**Seminární práce**

**Vzájemná regulace glykolýzy a glukoneogeneze**

Vypracovala: Jana Chalupová

Předmět. Oborový seminář 4 (KBC/OSE4)

Datum: 27. 4. 2011

Obor: Biochemie

Ročník: 5.

**Glykolýza** je metabolický proces degradace glykolýzy probíhající anaerobně (za nepřístupu kyslíku) ve všech živých buňkách. Jak prokaryotických, tak eukaryotických. V eukaryotických buňkách se proces glykolýzy odehrává v cytosolu. Glykolýza je tedy sled reakcí, kdy dochází k metabolizaci jedné molekuly glukosy na dvě molekuly pyruvátu a dvě molekuly ATP. Probíhá ve třech stupních:

1. Převedení glukosy na fruktosa-1,6-bisfofát (probíhají zde fosforylace)

2. Štěpení hexosy (fruktosa-1,6-bisfofátu) na dvě vzájemně převoditelné triosy (glyceraldehyd-3‑fosfát a dihydroxyaceton-3-fosfát)

3. Oxidace tříuhlíkatých sloučenin na pyruvát a současná tvorba molekul ATP

Chod metabolických procesů glykolýzy musí být regulován a kontrolován z důvodu tvorby ATP, vznikajícího degradací glukosy na pyruvát, a produkce stavebních látek pro anabolické reakce. V metabolické dráze glykolýzy existují proto tři místa kontroly, které zprostředkovávají enzymy katalyzující v podstatě ireversibilní reakce. Jedná se o enzymy, jejichž aktivity jsou regulovány reversibilní vazbou allosterických efektorů nebo kovalentní modifikací:

* **Hexokinasa** - enzym, který katalyzuje první krok glykolýzy. Za katalýzy tohoto enzymu dochází fosforylaci glukosy, a tím k zamezení průchodu glukosy přes buněčné membrány, a také k její destabilizaci. Hexokinasa je inhibována svým produktem - glukosa-6-fosfátem. Vysoká koncentrace této látky, tudíž naznačuje, že buňka má dostatek energie, která může být uložena ve formě glykogenu nebo může sloužit jako biosyntetický prekurzor. Zároveň také inhibice enzymu fosfofruktokinasy (roste hladina fruktosa-6-fosfátu a tudíž i glukosa‑6‑fosfátu) vede k inhibici hexokinasy.
* **Fosfofruktokinasa** - je nejdůležitější enzym v regulaci savčí glykolýzy. Katalyzuje fosforylaci fruktosa-6-fosfátu za účasti ATP. Jaterní enzym je tedy allostericky inhibován vysokou hladinou ATP tak, že snižuje afinitu tohoto enzymu k fruktosa-6-fosfátu. AMP naopak dovede zvrátit inhibiční účinek ATP. Se snižujícím se poměrem ATP/AMP se tudíž zvyšuje aktivita enzymu. Glykolýza je započata, jakmile dojde k poklesu energetické hotovosti. Pokles hladiny pH taktéž inhibuje aktivitu fosfofruktokinasy, při čemž se předchází produkci vysokých koncentrací laktátu a tudíž acidóze strmému poklesu pH v krvi.

 Citrát inhibuje fosfofruktokinasu jako důsledek nadbytku všech biosyntetických prekurzorů, a tudíž i pyruvátu, který není za těchto podmínek degradací glukosy potřeba získávat.

 **Fruktosa-2,6-bisfostát** (F-2,6-bP) je allosterický aktivátor a zvyšuje afinitu fosfofruktokinasy k fruktosa‑6‑fosfátu tím, že posouvá konformační rovnováhu ze stavu T do stavu R. Tento důležitý regulátor glykolýzy je regulován dvěma enzymy - fosforylací fruktosa‑6‑fosfátu reakcí katalyzovanou fosfofruktokinasou 2 (PFK2) a defosforylací F-2,6-bP specifickou fosfatasou bisfosfatasou 2 (FBasa 2). Ve skutečnosti se jedná o jednořetězcový polypeptid (55 kDa), který obsahuje jak kinasovou, tak fosfatasovou doménu a N-koncovou regulační doménu. Tento bifunkční enzym se vyskytuje v pěti isoformách lišících se velikostí, kinetikou, imunologickými a regulačními vlastnostmi. Forma L převažuje v játrech a hlídá homeostázu glukosy v krvi, forma M se vyskytuje převážně ve svalech. Je-li tedy vysoká koncentrace glukosy v krvi, zvyšuje se koncentrace fruktosa‑6‑fosfátu v játrech a tím i koncentrace (F‑2,6‑bP), který následně stimuluje fosfofruktokinasu. Aktivita fosfatasová, stejně tak kinasová je u bifunkčního enzymu vzájemně kontrolována fosforylací serinového zbytku. Touto fosforylací (proteinkinasou A) je aktivita PFK2 inhibovaná a naopak aktivita FBPasy 2 aktivovaná. Tento stav nastává při nízké hladině glukosy, kdy hormon glukagon spouští proteinkinasovou kaskádu přes cAMP. Naopak při vysoké hladině glukosy dochází ke ztrátě fosfátu na aminokyselinovém zbytku serinu a ke změně aktivit PFK2 (aktivovaná) a FBpasa2 (inhibovaná), a tudíž ke zrychlení procesu glykolýzy.

