



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Obecný metabolismus. Metabolismus glykogenu (4).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Glykogen.

1. Struktura a funkce glykogenu.
2. Odbourávání glykogenu, regulace degradačních enzymů.
3. Úloha hormonů při degradaci glykogenu.
4. Syntéza glykogenu.
5. Regulace syntézy a degradace glykogenu.

Struktura a funkce glykogenu.

Glukosa je významný zdroj energie a prekurzor syntéz mnoha molekul. Nelze ji skladovat, protože její větší koncentrace ruší osmotickou rovnováhu v buňkách.

Glykogen je neosmotický polymer.

Glykogen je pohotová zásobní forma glukosy. Většina glukosových jednotek je v glykogenu vázána α -1,4 glykosidovou vazbou.

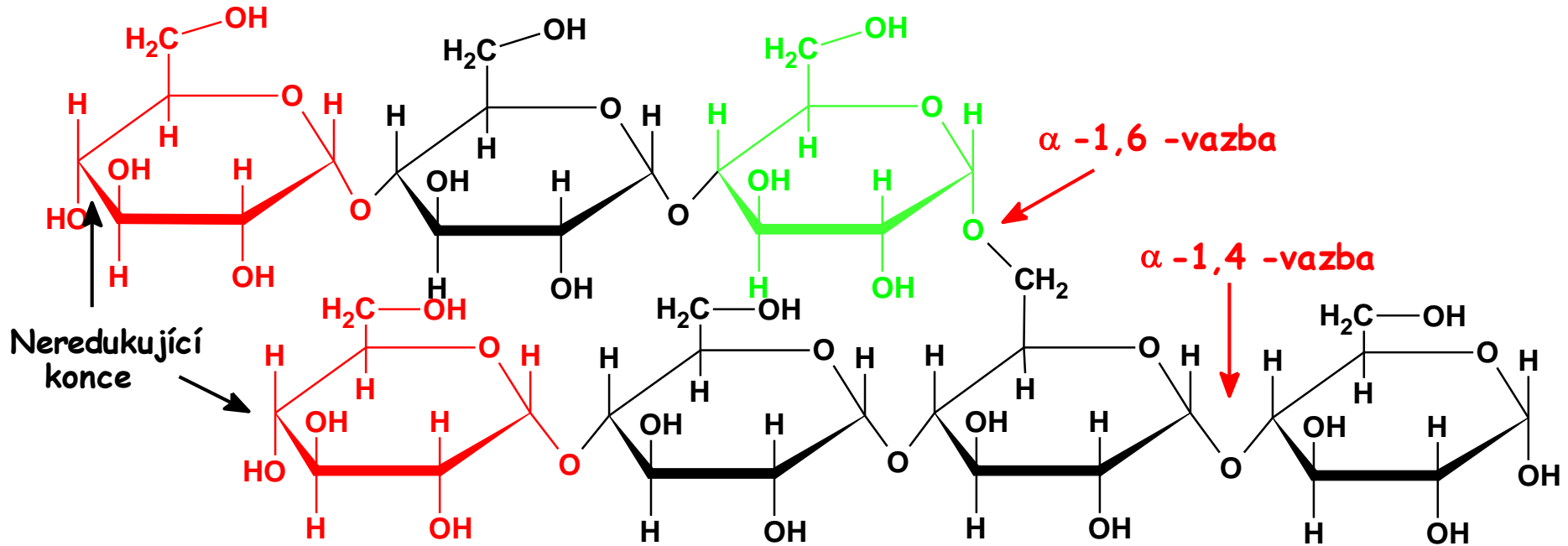
Lineární řetězec je po každé desáté glukosové jednotce větven glykosidovou vazbou α -1,6.

Alfa glykosidové vazby tvoří otevřené helikální polymery, zatímco β vazby produkují přímá strukturní vlákna jako např. celuloza.

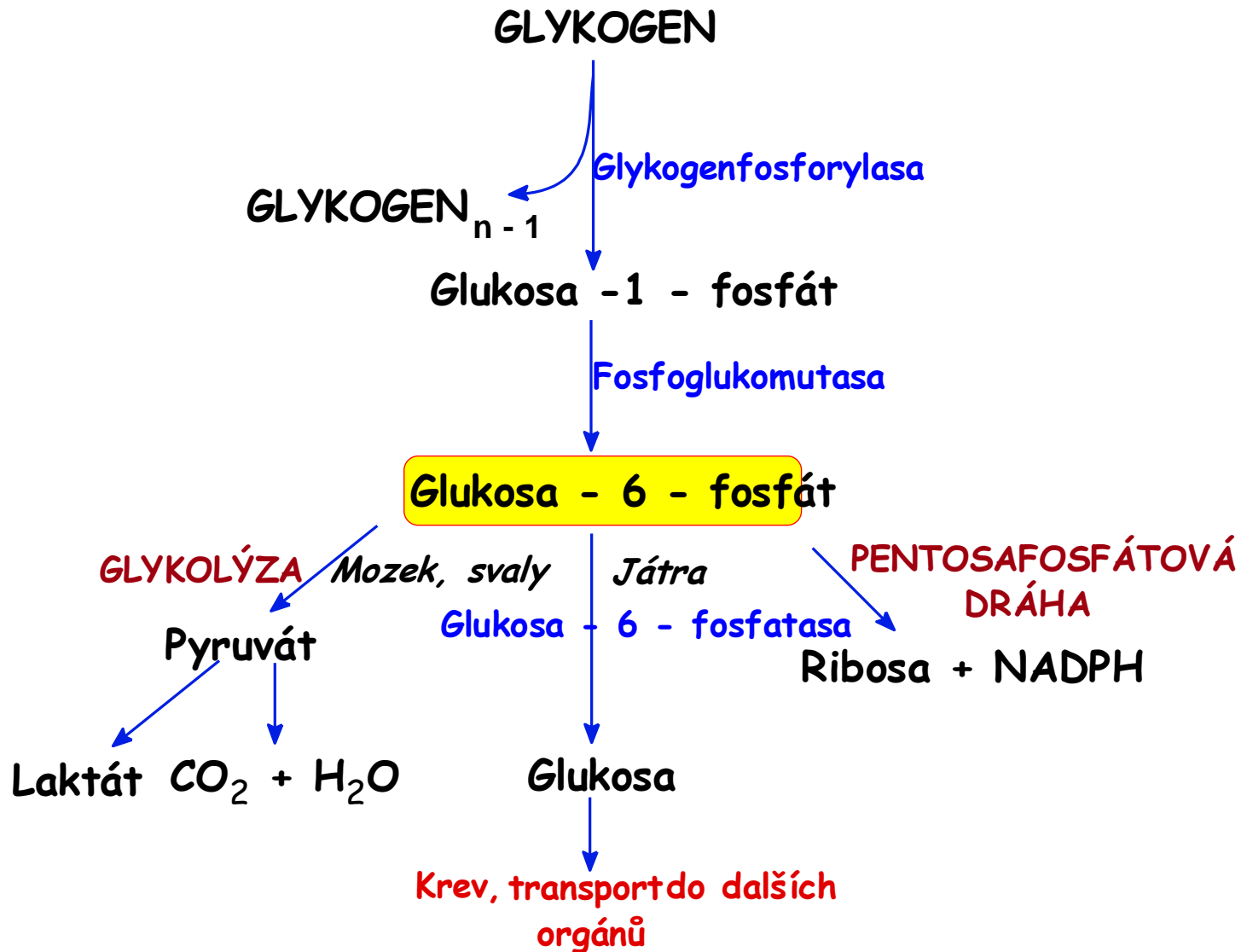
Glykogen není tak redukován jako mastné kyseliny a proto není tak energeticky bohatý. Je pohotová rezerva energie mezi jídly.

Glykogen je v těle lokalizován v játrech a kosterním svalstvu (v játrech 10%, ve svalstvu 2%). Je přítomen v cytoplasmě ve formě granulí.

