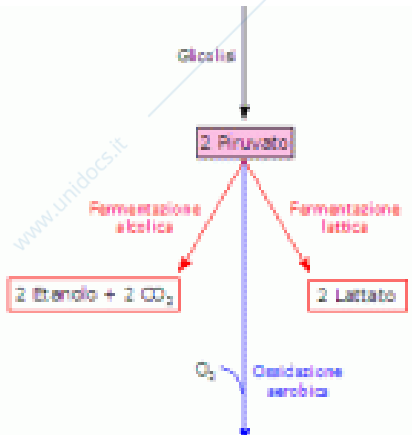


## Destino del piruvato e del NADH prodotti nella glicolisi

I prodotti della glicolisi sono tre: ATP, piruvato e NADH. Il NADH deve essere riossidato a  $\text{NAD}^+$  per permettere alla glicolisi di procedere. Il  $\text{NAD}^+$ , un coenzima derivante dalla vitamina niacina, è presente nella cellula in quantità limitata,  $\leq 10^{-5}\text{M}$ , valore ben inferiore a quello del glucosio metabolizzato in pochi minuti, e deve essere quindi continuamente rigenerato. E il passaggio finale della via glicolitica è proprio la sua rigenerazione dal NADH attraverso vie metaboliche aerobiche o anaerobiche, ognuna delle quali comporta un ulteriore metabolismo del piruvato, vie che permettono quindi il mantenimento del bilancio redox della cellula.



Il **piruvato** è una molecola assai versatile che può entrare in diverse vie metaboliche, sia anaboliche che cataboliche, a seconda del tipo di cellula, dello stato energetico della cellula e della disponibilità di ossigeno. Con l'esclusione di alcune "variazioni" che si incontrano nel mondo dei batteri, sfruttate anche dall'industria alimentare per la produzione di vari alimenti tra cui molti formaggi, sono essenzialmente tre le vie cataboliche che possono essere imboccate dal piruvato:

- la riduzione ad acido lattico, attraverso la **fermentazione lattica**;
- la riduzione ad alcol etilico, attraverso la **fermentazione alcolica**;
- l'**ossidazione aerobica**.

Questo permette alla glicolisi di procedere sia in condizioni anaerobiche che aerobiche. E' quindi anche possibile affermare, ampliando la visuale, che il destino catabolico dello scheletro carbonioso del glucosio è influenzato dal tipo di cellula, dal suo stato energetico e dalla disponibilità di ossigeno.

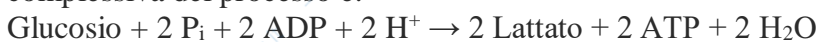
### Fermentazione lattica

Negli animali, con poche eccezioni, ed in molti microrganismi quando la disponibilità di ossigeno **non è sufficiente** a soddisfare le richieste energetiche della cellula, o se la cellula è priva di mitocondri, il piruvato prodotto dalla glicolisi viene **ridotto** a lattato nella reazione catalizzata dall'enzima citosolico **lattico deidrogenasi** (EC 1.1.1.27).



Nella reazione il NADH fornisce gli equivalenti riducenti e si ossida a  $\text{NAD}^+$ . L'equilibrio complessivo della reazione favorisce fortemente la formazione del lattato, come testimoniato anche dal valore del  $\Delta G^{\circ}$  pari a  $-6 \text{ kcal/mol}$  ( $-25,1 \text{ kJ/mol}$ ).

La conversione del glucosio in acido lattico viene definita **fermentazione lattica**. L'equazione complessiva del processo è:



Si noti che la **fermentazione**, scoperta da Louis Pasteur che la definì "*la vie sans l'air*", è un processo che:

- estrae energia dalla molecola del glucosio immagazzinandola in forma di ATP;

- non consuma ossigeno;
- non modifica la concentrazione del  $\text{NAD}^+$  o del  $\text{NADH}$ .

Riguardo ai coenzimi si noti che nell'equazione complessiva della fermentazione lattica non compaiono né  $\text{NAD}^+$  né  $\text{NADH}$ , sebbene entrambe cruciali nel processo. Quindi **non si verifica** alcuna ossidoriduzione netta. In altri termini, nel passaggio da glucosio  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , a lattato,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ , il rapporto H:C non varia. Dal punto di vista energetico va sottolineato che la fermentazione permette di estrarre una **ridotta quantità** dell'energia chimica contenuta nella molecola del glucosio.

Nell'uomo molto del lattato prodotto entra nel ciclo di Cori, per essere riutilizzato nella gluconeogenesi. In definitiva si può anche affermare che la produzione di lattato sposta parte del carico metabolico dalla periferia, ad esempio dal **muscolo scheletrico** di un atleta impegnato in un esercizio molto intenso, come uno sprint, quando la velocità della glicolisi può quasi istantaneamente aumentare anche di 2000 volte, al fegato. Al contrario del muscolo scheletrico che rilascia in circolo lattato, il **muscolo cardiaco** è in grado di assumere lattato ed utilizzarlo come carburante per produrre ATP, grazie alle proprietà dell'isoenzima cardiaco della lattico deidrogenasi, indicato come  $\text{H}_4$ , e al suo metabolismo completamente aerobico. Quindi, parte del lattato rilasciato dal muscolo scheletrico sottoposto ad un lavoro intenso sarà utilizzato dal muscolo cardiaco come carburante.