* **Pyruvátkinasa** - enzym katalyzující třetí ireverzibilní krok glykolýzy kontroluje konečný bod této dráhy, který poskytuje ATP a pyruvát. Opět existuje několik isoforem tohoto enzymu, L typ převažuje v játrech a M typ ve svalech a mozku a mají mnoho důležitých vlastností. Oba vážou fosfoenolpyruvát, jsou aktivovány fruktosa-1,6-bisfosfátem a allostericky inhibovány ATP a také alaninem, který je z pyruvátu syntetizován (signál dostatku stavebních kamenů). Katalytické vlastnosti jsou kontrolovány u L formy (nikoliv však u M formy) taktéž fosforylací. Je-li tedy hladina glukosy v krvi nízká, glukagon spouští kaskádu AMP vedoucí k fosforylaci také pyruvátkinasy snižující její aktivitu. Tyto hormonem spouštěné fosforylace (stejně tak jako kontrolovaný proces hladiny fruktosa-2,6-fosfátu u bifunkčního enzymu) předchází spotřebě glukosy v játrech, když je v tu chvíli víc potřebná pro mozek a svaly.

**Glukoneogeneze** je metabolická dráha syntézy glukózy z necukerných prekurzorů. Hlavním místem tohoto procesu jsou játra, v malé míře také ledviny a mozek, kosterní a srdeční svalstvo. Dochází tedy ke konverzi pyruvátu na glukózu. Necukerné prekurzory, jako je například laktát, aminokyseliny a glycerol jsou nejdříve přeměněny na pyruvát. Glukoneogeneze však není zvratem glykolýzy, u které je rovnováha posunuta ve prospěch tvorby pyruvátu. V dráze glukoneogeneze tudíž musejí být odlišné reakce, které tuto skutečnost obcházejí. Jedná se o tři ireverzibilní kroky, které se v v tomto procesu liší:

1. **Pyruvátkarboxylasa a fosfoenolpyruvátkarboxykinasa** jsou enzymy katalyzující reakci tvorby fosfoenolpyruvátu z pyruvátu přes oxaloacetát.

**2. Fruktosa-1,6-bisfosfatasa** katalyzuje reakci exergonické hydrolýzy fruktosa-1,6-bisfosfátu za vzniku fruktosa-6-fosfátu. Allosterický enzym aktivován citrátem, inhibován fruktosa-2,6-bisfosfátem a AMP.

**3. Glukosa-6-fosfatasa** katalyzuje reakci vzniku glukosy hydrolýzou glukosa-6-fosfátu.

**Pyruvátkarboxylasa** je enzym mitochondriální, ostatní enzymy jsou cytoplasmatické. Katalyzuje reakci karboxylace pyruvátu za vzniku oxaloacetátu za spotřeby ATP. Jedná se o enzym, který zprostředkovává karboxylaci za účasti biotinu jako prostetické skupiny. První krok tvorby karboxybiotinu záleží na přítomnosti acetylCoA, biotin totiž není karboxylován, pokud není acetyl CoA vázán na enzym. Jedná se o allosterickou aktivaci. Oxaloacetát vznikající reakcí pyruvátkarboxylasy v mitochondriích je redukován na malát, transportován skrz membránu do cytosolu a tam reoxidován na oxaloacetát. Ten je následně dekarboxylován a fosforylován za katalýzy **fosfoenolpyruvátkarboxykinasy,** kdy dochází k uvolnění oxidu uhličitého, což pohání reakci GTP a oxaloacetátu za vzniku fosfoenolpyruvátu. Dále je fosfoenolpyruvát metabolizován za účasti enzymů glykolýzy v opačném směru až k místu dalšího ireverzibilního kroku, kdy je fruktosa-1,6-bisfosfát hydrolyzován za účasti **fruktosa-1,6-bisfosfatasy** nafruktosa-6-fosfát a Pi. V dalším kroku dochází ke konverzi na glukosa-6-fosfát, kdy v mnoha tkáních proces glukoneogeneze takto končí. A takto modifikovaná glukosa nemůže difundovat přes membrány. Proto existují regulační mechanismy, které hlídají a regulují proces tvorby volné glukosy, aby byla udržována hladina glukosy v buňce. První z nich je enzym **glukosa‑6‑fosfatasa** zodpovědný za tvorbu volné glukosy a ten je regulován, druhým je skutečnost, že tento enzym je přítomen pouze ve tkáních, kde je potřeba udržovat homeostázu glukosy v krvi a tudíž musí docházet k uvolňování glukosy z buněk do jejich okolního prostředí (do krve). Jedná se hlavně o játra a v menší míře o ledviny. Tvorba glukosy se neodehrává v cytosolu ale v lumen endoplazmatického retikula, kde je enzym **glukosa‑6‑fosfatasa** vázán přímo k membráně a jeho fosfatasová aktivita je stabilizována Ca2+ -vazebným proteinem. Následně je glukosy zpět transportována do cytosolu párem transportérů.

