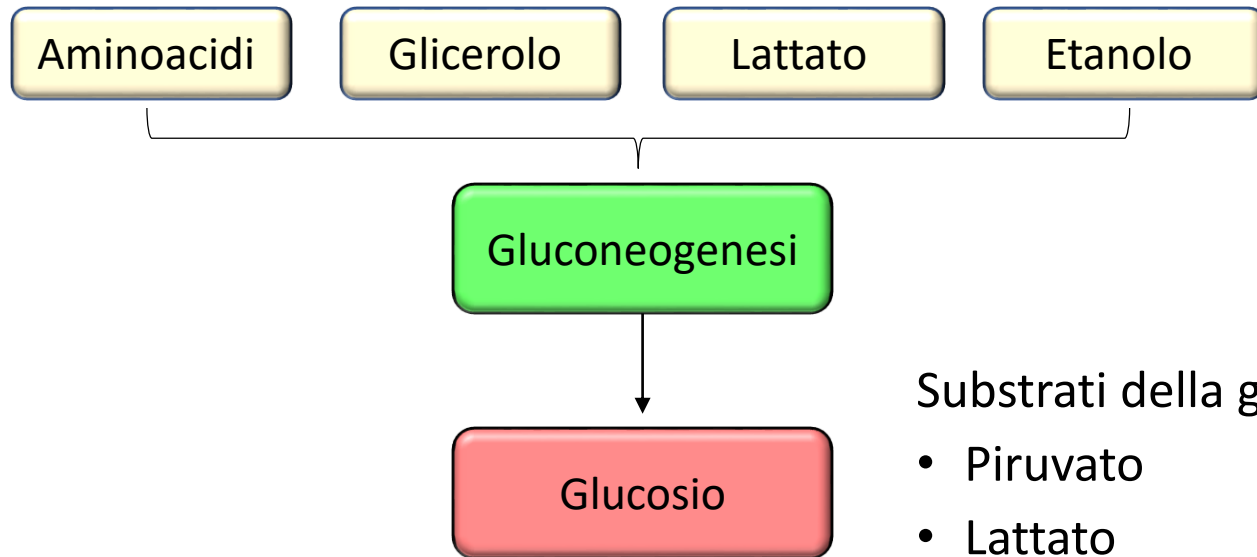




Gluconeogenesi:
sintesi di glucosio da precursori non glucidici



Substrati della gluconeogenesi:

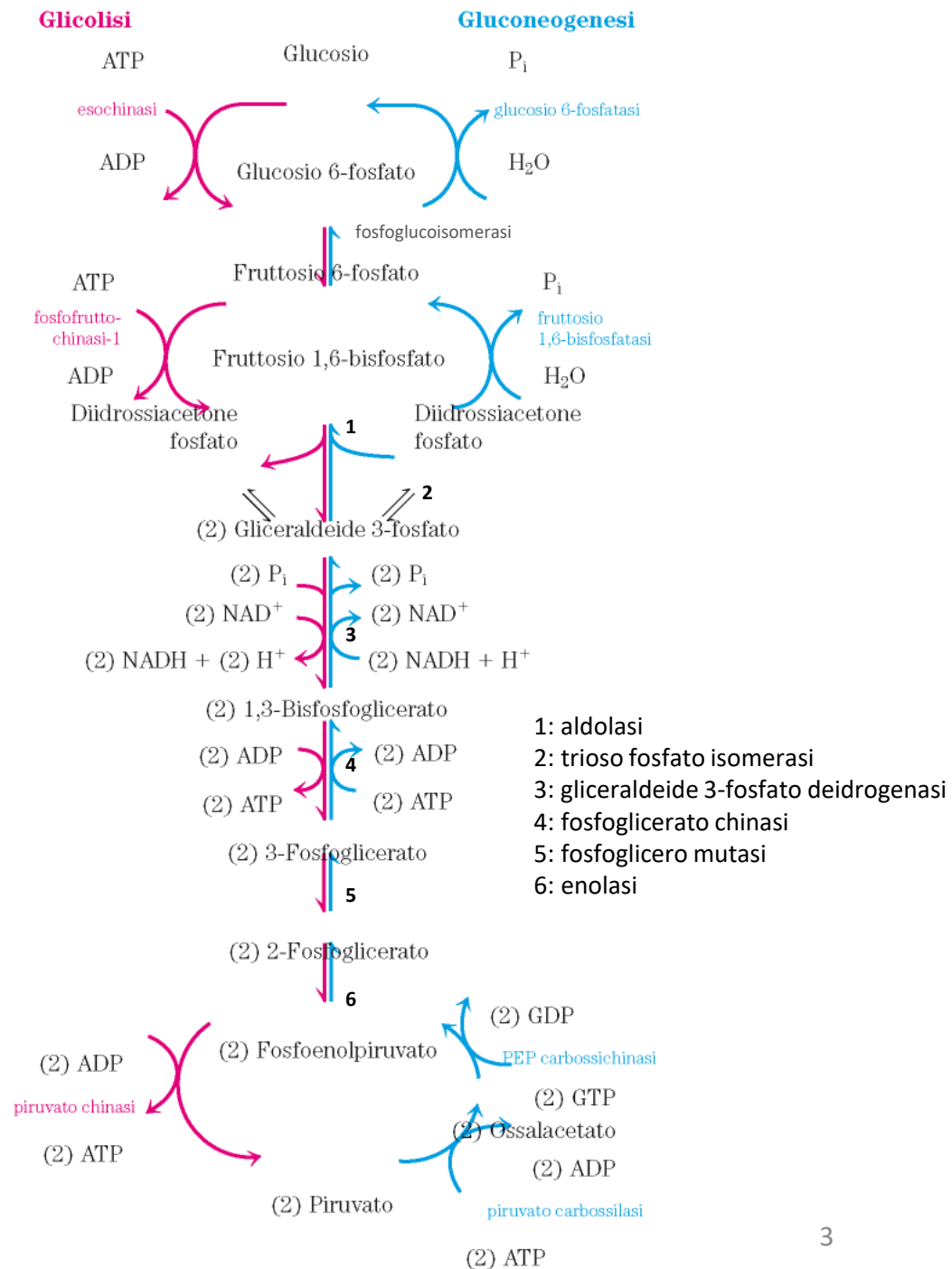
- Piruvato
- Lattato
- Etanolo
- Amminoacidi
- Glicerolo
- Intermedi del ciclo dell'acido citrico e del ciclo del glicolito

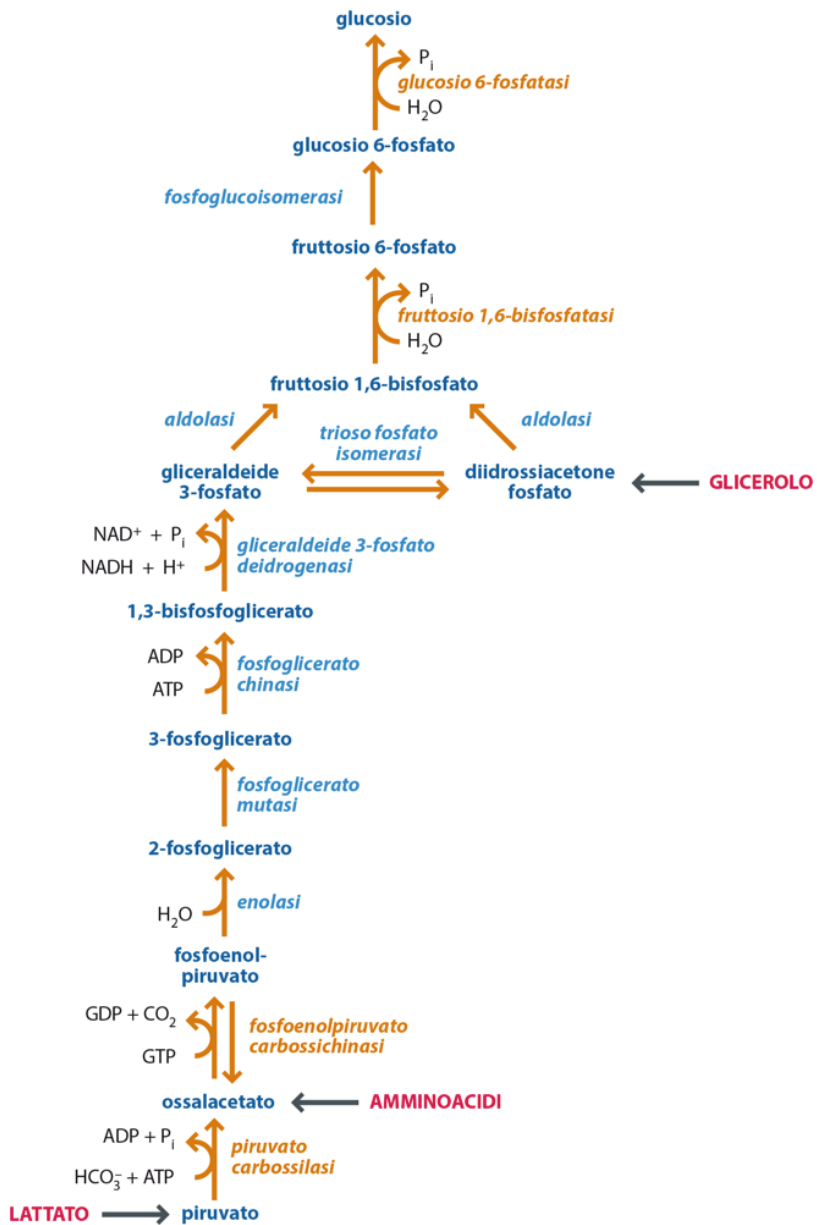
Confronto tra glicolisi e gluconeogenesi

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.

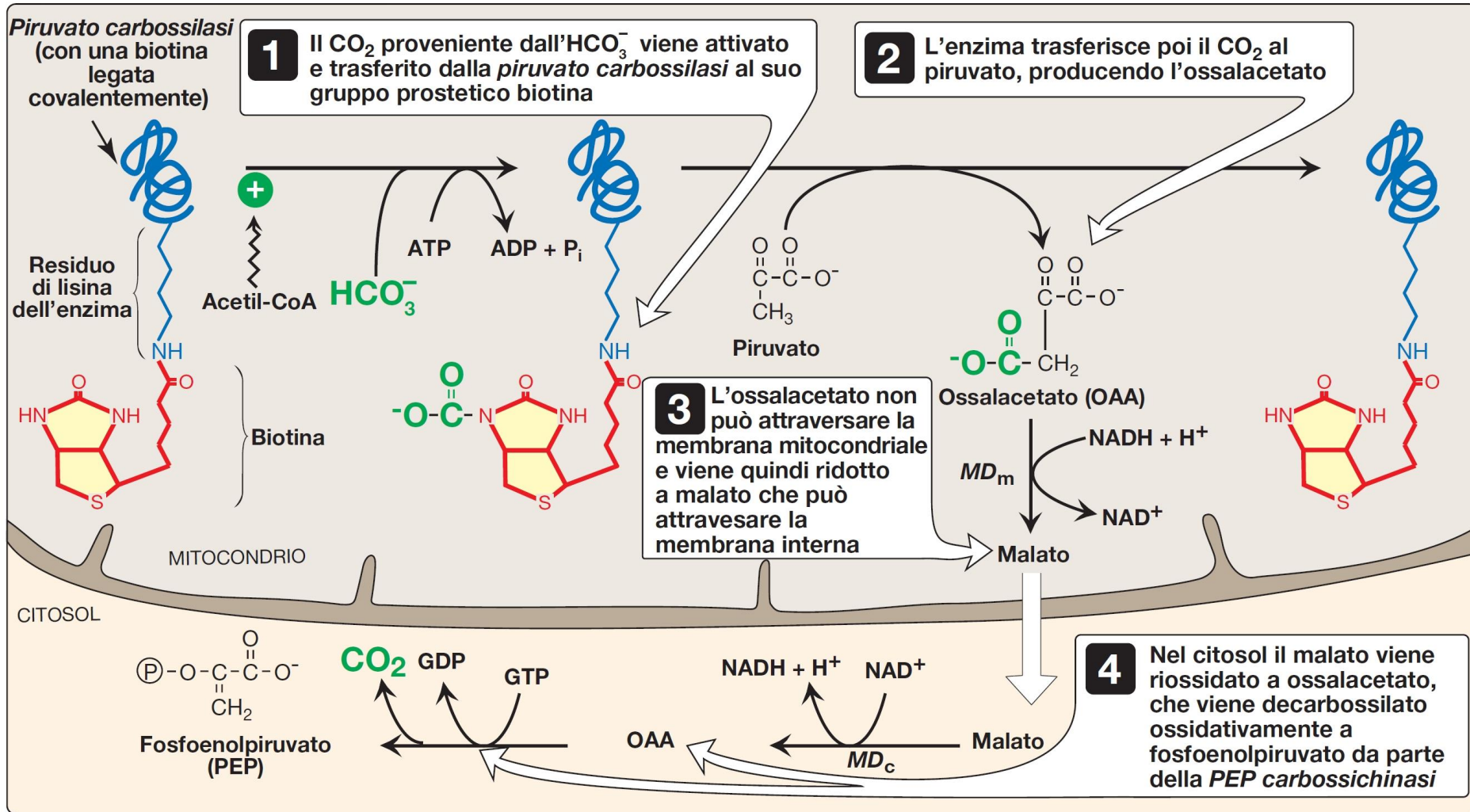
Sette delle dieci reazioni enzimatiche della gluconeogenesi sono reazioni della glicolisi che avvengono nella direzione opposta





Punti di ingresso
dei substrati
principali nella
gluconeogenesi

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



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.

