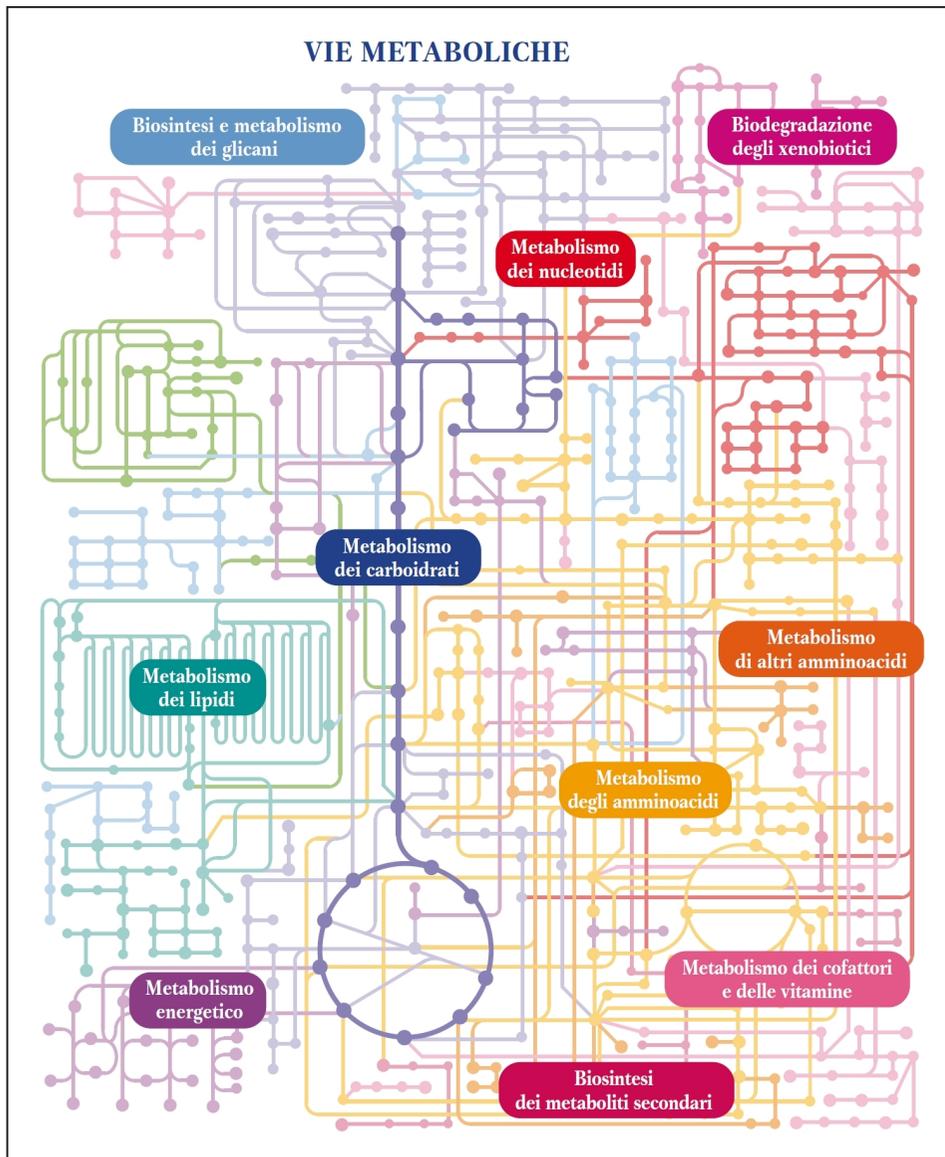


## Capitolo 15

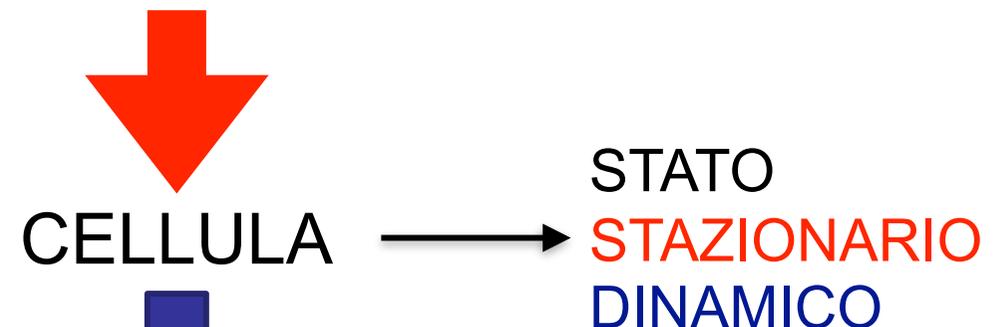
# Principi di regolazione metabolica

# Regolazione metabolica - metabolismo del glucosio



Glicolisi, gluconeogenesi e via del pentosio fosfato non sono tre vie connesse tra loro ma separate da tutto il resto...  
Intermedi e prodotti di una via sono quasi sempre condivisi da altre vie metaboliche.

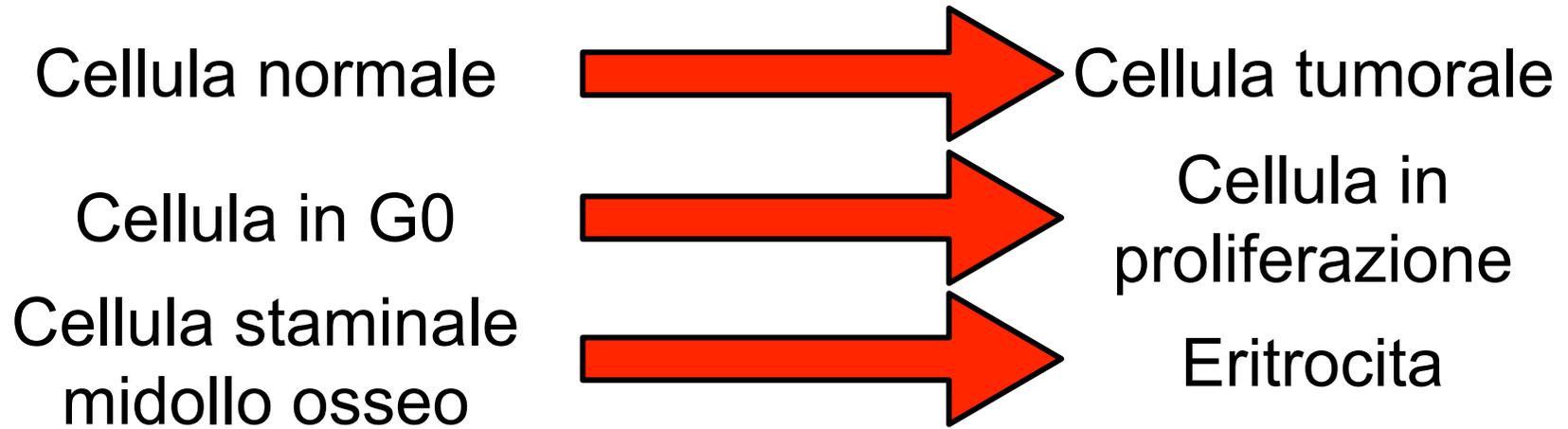
## OMEOSTASI MOLECOLARE



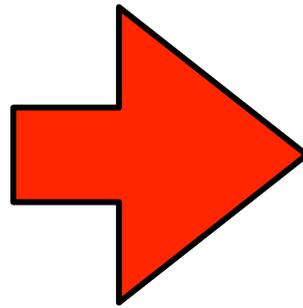
**PERDITA di OMEOSTASI:**  
Differenziamento  
Patologia

...

**Flusso: molecole processate/unità di tempo**



Omeostasi  
(1)



**Cambiamento**



Omeostasi  
(2)

# Regolazione metabolica

Ormoni/Citochine/altro

ENZIMA

Trascrizione  
Traduzione  
Degradazione  
Localizzazione  
**(lente)**

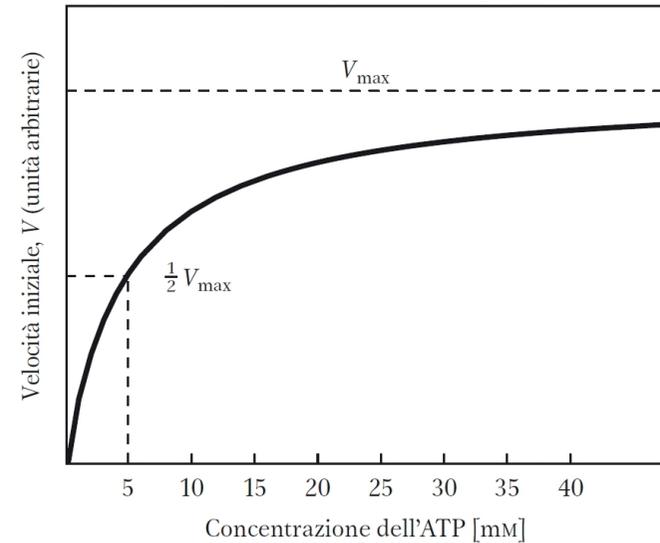
Modulatori  
allosterici  
PTMs  
**(veloci)**

**Quantità**

**Attività**

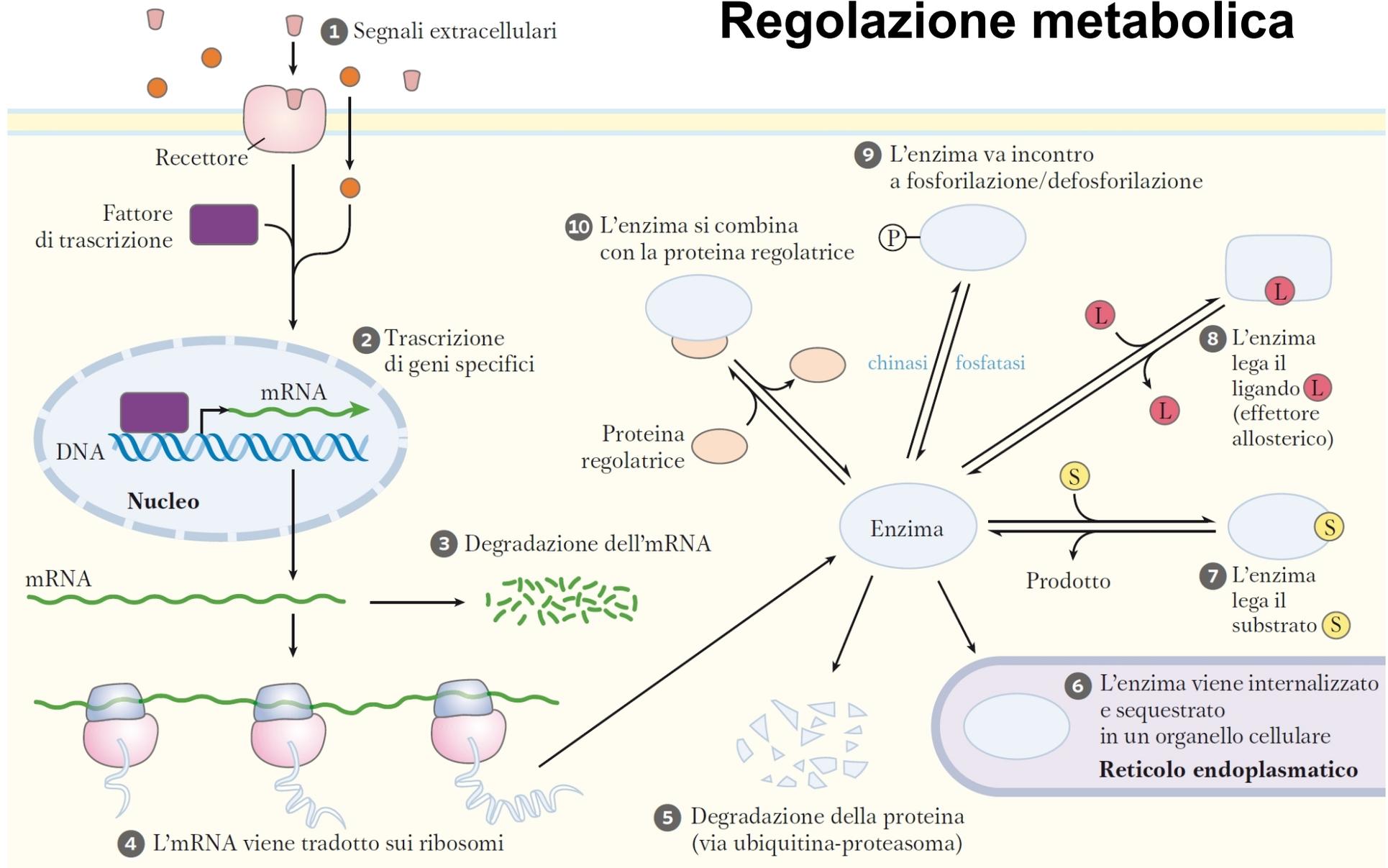
molecole/secondo  
**(velocità)**

[substrato]