Nota: il lattato prodotto dai microorganismi durante la fermentazione lattica è responsabile sia del profumo che del gusto dei crauti, ossia dei cavoli fermentati, come anche del gusto del latte acido.

### Fermentazione alcolica

In microorganismi come il lievito di birra e il lievito da panificazione, ma anche in certi tessuti vegetali, e in alcuni invertebrati e protisti, il piruvato, in condizioni ipossiche o anerobiche, può essere **ridotto** in due passaggi ad alcol etilico o etanolo, con liberazione di  $\text{CO}_2$ . Il primo passaggio comporta la **decarbossilazione non ossidativa** del piruvato a dare acetaldeide, una reazione essenzialmente irreversibile. La reazione è catalizzata dalla piruvato decarbossilasi (EC 4.1.1.1), enzima che richiede la presenza di  $\text{Mg}^{2+}$  e tiamina pirofosfato, un coenzima derivante dalla vitamina tiamina o vitamina  $\text{B}_1$ . L'enzima è assente nei tessuti dei vertebrati e negli altri organismi che operano la fermentazione lattica. Nel secondo passaggio si verifica la **riduzione** dell'acetaldeide ad etanolo nella reazione catalizzata dalla alcol deidrogenasi (EC 1.1.1.1), enzima che ha un atomo di zinco legato nel sito attivo. Nella reazione il  $\text{NADH}$  fornisce gli equivalenti riducenti e si ossida a  $\text{NAD}^+$ . A pH neutro, l'equilibrio della reazione è fortemente spostato verso la formazione dell'alcol etilico. La conversione del glucosio in etanolo e  $\text{CO}_2$  viene definita **fermentazione alcolica**. La reazione complessiva è:



E, al pari della fermentazione lattica, anche nella fermentazione alcolica non si verifica alcuna ossido-riduzione netta.

La fermentazione alcolica è alla base della produzione della birra e del vino. Da notare che la  $\text{CO}_2$  prodotta dal lievito di birra è responsabile delle caratteristiche bollicine della birra, dello champagne e dello spumante, mentre quella prodotta dal lievito usato nella panificazione porta alla lievitazione dell'impasto.

### Destino del piruvato e del $\text{NADH}$ in condizioni aerobiche

Nelle cellule dotate di mitocondri e in condizioni aerobiche, la situazione più comune negli organismi multicellulari e in molti unicellulari, l'ossidazione del  $\text{NADH}$  ed il catabolismo del piruvato seguono **vie distinte**. Il **piruvato** viene dapprima convertito in acetil-CoA nella reazione catalizzata dal complesso

multienzimatico mitocondriale della piruvato deidrogenasi. Nella reazione, una **decarbossilazione ossidativa**, la molecola perde un atomo di carbonio in forma di  $\text{CO}_2$ , e l'unità a due atomi di carbonio rimanente è legata al Coenzima A a dare acetil-coenzima A o semplicemente acetil-CoA.



Il gruppo acetilico dell'acetil-CoA è quindi completamente ossidato a  $\text{CO}_2$  attraverso le reazioni del ciclo dell'acido citrico, con produzione di ulteriore NADH, ed anche di  $\text{FADH}_2$ . La piruvato deidrogenasi rappresenta quindi un ponte tra la glicolisi, che si verifica nel citosol, e il ciclo dell'acido citrico, una via metabolica mitocondriale. Gli **elettroni** derivati dalle ossidazioni che si verificano durante la glicolisi sono trasportati nel mitocondrio a seguito della **riduzione** di intermedi metabolici citosolici. In questo modo nel citosol viene rigenerato  $\text{NAD}^+$  dal NADH, mentre l'intermedio ridotto, una volta nella matrice mitocondriale, è riossidato grazie al trasferimento dei suoi equivalenti riducenti al Complesso I della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale. In questa sede gli elettroni passano all'ossigeno a dare  $\text{H}_2\text{O}$ , trasferimento che fornisce l'energia necessaria per la sintesi dell'ATP attraverso il processo della **fosforilazione ossidativa**. Ovviamente anche gli elettroni trasportati dal NADH prodotto nella reazione catalizzata dalla piruvato deidrogenasi e nel ciclo dell'acido citrico, e quelli del  $\text{FADH}_2$ , seguono un analogo destino. Nota: il  $\text{FADH}_2$  cede i suoi equivalenti riducenti non al Complesso I ma al Complesso II.

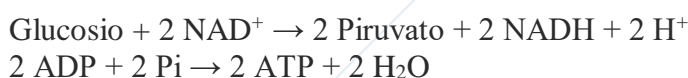
### Destino anabolico del piruvato

In condizioni anaboliche lo scheletro carbonioso del piruvato può avere destini diversi dalla completa ossidazione a  $\text{CO}_2$ , o dalla conversione in lattato. Infatti, previa conversione in acetil-CoA, potrà essere utilizzato ad esempio per la sintesi degli **acidi grassi**, o dell'aminoacido alanina (vedi Fig. 3).

