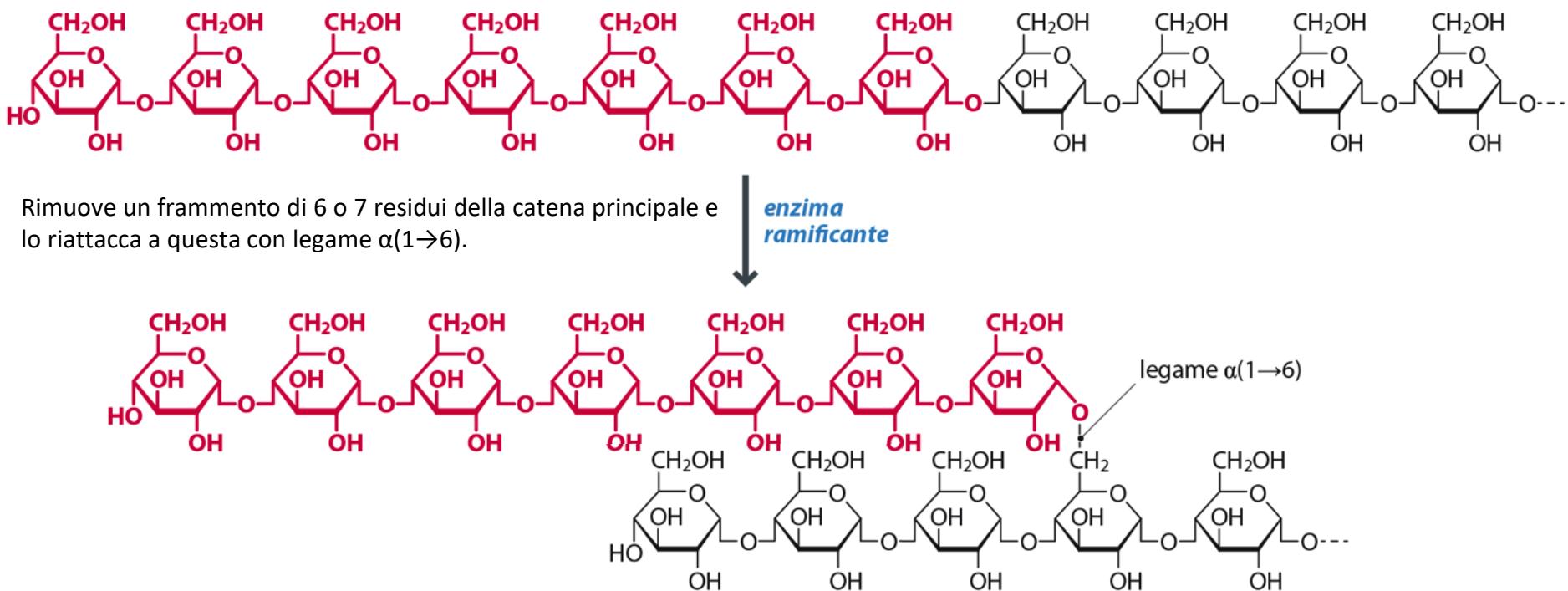
Brian J. Gibbons, Peter J. Roach and Thomas D. Hurley. (2002) Crystal Structure of the Autocatalytic Initiator of Glycogen Biosynthesis, Glycogenin. *J.Mol.Biol.* 319, 463-477



Glicogeno sintasi:  
enzima responsabile dell'accrescimento di una  
molecola di glicogeno