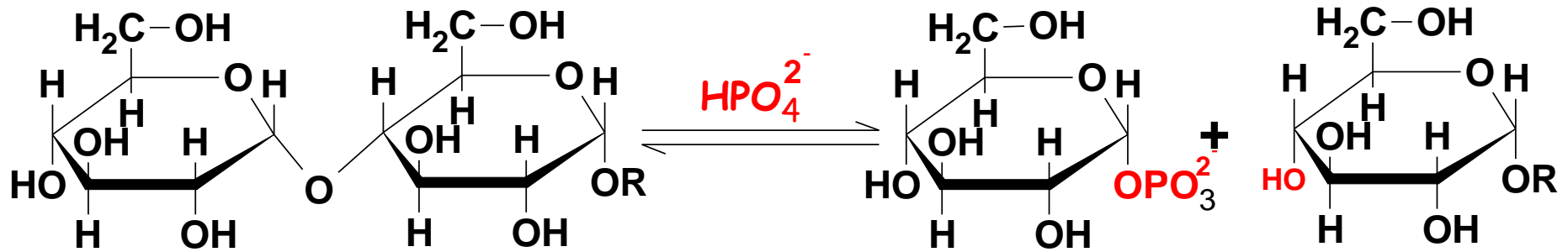
Struktura glykogenu.



Dráhy glukosa-6-fosfátu uvolněného štěpením glykogenu.



Glykogenfosforylasa.



Glykogenfosforylasa.

- Reakce katalyzovaná fosforylasou je „*in vitro*“ reversibilní. Při pH 6,8 je rovnováha mezi orthofosfátem a glukosa-1-fosfátem 3, 6. Hodnota ΔG° je nízká, protože glykosidová vazba je převedena na fosforečný ester se shodným transfer potenciálem.

Za podmínek „*in vivo*“ silně převažuje fosforolýza, protože poměr „*in vitro*“ $[P_i] / [\text{glukosa-1-fosfát}]$ je větší než 100.

Příklad jak poměry v buňce změny volnou energii ve prospěch tvorby produktu.

Fosforolytické štěpení glykogenu je energeticky výhodné, protože produkt - sacharid je již fosforylovaný !!

Hydrolytické štěpení by poskytlo glukosu, kterou je třeba dále za vynaložení energie ATP fosforylovat.

Další výhodou je fosforylovaný sacharid s negativním nábojem a ten se nemůže uvolnit ven z buňky.

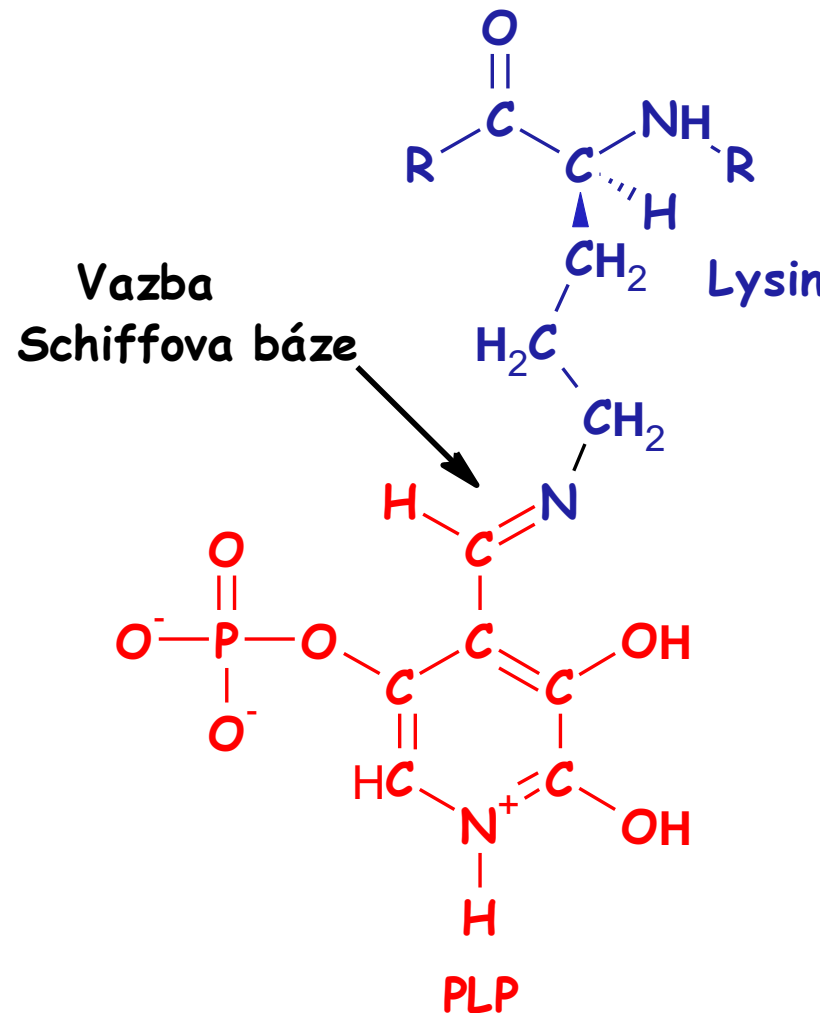
Mechanismus glykogenfosforylasy.

- Aby nedošlo k hydrolytickému štěpení, ale fosforolytickému je fosforylase uzpůsobena.
- Fosforylase je homodimer dvou identických 97 kD podjednotek.
- Vlastní aktivní místo je vnořeno do dutiny mezi oběma podjednotkami. Vazebné místo glykogenu je vzdáleno od aktivního místa pět glukosových jednotek (30 Å). Není nutné, aby po každé katalytické reakci glykogen oddisocioval. **Takovéto enzymy, které se obvykle účastní syntézy nebo degradace polymerů nazýváme „processive“ řetězové (průběžné).** Obdoby jsou známé u RNA a DNA.
- Vyloučení vody je dále zabezpečeno dvěma mechanistickými podmínkami:
- A) Substrát glykogen i produkt glukosa-1-fosfát mají v poloze C1 α konfiguraci. Jako meziproduct se tvoří karboniový iont, který by se musel invertovat na β konfiguraci. To by vyžadovalo další dvě reakce.
- B) Druhou překážkou hydrolýzy je účast pyridoxalfosfátu (PLP viz vit. B₆) na katalýze.
-

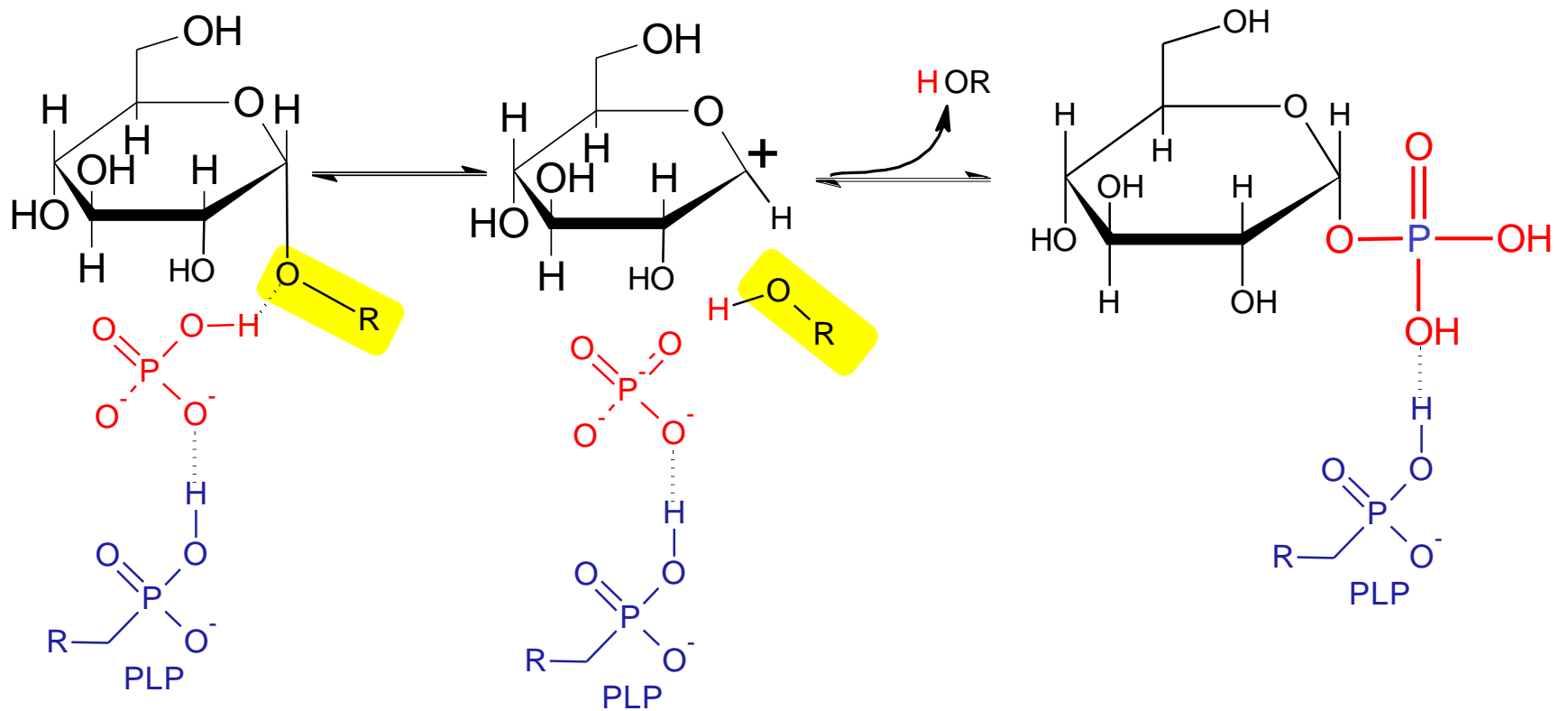
Mechanismus katalýzy glykogenfosforylasy.