### Glicolisi e produzione di ATP

Nella via glicolitica una molecola di glucosio viene convertita in due di piruvato. Nella prima fase, la fase preparatoria, sono consumate due molecole di ATP nelle reazioni catalizzate dalla **esochinasi** e dalla **PFK-1**. Nella seconda fase, la fase di recupero energetico, sono prodotte 4 molecole di ATP attraverso fosforilazioni a livello del substrato nelle reazioni catalizzate dalla fosfoglicerato chinasi e dalla piruvato chinasi. Quindi si ha un guadagno netto di **due molecole di ATP** per molecola di glucosio metabolizzata. In più, nella reazione catalizzata dalla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, per ogni molecola di glucosio sono prodotte due molecole di NADH.

Il  $\Delta G^\circ$  dell'intero processo è pari a **-20,3 kcal/mol** (-85 kJ/mol), valore che deriva dalla differenza tra il  $\Delta G^\circ$  della conversione del glucosio in due molecole di piruvato, pari a -34,9 kcal/mol (146 kJ/mol), e il  $\Delta G^\circ$  della formazione dell'ATP da ADP e  $\text{P}_i$ , pari a  $2 \times 7,3 \text{ kcal/mol} = 14,6 \text{ kcal/mol}$  ( $2 \times 30,5 \text{ kJ/mol} = 61 \text{ kJ/mol}$ ). Di seguito le due reazioni.

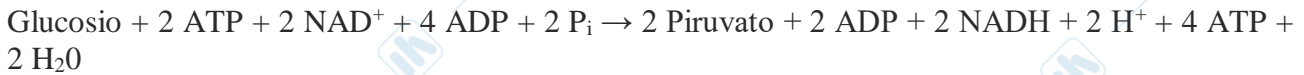


La somma delle due reazioni dà la reazione complessiva della glicolisi.



Dunque, in condizioni standard, la quantità di energia libera rilasciata che viene immagazzinata nell'ATP corrisponde a:  $(14,6/34,9) \times 100 = 41,8 \%$ .

Nota: l'equazione complessiva della glicolisi può anche essere derivata considerando tutti i reagenti in ingresso ed i prodotti.



Eliminando i termini comuni si ottiene l'equazione complessiva mostrata sopra.

### Glicolisi e produzione di ATP in condizioni anaerobiche

In **condizioni anaerobiche**, a prescindere da quello che sarà il destino metabolico del piruvato, conversione in lattato, etanolo o altre molecole, **non sono prodotte** altre molecole di ATP a valle della glicolisi.

Quindi in queste condizioni la glicolisi permette di estrarre solamente una frazione dell'energia chimica contenuta nella molecola del glucosio, pari a 679 kcal/mol (2840 kJ/mol) rilasciate a seguito della sua ossidazione a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Infatti, la conversione del glucosio in due molecole di piruvato porta al rilascio di 34,9 kcal/mol, il che significa che solamente il **5%**,  $[(34,9/679) \times 100]$ , dell'energia chimica contenuta nella molecola del glucosio è rilasciata a seguito della sua conversione in piruvato. Quindi il piruvato contiene ancora la maggior parte dell'energia chimica del glucosio. Analogamente, neppure i 4 elettroni, in forma di ioni idruro, trasportati dalle due molecole di NADH potranno essere utilizzati per la produzione di ATP. Considerando la **fermentazione lattica**, il  $\Delta G^\circ$  associato alla conversione di una molecola di glucosio in due di lattosio è pari a -43,9 kcal/mol (-183,6 kJ/mol) e la percentuale dell'energia libera rilasciata ed immagazzinata in forma di ATP sarà pari a:  $(14,6/43,9) \times 100 = \mathbf{33,2\%}$ , mentre se si considera la sola glicolisi la percentuale è del **41,8%**. Da notare che nelle condizioni intracellulari la quantità di energia libera necessaria per la sintesi dell'ATP da ADP e P<sub>i</sub> è molto più elevata di quella in condizioni standard, per cui la percentuale dell'energia libera disponibile immagazzinata è maggiore, pari a circa il **50%** del totale.

### Glicolisi e produzione di ATP in condizioni aerobiche

In **condizioni aerobiche**, nelle cellule dotate di mitocondri, la quantità di energia chimica che può essere estratta dalla molecola del glucosio ed immagazzinata in forma di ATP è **molto maggiore** rispetto a quanto accade in assenza di ossigeno. Se si considerano solo le due molecole di NADH prodotte durante la glicolisi, il trasferimento dei loro 4 equivalenti riducenti lungo la catena di trasporto degli elettroni mitocondriale permette la produzione di 2-3 molecole di ATP per coppia di elettroni attraverso la fosforilazione ossidativa. In questo caso si avrà una produzione netta di ATP compresa tra **6 ed 8 molecole per ogni molecola di glucosio** ossidata a due di piruvato, dalla glicolisi e 4-6 dalla fosforilazione ossidativa.

Nota: la quantità complessiva di ATP prodotta dagli equivalenti riducenti del NADH **dipende** dal sistema attraverso cui gli equivalenti riducenti del coenzima ridotto entrano nel mitocondrio.