La disponibilità del substrato determina la velocità con la quale la reazione procede. A seconda di dove ci si colloca rispetto a Km, si ottengono variazioni diverse della velocità. (i.e. se si è a valori di concentrazione di substrato molto elevati, molto superiori a Km allora le variazioni sulla velocità sono minime)

# Regolazione metabolica



**NB: l'enzima che si combina con la proteina regolatrice, viene modificato con una PTM o lega un effettore allosteric può comunque legare il substrato!**

# Metabolismo e sue variazioni/adattamenti

Trascrittomica

Proteomica

Metabolomica

mRNA  
miRNA  
ncRNA

Proteine  
PTMs

Metaboliti  
(piccole molecole)

**INTEGRAZIONE**

**Variazioni a lungo e breve termine**

**=>**

**Visione d'insieme sul metabolismo  
e sui suoi meccanismi regolativi**

# Metabolismo e cinetica enzimatica

## ENZIMA

Effettori  
allosterici

Substrato

PTMs

Proteine  
regolatrici

Cooperatività  
(Coefficiente di Hill)

$V_{max}$ ,  $K_m$   
attivazione/disattivazione

## Modulazione attività enzimatica (scopo):

**Regolazione metabolica** vs **Controllo metabolico**

Meccanismi atti al  
mantenimento  
dell'omeostasi  
(stato stazionario)

Processi messi in atto in risposta a  
stimoli esterni

## Reazioni regolate: $\Delta G \ll 0$ (lontane dall'equilibrio)

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln ([C]^c [D]^d / [A]^a [B]^b)$$

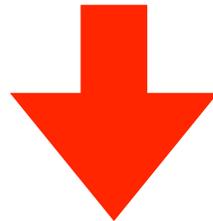
$$([C]^c [D]^d / [A]^a [B]^b) = Q \text{ (rapporto di azione di massa)}$$

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln Q$$

$$\text{All'equilibrio } \Delta G = 0 \text{ e } Q = K'_{eq}$$

Più Q è piccolo, più contribuisce a rendere negativo il  $\Delta G$   
(più è bassa la concentrazione dei prodotti rispetto ai substrati)

Mantenere questa condizione è necessario per permettere il  
procedere di una determinata via metabolica

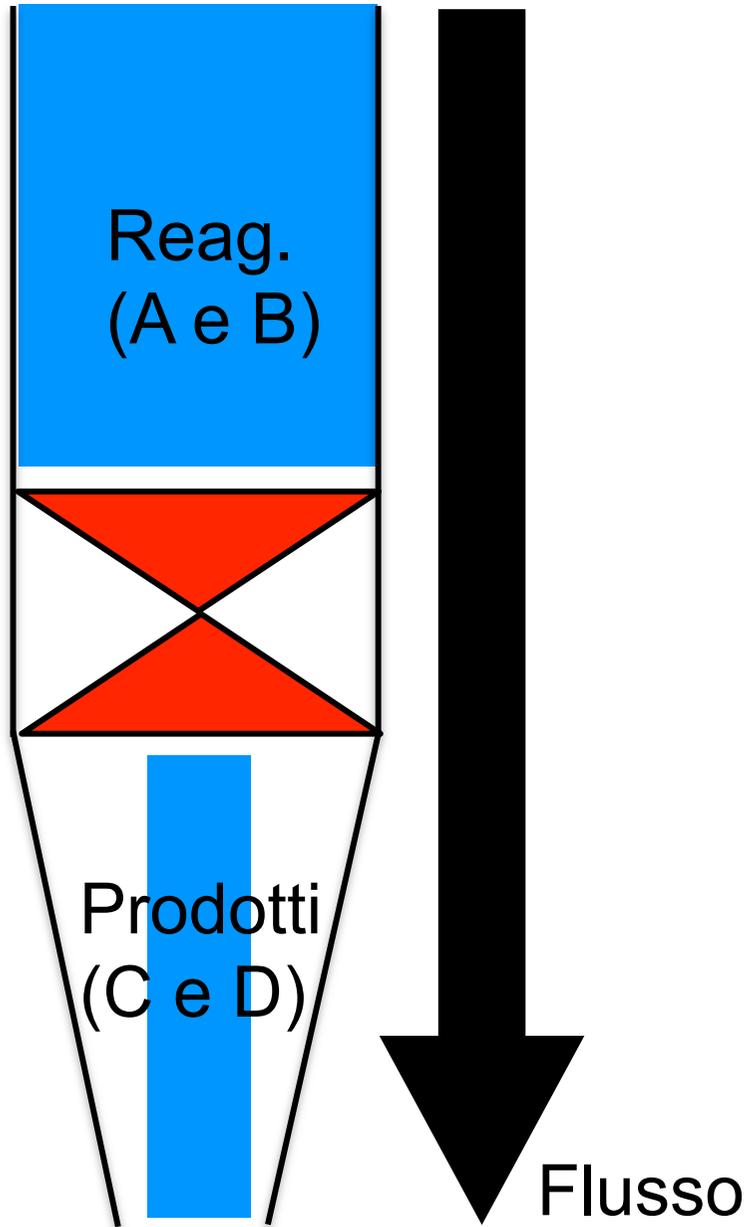


## REGOLAZIONE ENZIMATICA

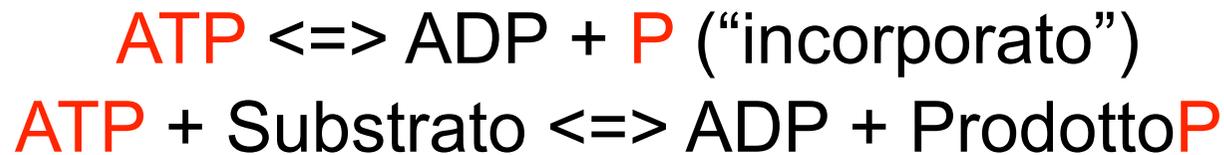
(le reazioni vicine all'equilibrio di solito non sono soggette a regolazione  
Bastano piccole variazioni delle [ ] dei substrati e prodotti per invertire flusso)

**FLUSSO: molecole prodotte / unità di tempo**

Velocità limitata dall'enzima:  
dipende dal N° di enzimi  
(concentrazione), dalla sua  
modulazione da parte di effettori e  
dalle caratteristiche stesse  
dell'enzima



# [ATP] (e altri cofattori): ruolo nella regolazione metabolica



$$Q = \frac{[\text{ADP}] [\text{ProdottoP}]}{[\text{ATP}] [\text{Substrato}]}$$

**[ADP]/[ATP]:**

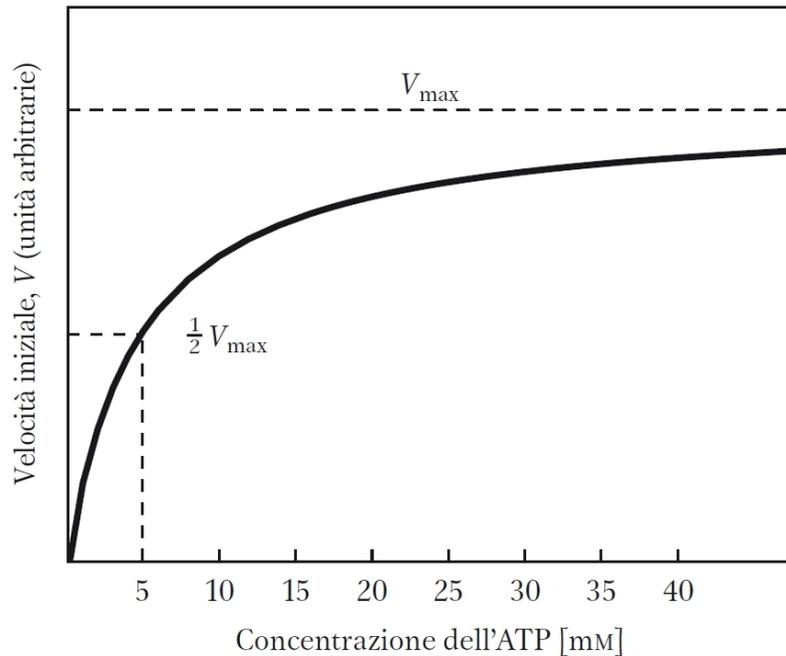
più piccolo è più elevata è la “spinta” termodinamica che quella reazione riceve

=>

[ATP] mantenuto elevato (circa 5-10 mM nelle cellule)  
Meccanismi di controllo che dipendono da [ATP], [ADP] e dalle concentrazioni degli altri cofattori



(sistema per mantenere elevati i livelli di ATP, ovvero per mantenere alto il potenziale di trasferimento del gruppo fosfati)



Molti enzimi hanno una  $K_M$ , per l'ATP di 1-5 mM. Se la concentrazione di ATP scende molto sotto questi valori la velocità della reazione cala drasticamente e questo non sarebbe compatibile. [ATP] deve rimanere elevata. Cosa succederebbe se la reazione di idrolisi dell'ATP procedesse all'equilibrio?