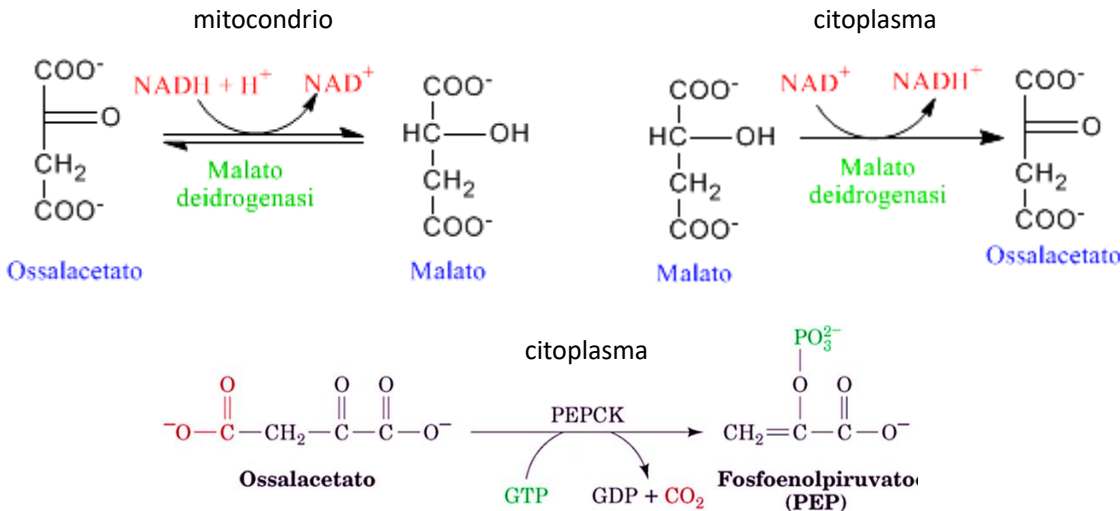
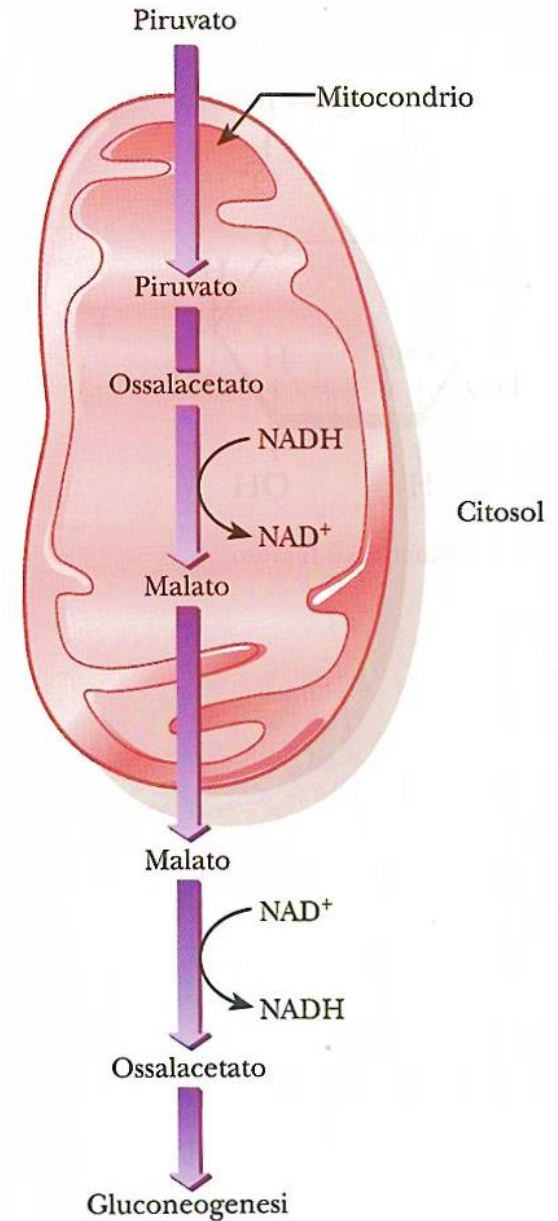
Le reazioni irreversibili della glicolisi vengono aggirate nelle gluconeogenesi

la membrana mitocondriale non ha trasportatori per l'ossalacetato.

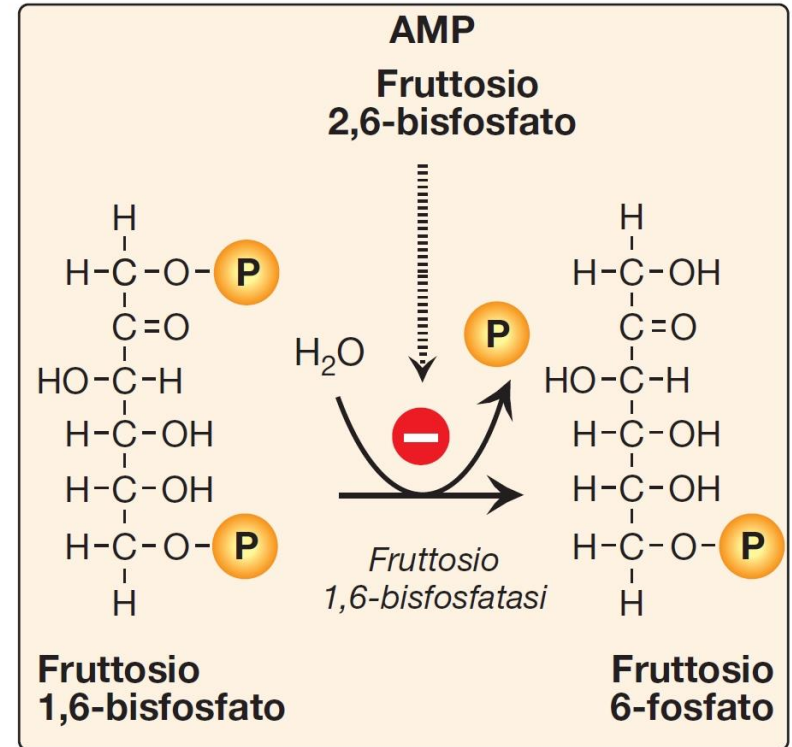
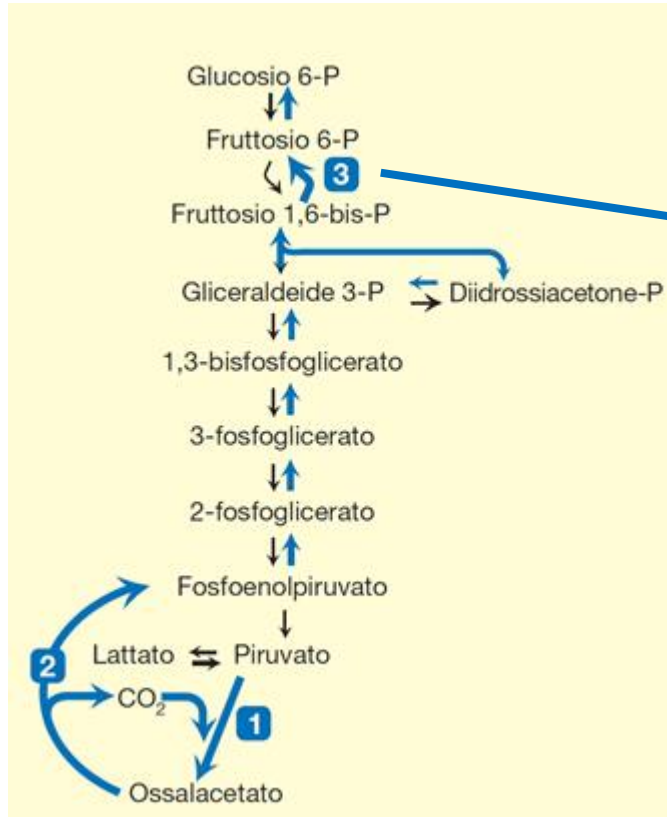
l'ossalacetato formato dal piruvato deve essere ridotto a malato dalla malato deidrogenasi mitocondriale a spese del NADH.

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 dalla malato deidrogenasi citoplasmatica.

La PEP carbossichinasi può trasformare l'ossalacetato in fosfoenolpiruvato.



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

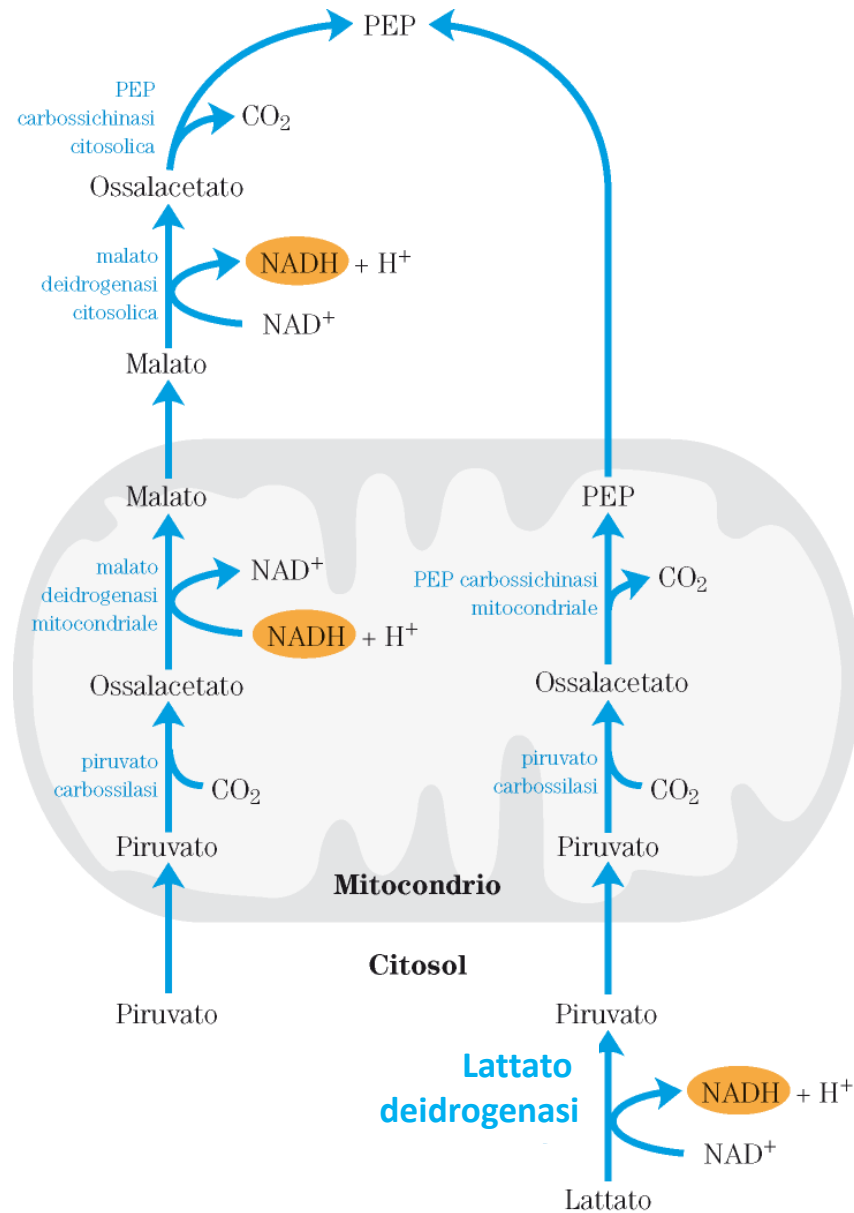


Defosforilazione del fruttosio 1,6-bisfosfato. AMP = adenosina monofosfato; P = fosfato.

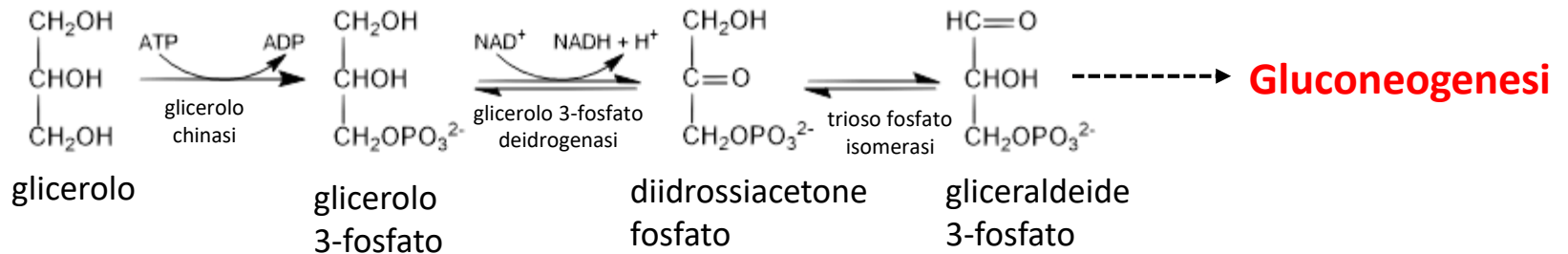
L'enzima fruttosio 1,6 bisfosfatasi aggrava la reazione irreversibile catalizzata dalla fosfofruttochinasi 1 nella glicolisi.

Questa reazione è un importante sito di regolazione della gluconeogenesi.