Se invece si analizza l'azione concertata della glicolisi, della piruvato deidrogenasi, del ciclo dell'acido citrico, della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale e della fosforilazione ossidativa, viene estratta ed immagazzinata in forma di ATP molta altra dell'energia chimica disponibile presente nel monosaccaride. In questo caso, secondo quanto riportato dal Lehninger sono prodotti **30-32 ATP/molecola di glucosio**, sebbene recenti stime suggeriscano una produzione netta pari a 29,85 ATP/molecola di glucosio, o 29,38 ATP/molecola di glucosio se anche l'ATP derivato dal GTP, prodotto dal ciclo dell'acido citrico, viene esportato. Considerando entrambe le

stima, la produzione di ATP è circa **15 volte maggiore** rispetto a quanto accade in assenza di ossigeno.

## Regolazione della glicolisi

Il flusso di carbonio attraverso la via glicolitica viene regolato in base alle condizioni metaboliche all'interno e all'esterno della cellula, rispondendo essenzialmente a due bisogni: la **produzione di ATP** e la **produzione di precursori** per molte vie biosintetiche. Inoltre, nel fegato, per evitare uno spreco di energia, glicolisi e **gluconeogenesi** sono finemente regolate in modo che quando una via procede l'altra rallenta. Come spiegato nell'articolo sulla **gluconeogenesi**, nel corso dell'evoluzione ciò è stato ottenuto selezionando **enzimi differenti** per catalizzare le reazioni essenzialmente irreversibili delle due vie, enzimi la cui attività è regolata separatamente. Se infatti queste reazioni procedessero simultaneamente ad elevata velocità creerebbero un **ciclo futile o ciclo del substrato**. Una regolazione così fine non potrebbe essere ottenuta se uno stesso enzima catalizzasse la reazione nelle due direzioni. Il controllo del flusso di carbonio attraverso la glicolisi coinvolge principalmente le reazioni catalizzate dagli enzimi **esochinasi**, **PFK-1** e **piruvato chinasi**, la cui attività è regolata mediante:

- meccanismi **allosterici**, che si svolgono in un arco temporale di millisecondi e sono istantaneamente reversibili;
- modificazioni **covalenti**, ossia fosforilazioni e defosforilazioni, che si svolgono in secondi;
- modificazioni nella **concentrazione** degli enzimi coinvolti, conseguenti a modifiche nella loro velocità di sintesi/degradazione, che avvengono in ore.

Nota: per la **gluconeogenesi** i principali punti di regolazione sono le reazioni catalizzate dagli enzimi **piruvato carbossilasi** (EC 6.4.1.1) e **fruttosio-1,6-bisfosfatasi** (EC 3.1.3.11).

## Esochinasi

Nell'uomo la **esochinasi** è presente con quattro forme isoenzimatiche tessuto specifiche, designate da I a IV, e codificate da altrettanti geni differenti. La esochinasi I è l'isoenzima prevalente nel cervello, mentre nel muscolo scheletrico si ritrova sia l'esochinasi I, che costituisce il 70-75% del totale, che la esochinasi II, che rappresenta il restante 25-30%.

L'esochinasi IV, detta anche **glucochinasi** (EC 2.7.1.2) è presente prevalentemente negli epatociti e nelle cellule  $\beta$  del pancreas, dove è il principale isoenzima. Nel fegato, con la **glucosio-6-fosfatasi**, catalizza il ciclo del substrato tra glucosio e glucosio-6-fosfato. La glucochinasi differisce dalle altre isoforme della esochinasi per quanto riguarda la cinetica e le proprietà regolatorie.

Nota: gli **isoenzimi** o **isozimi** sono **proteine** differenti che catalizzano la stessa reazione, e che in genere si differenziano per le proprietà cinetiche e regolatorie, distribuzione subcellulare, o per i cofattori utilizzati. Possono essere presenti contemporaneamente in una stessa specie, tessuto o anche cellula.

## Proprietà cinetiche delle esochinasi

Le esochinasi I, II e III hanno proprietà cinetiche simili. La esochinasi I e la II hanno una  $K_m$  per il glucosio, ossia la concentrazione del glucosio alla quale l'enzima è per metà saturato, rispettivamente pari a **0,03 mM** e **0,1 mM**. Pertanto questi due

isoenzimi lavorano in modo molto efficiente ai normali valori di glicemia, che sono pari a circa **4-5 mM**.

Invece la glucochinasi ha una  $K_m$  per il glucosio assai più alta, pari a circa **10 mM**; questo significa che l'attività dell'enzima diviene importante solo quando i valori della glicemia sono alti, come dopo un pasto ricco di carboidrati ad alto indice glicemico.

### Regolazione delle esochinasi I-III

Le **esochinasi I-III** sono inibite allostericamente dal **glucosio-6-fosfato**, il prodotto della loro reazione. Questo assicura che il glucosio-6-fosfato non si accumuli nella cellula quando non è richiesto ulteriore glucosio per la produzione di energia, la sintesi del glicogeno, la via del pentoso fosfato, o come fonte di intermedi per la sintesi di altre molecole, e al contempo permette di ridurre l'assunzione dal circolo di altro glucosio che rimane quindi disponibile per altri organi e tessuti. Ad esempio, quando la PFK-1 è inibita, si accumula fruttosio-6-fosfato e, grazie alla reazione catalizzata dalla fosfoglucoisomerasi, glucosio-6-fosfato. Dunque, l'inibizione della PFK-1 porta alla inibizione delle esochinasi I-III.