Q condizioni fisiologiche: [ATP] 5mM, [ADP] e [P<sub>i</sub>] 1mM e 10mM, H<sub>2</sub>O 55,5M => **Q=3,6x10<sup>-5</sup>**

$K_{eq}$  idrolisi ATP

=> ca.  $2.2 \times 10^5$  (220000)

$[ADP][P_i] / [ATP][H_2O] => 220000!!!!$

Consideriamo costante la concentrazione di acqua 55,5 M e P<sub>i</sub> 10mM

**Fisiologiche** [ADP]/[ATP] => 1/5 (0.2) e **Q=3,6x10<sup>-5</sup>**

**Equilibrio** [ADP]/[ATP] =>  $1,23 \times 10^9$  e **Q=2.2x10<sup>5</sup>**

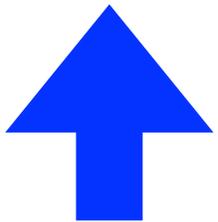
La concentrazione di ATP dovrebbe essere di circa  $5 \times 10^{-12} M$   
 $5 \times 10^{-12} M \ll 1 \times 10^{-3} M =>$  molto distante da  $K_M => V$  circa 0

## AMP: fattore regolativo

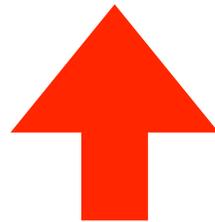
[AMP]<sub>intracellulare</sub>: 0.1 mM / [ATP]<sub>intracellulare</sub>: 5 mM / [ADP]: 1 mM

Immaginiamo un consumo di 0.5 mM ATP e che l'**adenilato chinasi** operi estremamente velocemente convertendo tutto l'ADP consumato in AMP e ATP (metà e metà)

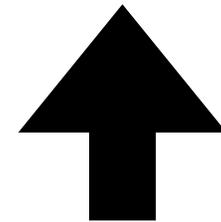
[AMP]<sub>intracellulare</sub>: 0.350 mM / [ATP]<sub>intracellulare</sub>: 4,75 mM / [ADP]: 1 mM



+250%



-5%



0%

[AMP]: Sensore dello stato energetico più sensibile della [ATP]  
AMP è soggetto a una **enorme variazione (+250%)** rispetto all'ATP (-5%) in termini di concentrazione)

# AMP: sensore metabolico

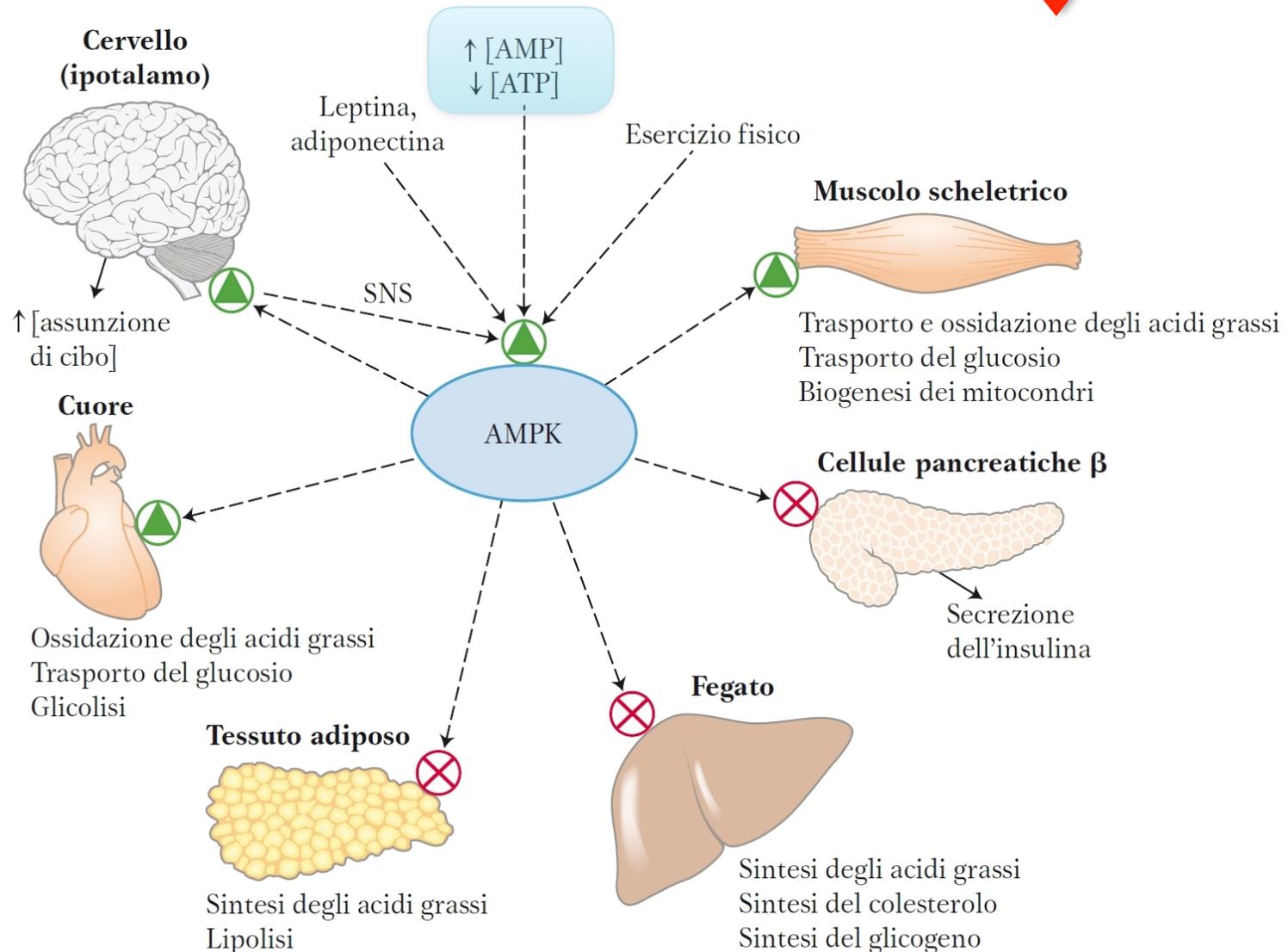
## AMPK (AMP-dependent kinase)

Il legame di AMP a AMPK la attiva

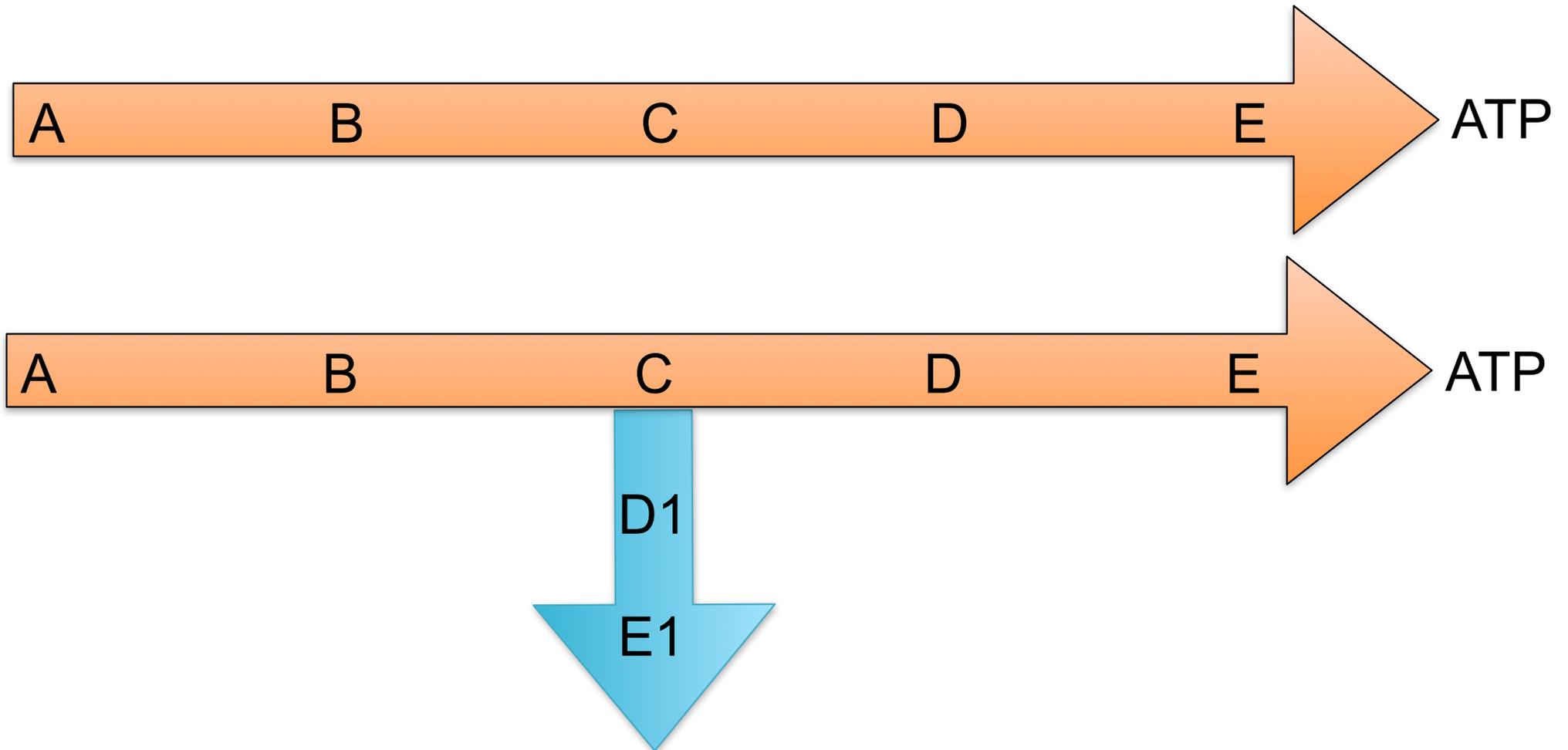
=>

### Innesco di risposte sistemiche

↑ Attività catabolica  
↓ Attività anabolica



# Perchè è importante la regolazione metabolica?



## Meccanismi di regolazione:

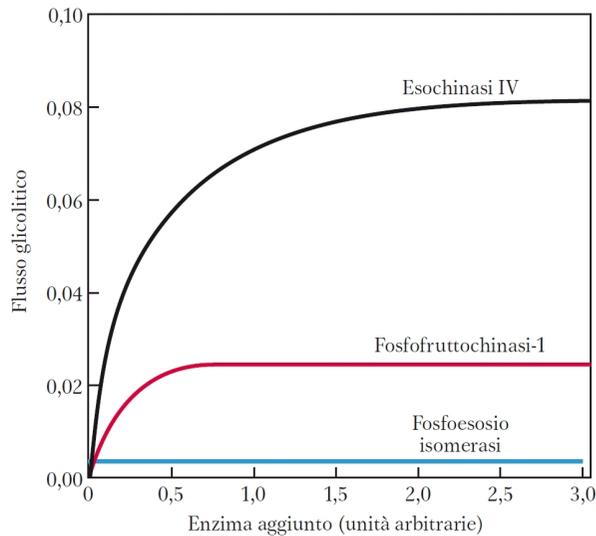
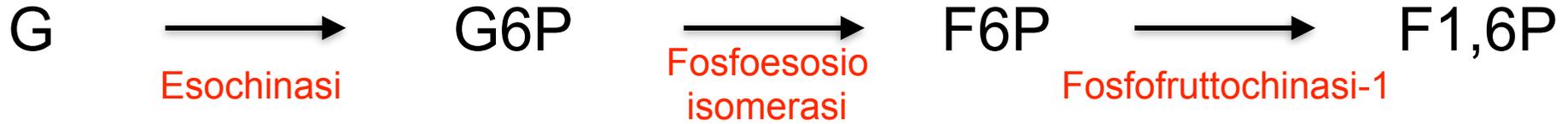
- 1) consentire che vie metaboliche contrapposte possano funzionare senza che si verifichino cicli futili (glicolisi/gluconeogenesi)
- 2) Ripartire metaboliti lungo vie alternative (Glicolisi/via del pentosio fosfato)
- 3) Scegliere “combustibili” più adatti alla condizione metabolica (Glucosio, acidi grassi, proteine, etc)
- 4) Bloccare vie metaboliche in caso di accumulo dei prodotti

# CONTROLLO METABOLICO

Perché è importante sapere quali sono gli enzimi che sono coinvolti nella regolazione del flusso lungo una via metabolica?

- 1) **comprensione del sistema** (risolti in termine di comprensione delle patologie);
- 2) **sviluppo di farmaci:** è logico cercare di colpire l'enzima che è quello più rilevante ai fini del controllo del flusso attraverso la pathway coinvolta (vedasi gli aspetti dell'inibizione della glicolisi nelle cellule tumorali);
- 3) **bioingegnerizzare processi industriali:** se viene identificato l'enzima (o gli enzimi che sono maggiormente coinvolti nel controllo del flusso in una via metabolica allora andando ad ingegnerizzare un organismo facendolo esprimere elevati livelli di quel determinato enzima si potrà ottimizzare la produzione del prodotto desiderato;
- 4) ...