- Aldehydová skupina PLP vytváří se specifickým Lys apoenzymu Schiffovu bázi.
- Orthofosfátová skupina vstupuje do reakce mezi 5' fosfátem PLP a glykogenem. Tato fosfátová skupina vytváří tandem s orthofosfátem, kterému poskytuje proton (acidobazická katalýza). Orthofosfát je akceptor.
- Orthofosfát poskytuje proton kyslíku v poloze 4 glykogenu. Vytváří se karbokation, který se naváže na orthofosfát za tvorby glukosa-1-fosfátu. Současně se vrací proton na PLP.

Vazba PLP na Lysin peptidovho řetězce apoenzymu- Schiffova báze.



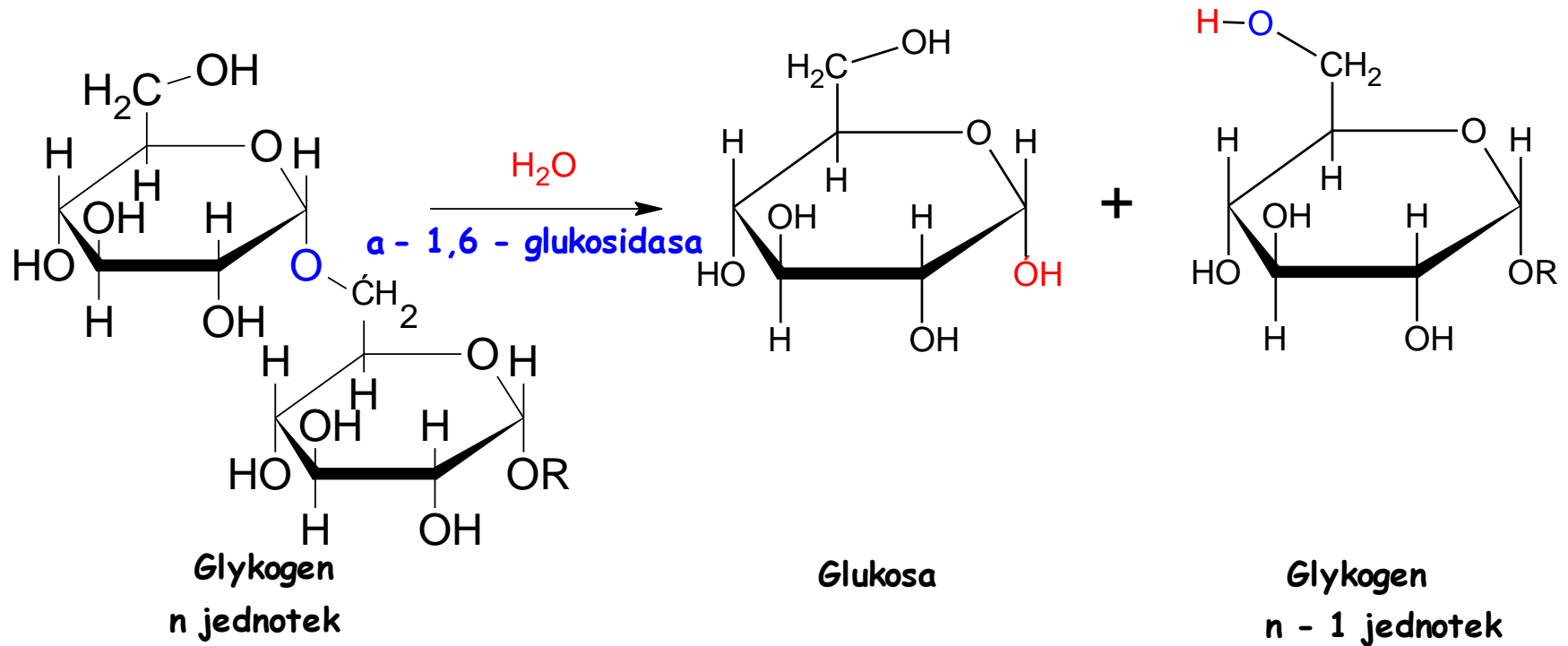
Mechanismus fosforylace.



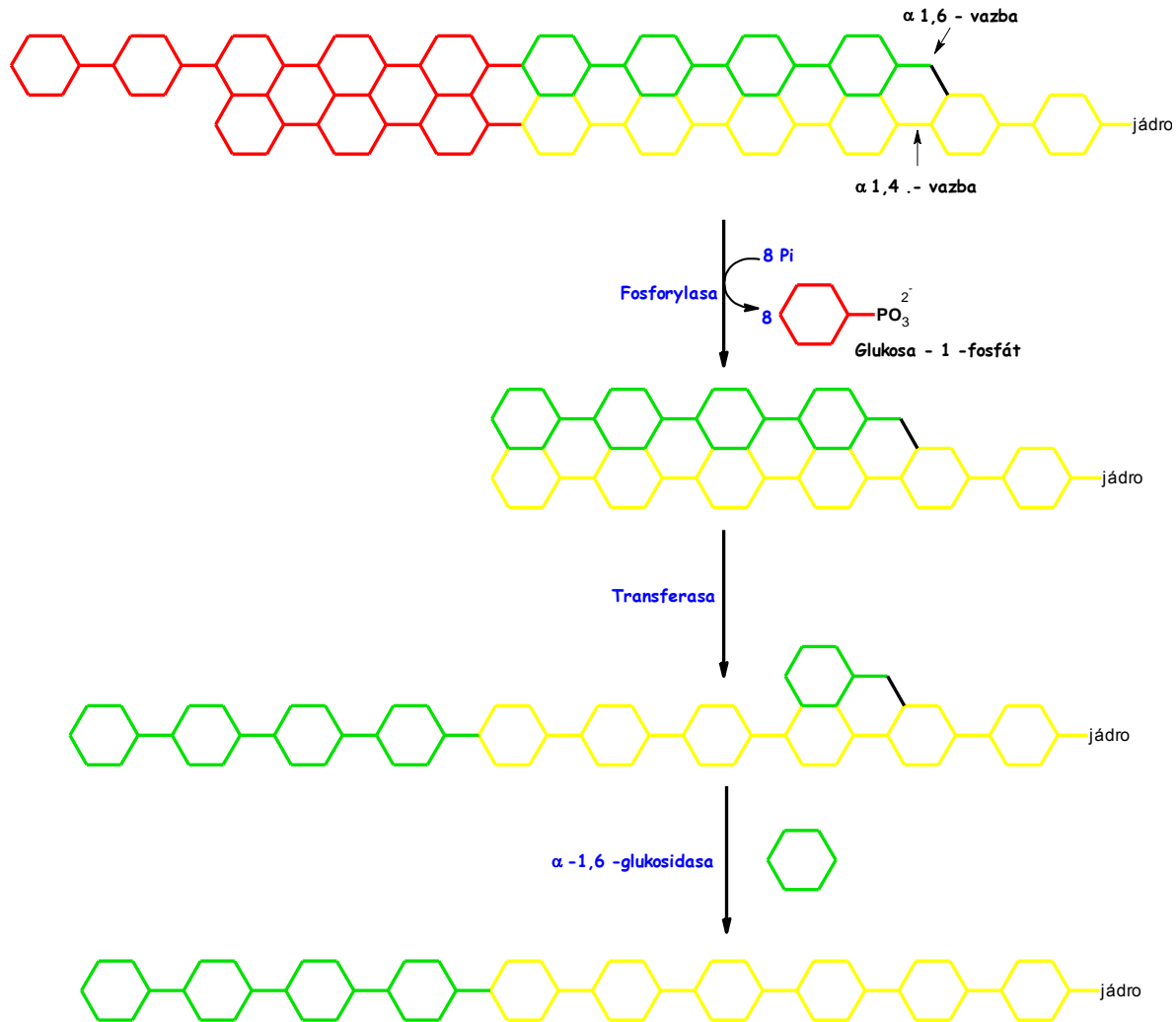
Odvětvovací enzym glykogenu.