Nel **muscolo scheletrico** l'attività della esochinasi I e II è coordinata con quella di **GLUT4**, un trasportatore del glucosio con una bassa  $K_m$  per il monosaccaride (5 mM), la cui traslocazione sulla membrana plasmatica è indotta sia dall'insulina che dall'attività fisica. L'azione combinata delle esochinasi e di GLUT4 mantiene un **equilibrio** tra l'ingresso del glucosio nella cellula e la sua fosforilazione. Considerando che la concentrazione ematica del monosaccaride è compresa tra 4 e 5 mmol/L, il suo ingresso nel miocita per mezzo di GLUT4 può portare la sua concentrazione a valori sufficientemente elevati da saturare o quasi l'enzima, che dunque può lavorare vicino o addirittura alla sua  $V_{max}$ .

### Regolazione della glucochinasi epatica

La **glucochinasi** differisce per almeno tre aspetti dalle esochinasi I-III, ed è particolarmente idonea per il ruolo che il **fegato** svolge nel controllo della glicemia. Perché?

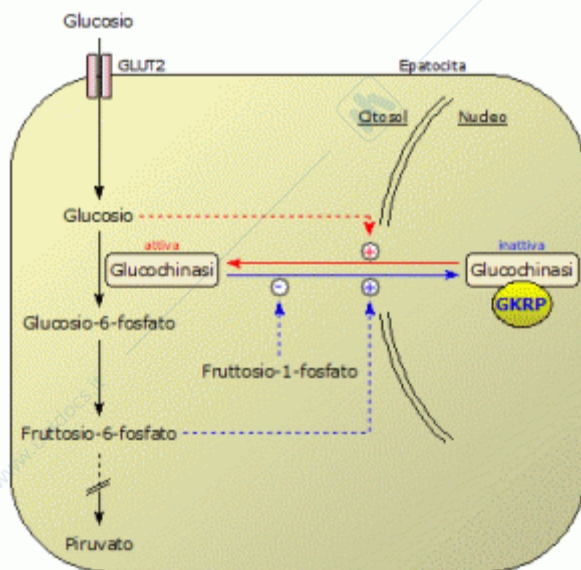
- Come detto in precedenza, la glucochinasi ha una  $K_m$  per il glucosio pari a circa 10 mM, molto più elevata rispetto alla  $K_m$  per il glucosio delle esochinasi I-III, e più alta anche del valore della glicemia a digiuno, pari a circa 4-5 mM. Nel fegato, dove rappresenta l'isoenzima prevalente, il suo ruolo è quello di fornire glucosio-6-fosfato per la sintesi del glicogeno e degli acidi grassi. L'enzima lavora in modo **coordinato** con il trasportatore del glucosio **GLUT2**, il principale carrier per il glucosio nell'epatocita, la cui  $K_m$  per lo zucchero è circa 10 mM. Quindi GLUT2 è molto attivo quando la glicemia è elevata, equilibrando rapidamente la concentrazione del glucosio nel citosol dell'epatocita con quella presente nel sangue. In queste condizioni la glucochinasi è attiva e catalizza la conversione del glucosio in glucosio-6-fosfato, e, grazie alla elevata  $K_m$  per il glucosio la sua attività continua ad aumentare anche quando la concentrazione intracellulare dello zucchero raggiunge o supera le 10 mM. Quindi la velocità con cui il monosaccaride entra nella cellula e di seguito viene fosforilato è determinata dal valore della stessa **glicemia**.

Quando invece la disponibilità del glucosio è scarsa, la sua concentrazione nel citosol dell'epatocita è altrettanto bassa, ben più bassa del valore della  $K_m$  della glucochinasi, per cui il glucosio prodotto attraverso la gluconeogenesi e/o la glicogenolisi non viene fosforilato e può lasciare la cellula.

Una situazione simile si verifica anche nelle **cellule  $\beta$  del pancreas**, dove il sistema GLUT2/glucochinasi fa sì che la concentrazione intracellulare del glucosio-6-fosfato equipari quella del glucosio nel sangue, permettendo alla cellula di rilevare e rispondere ad elevate glicemie.

- A differenza delle esochinasi I-III, la glucochinasi **non è inibita dal glucosio-6-fosfato**, per cui continua a catalizzarne la sintesi anche quando questi si accumulano.

- La glucochinasi viene inibita a seguito del legame reversibile ad una specifica proteina regolatrice detta anche **GKRP**, acronimo dell'inglese glucokinase regulatory protein. Il meccanismo con cui la proteina regolatrice agisce implica l'ancoraggio della glucochinasi all'interno del **nucleo**, dove rimane separata dagli altri enzimi della glicolisi.



Il legame tra glucochinasi e GKRP è molto più forte in presenza del **fruttosio-6-fosfato** mentre è indebolito dal **glucosio** e dal **fruttosio-1-fosfato**. In assenza di glucosio la glucochinasi si trova nella sua conformazione “super-aperta” che è dotata di bassa attività. L'aumento nei livelli citosolici di glucosio determina una transizione concentrazione-dipendente dell'enzima verso la sua conformazione chiusa, la conformazione attiva che non è accessibile alla GKRP. Ne consegue che la glucochinasi è attiva e non più inibita. Da notare che il fruttosio-1-fosfato è presente nell'epatocita solamente quando viene metabolizzato il fruttosio, che quindi, quando disponibile fa venire meno l'inibizione della glucochinasi da parte di GKRP.

Esempio.