**Obr. 1** Tři klíčové kroky glykolýzy a glukoneogeneze

**Glukoneogeneze a glykolýza** jsou vzájemně zkoordinované, to znamená, že pokud jedna dráha je relativně neaktivní, ta druhá je vysoce aktivní. Jelikož obě dráhy jsou exergonické, teoreticky by mohly paralelně být aktivní obě. Existují však důležité regulační mechanismy, které kontrolují množství a aktivitu enzymů obou drah, takže k této skutečnosti nedochází.

 Vzájemná přeměna fruktosa-6-fosfátu a fruktosa-1,6-bisfosfátu je přísně kontrolována. AMP stimuluje fosfofruktokinasu, ale inhibuje fruktosa-1,6-bisfosfatasu. Citrát a ATP inhibují fosfofruktokinasu, ale citrát stimuluje fruktosa-1,6-bisfosfatasu. Z tohoto je jasné, že vysoká hladina AMP vypovídá o nedostatku potřebné energie a signalizuje pro tvorbu ATP a spouští se proces glykolýzy, a naopak při dostatečném množství energie a biosyntetických meziproduktů, dochází k inhibici glykolýzy a spouští se mechanismy glukoneogeneze. Důležitým regulačním mechanismem, je také kontrola metabolických procesů za účasti hormonů. V případě glykolýzy a glukoneogeneze se jedná o antagonisty insulin a glukagon, které ovlivňují tvorbu s degradaci signální molekuly fruktosa‑2,6-bisfosfátu, která silně stimuluje aktivitu fosfofruktokinasy a inhibuje fruktosa-1,6-bisfosfatasu. Při hladovění, kdy je koncentrace glukosy nízká dochází k sekreci hormonu glukagonu, který spouští kaskádu cAMP, dochází k fosforylaci bifunkčího enzymu, který má za následek snížení aktivity PFK2 a zvýšení aktivity FBPasy2, jež sníží hladinu fruktosa-2,6-bisfosfátu a dojde ke zpomalení glykolýzy a zvýšené glukoneogenezi.

 Vzájemná přeměna fosfoenolpyruvátu a pyruvátu je regulována allosterickými efektory, a taktéž fosforylací. Vysoké hladiny ATP a alaninu vypovídají o dostatečné energii a dostatečném množství stavebních kamenu a tudíž inhibují pyruvátkinasu v játrech, naopak pyruvátkarboxylasa je aktivována acetylCoA a inhibována ADP. Stejně tak fosfoenolpyruvátkarboxykinasa je inhibována ADP.

 Hormony ovlivňují množství a aktivity enzymů ne základě genové exprese. Ovlivňují rychlost transkripce nebo degradace mRNA. Hladina insulinu se zvyšuje po jídle, ten stimuluje expresi fosfofruktokinasy, pyruvátkinasy a bifunkčního enzymu. Hladina glukagonu se zvyšuje při hladovění a dochází inhibici exprese těchto enzymů a ke stimulaci produkce enzymů klíčových při glukoneogenezi - fosfoenolpyruvátkarboxykinasy a fruktosa-1,6-bisfosfatasy. Ve srovnání s allosterickou regulací je ta transkripční mnohem pomalejší a může trvat i několik hodin nebo dní.



**Obr. 2** Reciproká regulace glykolýzy a glukoneogeneze v játrech

Literatura:

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002) Biochemistry, pp. 345-349, 358-368, [W. H. Freeman and Co.](http://www.whfreeman.com/), NY, USA.

Voet. D., Voetová J. G. (1995) Biochemie, [Victoria](http://www.whfreeman.com/) publishing, Praha, CZ.