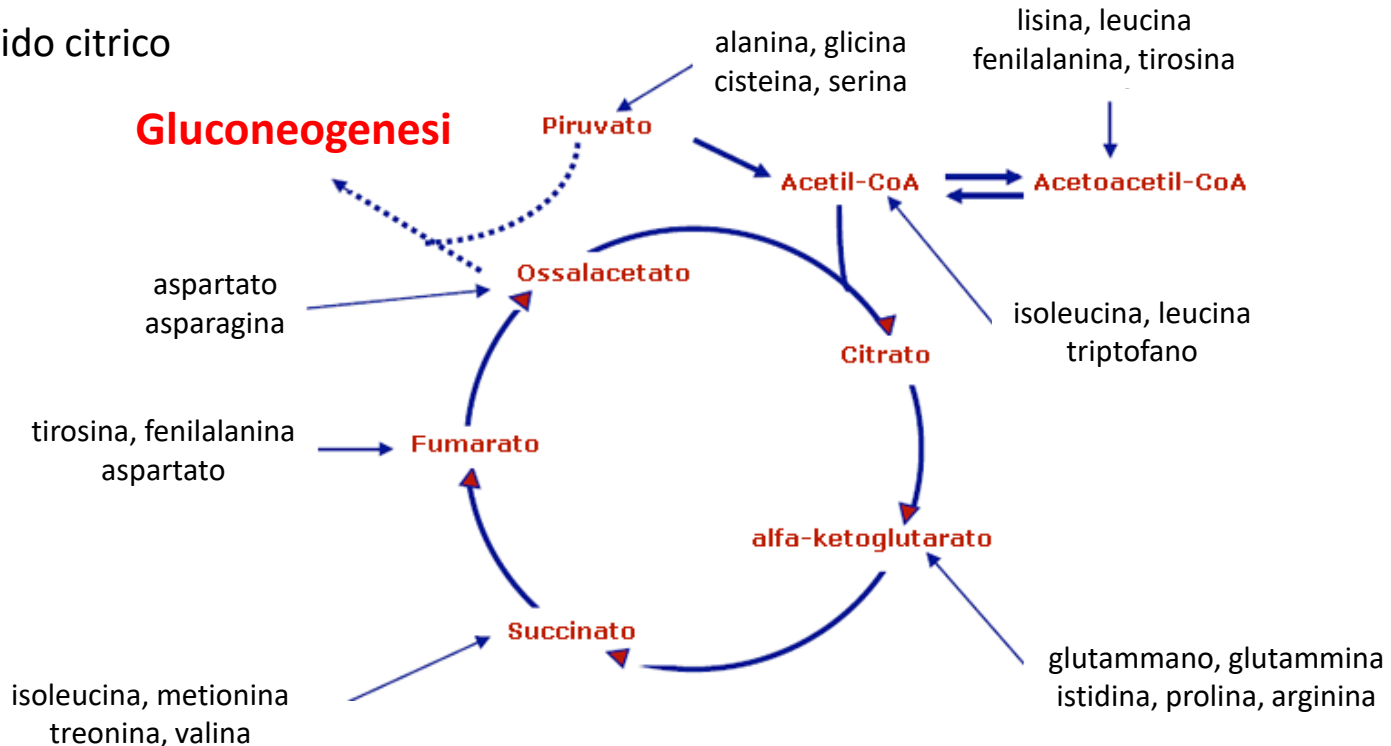
Il lattato nella gluconeogenesi



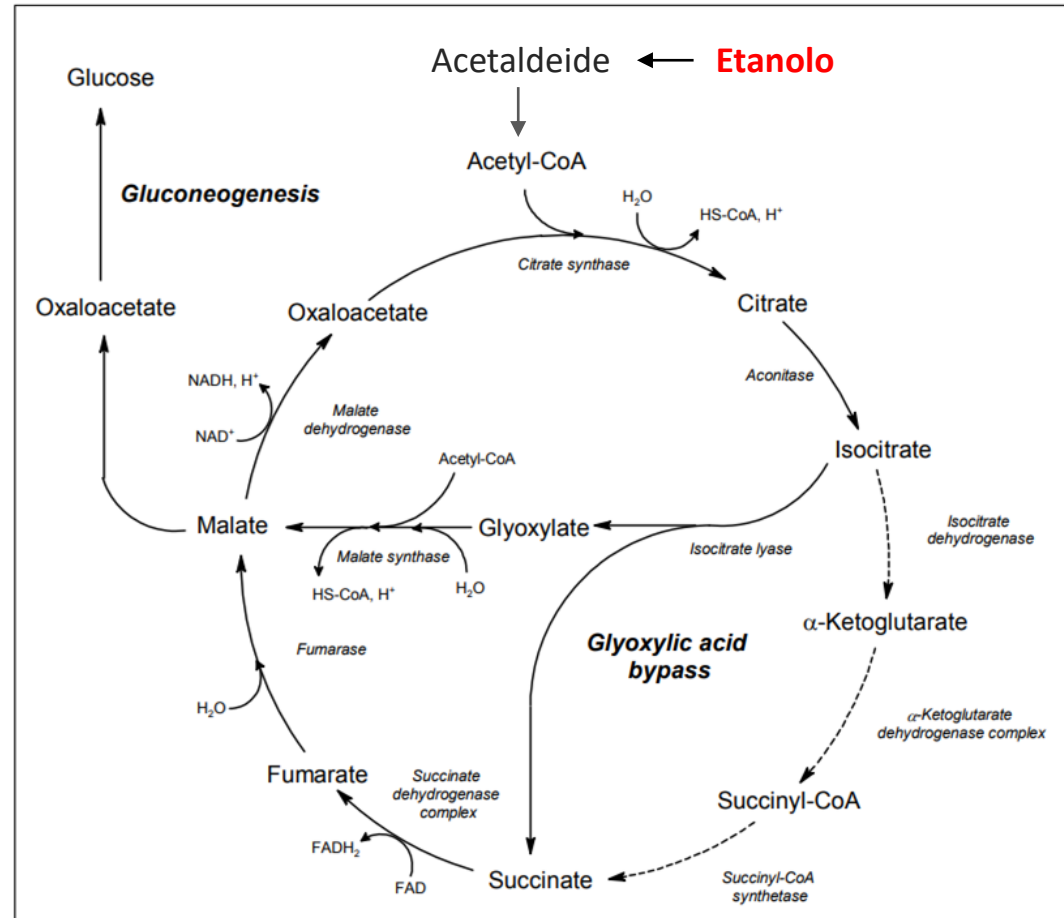
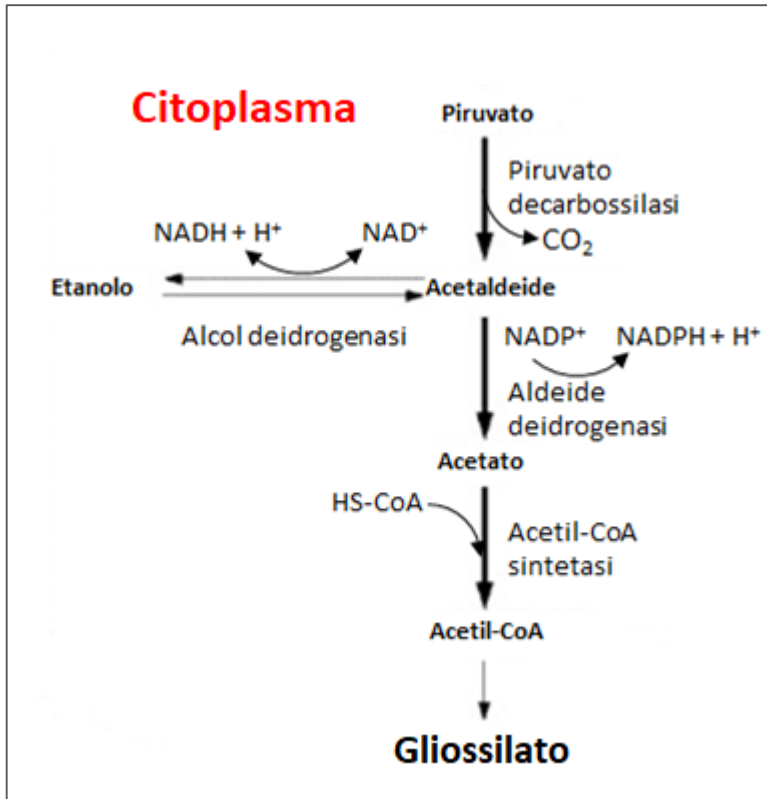
Il glicerolo e gli aminoacidi gluconeogenici



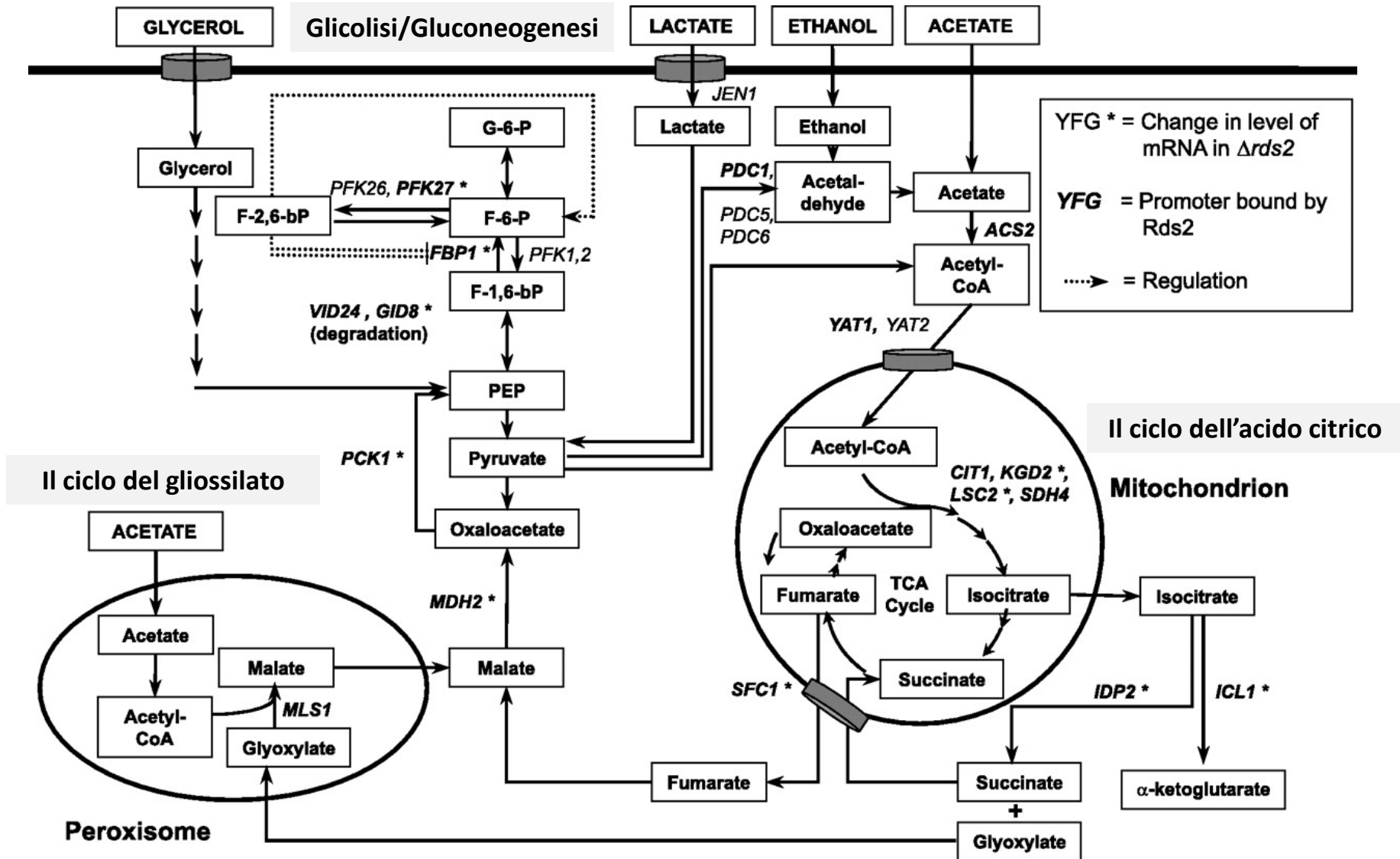
Ciclo dell'acido citrico



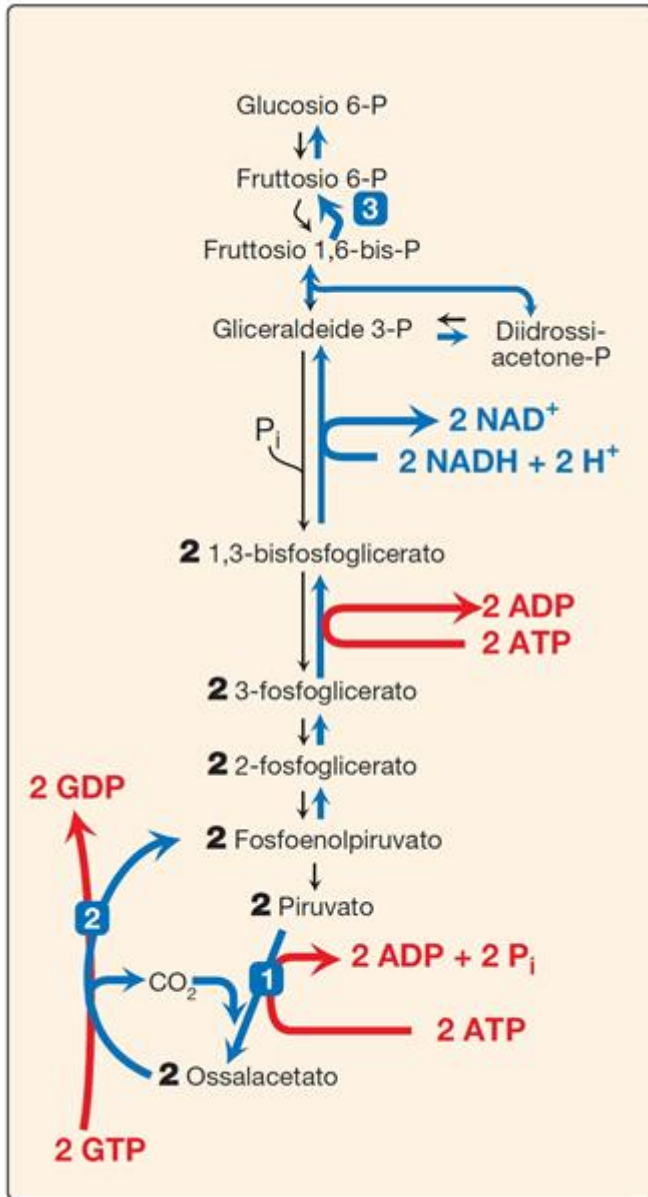
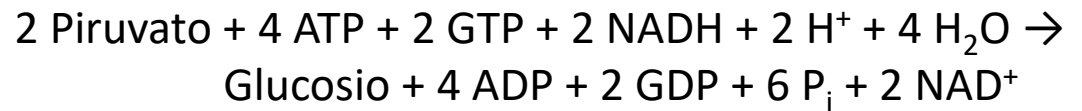
L'etanolo nella gluconeogenesi