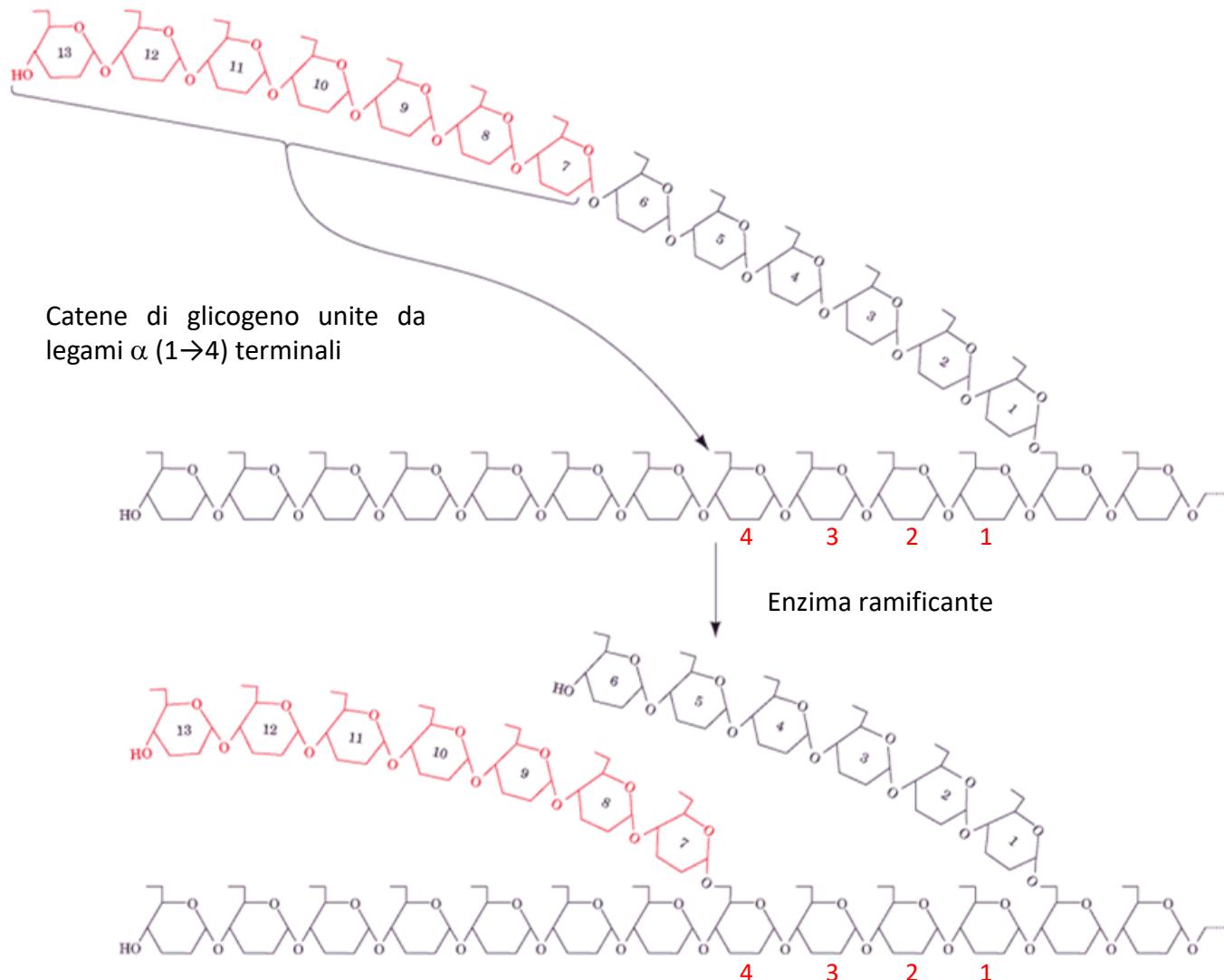
## Enzima ramificante



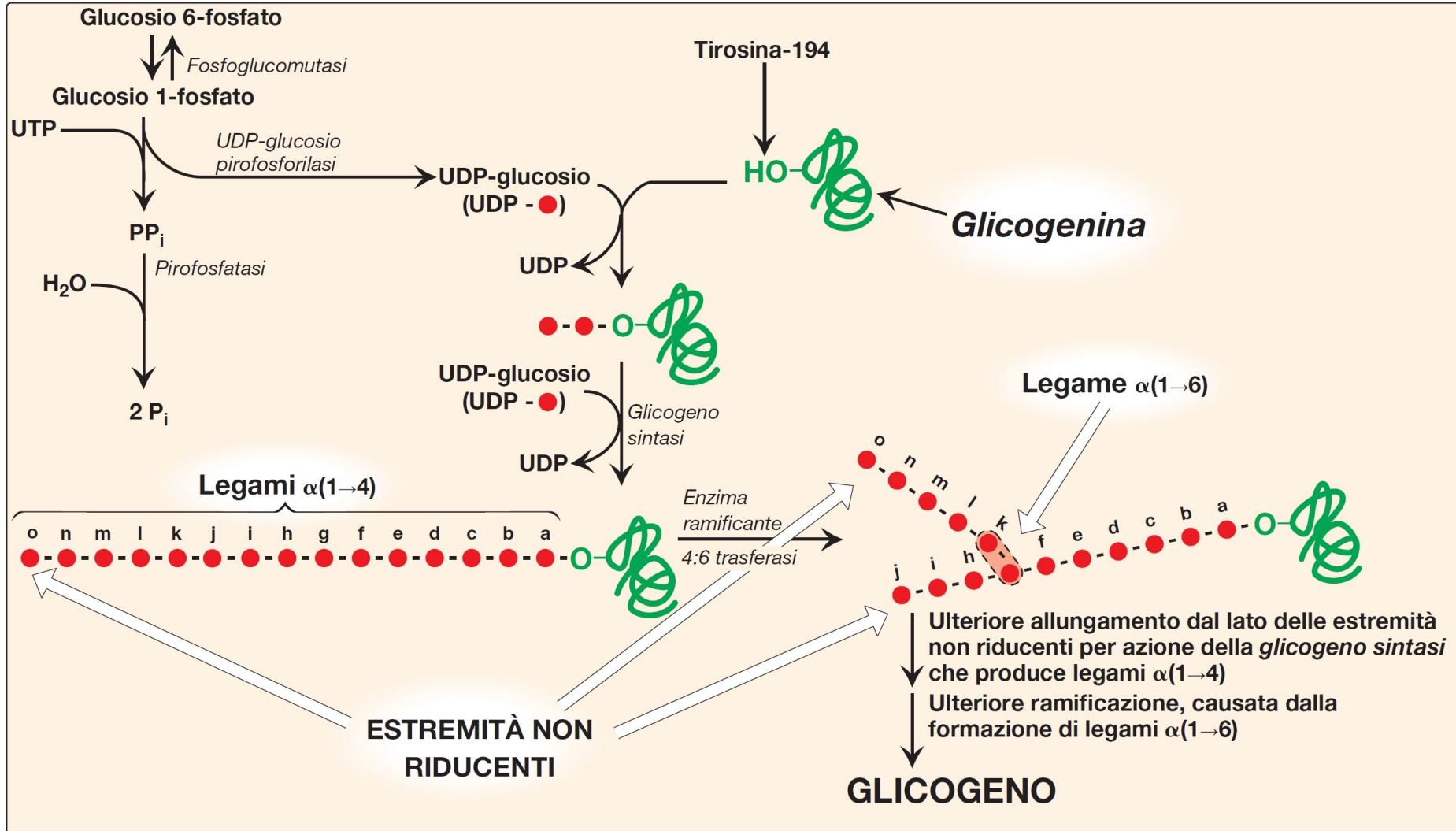
L'enzima ramificante che catalizza questa reazione è molto preciso:

- il gruppo di 7 residui deve includere anche l'estremità non riducente terminale;
- deve derivare da una catena di almeno 11 residui;