# Aspetti quantitativi: Coefficiente di controllo del flusso



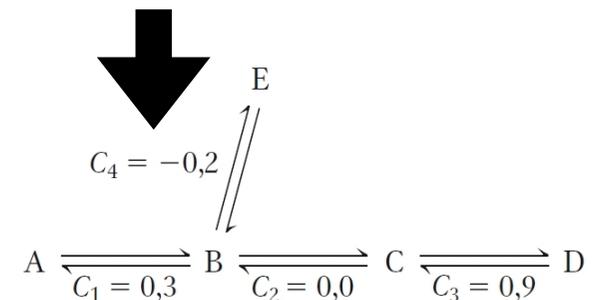
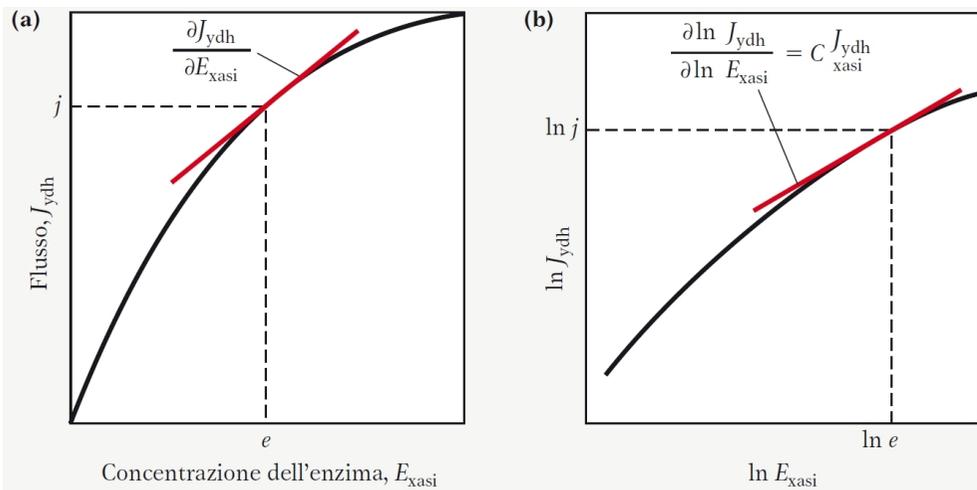
Via metabolica

Si misura variazione della [F1,6P] nel tempo, ovvero il flusso (J) per ciascun enzima e per ciascuna aggiunta.

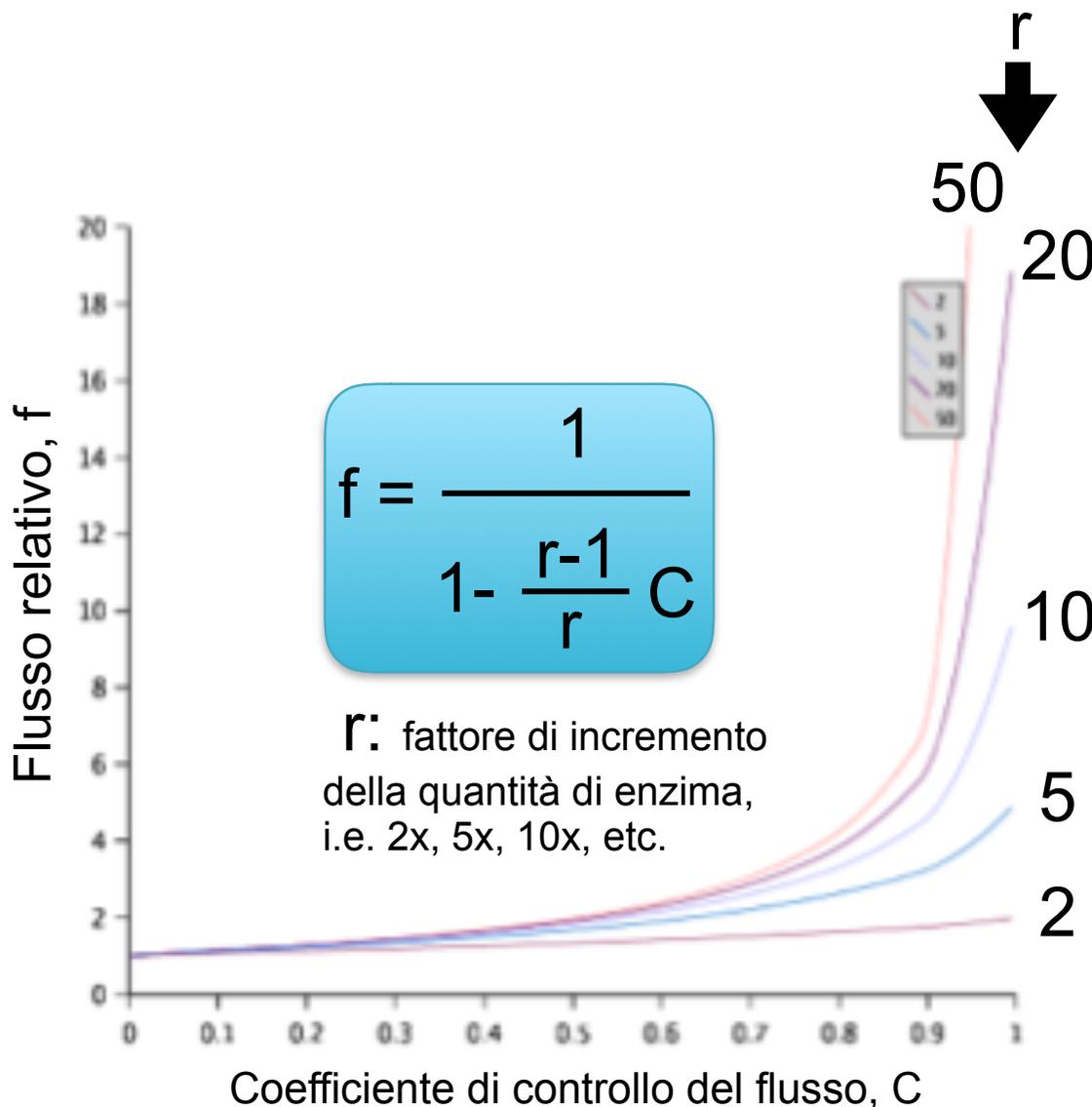
C non è una costante, dipende condizione dell'intero sistema considerato (concentrazione substrati ed effettori e dagli altri enzimi). C: pendenza della tangente alla curva riportata in b (lnJ vs lnE).

**La somma dei coefficienti di flusso di una via metabolica è sempre pari a 1.**

Può anche essere negativo nel caso di una enzima che fa parte di una diramazione.



# Coefficiente di controllo del flusso



In certe situazioni vale la formula indicata. Questo ha delle notevoli implicazioni. Immaginiamo che un enzima abbia un C pari a 0,5 e vediamo cosa succede al flusso della via (f) se la sua quantità viene raddoppiata o aumentata di 20 volte:

2x => f da 1 passa a 1,33  
 20x => f da 1 passa a 1,90

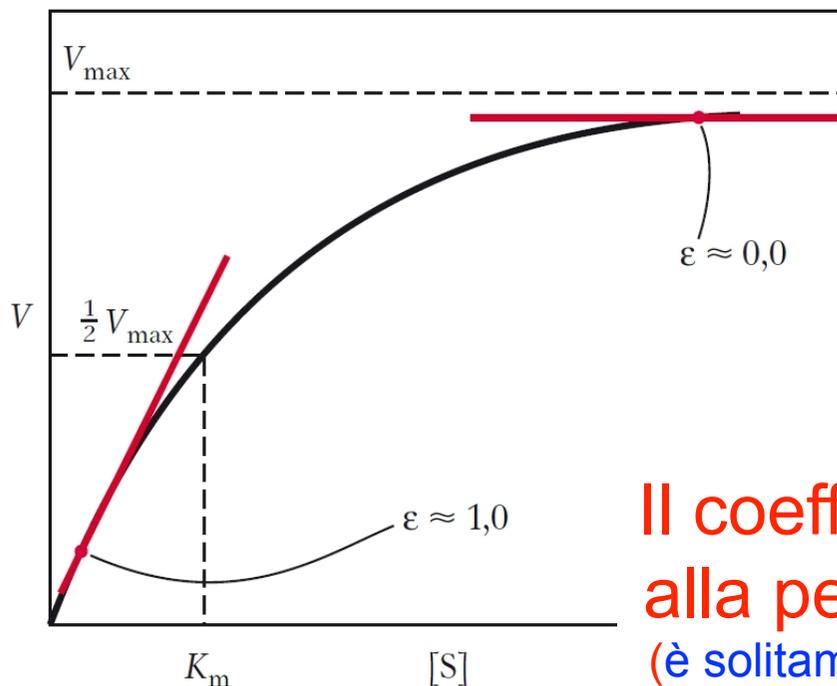
Supponiamo ora che lo stesso enzima abbia un C pari a 0,9

2x => f da 1 passa a 1,8  
 20x => f da 1 passa a 6,9

**Dove vale più la pena investire per modificare il flusso di una via?**  
**Su un enzima che ha un elevato C. Per bassi valori di C (in pratica per C < 0,5), non si riesce ad ottenere dei rilevanti aumenti di flusso.**

## Aspetti quantitativi: **coefficiente di elasticità di un enzima**

Indice di come l'attività di un enzima dipende da variazioni delle concentrazioni dei suoi substrati, fattori allosterici, etc. (nel grafico è mostrato la variazione della velocità ( $V$ ) in funzione della  $[S]$ ).



In (Velocità della reazione)  
vs  
In [substrato, prodotto, effettore].

**Il coefficiente di elasticità di un enzima è pari alla pendenza della tangente a questa curva** (è solitamente compreso tra 0 e 1 o tra 0 e 4 per enzimi allosterici, può anche essere negativo in caso di effettori con effetto inibitorio)

**Sempre riferito ad una determinata concentrazione di substrato!**  
**Nella figura, ad alte concentrazioni di substrato  $\epsilon = 0$ !**

## Aspetti quantitativi: **coefficiente di risposta (R)**

Indica di come il flusso di una via metabolica sia influenzato da fattori esterni alla via stessa (esempio dell'insulina sulla via glicolitica).

Per avere una risposta ad un fattore esterno, almeno un enzima della via in oggetto deve essere "sensibile" al fattore esterno. Può essere calcolato allo stesso modo del coefficiente C (ovvero la pendenza della tangente alla curva  $\ln J$  vs  $\ln P$ , dove P è il fattore esterno).

Di solito il fattore esterno influenza un enzima specifico e quindi è possibile anche esprimerlo in questo modo:

Il coefficiente di risposta (R) tiene quindi conto di

- 1) quanto l'enzima è coinvolto nel controllo della via metabolica, ovvero del **coefficiente di controllo, C**
- 2) quanto l'enzima è sensibile al fattore esterno (**coefficiente di elasticità,  $\epsilon$  per il fattore esterno**)

$$R = C \times \epsilon$$

NB: coefficiente di risposta della via metabolica per quel che concerne l'enzima preso in considerazione e considerando il suo coefficiente di elasticità rispetto al fattore specifico preso in considerazione.