Quando dopo un pasto ricco di carboidrati la glicemia sale, il glucosio tramite il GLUT2 entra nella cellula epatica, e quindi attraverso i pori nucleari nel suo nucleo dove determina la transizione della glucochinasi verso la sua conformazione chiusa, attiva e non accessibile a GKRP, permettendo così all'enzima di diffondere nel citosol dove potrà fosforilare il glucosio. Viceversa, quando il glucosio è scarso, come nel digiuno quando la glicemia può scendere sotto il valore di 4 mM, la concentrazione del glucosio nell'epatocita è bassa, ed il fruttosio-6-fosfato associandosi a GKRP permette a quest'ultima di legarsi in modo più saldo alla glucochinasi. Da ciò ne risulta una inibizione molto efficace dell'enzima. Questo concorre ad evitare che il fegato, in condizioni di bassa glicemia, competa con gli altri organi, *in primis* il cervello, per il poco glucosio disponibile.

Nella cellula il fruttosio-6-fosfato è presente in equilibrio con il glucosio-6-fosfato grazie alla reversibilità della reazione catalizzata dalla fosfoglucoisomerasi. Tramite la sua associazione con GKRP, il fruttosio-6-fosfato opera quindi un feedback negativo segnalando alla cellula che non è necessario produrre altro glucosio-6-fosfato, ossia che l'attività della glucochinasi può ridursi per prevenire l'accumulo di intermedi.

Riassumendo si può dire che quando i valori della glicemia sono normali, il glucosio viene fosforilato prevalentemente ad opera delle esochinasi I-III, mentre quando la glicemia è elevata l'esoso è fosforilato ad opera della glucochinasi.

## Regolazione della fosfofruttochinasi-1

La **fosfofruttochinasi-1** è il principale punto di controllo del flusso di carbonio attraverso la via glicolitica.

L'enzima, oltre ai siti di legame per i substrati, presenta molti altri siti su cui vanno a legarsi effettori allosterici sia inibitori che attivatori.

Tra gli **effettori allosterici negativi** si ha l'ATP, che è anche un substrato dell'enzima ed un prodotto finale della glicolisi, il citrato e gli ioni idrogeno.

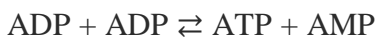
Tra gli **effettori allosterici positivi** si ritrovano l'AMP, il  $P_i$  ed il **fruttosio-2,6-bisfosfato**.



## Regolazione della PFK-1 e della Fruttosio-1,6-bisfosfatasi

Nota: la PFK-1 presenta due siti di legame distinti per l'ATP, uno nel sito attivo e dotato di grande affinità per la molecola, e l'altro, regolatorio, a bassa affinità. Che cosa segnalano i diversi effettori allosterici?

- **ATP, AMP e  $P_i$**  segnalano lo **stato energetico** della cellula. L'attività della fosfofruttochinasi-1 aumenta quando la cellula necessita di energia, ossia quando c'è necessità di ATP, mentre si riduce quando lo stato energetico della cellula è alto, ossia quando la cellula è ricca di ATP. In che modo? Quando la concentrazione di **ATP** è elevata, quando cioè il nucleotide viene prodotto ad una velocità superiore a quella con cui è consumato, lo stesso legandosi allo specifico sito allosterico va ad **inibire** la fosfofruttochinasi-1, riducendone l'affinità per il fruttosio-6-fosfato. Dal punto di vista cinetico l'aumento della concentrazione dell'ATP determina un cambiamento della relazione tra la velocità di reazione e la concentrazione del fruttosio-6-fosfato che diviene sigmoide da iperbolico, e quindi si ha un **aumento della  $K_m$**  dell'enzima per il fruttosio-6-fosfato stesso. Tuttavia nella maggior parte delle condizioni cellulari la concentrazione dell'ATP non varia più di tanto. Ad esempio, nel muscolo durante un esercizio vigoroso si possono avere riduzioni della concentrazione di ATP di circa un 10% rispetto alla situazione di riposo mentre la velocità della glicolisi varia molto di più rispetto a quanto ci si aspetterebbe da tale riduzione. Quando la velocità di produzione dell'ATP è inferiore a quella con cui viene consumato, si verifica l'aumento della concentrazione dell'**AMP** e dell'**ADP**, e in particolare dell'**AMP**, grazie all'azione dell'enzima adenilato chinasi (EC 2.7.4.3), secondo la reazione di seguito descritta.



La costante di equilibrio  $K_{eq}$  della reazione è:

$$K_{eq} = \frac{[ATP][AMP]}{[ADP]^2} = 0,44$$

Nelle normali condizioni cellulari la concentrazione dell'ADP e dell'AMP corrispondono rispettivamente a circa il 10% e a meno dell'1% di quella dell'ATP. Pertanto, considerando che il pool dell'adenilato è costante nel breve periodo, anche una piccola variazione nella concentrazione dell'ATP porterà, grazie all'attività della adenilato chinasi, ad una variazione relativa molto maggiore della concentrazione dell'AMP. A sua volta l'**AMP agisce rimuovendo l'inibizione dovuta all'ATP**.

Quindi, l'attività della fosfofruttochinasi-1 dipende dallo stato energetico della cellula: quando l'ATP è abbondante l'attività dell'enzima si riduce;

quando i livelli di AMP aumentano l'attività dell'enzima aumenta.