- il nuovo punto di ramificazione deve distaccare di almeno 4 residui da quella già formata.

## Enzima ramificante



# Schema riassuntivo della sintesi del glicogeno

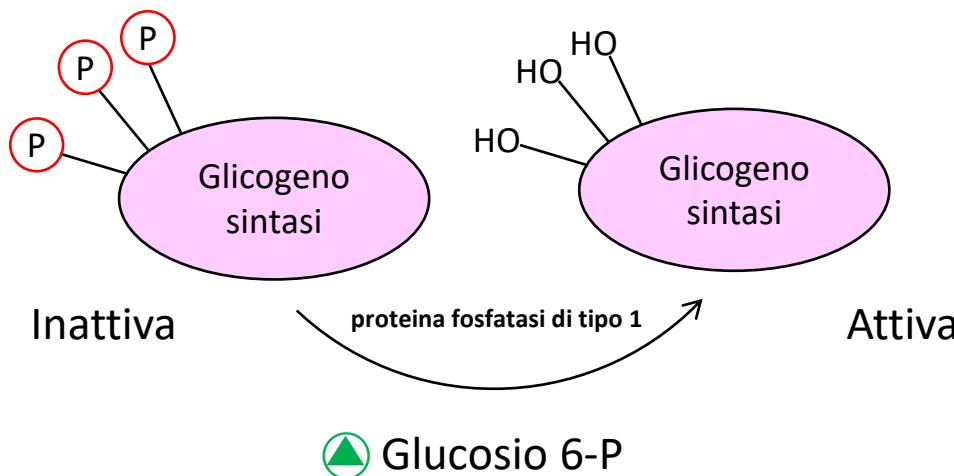


Sintesi del glicogeno. UTP = uridina trifosfato; UDP = uridina difosfato; PP<sub>i</sub> = pirofosfato inorganico.