$0 < \epsilon <_{ca} 4 \Rightarrow 0 < R < 4C$  (NB:  $\epsilon$  può anche essere negativo, in caso gli effettori siano degli inibitori)

# Controllo vs regolazione

**Controllo metabolico:** modificare il flusso (J)

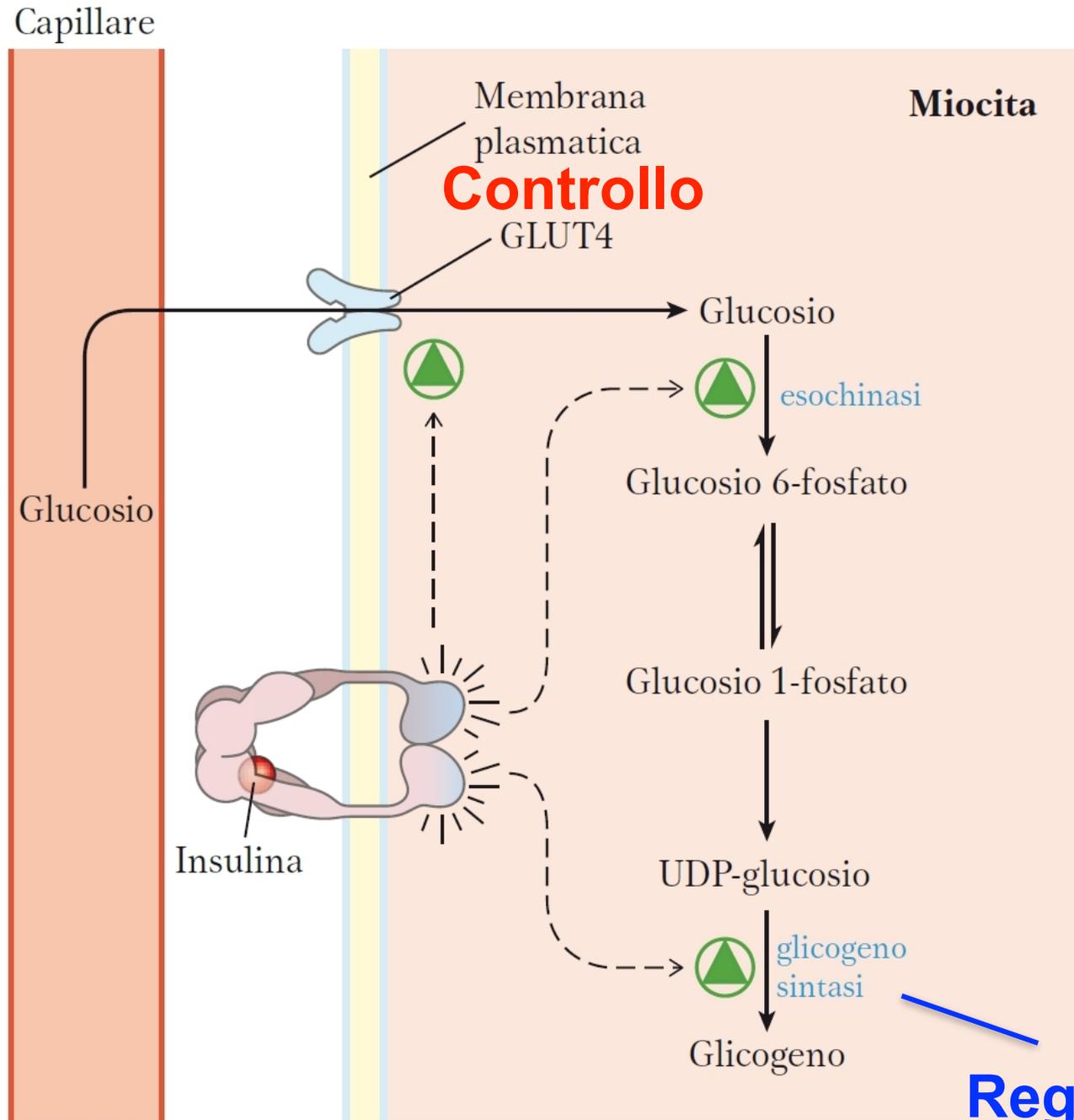
Flusso (J) = n° metaboliti generato / arco di tempo

=> accumulo di metaboliti/intermedi

=> scostamento dall'omeostasi

Innesco di fenomeni di **regolazione metabolica** per riportare le condizioni all'omeostasi

# Controllo vs regolazione



INSULINA: innesca processi di controllo e regolazione:

L'analisi del controllo della via di produzione del glicogeno ha portato ad evidenziare che i coefficienti di controllo di questa via sono elevati per il trasportatore GLUT4 e per l'esochinasi. Ciò nonostante l'insulina agisce anche andando ad attivare la glicogeno sintasi.

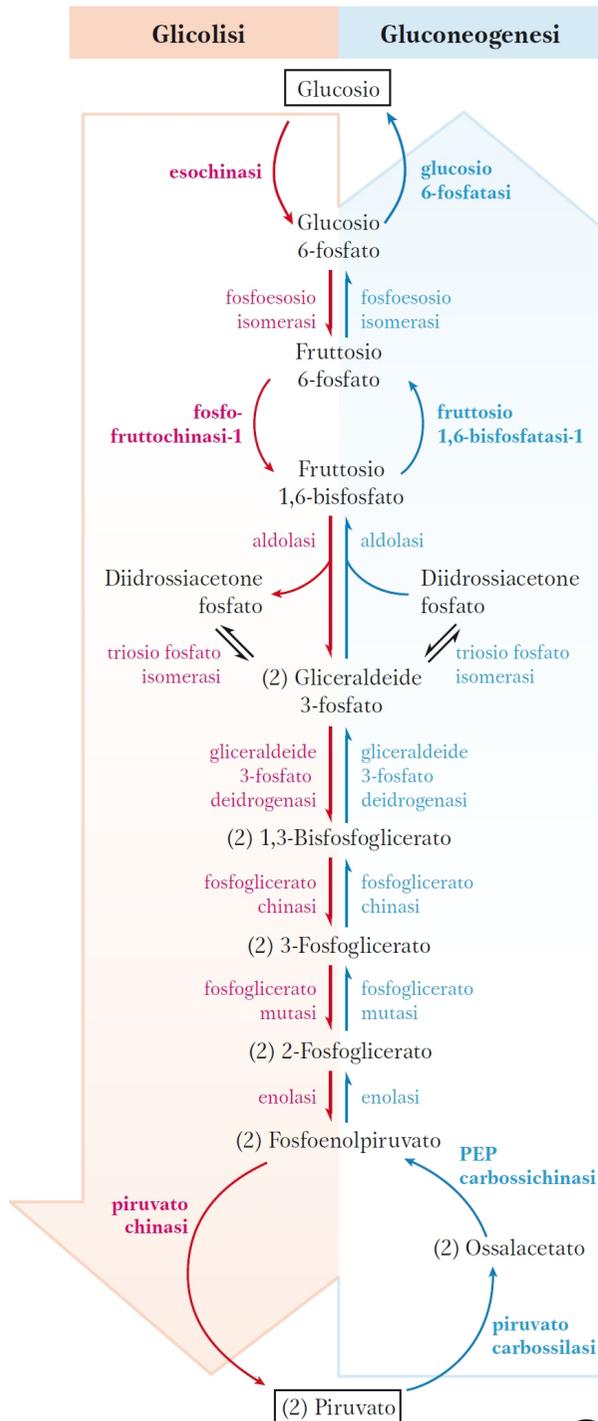
DUE EFFETTI DIVERSI:

**Controllo:** traslocazione di GLUT4 sulla membrana e sintesi esochinasi (aumento del flusso di entrata del glucosio nella cellula).

**Regolazione:** attivazione glicogeno sintasi per portare il Glucosio 6P ad essere accumulato nel glicogeno (mantenimento di una situazione di omeostasi cellulare - [G6P]).

**Regolazione**

# Glicolisi e Gluconeogenesi: coordinazione e regolazione



← Ciclo futile (senza regolazione)

← Ciclo futile (senza regolazione)

Senza un'opportuna regolazione i cicli futili porterebbero a semplice idrolisi di ATP con produzione di calore.

**Regolazione: Sistema integrato muscolo - fegato**  
**La dove ci potrebbero essere dei cicli futili**

← Ciclo futile (senza regolazione)

**CICLO FUTILE => CICLO DEL SUBSTRATO**

# Esochinasi (ruolo degli isoenzimi)

Logica: **Eccesso glucosio**: stoccarlo/consumarlo - **Mancanza**: renderlo disponibile

Ruolo:

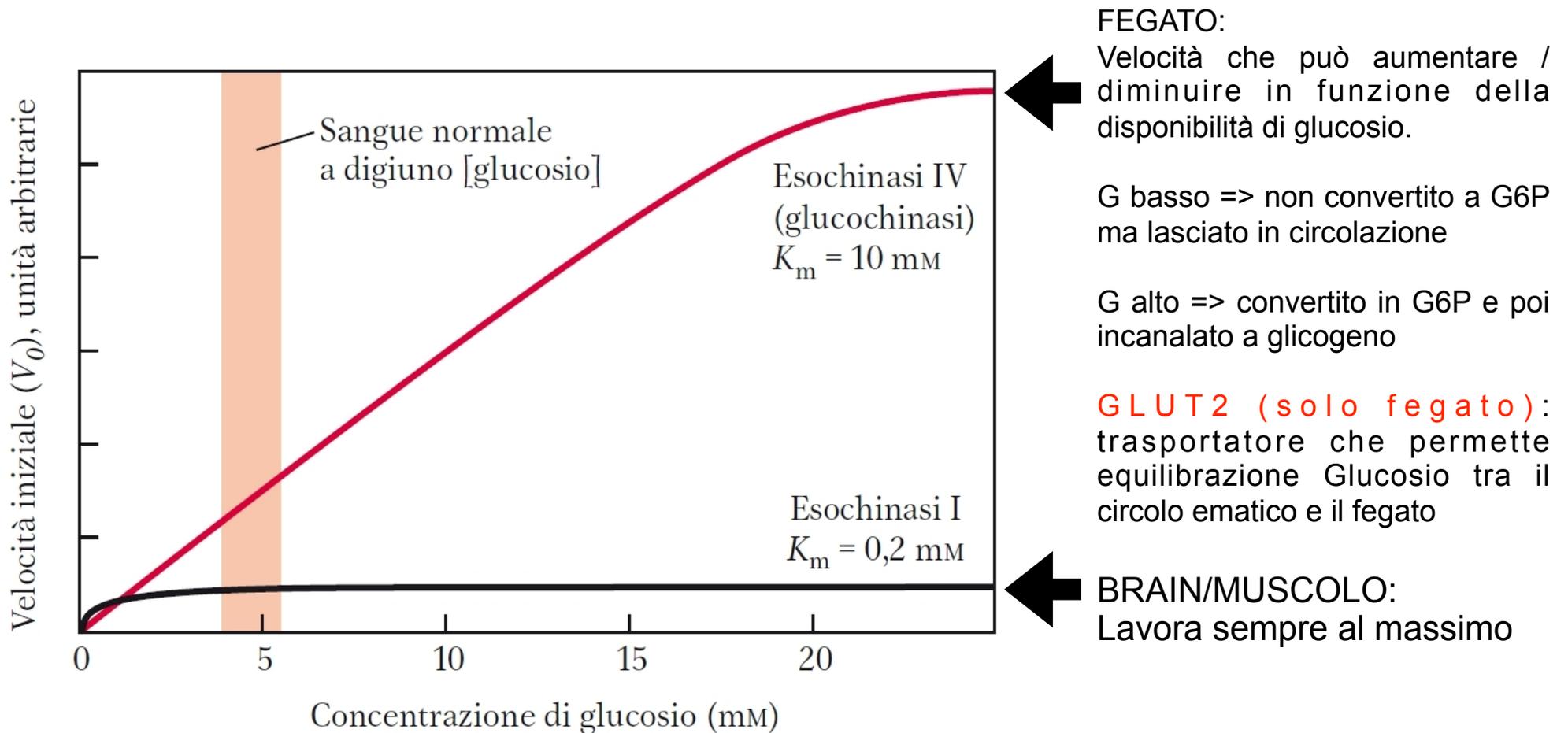
**Fegato**: produrre Glucosio, stoccare in glicogeno l'eccesso di Glucosio o produrre Acidi grassi.