Perché l'ADP non è un effettore allosterico positivo della fosfofruttochinasi-1? Ci sono due ragioni. Quando la carica energetica della cellula si riduce, l'ADP è utilizzato per riformare l'ATP, nella reazione catalizzata dalla adenilato chinasi. Inoltre, come detto in precedenza, una piccola riduzione nei livelli di ATP porta una più elevata variazione percentuale nei livelli dell'ADP e soprattutto dell'AMP.

- Gli **ioni idrogeno** inibiscono la fosfofruttochinasi-1. Tale inibizione previene, controllando la velocità della glicolisi, l'eccessivo accumulo di lattato e la conseguente caduta del pH ematico.
- Il **citrato** è un inibitore allosterico della fosfofruttochinasi-1 che agisce aumentando l'effetto inibitorio dell'ATP. Il citrato è il prodotto del primo passaggio del ciclo dell'acido citrico, una via metabolica che fornisce intermedi metabolici per le vie biosintetiche e indirizza gli elettroni verso la catena di trasporto degli elettroni mitocondriale per la sintesi dell'ATP via fosforilazione ossidativa. Elevati livelli citosolici di citrato indicano che nel mitocondrio si sta verificando la produzione di un eccesso di precursori e che le richieste energetiche della cellula sono state soddisfatte, ossia, **il ciclo dell'acido citrico ha raggiunto la saturazione**; pertanto la glicolisi, che rifornisce il ciclo in condizioni aerobiche, può rallentare, risparmiando glucosio. Quindi, va sottolineato che la PFK-1 accoppia la glicolisi ed il ciclo dell'acido citrico.
- Nel **fegato** il punto centrale per la regolazione sia della glicolisi che della **gluconeogenesi** è rappresentato dal ciclo del substrato tra fruttosio-6-fosfato e fruttosio-1,6-bisfosfato, catalizzato dagli enzimi fosfofruttochinasi-1 e **fruttosio-1,6-bisfosfatasi**. Il fegato gioca un ruolo cruciale nel mantenimento della glicemia entro valori normali. Se la glicemia scende, il glucagone a livello epatico stimola la sintesi, via **glicogenolisi** e **gluconeogenesi**, di glucosio, e al contempo segnala all'organo di non consumare l'esoso per soddisfare i propri fabbisogni. Quando invece la glicemia è elevata, l'insulina induce il fegato ad utilizzare il glucosio per produrre energia, sintetizzare **glicogeno** e trigliceridi. In quest'ottica, la regolazione della glicolisi e della **gluconeogenesi** è mediata dal **fruttosio-2,6-bisfosfato**, una molecola che permette all'organo di svolgere un ruolo di primo piano nella regolazione della glicemia segnalando il rapporto tra insulina e glucagone. A seguito del legame allo specifico sito allosterico sulla fosfofruttochinasi-1, il **fruttosio-2,6-bisfosfato** **aumenta** l'affinità dell'enzima per il fruttosio-6-fosfato, il suo substrato, mentre diminuisce quella per gli inibitori allosterici citrato e ATP. Ed è notevole sottolineare che in presenza di concentrazioni fisiologiche dei substrati e degli effettori allosterici sia positivi che negativi l'enzima, in assenza di **fruttosio-2,6-bisfosfato**, è praticamente inattivo. Viceversa, il legame del **fruttosio-2,6-bisfosfato** alla **fruttosio-1,6-bisfosfatasi** ne comporta l'inibizione, anche in assenza di AMP, un altro inibitore allosterico dell'enzima. Grazie a queste azioni la molecola aumenta il flusso netto di glucosio attraverso la glicolisi. Per la trattazione approfondita del metabolismo del **fruttosio-2,6-bisfosfato** si rimanda all'articolo sulla **gluconeogenesi**.
- Altro metabolita importante per il controllo del flusso del carbonio attraverso la glicolisi e la **gluconeogenesi** è lo **xilulosio-5-fosfato**, un intermedio della **via del pentoso fosfato**, la cui concentrazione nell'epatocita aumenta a seguito dell'ingestione di un pasto ricco di **carboidrati**. La molecola, attivando la protein fosfatasi 2A porta infine ad un aumento della concentrazione del **fruttosio-2,6-bisfosfato** e quindi ad un **incremento** del flusso del carbonio attraverso la glicolisi e alla riduzione di quello attraverso la **gluconeogenesi**.

↑ [Torna all'inizio](#) ↑

## Regolazione della piruvato chinasi

Un ulteriore punto di regolazione del flusso di carbonio attraverso la glicolisi e la gluconeogenesi è rappresentato dal ciclo del substrato tra il fosfoenolpiruvato ed il piruvato, catalizzato dalla **piruvato chinasi**, per la glicolisi, e dall'azione combinata della **piruvato carbossilasi** e della **fosfoenolpiruvato carbossichinasi** (EC 4.1.1.32) per la **gluconeogenesi**. Tutte le **isoforme** della piruvato chinasi sono allostericamente inibite da elevate concentrazioni di **ATP**, **acetil-CoA** e **acidi grassi a catena lunga**, segnali che la cellula si trova in uno **stato energetico ottimale**. Anche l'**alanina**, che può essere sintetizzata dal piruvato attraverso una reazione di transaminazione, è un inibitore allosterico dell'enzima; il suo accumulo segnala l'**abbondanza di precursori** per le vie biosintetiche.