## Regolazione della glicogeno sintasi

La regolazione post-traduzionale della glicogeno sintasi implica l'interazione di due meccanismi regolatori, ovvero l'inibizione mediante fosforilazione reversibile e l'attivazione da parte del modulatore allosterico, glucosio-6-P.

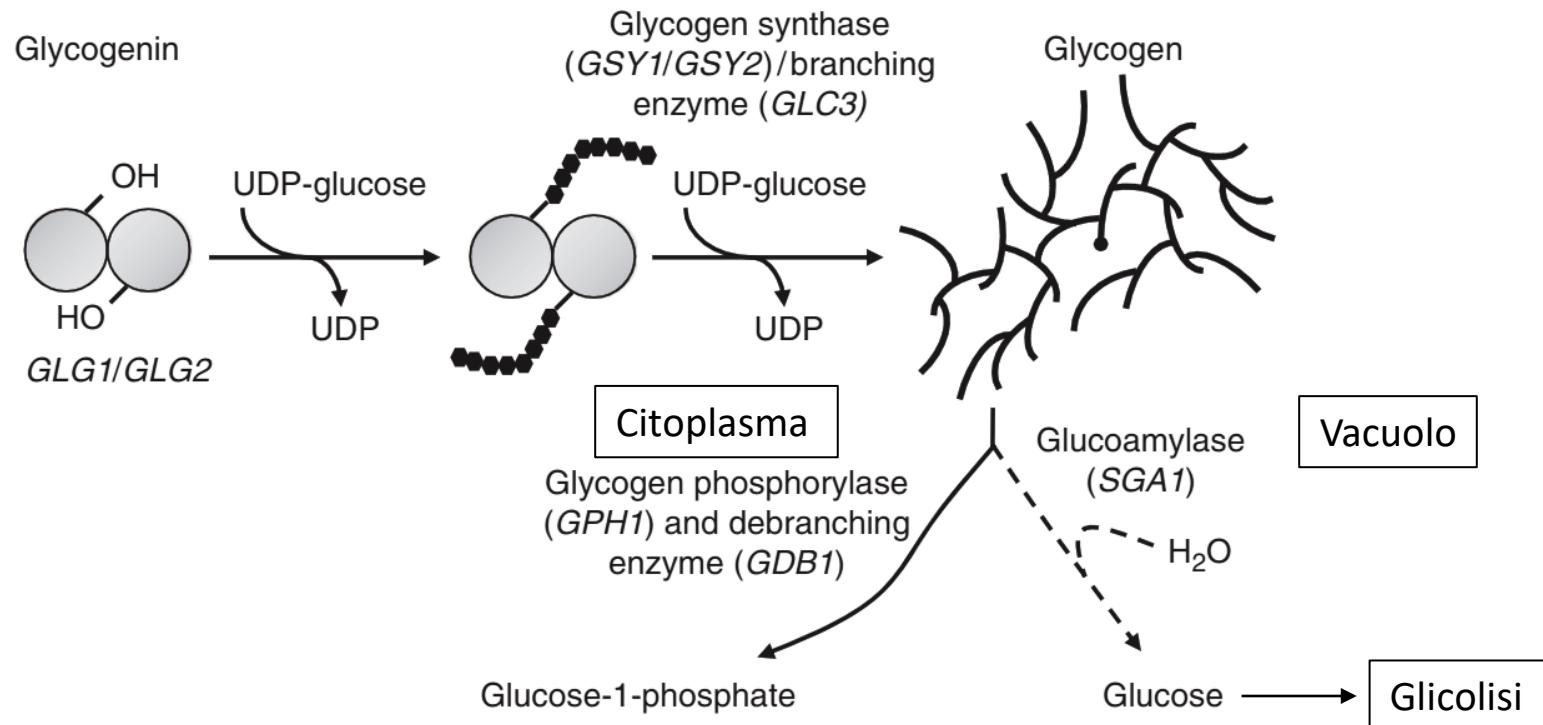
La forma inattiva della glicogeno sintasi è la forma fosforilata mentre la forma attiva è la forma defosforilata. La glicogeno sintasi è stimolata dal glucosio 6-P