- Fosforylasa nedokáže štěpit vazbu α -1, 6. Fosforylasové štěpení se zastavuje čtyři glukosové jednotky před větvením.
- Pokračují dva další enzymy: transferasa a α -1,6-glukosidasa.
- Transferasa přesouvá skupinu tří glukosových jednotek z bočního řetězce na hlavní (α -1, 4). Zůstává jedna glukosová jednotka vázaná vazbou α -1, 6. Enzym α -1, 6-glukosidasa (také nazývána jako odvětvovací enzym) odhydrolyzuje glukosovou jednotku ve formě α -D-glukosy.
- Volná glukosová jednotka je posléze fosforylována hexokinasou na glukosa-6-fosfát.
- U eukaryot je transferasa a α -1,6-glukosidasa na jednom peptidovém řetězci (160 kD). Další příklad bifunkčního enzymu.

Hydrolýza vazby α -1 - 6 glykogenu α - 1 - 6 glukosidasou.



Postup odbourávání glykogenu.



Jaterní glukosa-6-fosfatasa.

- Hlavní funkcí jater je udržovat konstantní hladinu glukosy v krvi. Játra uvolňují glukosu do krve během svalového pohybu a mezi jídly. Uvolněná glukosa je spotřebována přednostně mozkem a svalstvem.
- Z jaterních buněk se uvolňuje glukosa a ne štěpením glykogenu vzniklá glukosa-6-fosfát.
- Uvolnění glukosy do oběhu je katalyzováno glukosa-6-fosfatasou.
- Tentýž enzym uvolňuje glukosu po glukoneogenezi. Enzym je lokalizován v dutině hladkého endoplasmatického retikula.
- Glukosa-6-fosfát se transportuje dovnitř a glukosa s orthofosfátem ven.
- Enzym se nenachází ve většině dalších tkání. Svalová tkáň spotřebovává glukosu na tvorbu ATP.
- Glukosa není hlavním zdrojem energie pro játra !!!

Regulace aktivity glykogenfosforylasy.

- Metabolismus glykogenu je kontrolován vícenásobným mechanismem. Hlavním enzymem pod kontrolou je glykogenfosforylase.
- Enzym je regulován měkolika allosterickými efektory, které signalizují energetický stav buňky a reversibilní fosforylací.
- Reversibilní fosforylace je pod hormonální kontrolou - insulin, glukagon a adrenalin.
- Kontrolní mechanismy jsou odlišné v játrech a ve svalech.
- **Svalová glykogenfosforylase.**
- Svalová glykogenfosforylase (dimer) existuje ve dvou vzájemně převeditelných formách.
- **Aktivní fosforylase a neaktivní fosforylase b.** Každá z těchto forem ještě existuje v aktivnějším stavu R a méně aktivním stavu T.
- Rovnováha fosforylasy a je posunuta na stranu aktivnější R, rovnováha fosforylasy b je posunuta na stranu T.

Regulace aktivity glykogenfosforylasy.

- Při svalové práci přechází ATP na AMP, což je signál pro fosforylasu odbourávat glykogen. Svalová fosforylase b je aktivována přítomností vysoké koncentrace AMP, který se váže do nukleotidového vazebného místa a stabilizuje konformaci fosforylasy b ve stavu R. ATP působí jako negativní allosterický efektor tak, že kompetuje s AMP.
- Přejít fosforylasy b mezi stavy R a T je kontrolován energetickým nábojem svalové buňky.
- Váže se také glukosa-6-fosfát stabilizující méně aktivní stav fosforylasy b (inhibice zpětnou vazbou).
- Za fyziologických podmínek je fosforylase b neaktivní díky inhibičnímu účinku ATP a přítomnosti glukosa-6-fosfátu.
- Fosforylase a je plně aktivní nezávisle na hladinách AMP, ATP a glukosa-6-fosfátu.
- V odpočívajícím svalu je téměř veškerý enzym v inaktivní b formě.

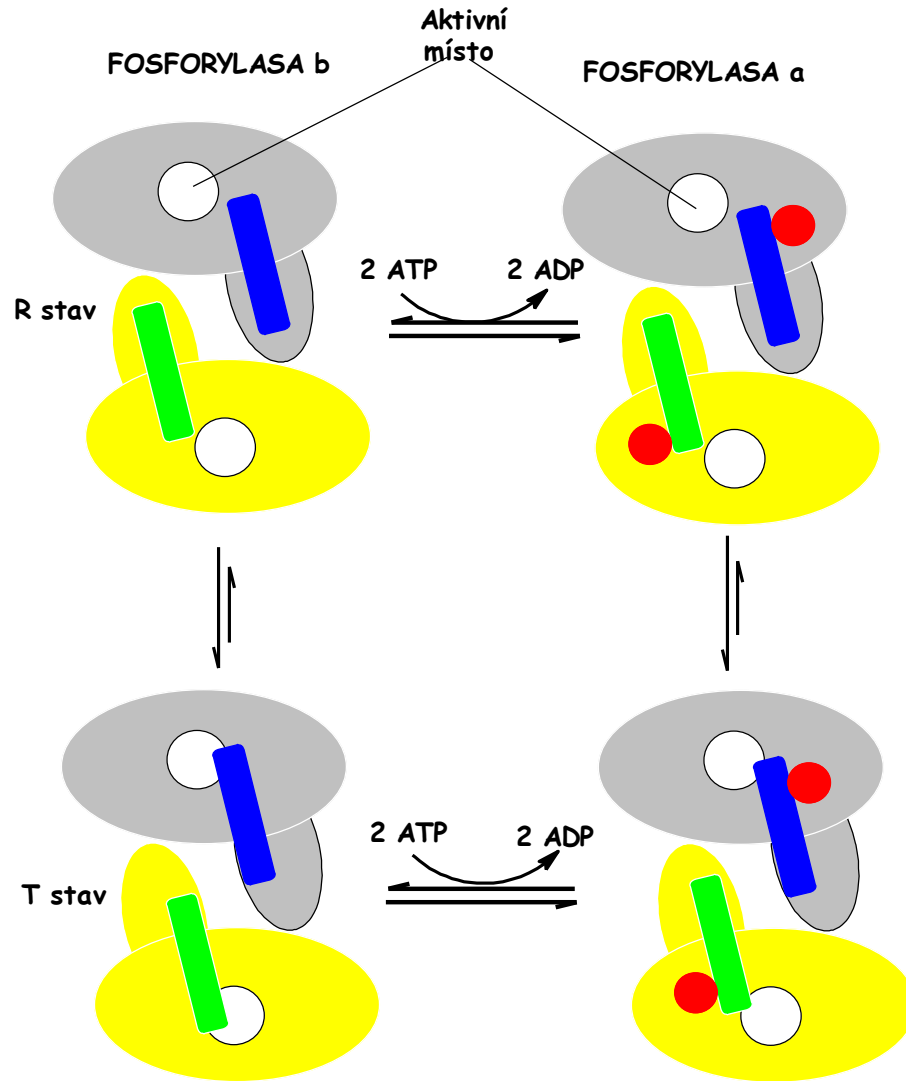
Regulace aktivity glykogenfosforylasy.

- Fosforylase b se převádí na formu a fosforylací Ser 14 na obou podjednotkách.
- Fosforylace se uskutečňuje enzymem fosforylasakinasou, který se aktivuje signálem adrenalinu.
- R stav v obou případech je otevřený a usnadňuje vstup substrátu do aktivního místa enzymu.
- **Jaterní glykogenfosforylase.**
- Funkcí degradace glykogenu v játrech je udržovat potřebnou hladinu glukosy v krvi.
- Jaterní fosforylase je ve formě a nezávisle na dalších signálech.
- Enzym se vazbou glukosy pohybuje mezi stavy R a T. Dostatek glukosy posunuje rovnováhu na stranu T.
- Jaterní fosforylase je inertní ke stavu hladiny AMP.