Gluconeogenesi nel lievito e intermedi del ciclo dell'acido citrico e del ciclo del gliossilato



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

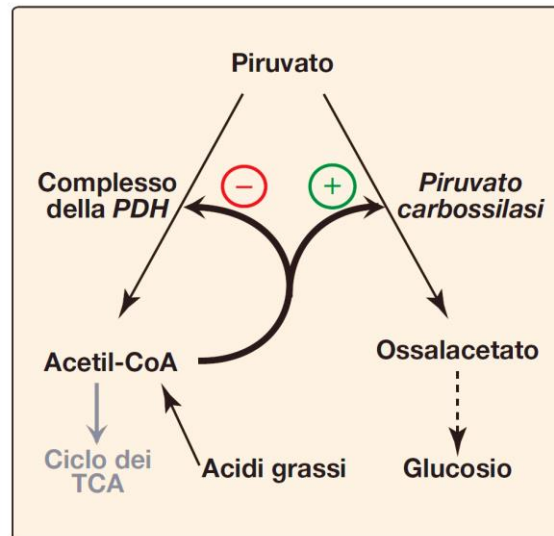
La regolazione dipende dallo stato energetico della cellula.

- 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:

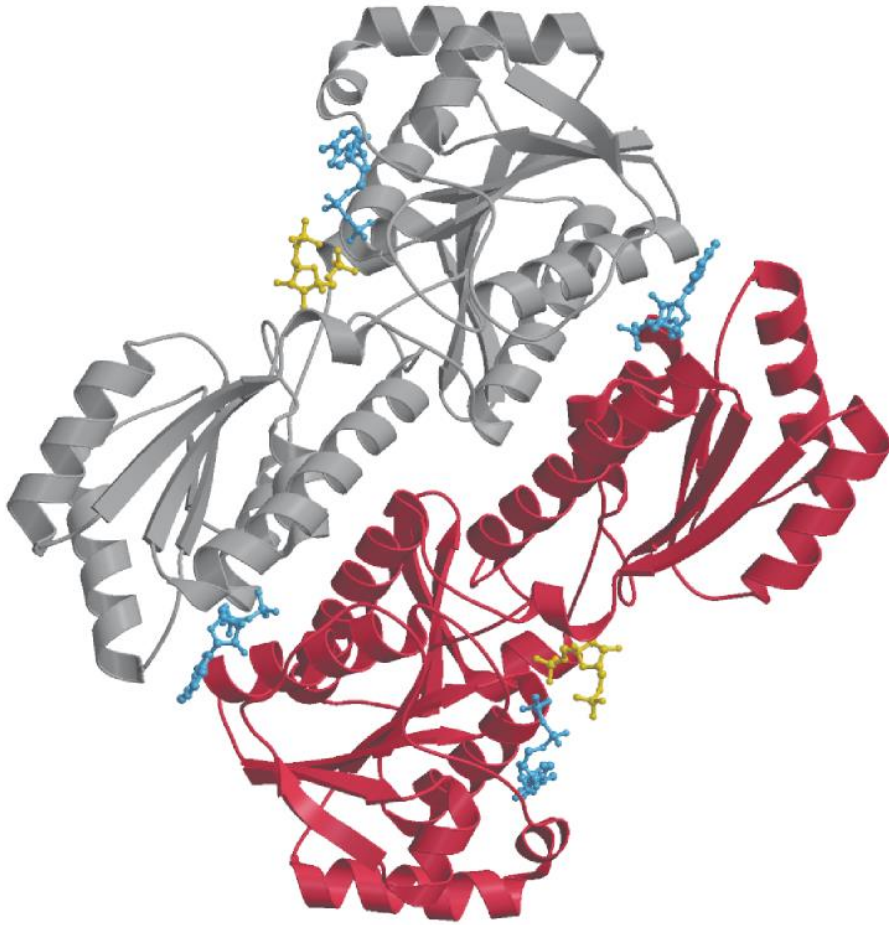
La disponibilità dei substrati, in particolare gli aminoacidi glucogenici, influenzano in modo significativo la velocità di sintesi del glucosio. L'ATP e il coenzima NADH necessari per la gluconeogenesi sono generati dall'ossidazione degli acidi grassi.

In carenza di zuccheri si verifica l'attivazione allosterica della piruvato carbossilasi da parte dell'acetil-CoA. La β -ossidazione è attiva con accumulo di acetil-CoA che determina l'attivazione della piruvato carbossilasi e la contemporanea inibizione della piruvato deidrogenasi. Questo meccanismo sottrae piruvato all'ossidazione e lo indirizza verso la gluconeogenesi.

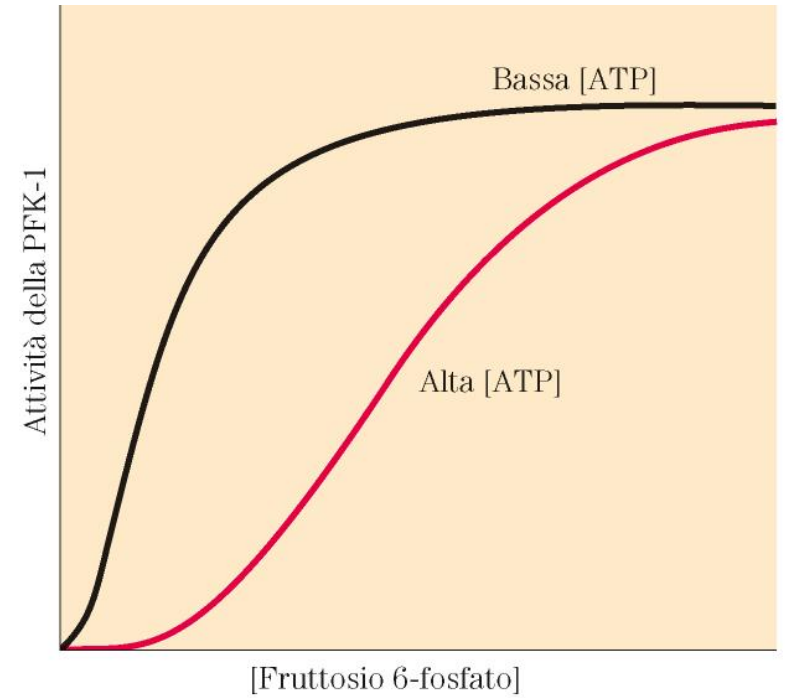


La fruttosio 1,6-bisfosfatasi è inibita dall'AMP invece attiva l'enzima della glicolisi, la fosfofruttochinasi 1. Questo meccanismo determina la regolazione reciproca della glicolisi e della gluconeogenesi. Livelli elevati di AMP stimolano le vie metaboliche che producono energia e inibiscono quelle che consumano energia.

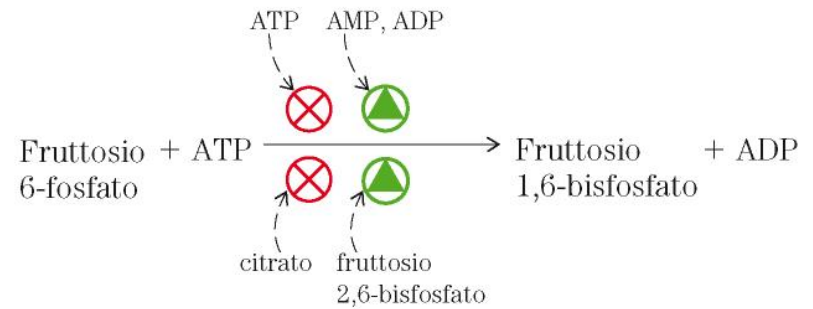
La fosfofruttochinasi-1 e la sua regolazione



(a)



(b)



(c)

Controllo della fosfofruttochinasi 1

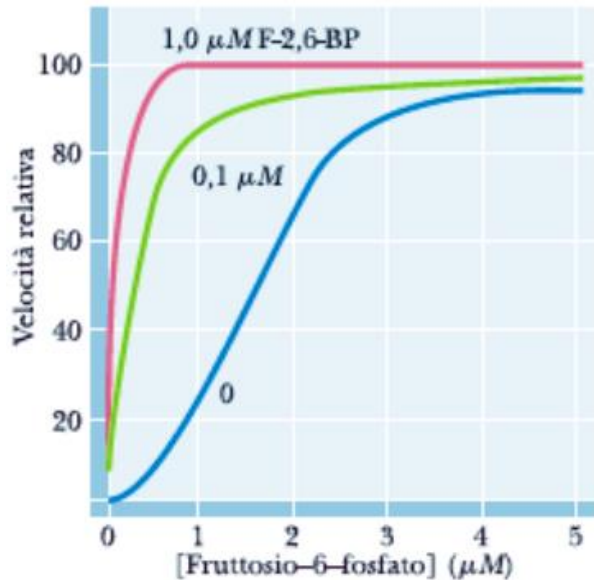
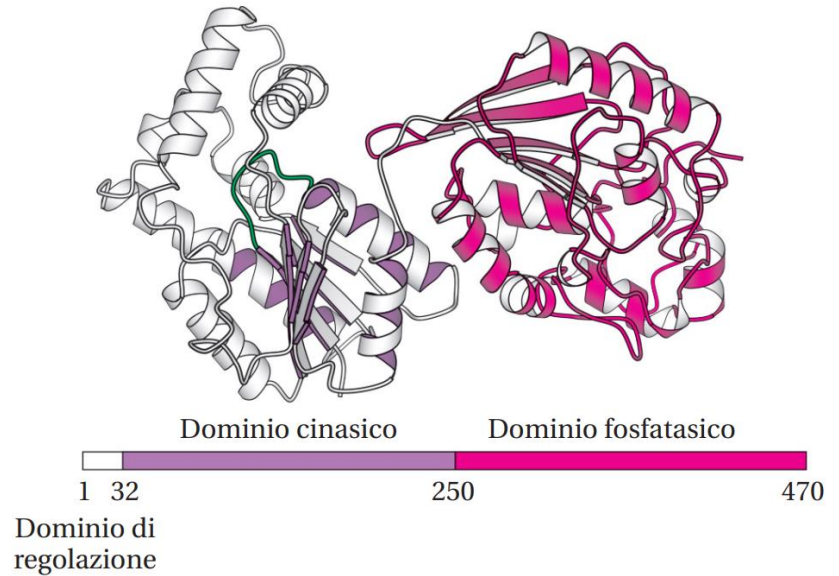


FIGURA 18.10 Il fruttosio-2,6-bisfosfato attiva la fosfofruttochinasi, aumentando l'affinità dell'enzima per il fruttosio-6-fosfato e ristabilendo la dipendenza iperbolica dell'attività enzimatica dalla concentrazione del substrato.

Il fruttosio 2,6 *bis*fosfato attiva la fosfofruttochinasi 1 diminuendo gli effetti inibitori dell'ATP.

Questo è un attivatore allosterico che sposta l'equilibrio conformazionale dell'enzima tetraedrico dallo stato T allo stato R.