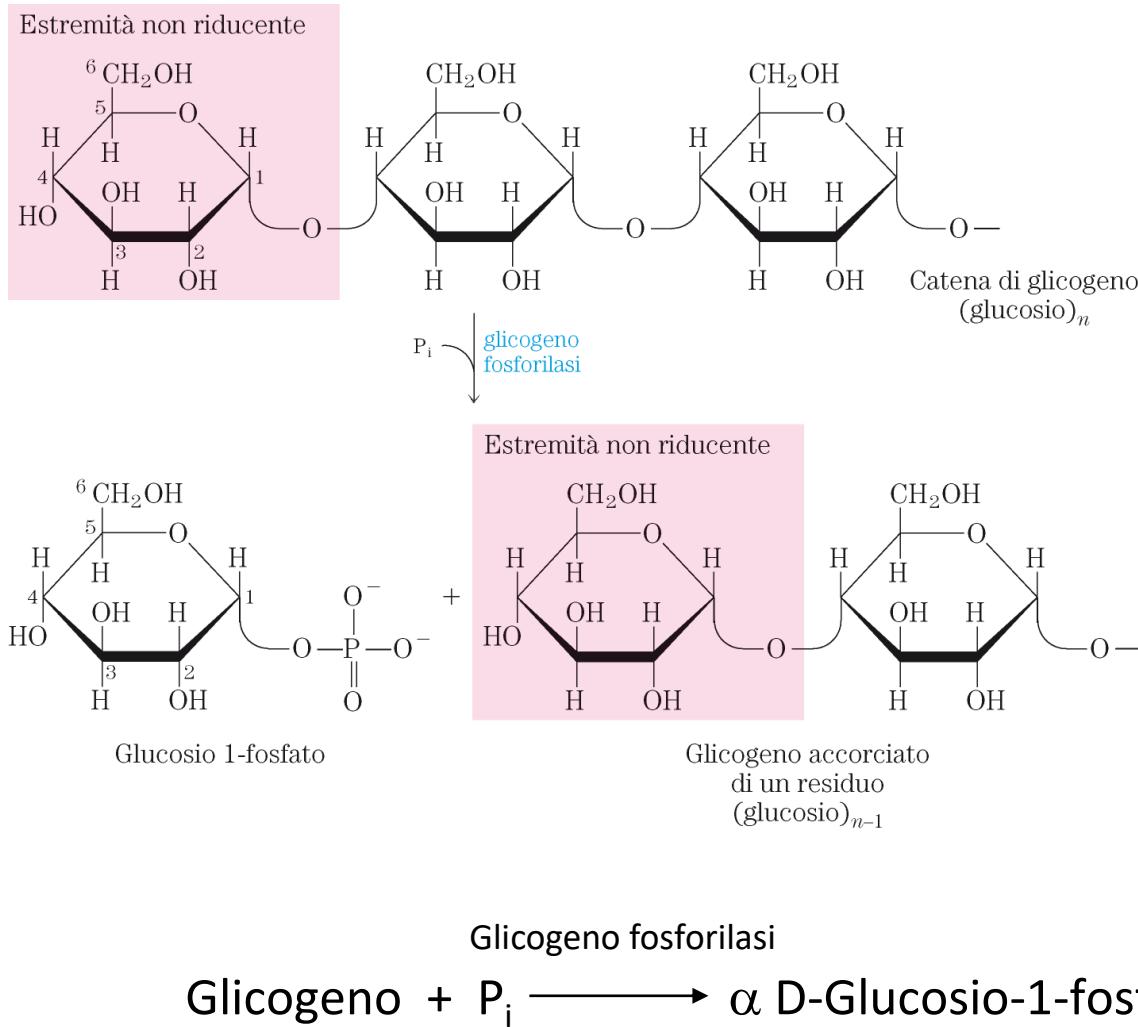
G6P si lega all'enzima e aumenta l'attività. Consente all'enzima di rispondere rapidamente all'abbondanza di glucosio.

La degradazione del glicogeno nel lievito può procedere attraverso due percorsi diversi.