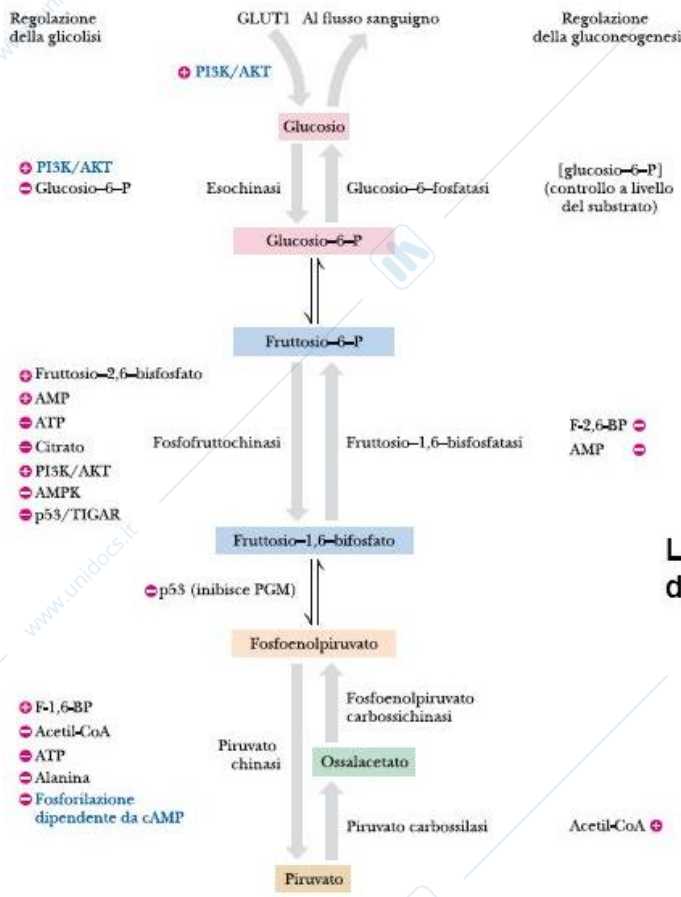


## Regolazione della Piruvato Chinasi Epatica

Di contro la piruvato chinasi è allostericamente attivata dal **fruttosio-1,6-bisfosfato**, il prodotto della prima reazione esclusiva della glicolisi, il che permette all'enzima di tenere il passo con il flusso di intermedi in arrivo. E va sottolineato il fatto che, in una situazione di concentrazioni fisiologiche di substrato, ossia il fosfoenolpiruvato, e degli inibitori ATP ed alanina, la piruvato chinasi sarebbe completamente inibita senza l'effetto stimolatorio del fruttosio-1,6-bisfosfato. L'**isoenzima epatico**, ma non quello muscolare, è soggetto anche a regolazione attraverso **fosforilazione** ad opera della:

- protein chinasi A, attivata a seguito del legame del glucagone allo specifico recettore o dell'epinefrina ai recettori  $\beta$ -adrenergici;
- protein chinasi calcio/calmodulina dipendente, attivata dal legame dell'epinefrina ai recettori  $\alpha_1$ -adrenergici.

La fosforilazione dell'enzima ne **riduce** l'attività a seguito di un **aumento della sua  $K_m$**  per il fosfoenolpiruvato, e **rallenta** la glicolisi. Ad esempio, a seguito di una riduzione della glicemia, la fosforilazione indotta dal glucagone riduce l'attività dell'enzima. Nella forma fosforilata l'enzima è anche meno facilmente stimolato dal fruttosio-1,6-bisfosfato ma più facilmente inibito dall'alanina e dall'ATP. Di contro, l'enzima in forma defosforilata è più sensibile al fruttosio-1,6-bisfosfato, e meno agli inibitori allosterici ATP ed alanina. In questo modo quando la glicemia è bassa, il fegato rallenta l'ossidazione del glucosio a scopi energetici, e lo zucchero rimane quindi disponibile per altri tessuti ed organi, come il cervello. Va comunque notato che la piruvato chinasi non subisce la fosforilazione indotta dal glucagone in presenza del fruttosio 1,6-bisfosfato. Di contro, un aumento nel rapporto insulina/glucagone porta infine alla defosforilazione dell'enzima e quindi alla sua attivazione. Nella forma defosforilata l'enzima è meno sensibile agli inibitori allosterici alanina ed ATP, ma più sensibile al suo attivatore allosterico, il fruttosio-1,6-bisfosfato.



## Regolazione reciproca di glicolisi e gluconeogenesi

La gluconeogenesi è stimolata dal glucagone e dai glucocorticoidi (...cortisolo)

**FIGURA 22.8** I principali meccanismi di regolazione della glicolisi e della gluconeogenesi. Gli attivatori sono indicati dai segni "+" e gli inibitori dai segni "-". Anche il metabolismo dei carboidrati è modulato da una varietà di segnali cellulari, tra cui le protein chinasi PI3K, AKT ed AMPK, il soppressore di tumori p53 e TIGAR (vedere il riquadro "Uno Sguardo Più Approfondito" a pag. 765).

## Regolazione del livello di fruttosio 2,6-bisfosfato