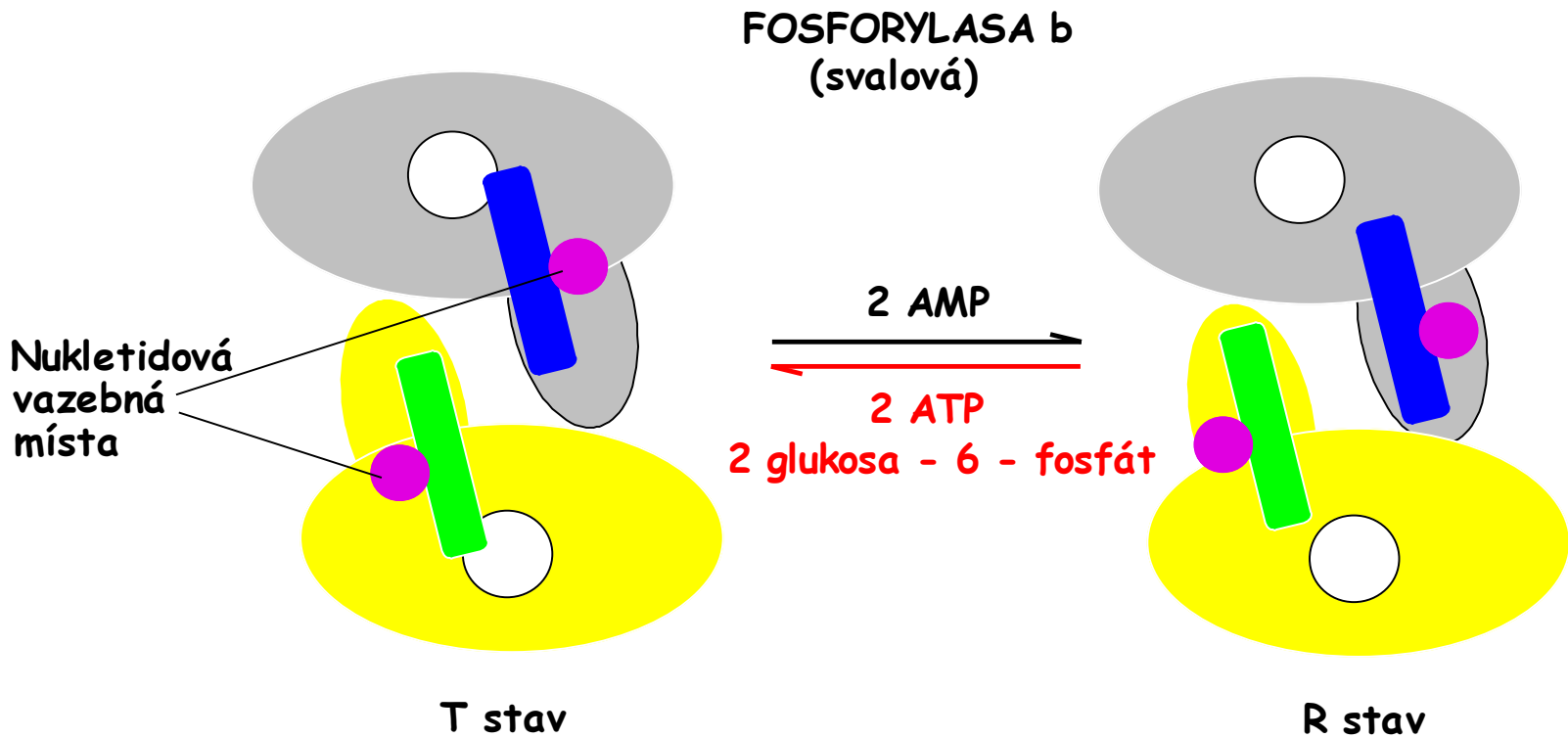
Regulace aktivity glykogenfosforylasy.

- Aktivita fosforylasakinasy.
- Fosforylasakinasa katalyzuje fosforylaci fosforylasy β na formu α .
- Fosforylasakinasa kosterního svalu má složení $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ - heterotetramer (1 200 kD).
- Katalytickou funkci má podjednotka γ , ostatní mají regulační funkci.
- Enzym je pod dvojitou kontrolou: Fosforylací (aktivací) fosforylasakinasou A (PKA) a zvýšenou hladinou Ca^{2+} .
- Jako vlastní substrát je fosforylasakinasa aktivována fosforylací na β podjednotce (iniciováno hormonálně).
- Fosforylasakinasa je také částečně aktivována Ca^{2+} . Její δ podjednotka je calmodulin - sensor vápenatých iontů a aktivátor mnoha dalších enzymů (hladina se zvedne až na $1 \mu M$). Maximální aktivity dosahuje fosforylací a zvýšenou hladinou Ca^{2+} .

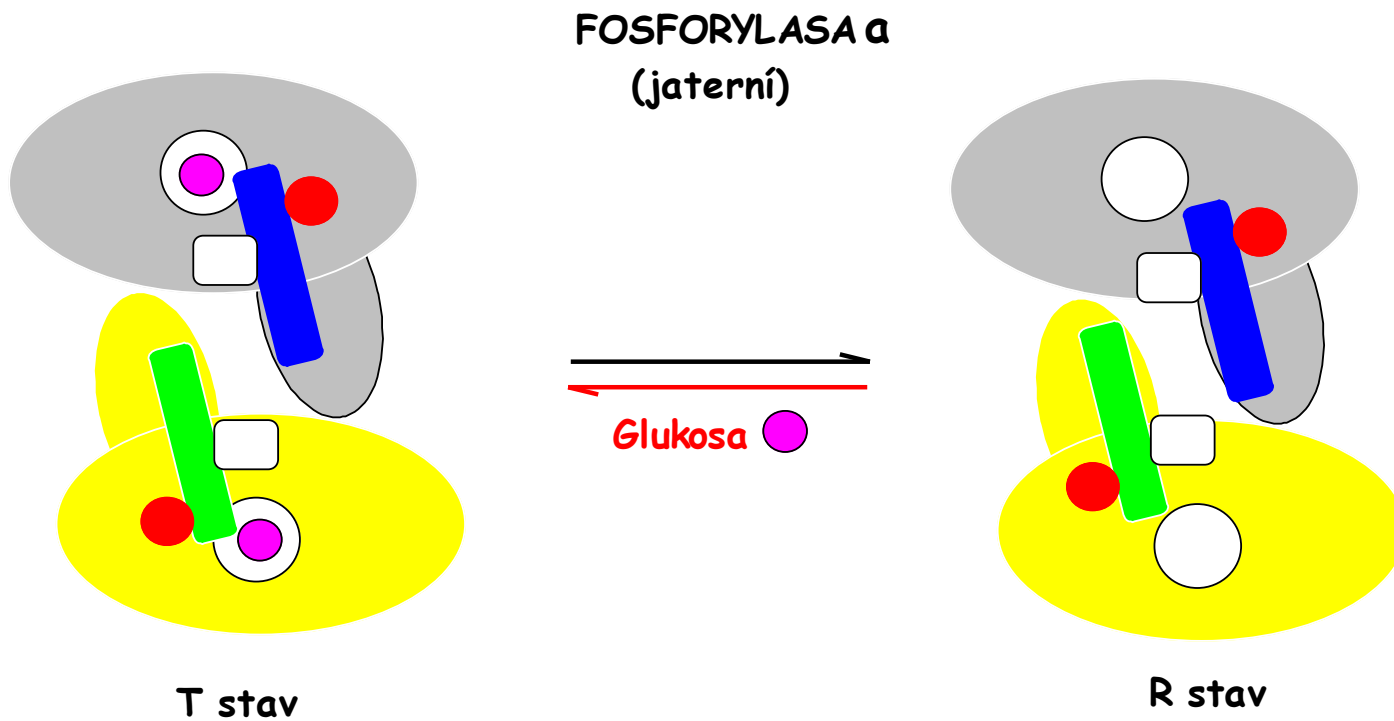
Regulace glykogenfosforylasy fosforylací.



Allosterická regulace svalové fosforylasy.



Allosterická regulace jaterní fosforylasy.



Adrenalin a glukagon - hormony podílející se na odbourávání glykogenu.