Struttura dell'enzima tandem

Il fruttosio 2,6 bisfosfato si forma dalla fosforilazione del fruttosio 6 fosfato, una reazione catalizzata dalla fosfofruttochinasi 2, mentre viene defosforilato dalla fruttosio 2,6-*bis*fosfatasi, entrambi presenti in unica catena polipeptidica chiamato enzima a tandem

Regolazione della glicolisi

Regolazione della gluconeogenesi

Nel circolo sanguigno

Glucosio

Glucosio 6-fosfato

Fruttosio 6-fosfato

Fruttosio 1,6-bisfosfato

Fosfoenolpiruvato

Ossalacetato

Piruvato

Esochinasi

Glucosio 6-fosfatasi

Fosfofruttochinasi

Fruttosio 1,6-bisfosfatasi

Piruvato chinasi

Fosfoenolpiruvato carbossichinasi

Piruvato carbossilasi

(-) Glucosio 6-fosfato

Glucosio 6-fosfato controllo a livello del substrato

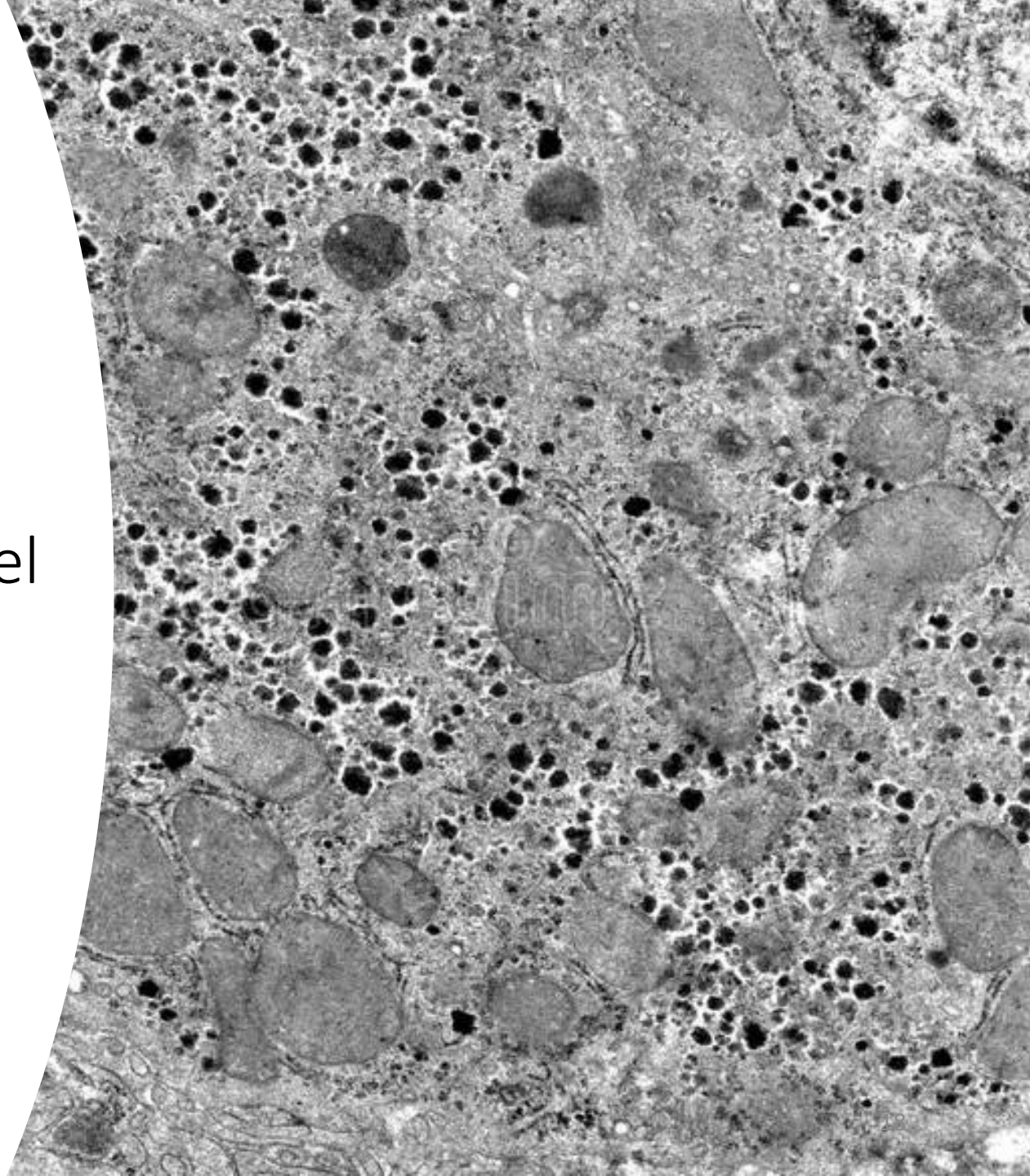
(+) Fruttosio 2,6-bisfosfato
(+) AMP
(-) ATP
(-) Citrato

(-) Fruttosio 2,6-BP
(-) AMP

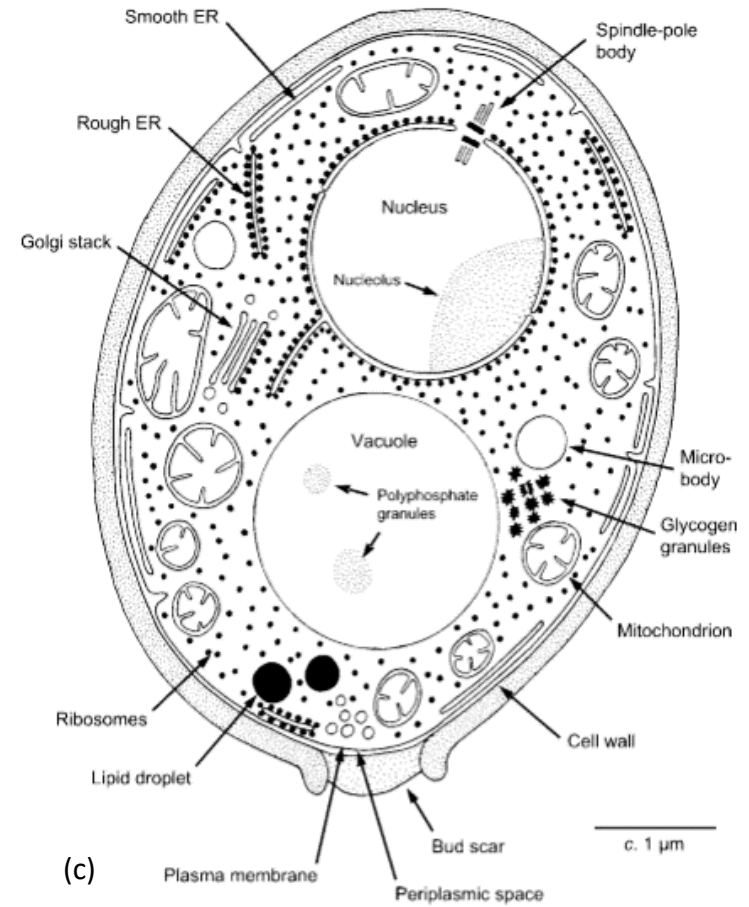
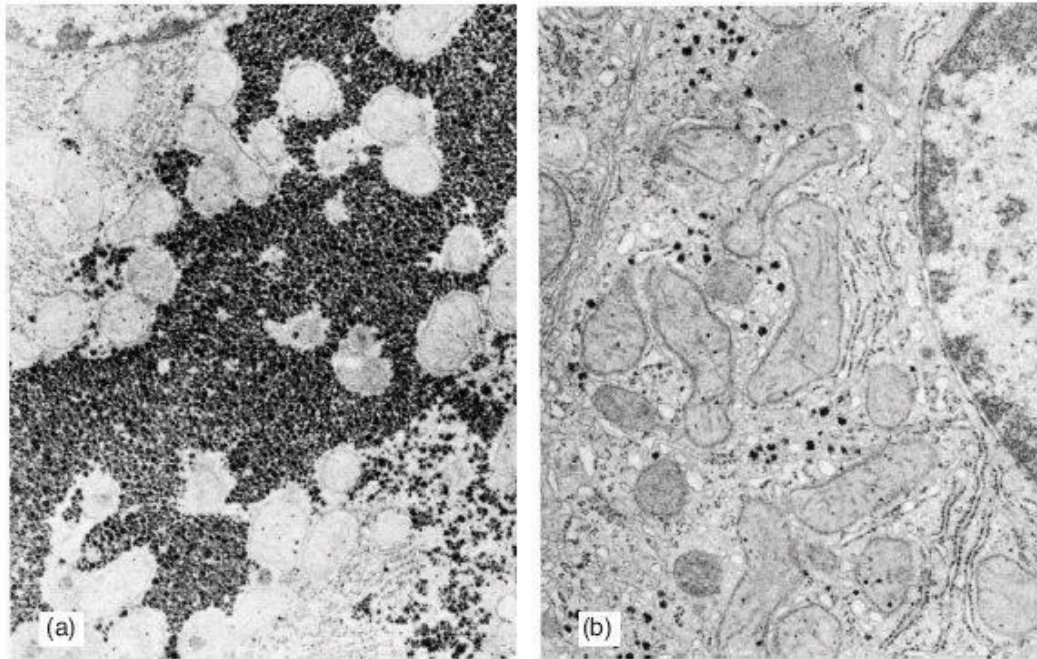
(+) Fruttosio 1,6 BP
(-) Acetil-CoA
(-) ATP
(-) Alanina
(-) Fosforilazione dipendente da cAMP

(+) Acetil-CoA

Metabolismo del Glicogeno



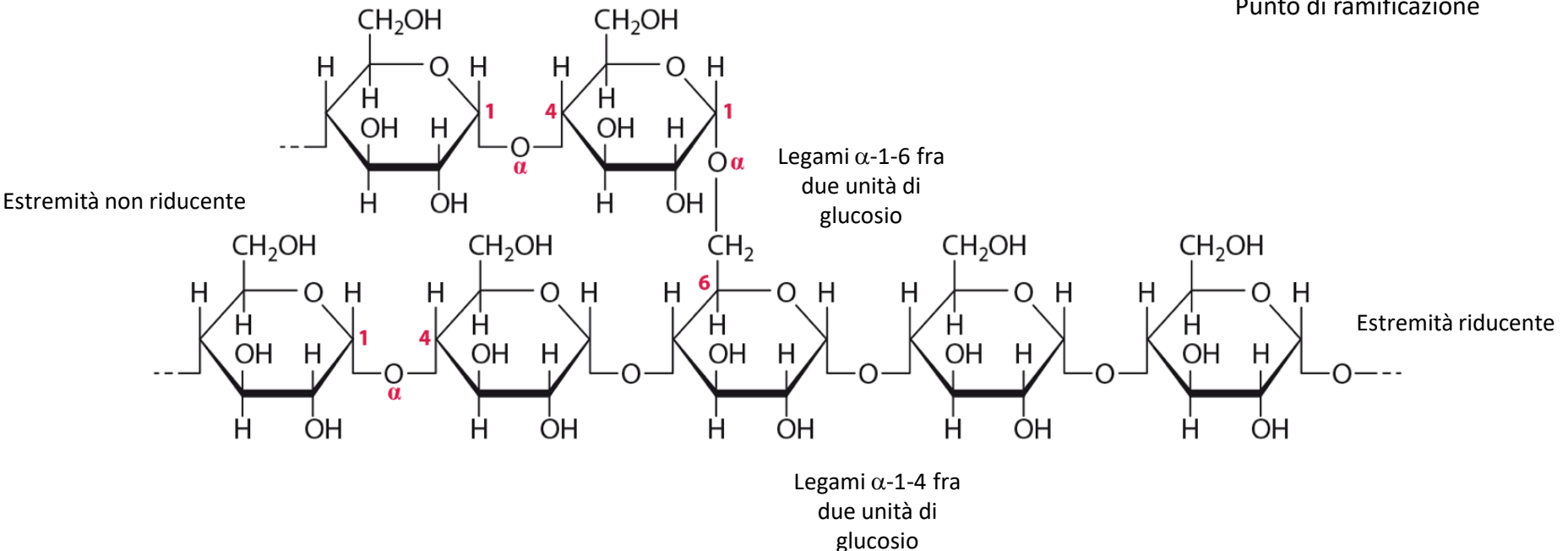
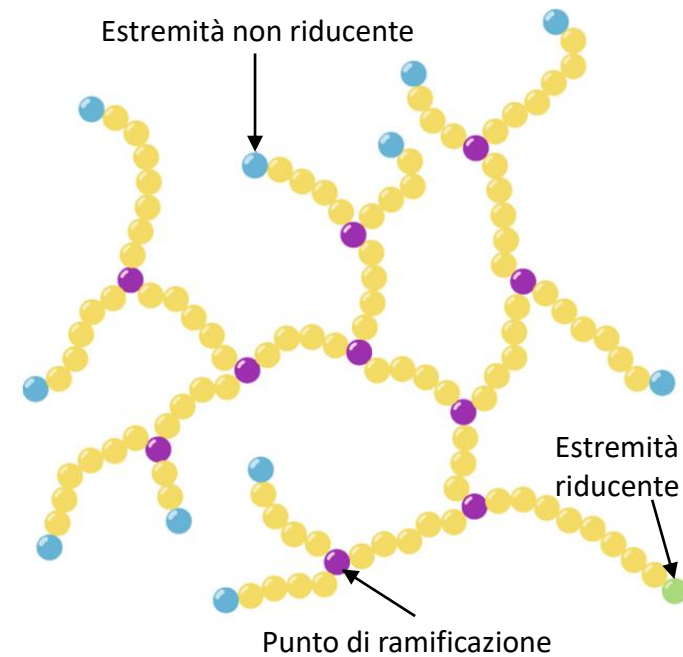
I granuli di glicogeno appaiono come macchie scure nelle fotografie al microscopio elettronico. Contengono gli enzimi che catalizzano la sintesi e la degradazione del glicogeno ed alcuni enzimi che regolano questi processi.



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 α (1-4) e ramificazioni α (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.