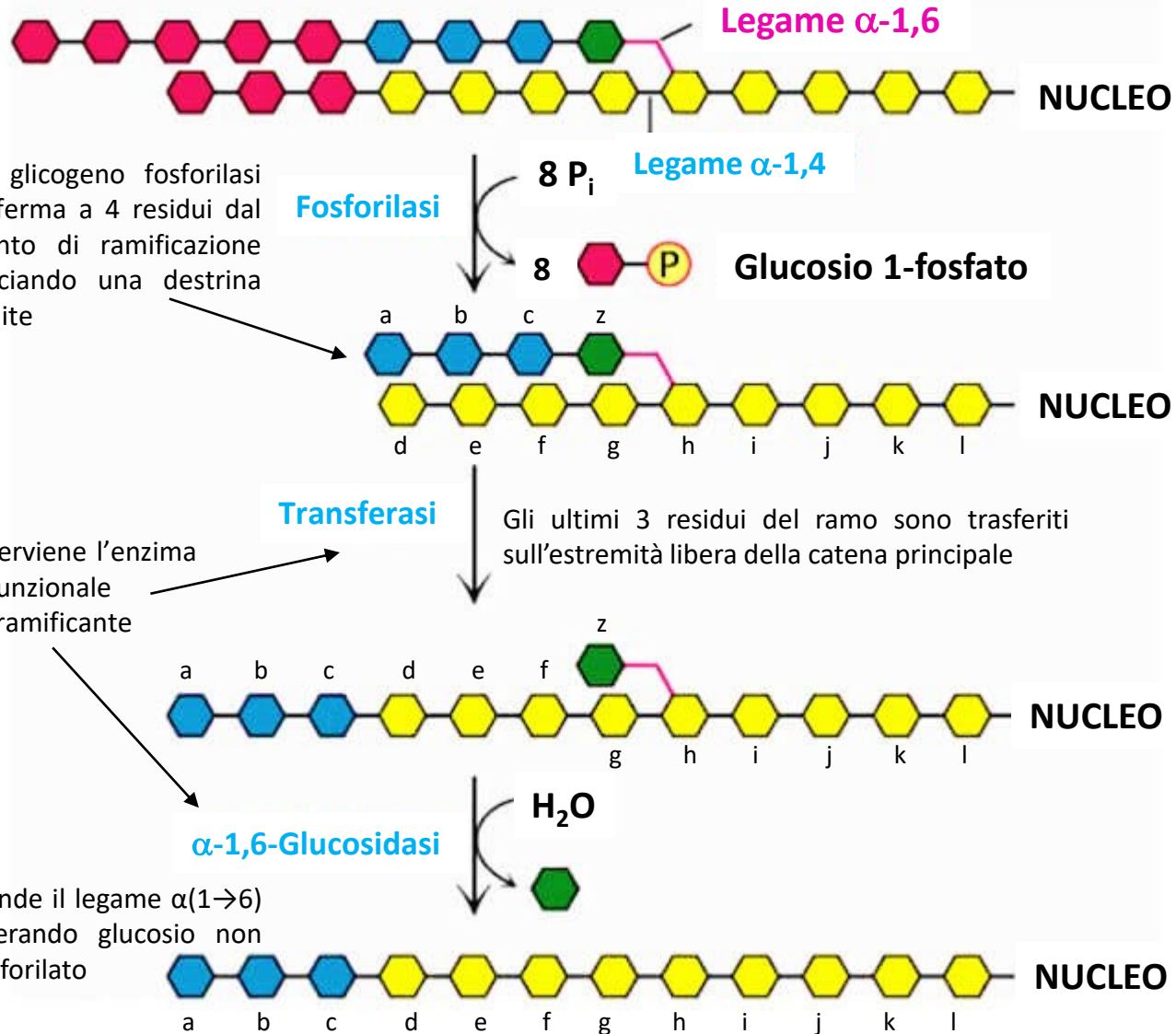
- 1) il glicogeno può essere degradato dalla glicogeno fosforilasi che rilascia glucosio sotto forma di glucosio-1-fosfato dalle estremità non riducenti delle catene  $\alpha$ -1,4 legate. L'enzima non è in grado di scindere i punti di ramificazione  $\alpha$ -1,6. E' necessaria la presenza di un enzima deramificante.
- 2) il glucosio libero può essere generato dal glicogeno tramite l'idrolisi catalizzata da un enzima vacuolare, la glucoamilasi che catalizza la scissione dei legami  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6.