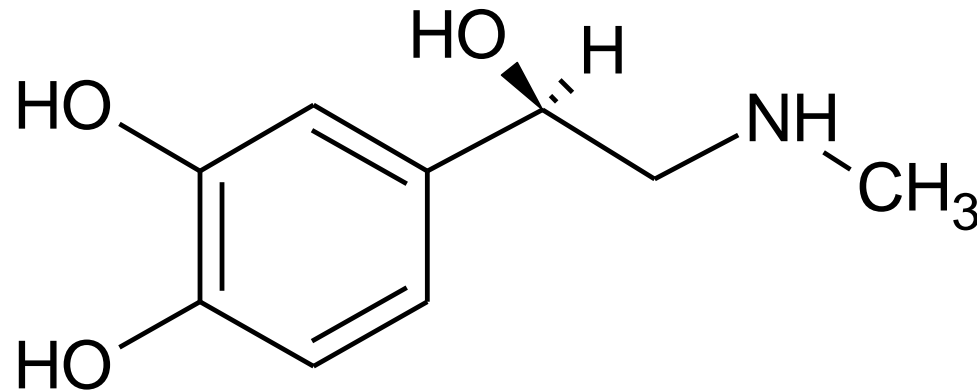
- Čím je aktivována proteinkinasa A ??
- Svalová činnost vyvolává tvorbu adrenalinu (epinefrinu), katecholaminu uvolňovaného z dřeně nadledvin.
- Adrenalin stimuluje degradaci glykogenu ve svalech a znatelně méně v játrech.
- Játra jsou podstatně ovlivňována glukagonem, polypeptidovým hormonem uvolňovaným z pankreatu za situace, kdy je hladina glukosy v krvi nízká. Fyziologicky - glukagon je signálem hladu.
- Adrenalin se váže na specifický 7TM receptor na plasmové membráně (β adrenergní receptor ve svalech), glukagon se váže na specifický receptor na jaterních buňkách.
- Těmito signály je aktivován G protein uvnitř buněk. Vytvoří se podjednotka G_s s vázaným GTP, která aktivuje transmembránovou adenylátcyklasu za tvorby cAMP z ATP.

Adrenalin a glukagon - hormony podílející se na odbourávání glykogenu.

- Zvýšená hladina cAMP v cytoplasmě aktivuje proteinkinasu A. Vazba cAMP do inhibitorového regulačního místa vyvolá jeho disociaci od katalytické podjednotky. Volná katalytická podjednotka je nyní aktivní.
- Proteinkinasa A fosforyluje fosforylasukinasu na β podjednotce a poté na α podjednotce. Fosforylovaná fosforylasakinasu aktivuje glykogenfosforylasu.
- Kaskáda cAMP velmi zesiluje efekt hormonu.
- Přenos signálu v játrech je složitější. Adrenalin vyvolává degradaci glykogenu. Kromě vazby na β adrenergní receptor se také váže na 7TM α adrenergní receptor a vyvolává fosfoinositidovou kaskádu, která vede k uvolnění Ca^{2+} z endoplasmatického retikula.
- Vápenaté ionty se váží na δ podjednotku (calmodulin) fosforylasykinasy. Obě stimulace vedou k maximální mobilizaci jaterního glykogenu.

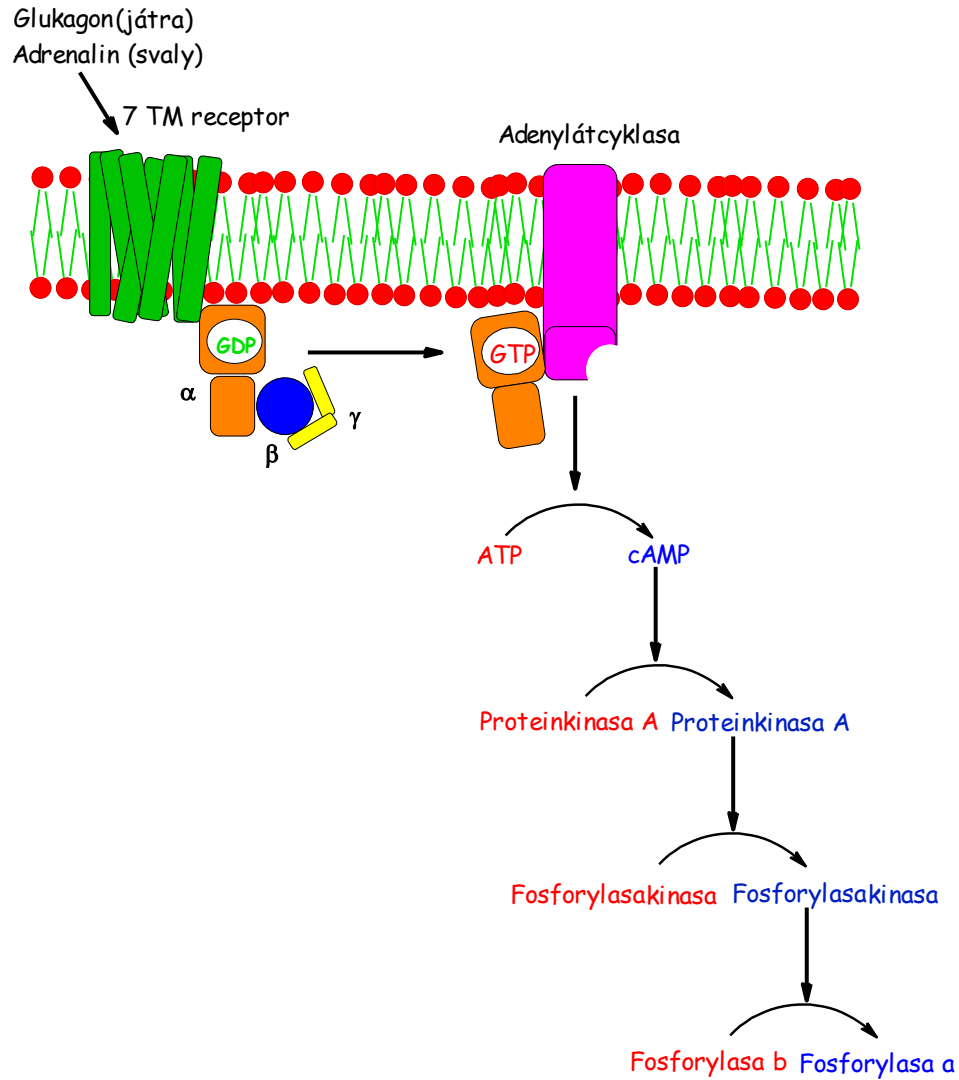
Adrenalin a glukagon - hormony podílející se na odbourávání glykogenu.

- Ukončení hormonální stimulace degradace glykogenu nastává při dostatečné hladině glukosy. Fosforylasakinas a glykogenfosforylasa jsou defosforylovány. Současně je aktivována syntéza glykogenu.
- Glukagon je oligopeptid produkovaný A buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu (29 aminokyselin, na N konci His a na C konci Thr).



Adrenalin

Regulační kaskáda degradace glykogenu.



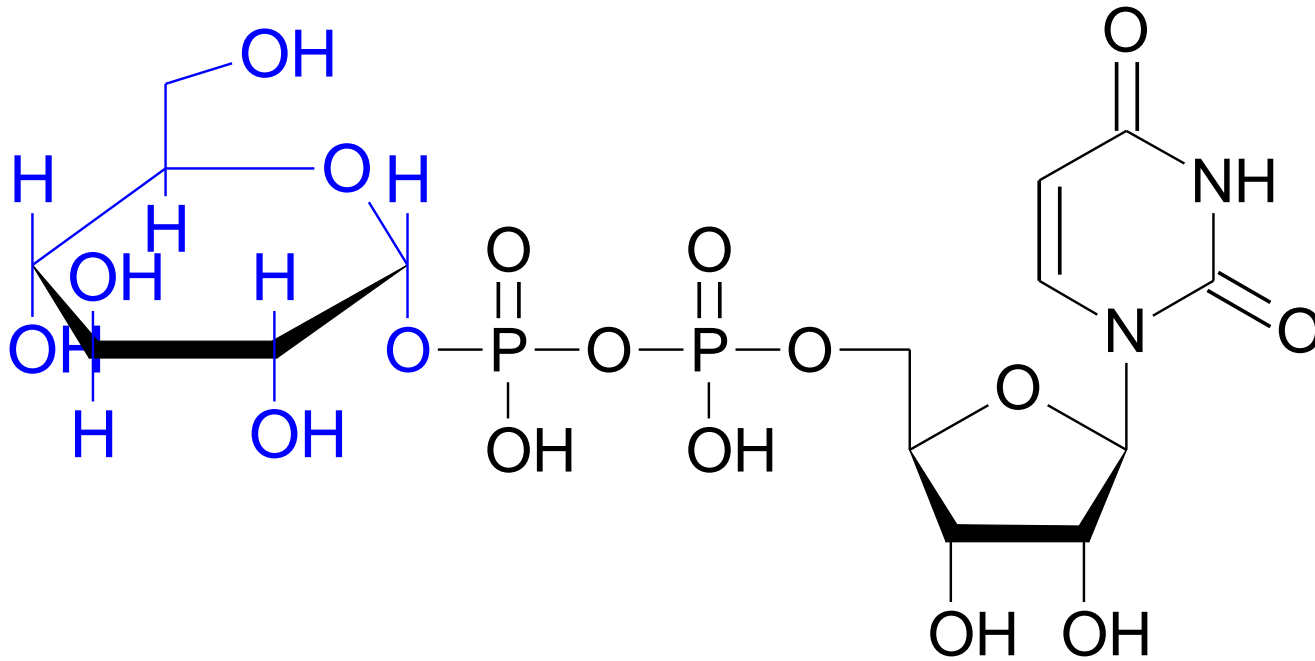
Syntéza glykogenu.