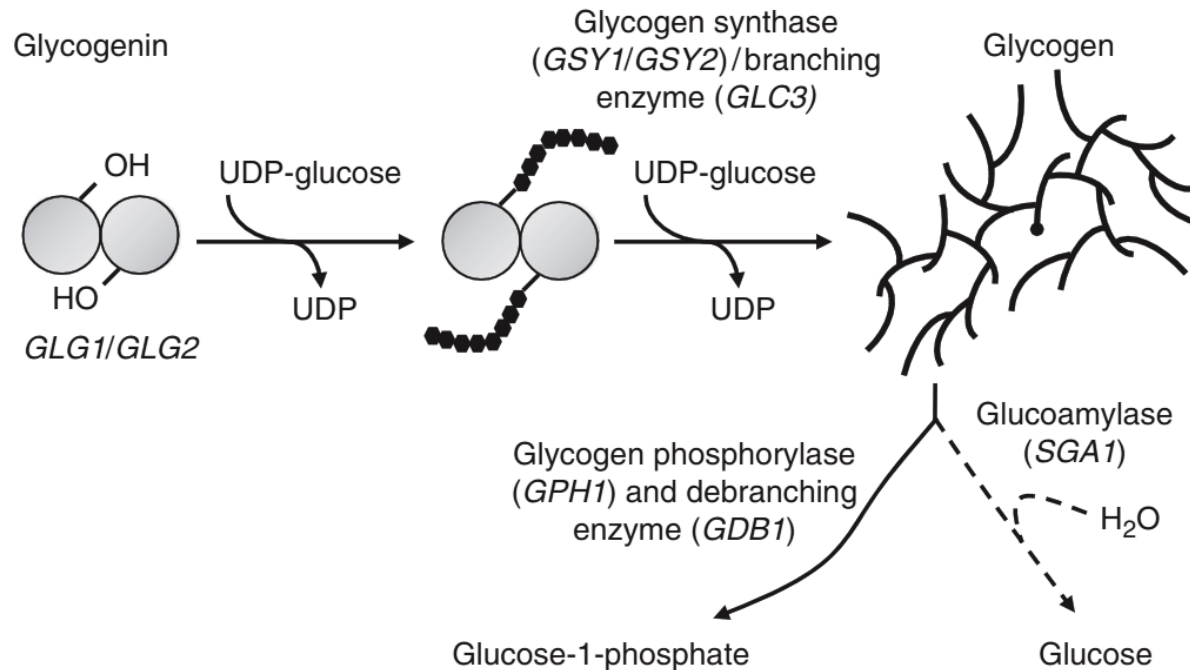


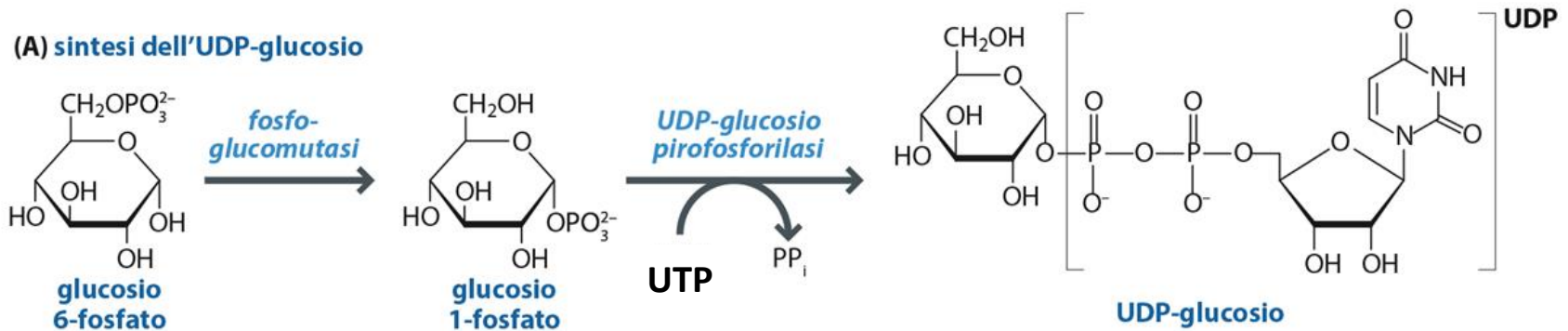
Fig. 1. Schematic representation of the pathways of glycogen synthesis and degradation in yeast. The initiator protein, glycogenin, attaches a glucose residue from UDPG to a tyrosine residue within its own sequence. Glycogenin then adds additional glucose residues, in α -1,4-glycosidic linkage, forming a short oligosaccharide. This oligosaccharide serves as a primer for glycogen synthase, which catalyzes bulk glycogen synthesis by processively adding additional glucose residues in α -1,4-glycosidic linkage. The branching enzyme introduces the α -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 α -1,4-linked glucose chains, and the debranching enzyme, which eliminates the α -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_n + UDP-glucosio \longrightarrow glicogeno_{n+1} + UDP

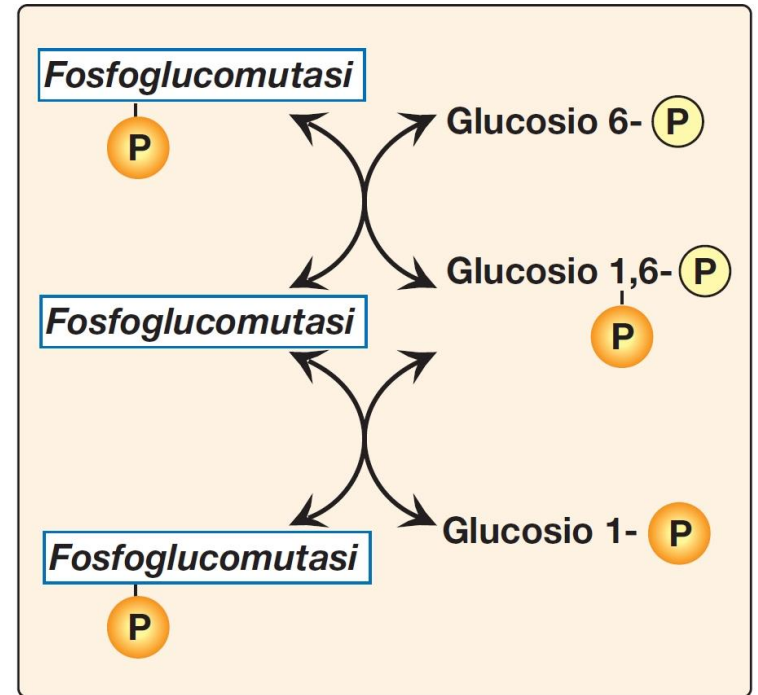
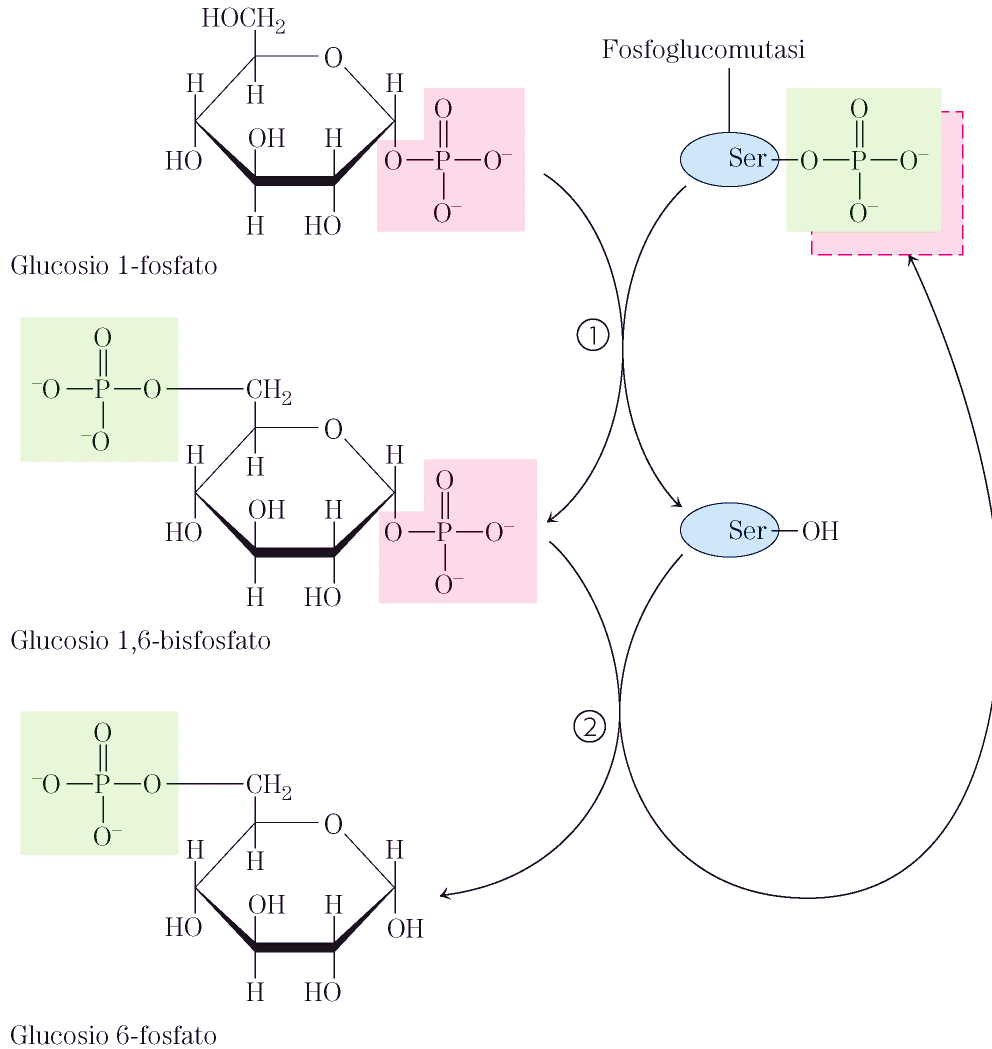
Degradazione: glicogeno_{n+1} + P_i \longrightarrow glicogeno_n + glucosio 1-fosfato

(A) sintesi dell'UDP-glucosio



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



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

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 α -1,4-glicosidici.

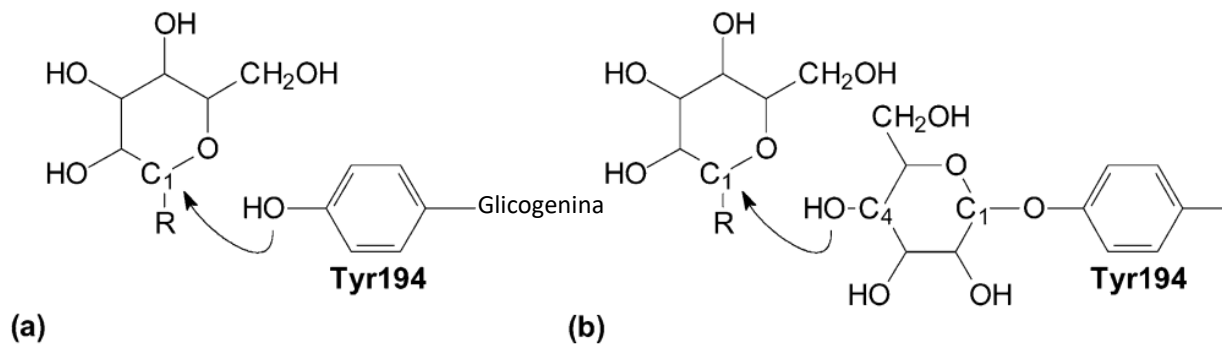
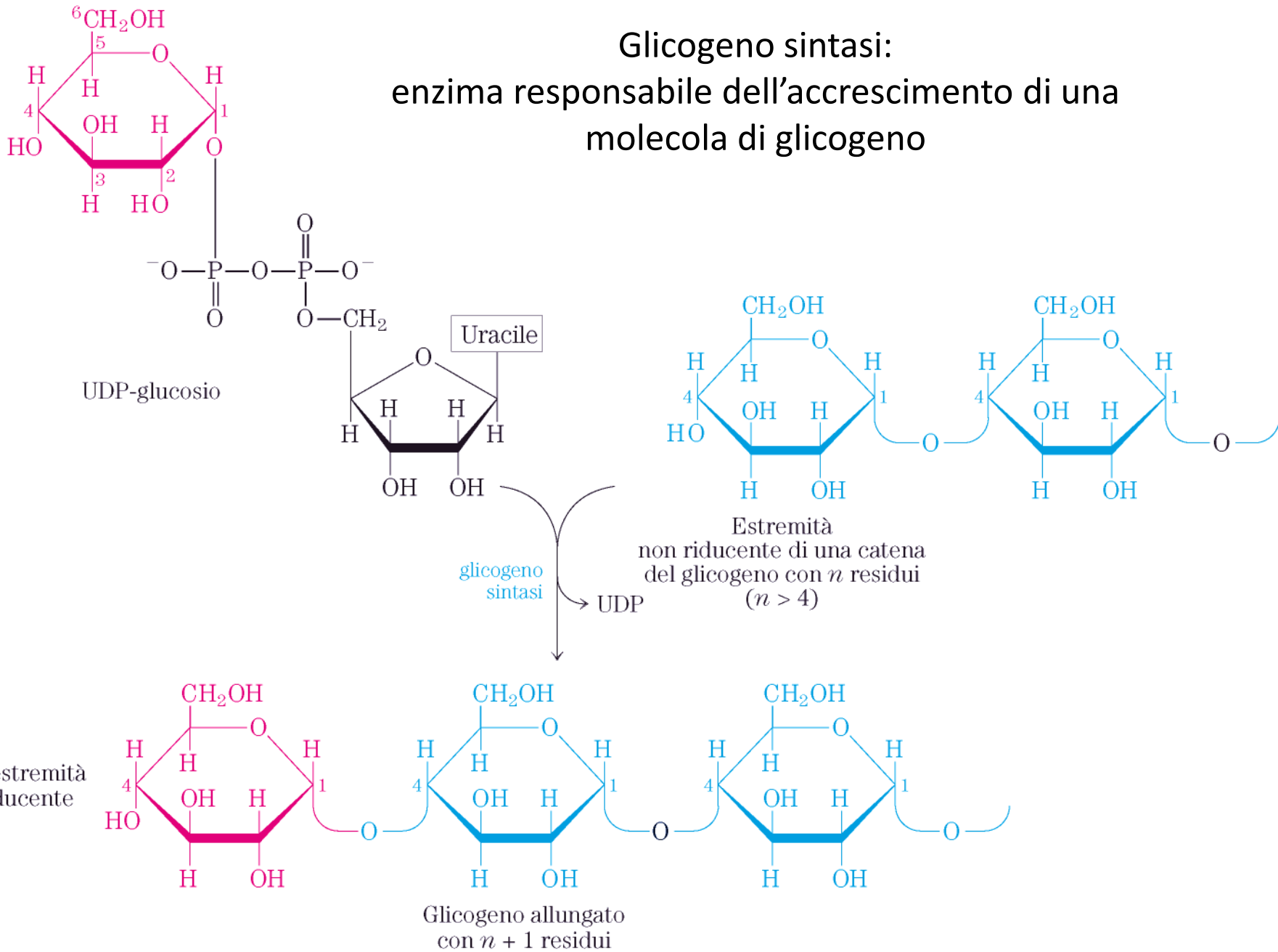