**Muscolo/Cervello**: utilizzare Glucosio per produrre energia - consumo

Glucosio ematico 4-5 mM

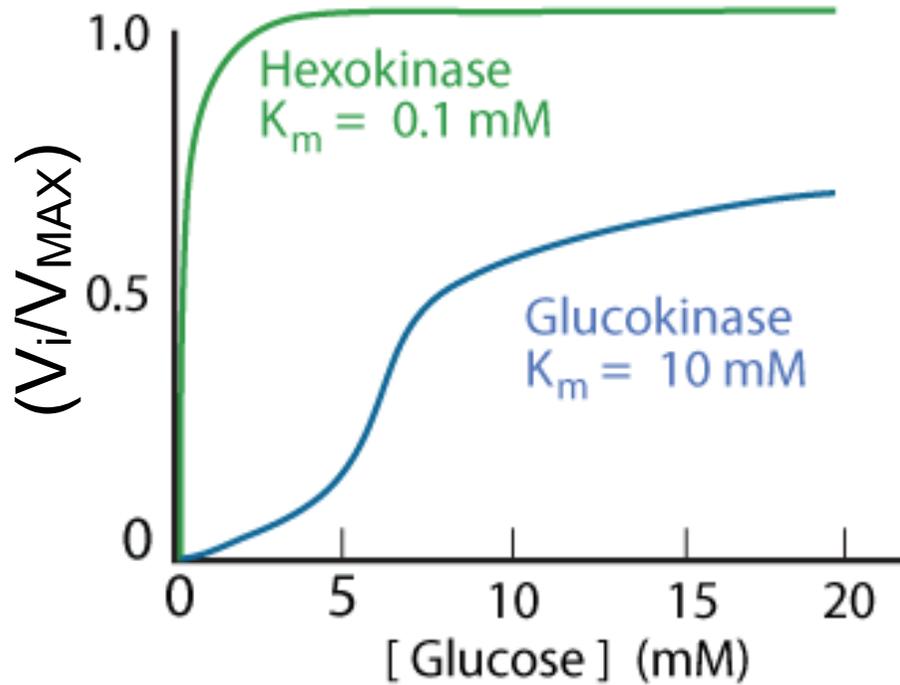
Muscolo/cervello: esochinasi I II -  $K_M$ : 0.1-0.2 mM - Inibitore allosterico: G6P (prodotto)

Fegato: esochinasi IV -  $K_M$  10 mM - Inibitore: proteina nucleare sequestratrice

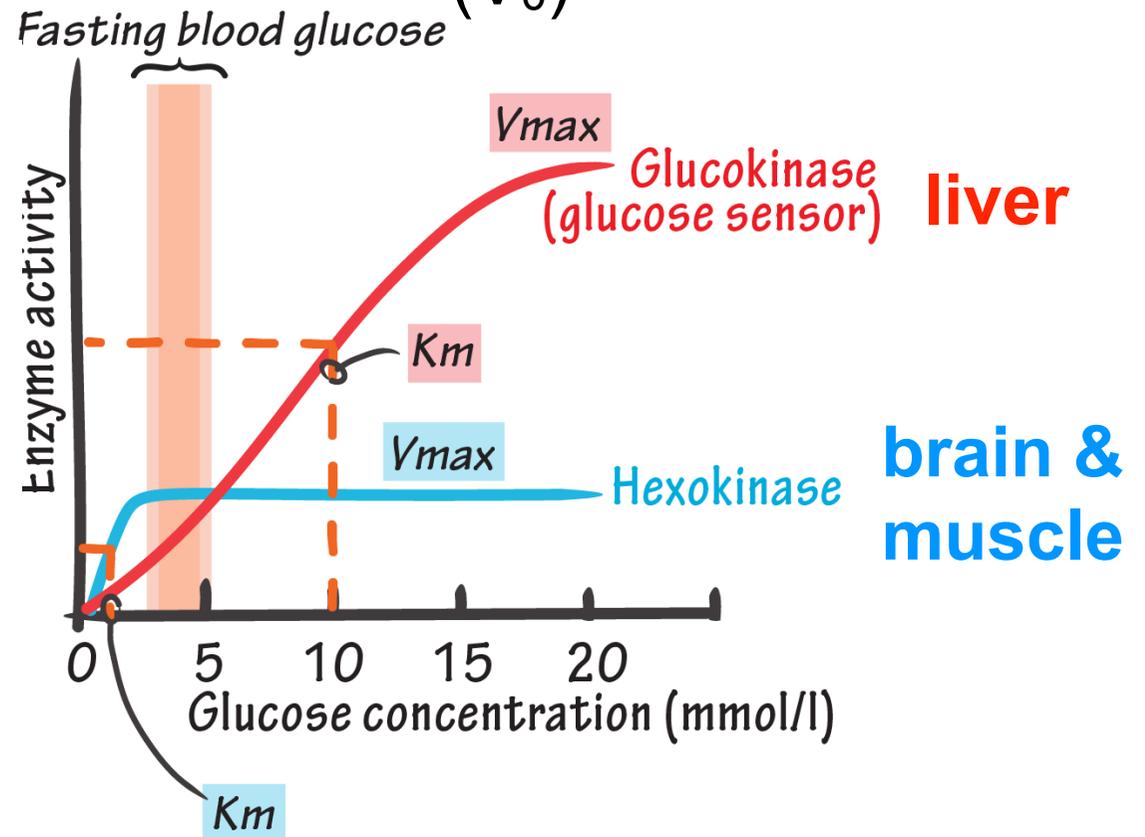


# Glucokinase vs Hexokinase

Relative comparison  
( $V_i/V_{MAX}$ )



Direct comparison  
( $V_0$ )



**$K_m$**

**Glucokinase > Hexokinase**

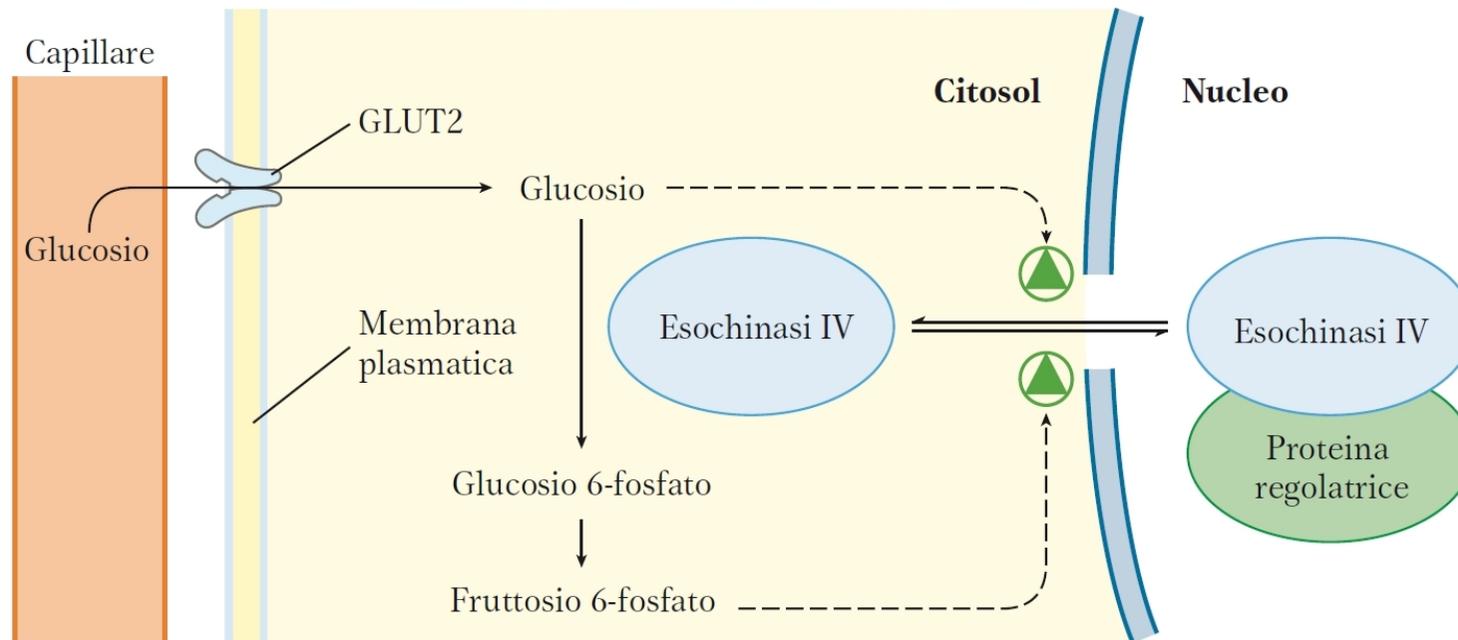
Sparses glucose stores for brain, muscle & other tissues.

**$V_{max}$**

**Glucokinase > Hexokinase**

At fasting glc conc. – Hexokinase is at  $V_{max}$ , Glucokinase activity varies according to glc conc.