- Syntéza a degradace glykogenu jsou od sebe odděleny stejně jako glykolýza a glukoneogeneze.
- Oddělené procesy umožňují větší flexibilitu, energetiku a kontrolu obou procesů.
- Při syntéze glykogenu je aktivovanou glukosou uridindifosfátglukosa (UDP-glukosa).
- Syntéza glykogenu:
 - $\text{Glykogen}_n + \text{UDP-glukosa} \rightarrow \text{glykogen}_{n+1} + \text{UDP}$
- Degradace glykogenu:
 - $\text{Glykogen}_{n+1} + \text{P}_i \rightarrow \text{glykogen}_n + \text{glukosa-1-fosfát}$
 - UDP-glukosa se syntetizuje z glukosa-1-fosfátu a uridintrifosfátu (UTP) za katalýzy UDP-glukosapyrofosforylasy. Při reakci se uvolňují dva fosfáty jako pyrofosfát (difosfát).

Syntéza glykogenu.

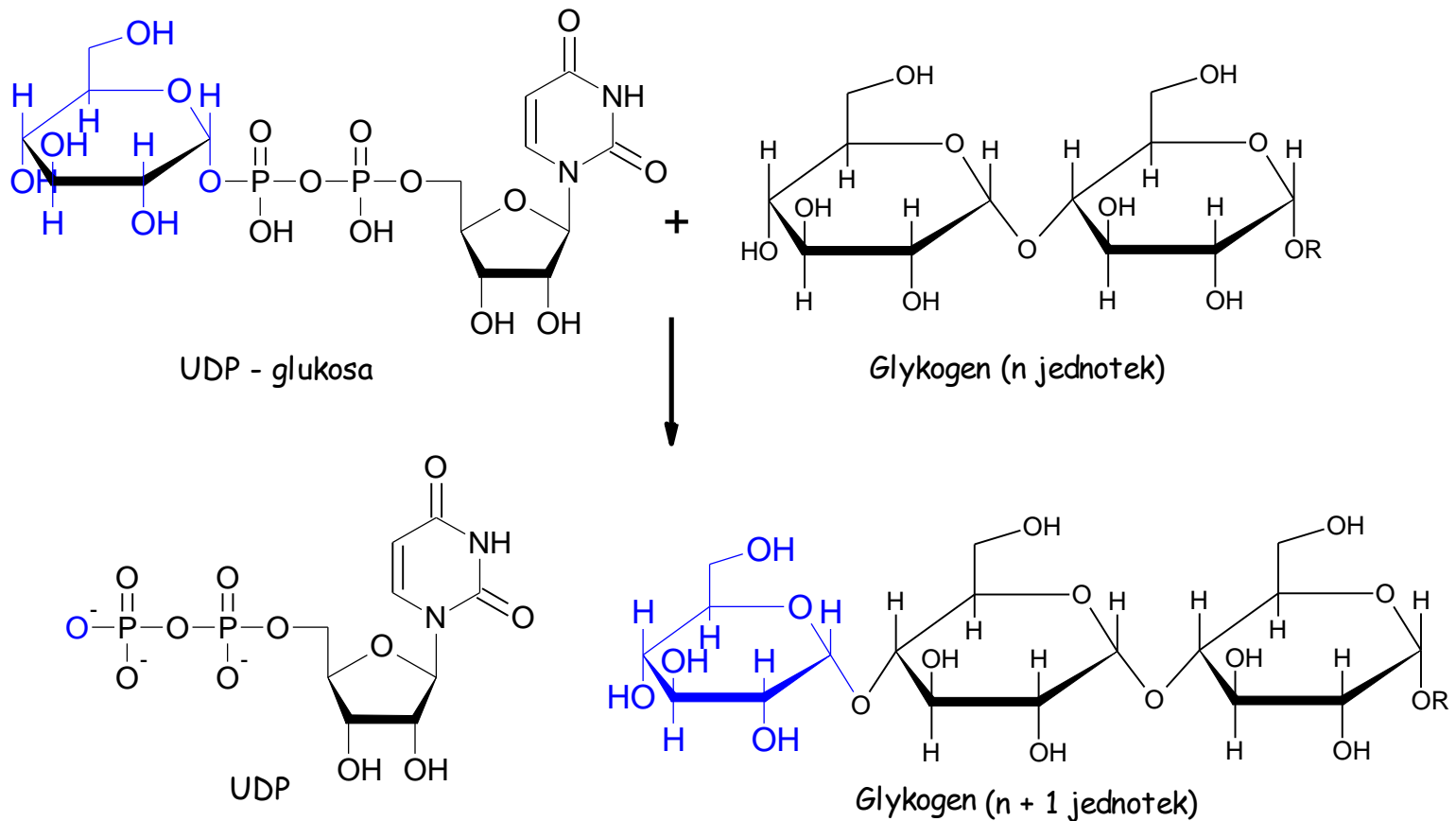
- Reakce tvorby UDP-glukosy je reversibilní, ale vznikající pyrofosfát je *in vivo* hydrolyzován pyrofosfatasou na dva orthofosfáty (reakce je ireversibilní). Hydrolýza pyrofosfátu pohání tvorbu UDP-glukosy.
- Hydrolýza pyrofosfátu pohání i řadu dalších metabolických reakcí.
- Glykogensynthasa: UDP-glukosa je přenášena na neredukující konec glykogenu (C-4). Glykogensynthasa přenáší aktivní glukosu na řetězec s minimálním počtem glukosových jednotek 4. Glykogensynthasa vyžaduje primer !!
- Tímto primerem je obvykle glykogenin což je glykosyltransferasa složená ze dvou identických podjednotek (37 kD). Každá podjednotka glykogeninu katalyzuje přenos osmi glukosových jednotek na druhou podjednotku. Tyto glukosylové jednotky vytváří krátké polymery, které jsou kovalentně vázány na Tyr glykogeninové podjednotky.

Uridindifosfátglukosa (UDP-glukosa).



Syntéza glykogenu (glykogensynthasa).

- Každá molekula glykogenu má ve svém středu (jádře) glykogenin.



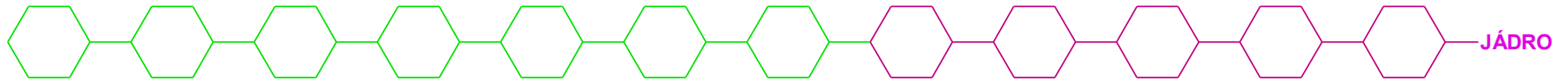
Syntéza glykogenu (větvicí enzym).

- Větvicí enzym vytváří vazby $\alpha - 1,6$. Enzym odštěpí z lineárního řetězce (minimálně 11 jednotek) $\alpha - 1,4$ nejčastěji sedmijednotkový řetězec s neredukujícím koncem a vnese na větvicí místo, které musí být nejméně 4 jednotky od již existujícího větvení.
- Větvení podstatně zvyšuje rozpustnost glykogenu a poskytuje obrovské množství terminálních řetězců, které jsou přístupné degradačním enzymům.
- Větvení urychluje syntézu i degradaci glykogenu.