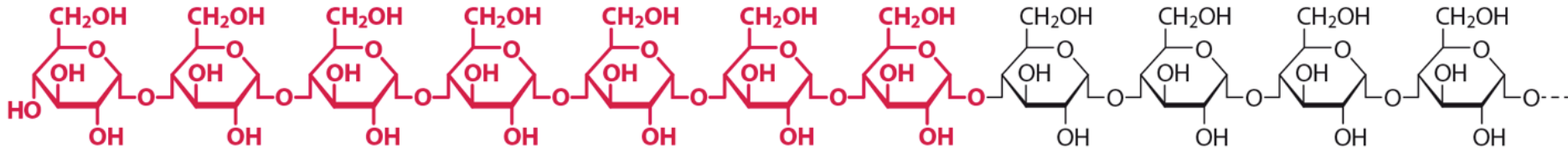
Figure 1. The two chemically distinct reactions catalyzed by glycogenin. (a) The initial glucosylation of the hydroxyl group of Tyr194 resulting in the formation of a glucose 1-O-tyrosyl linkage. (b) The subsequent glucosylation of the C4'-hydroxyl group of the terminal glucose on the nascent glycogen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

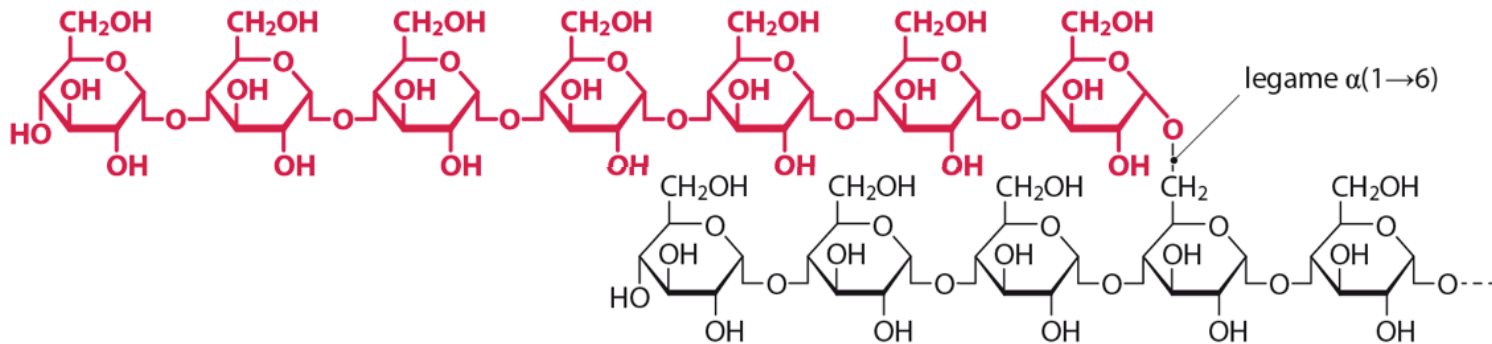


Enzima ramificante



Rimuove un frammento di 6 o 7 residui della catena principale e lo riattacca a questa con legame $\alpha(1\rightarrow6)$.

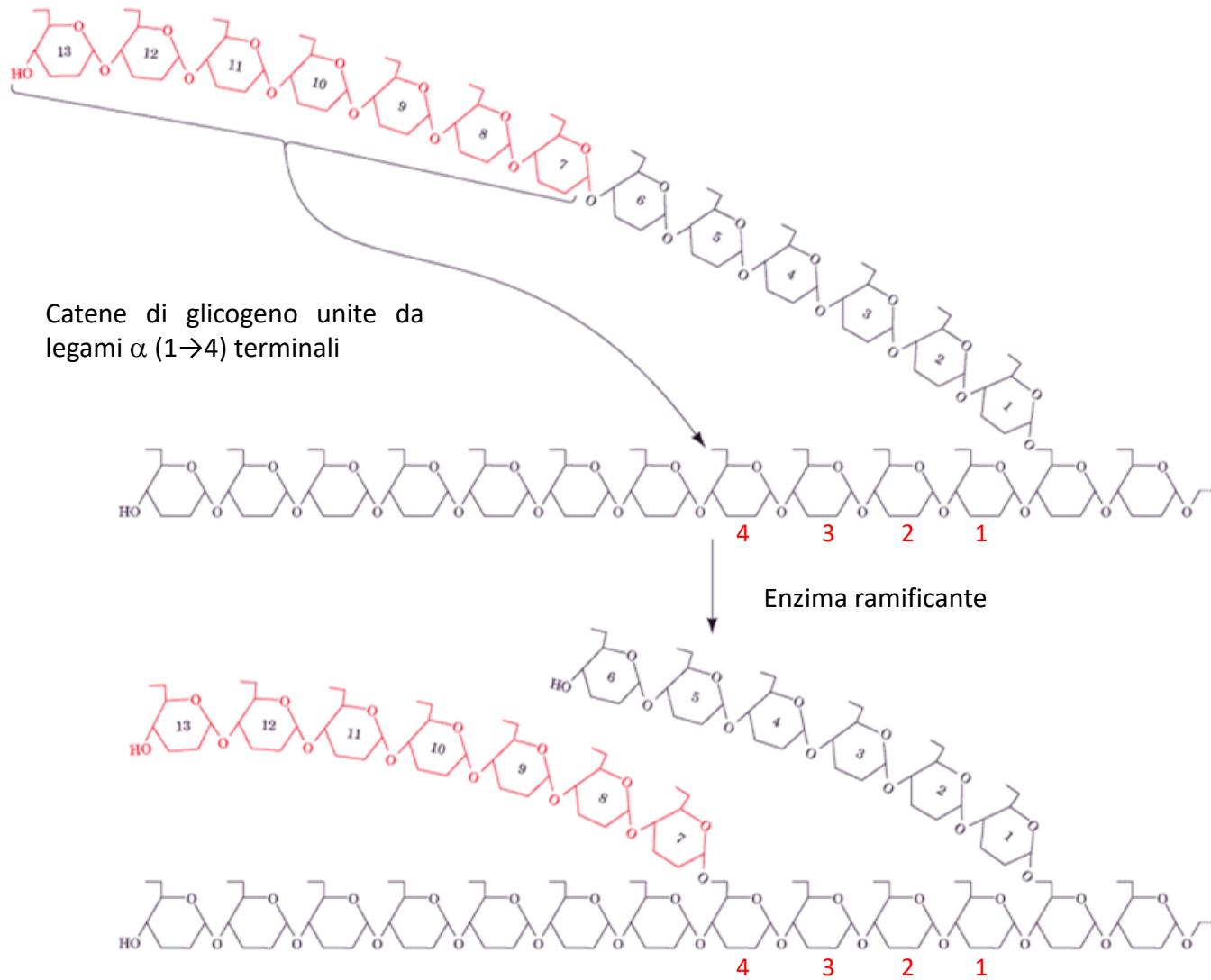
↓
enzima ramificante



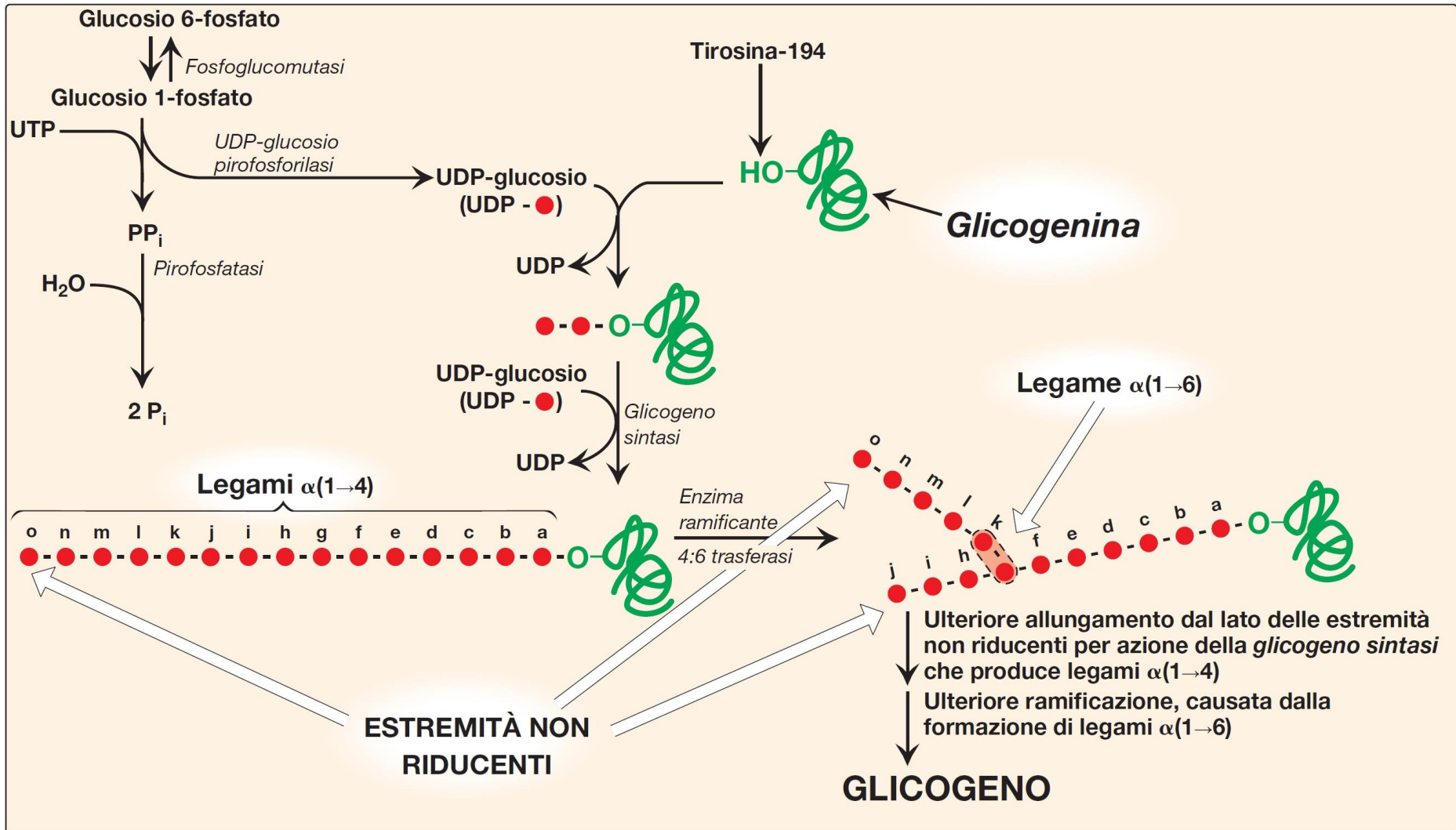
L'enzima ramificante che catalizza questa reazione è molto preciso:

- 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

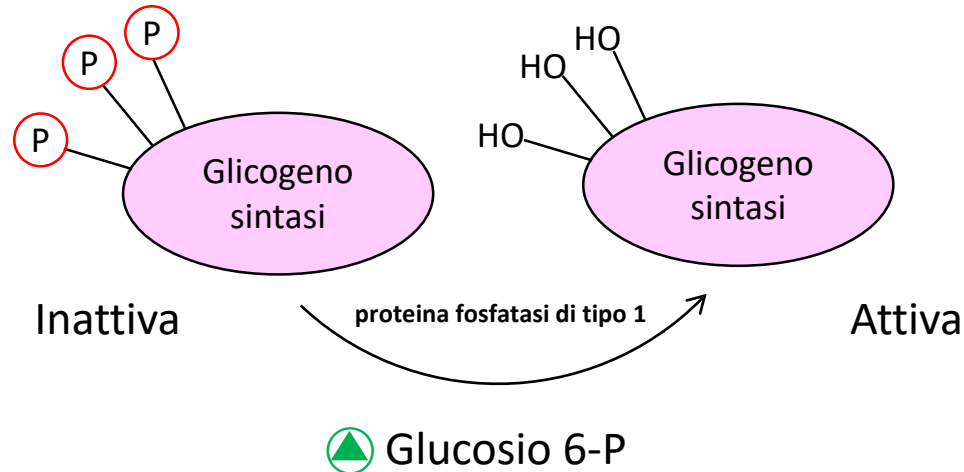


Sintesi del glicogeno. UTP = uridina trifosfato; UDP = uridina difosfato; PP_i = pirofosfato; P_i = fosfato inorganico.