# Esochinasi IV (Glucocinasi)



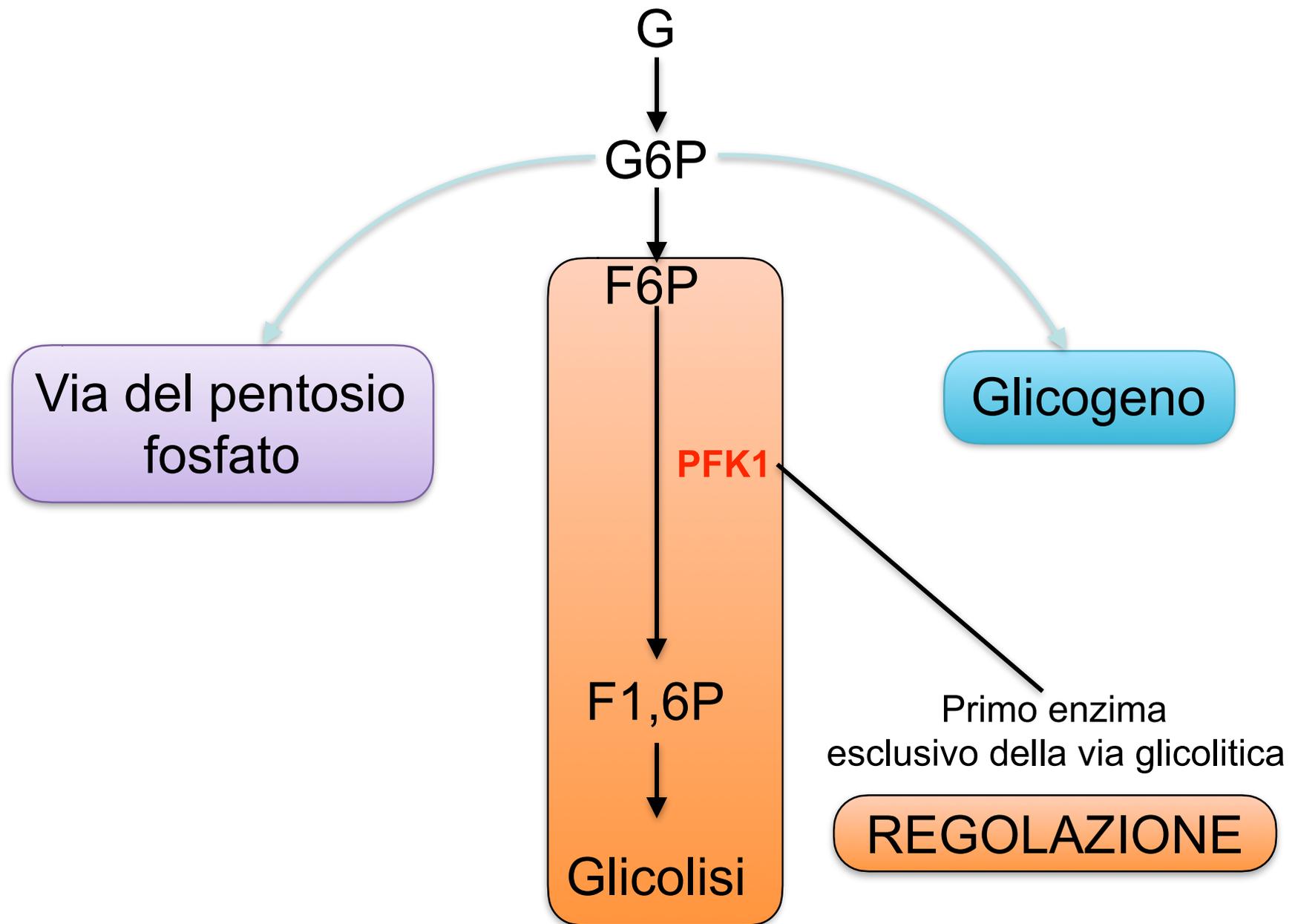
**Libera inibizione**

**Favorisce inibizione**

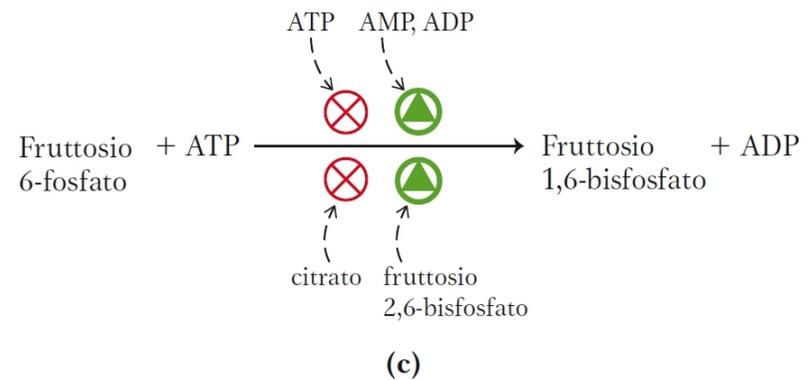
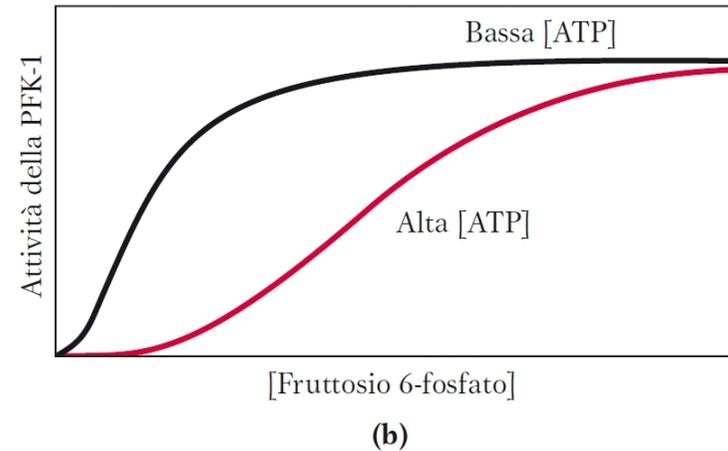
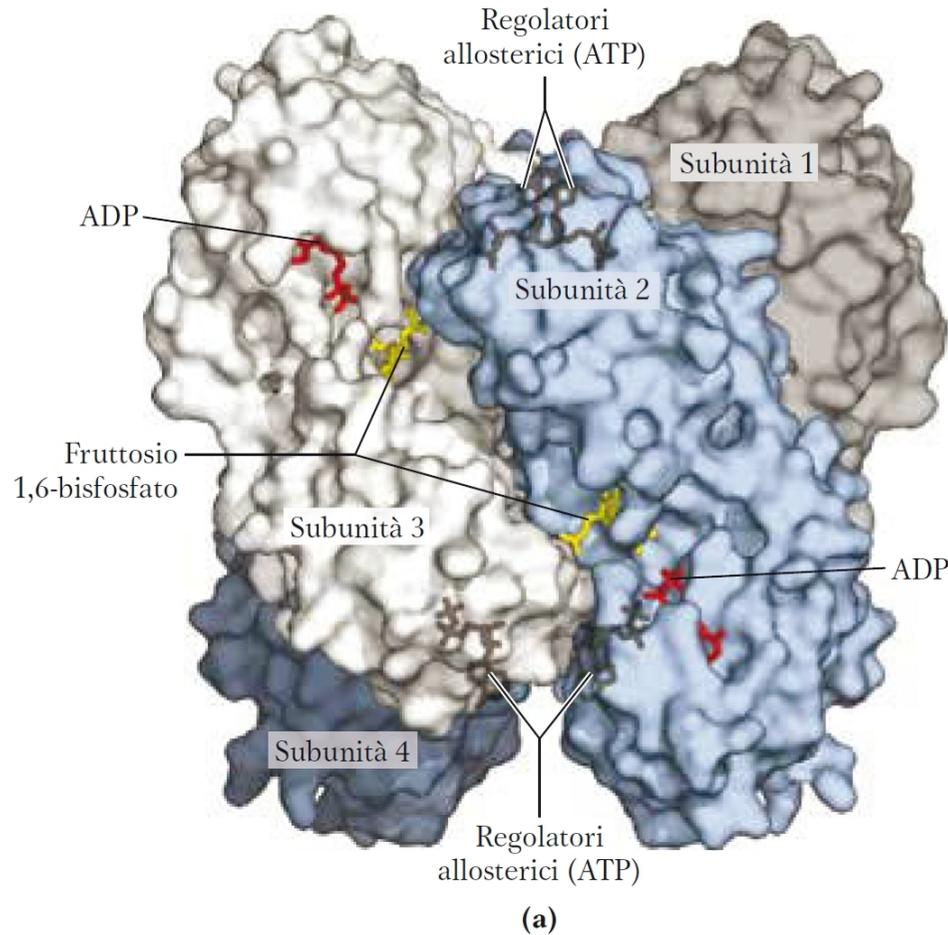
Glucosio  $\longrightarrow$  Esochinasi IV  $\longleftarrow$  Fruttosio 6P  
(F1P, sorbitolo)

PRODUZIONE  
G6P  $\Rightarrow$  Glicogeno

Importante: quando la concentrazione del Glucosio diminuisce, il F6P non trova il suo "competitore" Glucosio e riesce quindi a promuovere il legame della esolV alla proteina regolatrice e quindi ad inibire la esolV. Questo è molto importante quando la concentrazione ematica di glucosio scende per non sottrarre glucosio agli altri organi



# PFK-1 Fosfofruttochinasi 1



Regolazione allosterica

Inibizione: stato energetico elevato => ATP, Citrato (intermedio di ossidazione piruvato, acidi grassi, aa)

attivazione: ADP, AMP,

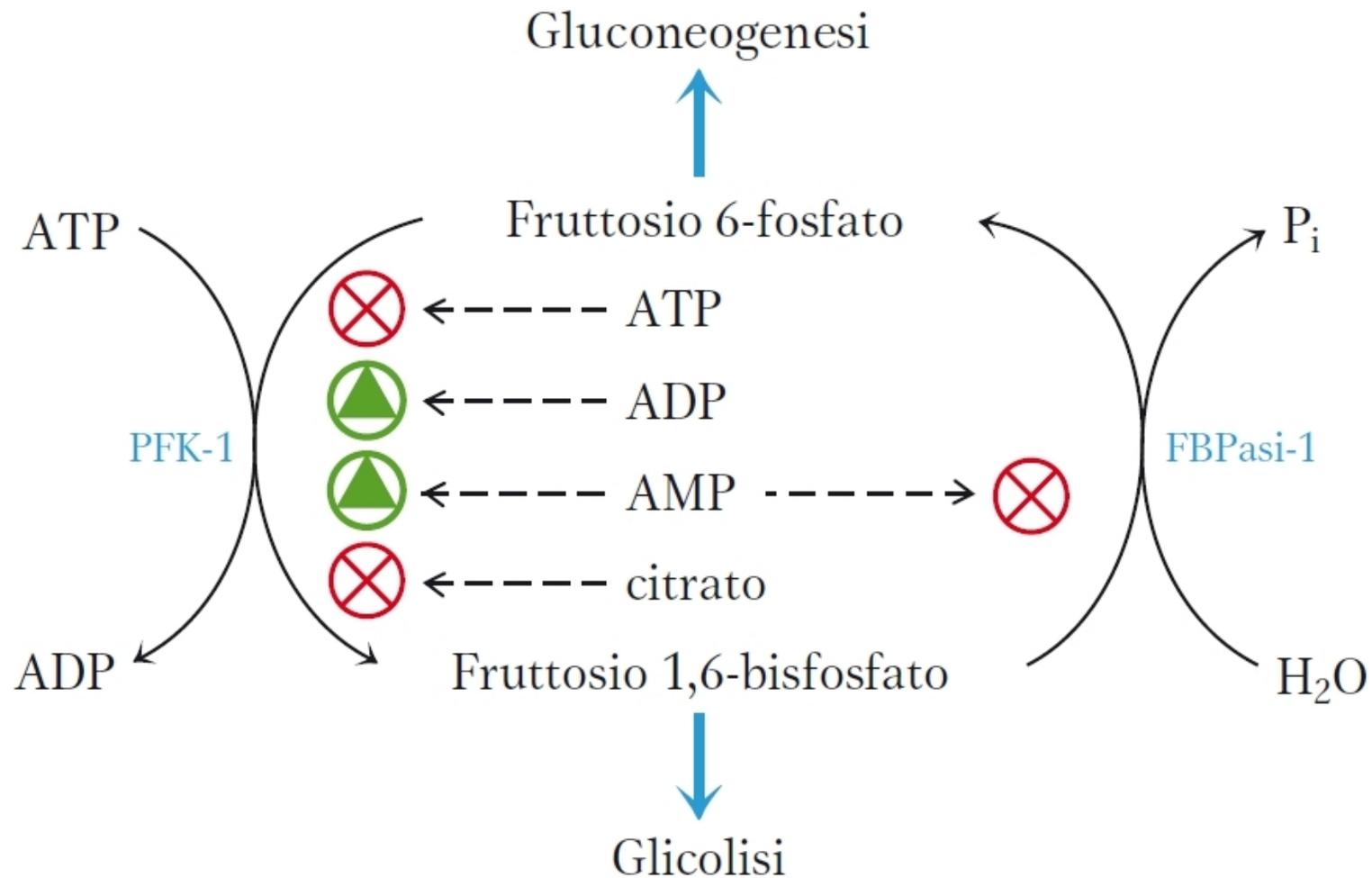
**CITRATO => indice che il ciclo di Krebs è alimentato => produzione di energia**