## La glicogeno fosforilasi catalizza la scissione fosforolitica del glicogeno in glucosio 1-fosfato



La fosforilasi smette di rompere i legami  $\alpha$  1-4 quando incontra un residuo glucosidico terminale che dista a 4 residui dal punto di ramificazione.



La degradazione del glicogeno fornisce glucosio per la glicolisi

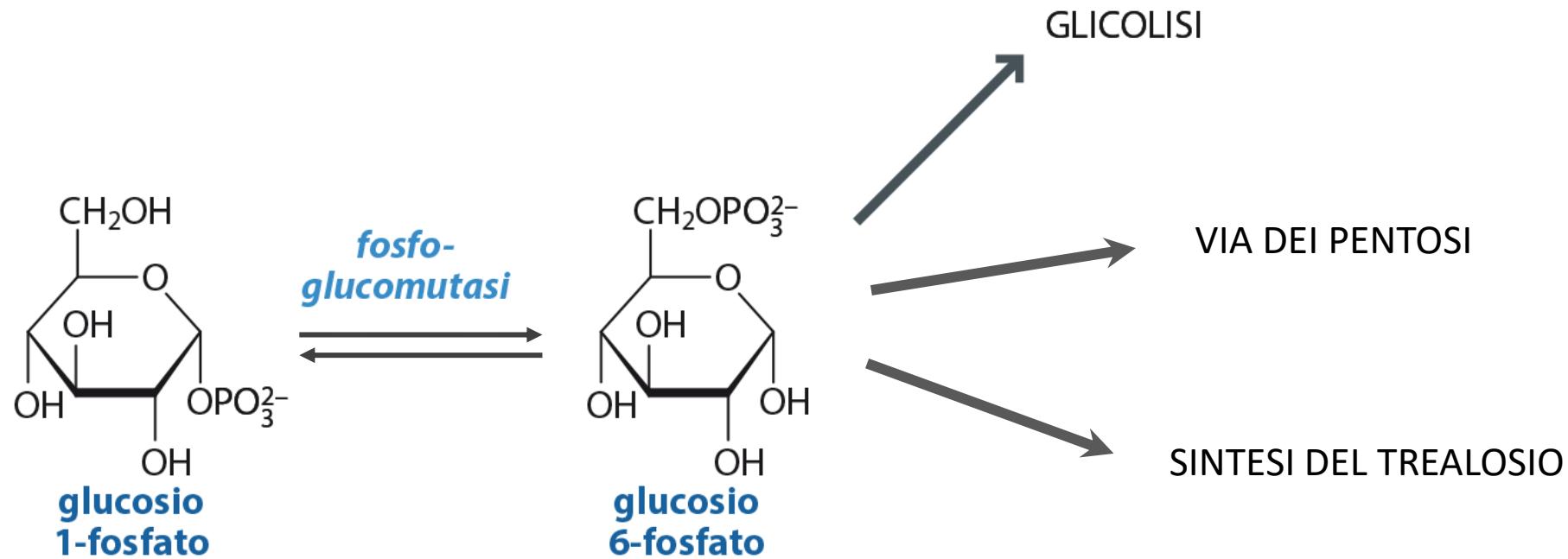
**Enzima deramificante** presenta due attività catalitiche distinte:

- **Transferasi:** trasferisce la ramificazione all'estremità non riducente;