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

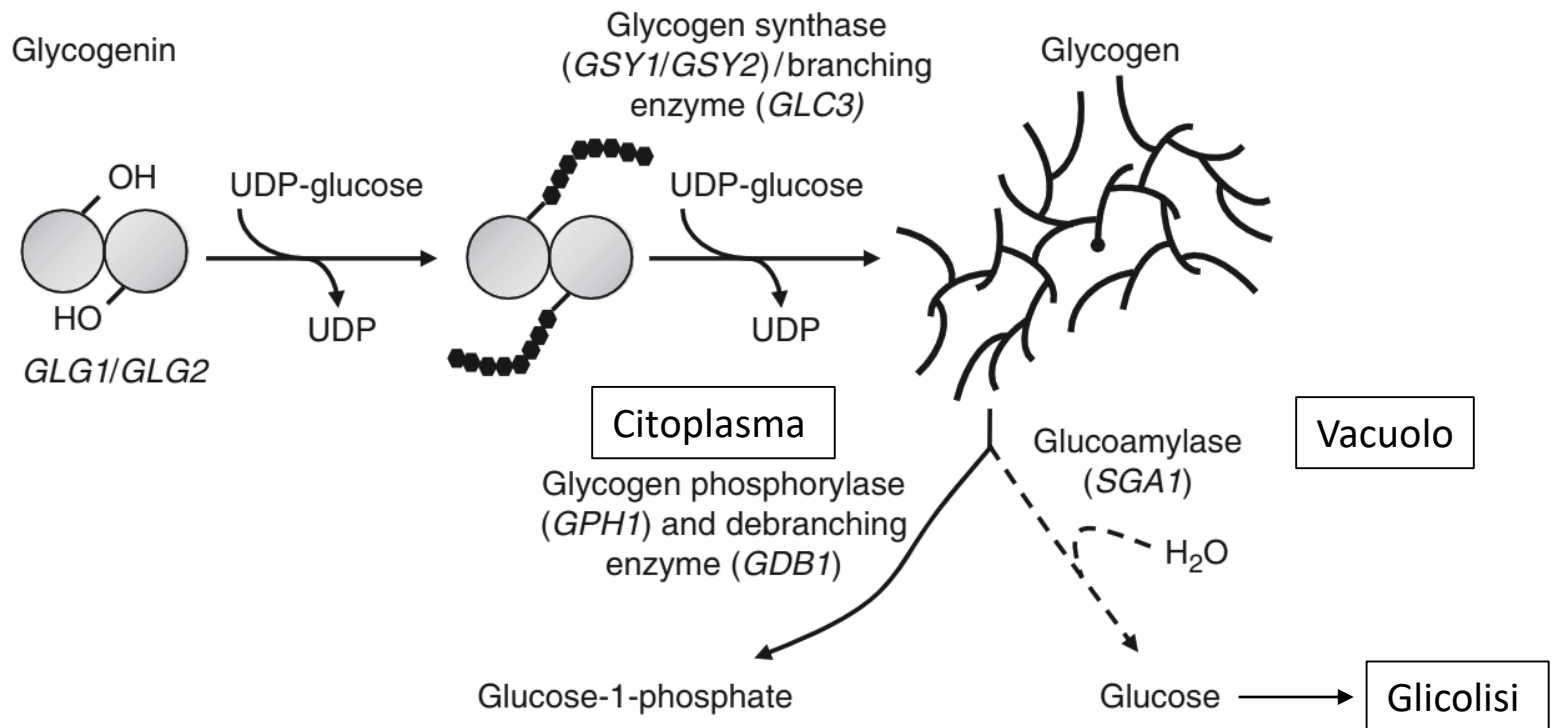


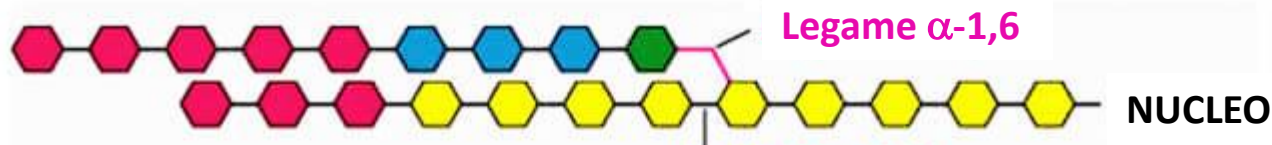
Nei lieviti, la proteina fosfatasi di tipo 1, codificata da GLC7, è la principale fosfatasi che regola l'accumulo di glicogeno, anche se sembra esserci una fosfatasi di tipo 2.

L'attivazione del glicogeno sintasi (aumento glucosio-6-P) comporta aumento e accumulo di glicogeno.

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 α -1,4 legate. L'enzima non è in grado di scindere i punti di ramificazione α -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.





La degradazione del glicogeno fornisce glucosio per la glicolisi

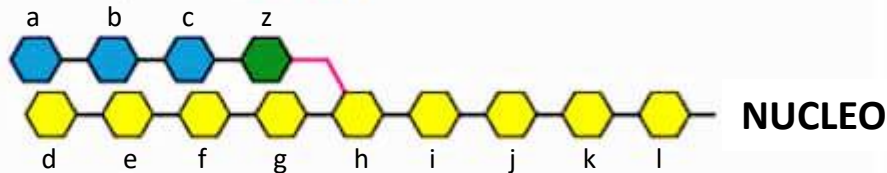
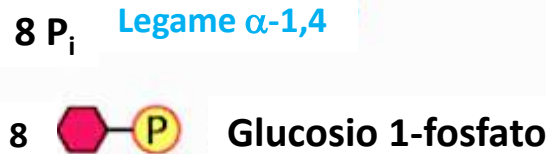
Enzima deramificante presenta due attività catalitiche distinte:

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

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

La glicogeno fosforilasi si ferma a 4 residui dal punto di ramificazione lasciando una destrina limite

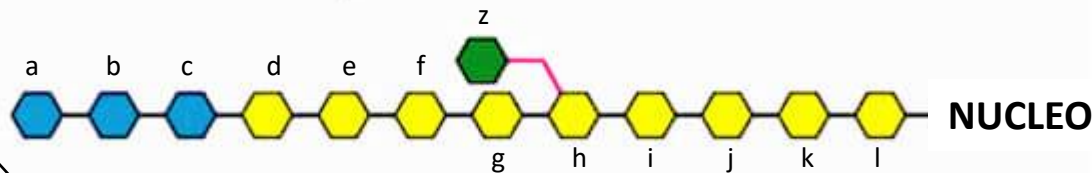
Fosforilasi



Transferasi

Gli ultimi 3 residui del ramo sono trasferiti sull'estremità libera della catena principale

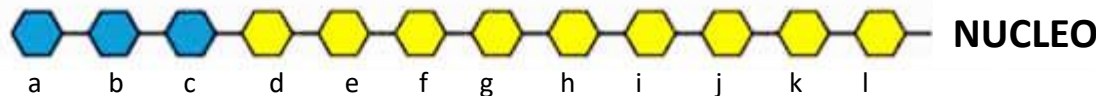
Interviene l'enzima bifunzionale deramificante



α-1,6-Glucosidasi

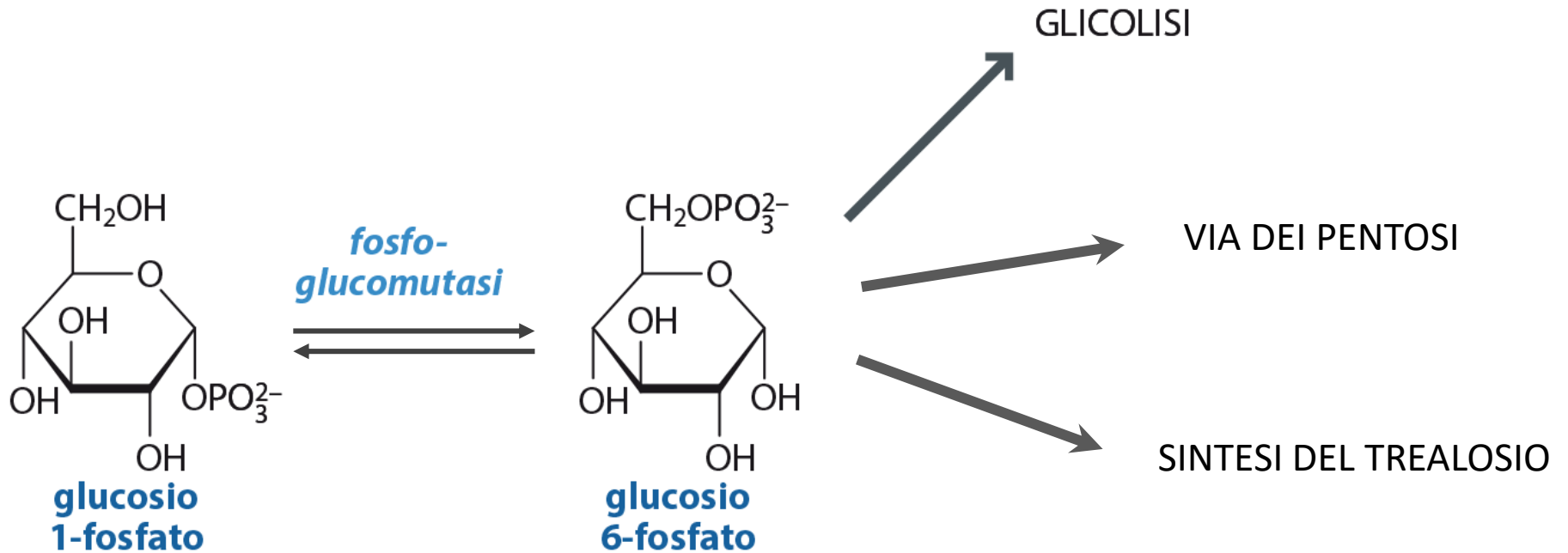


Scinde il legame α(1→6) liberando glucosio non fosforilato

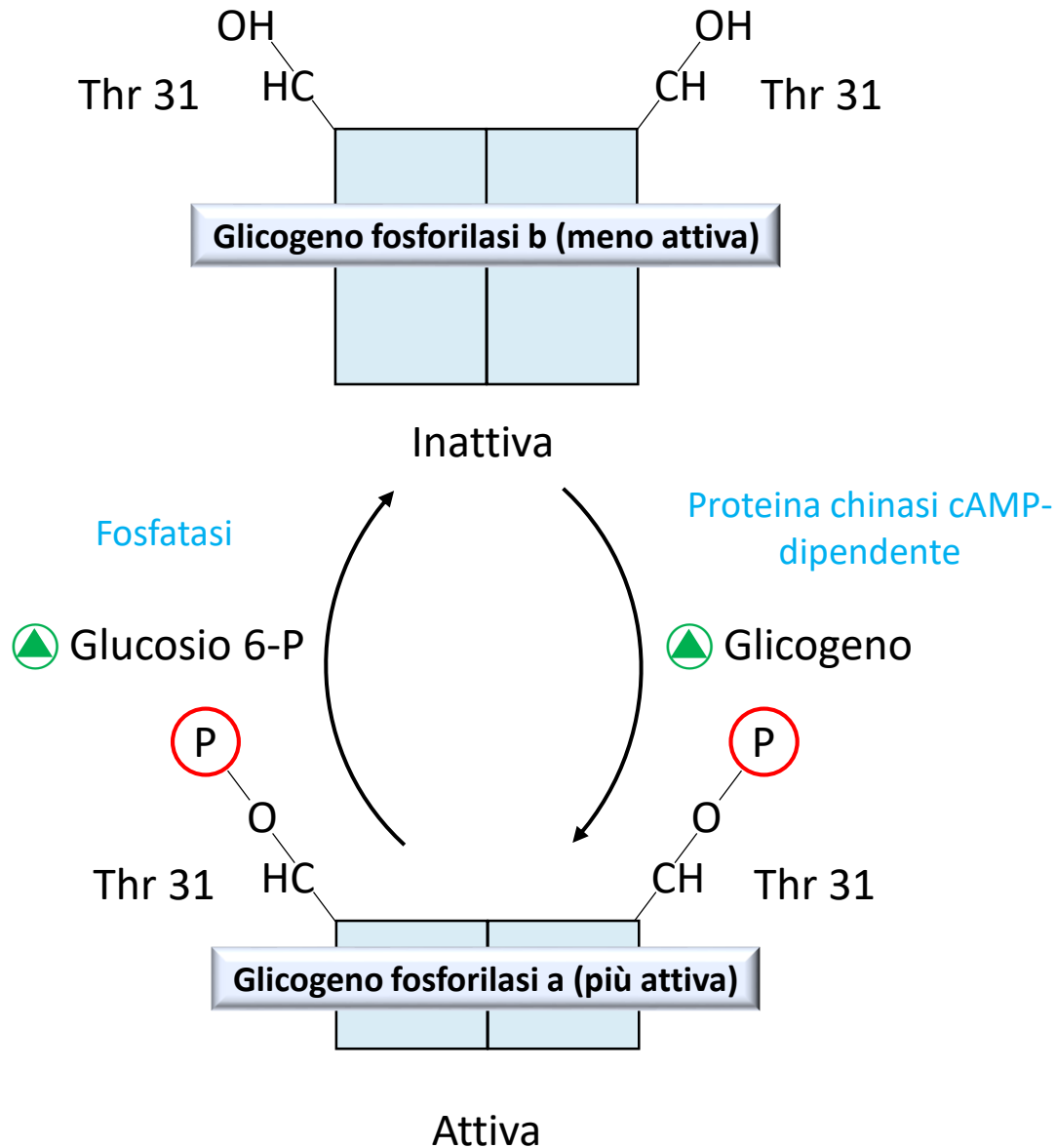


Glicogeno fosforilasi può rompere solo i legami α (1-4) quando incontra α (1-6) si ferma ed interviene l'enzima deramificante

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.

Il sito di fosforilazione della fosforilasi del lievito è una treonina situata nella regione N-terminale.

La fosforilasi del lievito è insensibile al glucosio ed è inibita in modo non competitivo dal glucosio-6-P ($K_i = 2-5$ mM), un incremento di esso facilita la defosforilazione e l'inattivazione dell'enzima.

Un altro importante fattore nel controllo della glicogeno fosforilasi è il glicogeno che facilita la fosforilazione spostando l'equilibrio dell'enzima da uno stato tetrameric (inattivo) a uno dimerico (attivo).

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