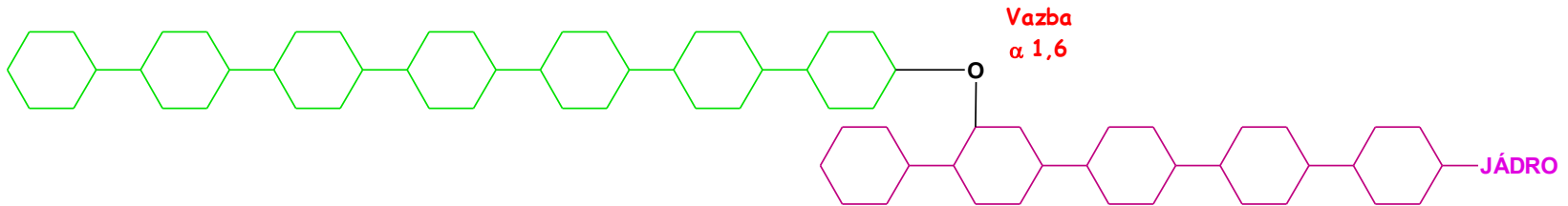
Větvící reakce.



↓
↓
↓
UDP - glukosa
+
glykogensynthasa



↓
Větvící
enzym



Glykogensynthasa

- Glykogenynthasa je klíčový enzym regulace syntézy glykogenu.
- Deaktivace glykogensynthasy se uskutečňuje proteinkinasami fosforylací na více místech. Enzymy fosforylace jsou proteinkinasa A a glykogensynthasakinasa (GSK). Fosforylace převádí aktivní formu glykogensynthasy na neaktivní !!
- Fosforylací se převádí aktivní forma a na obvykle neaktivní formu b. Fosforylovaná forma b je aktivní pouze za situace, kdy je vysoká hladina allosterického aktivátoru glukosa-6-fosfátu. Forma a je aktivní nezávisle na přítomnosti nebo nepřítomnosti glukosa-6-fosfátu.

Glykogen jako zásobní forma energie.

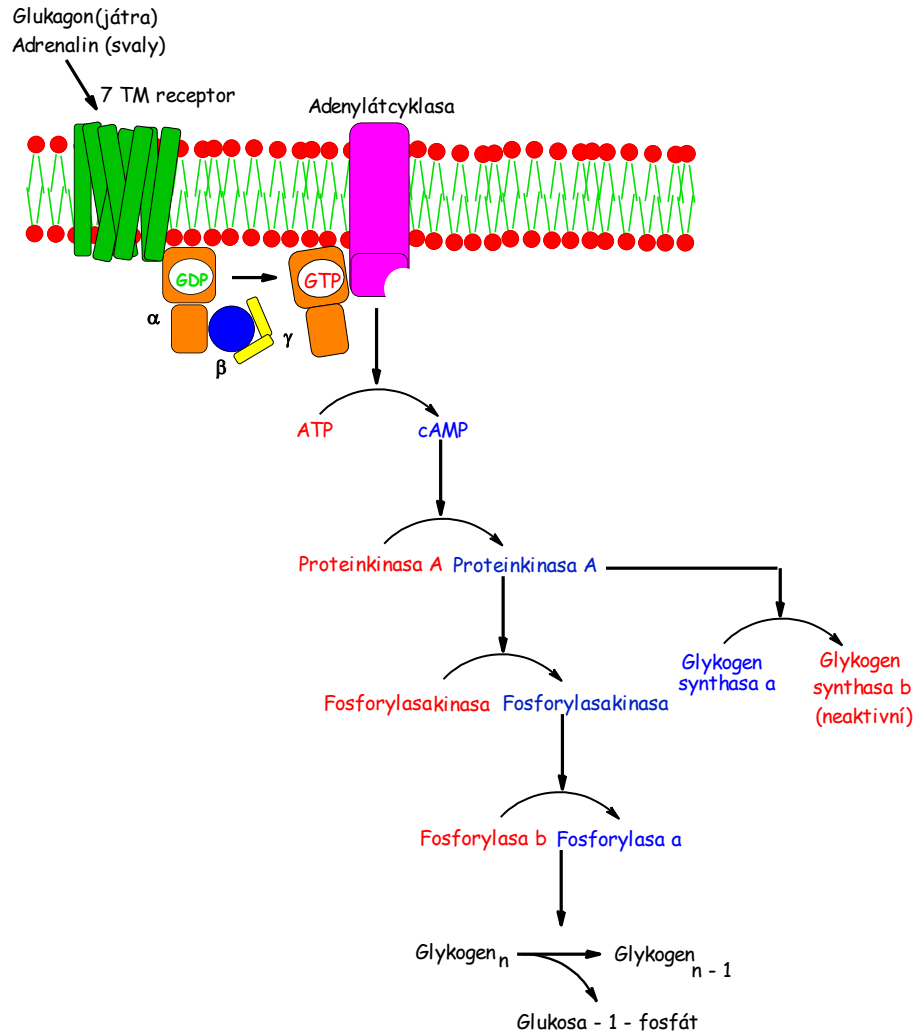
- Pro vstup jedné molekuly glukosa-6-fosfátu do řetězce glykogenu se spotřebuje jedna molekula ATP.
- Asi 90 % glukosových jednotek je při degradaci získáno fosforylací ve formě glukosa-1-fosfátu, který je izomerován na glukosa-6-fosfát. Zbylých 10 % glukosových jednotek z větvení je odštěpeno hydrolyticky. Na fosforylaci každé z těchto jednotek se spotřebuje jedna molekula ATP.
- Kompletní oxidací glukosa-6-fosfátu se získá 31 molekul ATP. Skladování spotřebuje o něco málo více než 1 molekulu ATP. Znamená to, že efekt skladování glukosy ve formě glykogenu je 97 %.

Regulace degradace a syntézy glykogenu.

- Kontrolní mechanismus zabraňuje, aby probíhala současně syntéza i odbourávání.
- Glukagon a adrenalin iniciují cAMP kaskádu vedoucí k degradaci glykogenu ve svalech i játrech. Současně blokuje syntézu.
- **Kontrola probíhá přes proteinkinasu A !!! Proteinkinasa fosforylací aktivuje glykogenfosforylasu a současně inaktivuje fosforylací glykogensynthasu !!**
- Opačný proces je realizován proteinfosfatasou, která katalyzuje hydrolytické štěpení fosfátů.
- Proteinfosfata 1 (PP1) inaktivuje fosforylasu a a fosforylasukinasu.
- PP1 odstraňuje fosfát z glykogensynthasy b a převádí ji na glykogensynthasu a. PP1 pohání syntézu glykogenu.

Koordinovaná kontrola metabolismu glykogenu.

Aktivace degradace glykogenu přes G kaskádu a současně inaktivace syntézy glykogenu (**glykogensynthasa b**)



Insulin stimuluje syntézu glykogenu.

- Při vysoké hladině sacharidů v krvi stimuluje insulin syntézu glykogenu inaktivací glykogensynthasakinas. Enzym udržující glykogensynthasu ve fosforylovaném inaktivním stavu.
- Insulin se váže na povrchu plasmové membrány na tyrosinkinasový receptor. Dochází k fosforylaci insulin-receptorových substrátů (IRS) což vede k aktivaci proteinkinas, které fosforylují a inaktivují glykogensynthasakinas.
- Opačně působí proteinfosfatasa1 - defosforyluje glykogensynthasu.
- Insulin také zvyšuje hladinu sacharidu v buňce tím, že zvyšuje počet glukosových transportérů.

Metabolismus glykogenu v játrech.

- Prvním signálem syntézy glykogenu v játrech je insulin.
- Druhým je koncentrace glukosy v krvi, která normálně kolísá od 80 do 120 mg/100 mL (4,4 až 6,7 mM),
- Glukosvým senzorem v játrech je fosforylasa a!!
- Vazbou glukosy na fosforylasu a se posunule allosterická rovnováha od aktivní formy R k formě neaktivní T. Tím se otevře prostor pro PP1 - oddisociuje a je aktivní.
- U svalové fosforylasy a k tomuto efektu při zvýšené hladině glukosy nedochází.
- Zvýšená hladina glukosy vede k uvolnění PP1 a následně k aktivaci glykogensynthasy a defosforylaci glykogenfosforylas.
- Aktivita glykogensynthasy se zvyšuje až je většina fosforylasy a převedena na fosforylasu b. Zabraňuje se tak paralelní syntéze a odbourávání glykogenu.

Hladina krevní glukosy reguluje metabolismus glykogenu v játrech.

Infúze glukosy vede k inaktivaci fosforylasy α a k aktivaci glykogensynthasy.