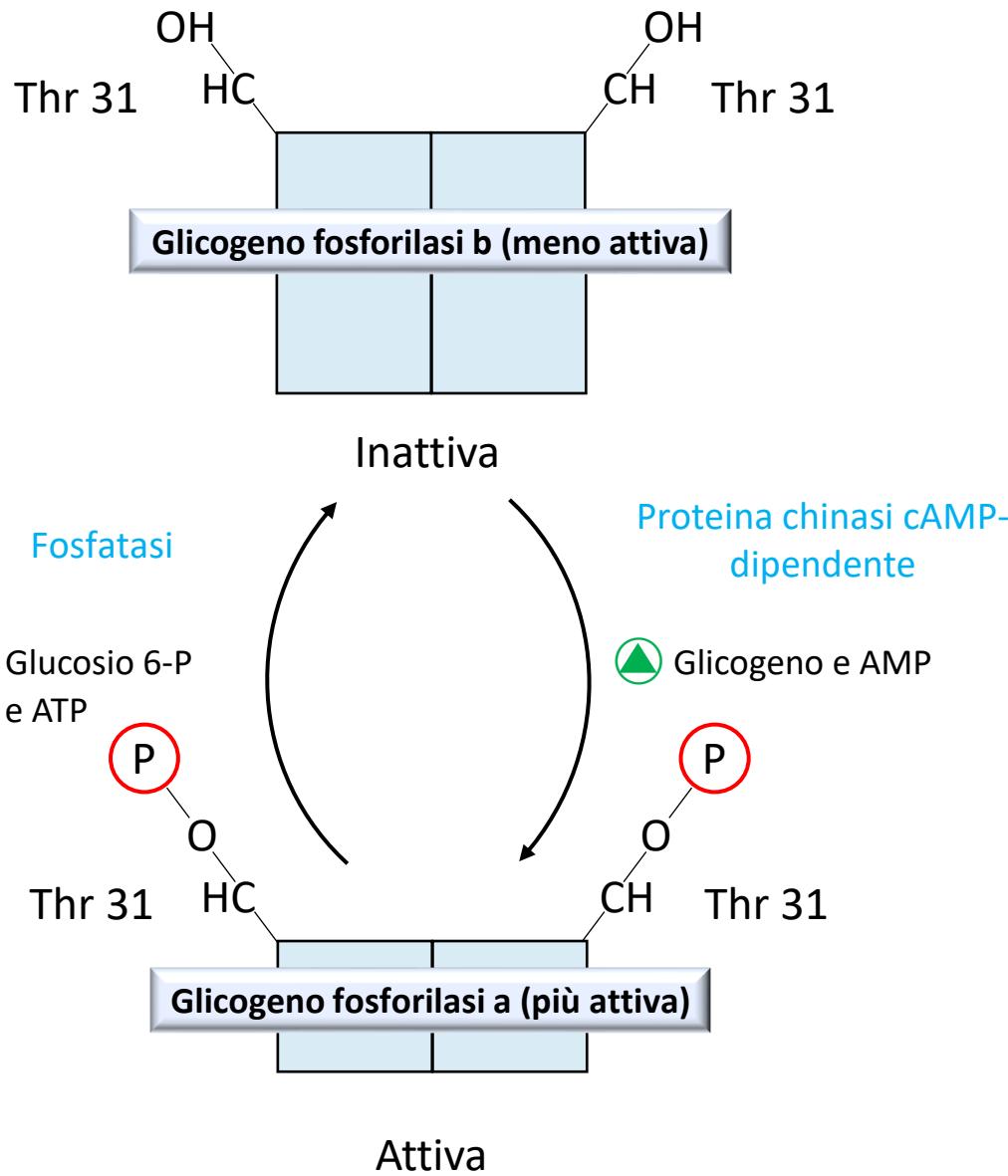
- **α (1-6) glucosidasi:** rimuove l'unità di glucosio dal punto di ramificazione.

Glicogeno fosforilasi può rompere solo i legami α (1-4) quando incontra α (1-6) si ferma ed interviene l'enzima deramificante

Il glucosio 1-fosfato è il prodotto finale della glicogeno fosforilasi che viene convertito in glucosio 6-fosfato dalla fosfoglucomutasi



# Modulazione covalente reversibile della glicogeno fosforilasi fosforilazione/defosforilazione



L'attività della glicogeno fosforilasi è soggetta a modificazione covalente e regolazione allosterica.

La glicogeno fosforilasi nel lievito presenta un sito di fosforilazione su una treonina nella regione N-terminale. L'enzima è insensibile al glucosio, ma viene inibito in modo non competitivo dal glucosio-6-fosfato: un aumento di G6P favorisce la defosforilazione e l'inattivazione dell'enzima. Allo stesso tempo, l'AMP, segnalando una bassa disponibilità energetica, stimola la degradazione del glicogeno.

Un ulteriore fattore regolatorio è il glicogeno stesso: quando le riserve sono abbondanti, il glicogeno favorisce la fosforilazione dell'enzima, spostando l'equilibrio verso la sua forma attiva. In questo modo, la glicogeno fosforilasi può integrare segnali metabolici e disponibilità di riserve per modulare la degradazione del glicogeno in modo efficiente.

Il metabolismo del glicogeno è finemente regolato: quando è attiva la sua sintesi non è attiva la sua demolizione e viceversa