# Glicolisi e Gluconeogenesi Coordinazione

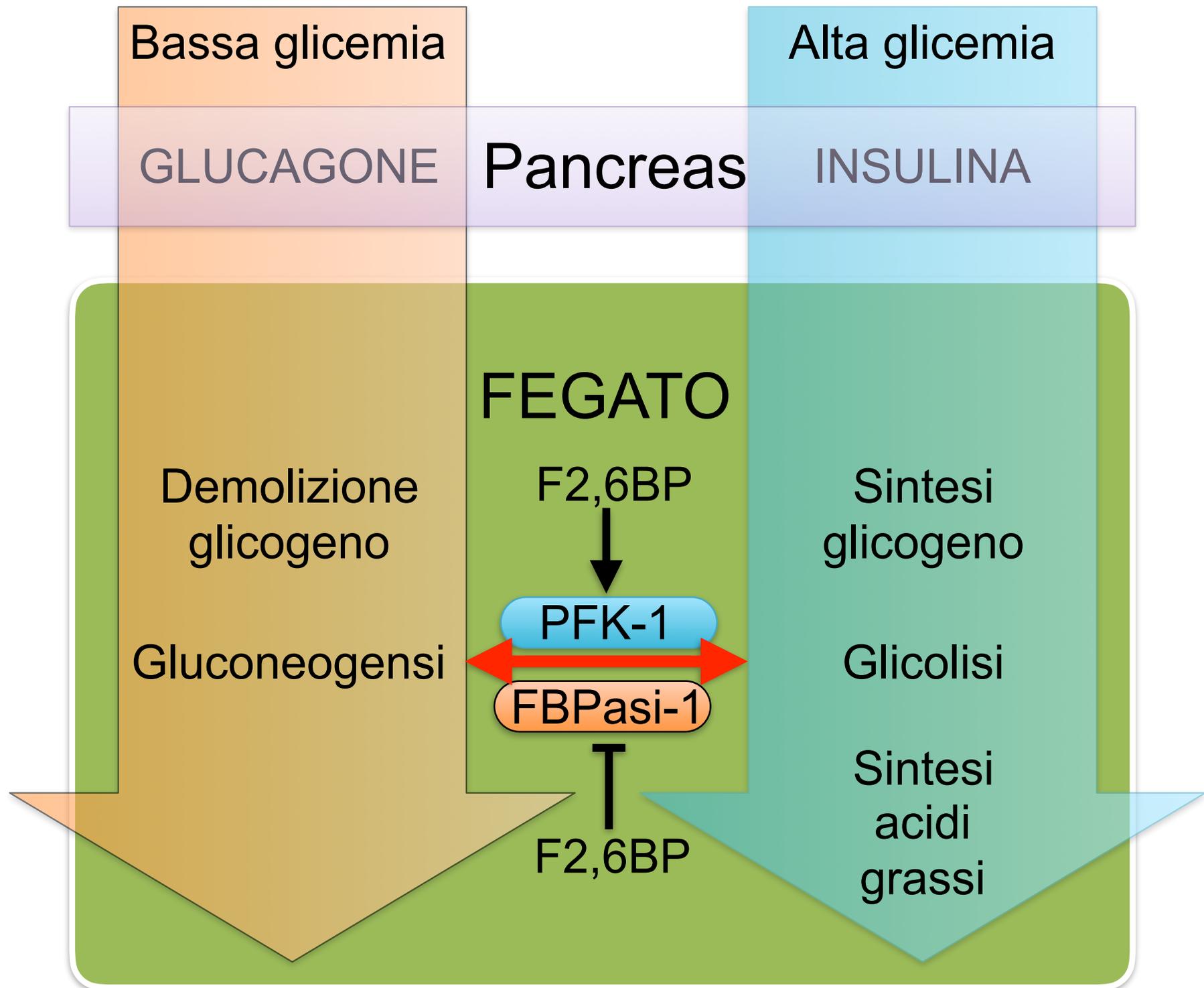
Logica:

Mancanza energia => Glicolisi + / gluconeogenesi -

Disponibilità energetica => Glicolisi - / gluconeogenesi +



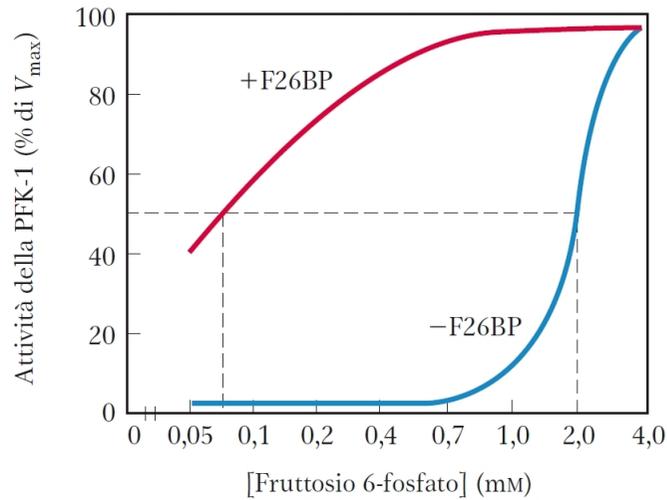
**NB: osservare il ruolo dell'AMP nei confronti di glicolisi e gluconeogenesi**



# F26BP

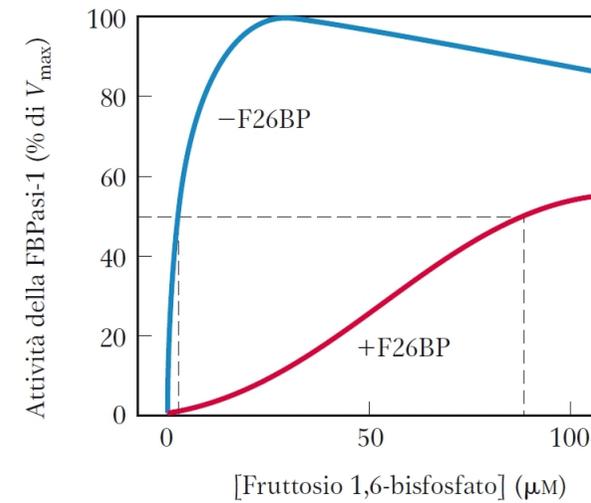
## Forte Regolatore allosterico sia di PFK-1 che di FBPasi-1

### Attivatore PFK-1

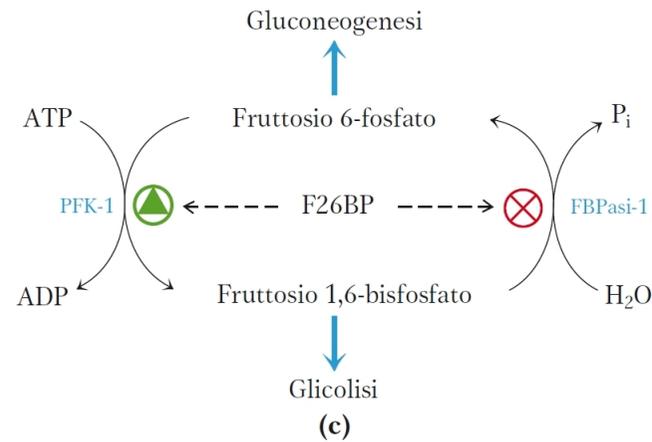


(a)

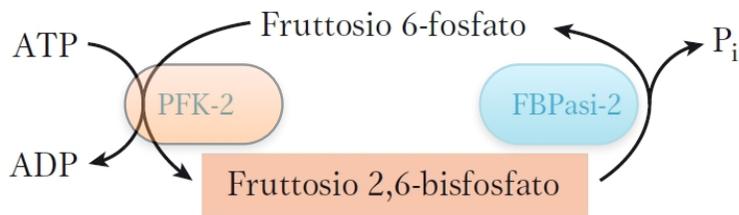
### Repressore FBPasi-1



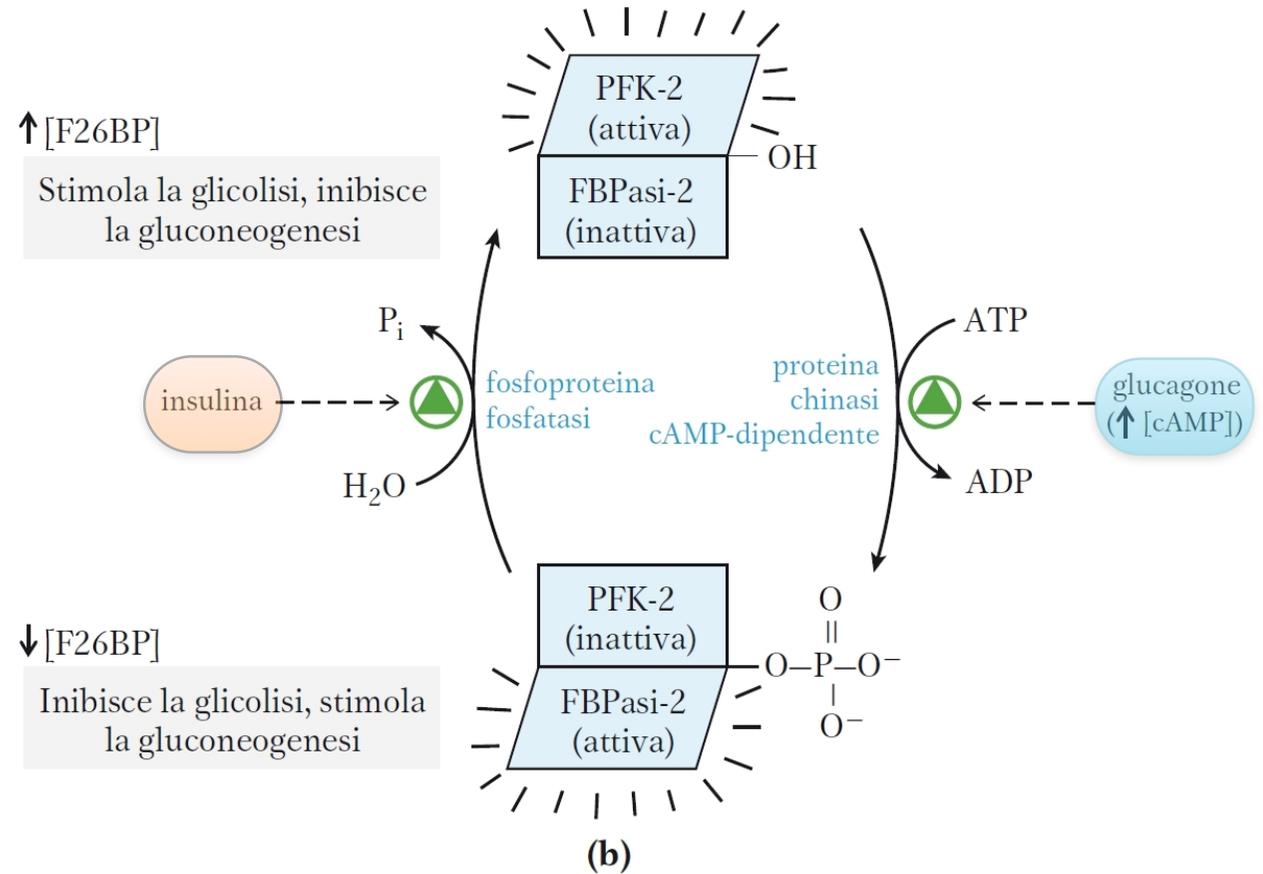
(b)



# F26BP: “sensore dell’indice glicemico” ENZIMA BI-FUNZIONALE (PFK-2/FBPasi-2)



(a)



(b)

PFK-2 FBPasi-2

Proteina bifunzionale

(2 attività enzimatiche distinte)

**Modulate in modo dipendente da  
FOSFORILAZIONE**