



*mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii*

*CZ.1.07/2.2.00/28.0171*

# Obecný metabolismus.

## Regulace glykolýzy a glukoneogeneze (5).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Souhrn reakcí glykolýzy

## Stupeň

1. Glukosa + **ATP**  $\rightarrow$  glukosa-6-fosfát + ADP Hexokinasa (-33,5)
2. Glukosa-6-fosfát  $\leftrightarrow$  fruktosa-6-fosfát Fosfoglukosaisomerasa (-2,5)
3. Fruktosa-6-fosfát + **ATP**  $\rightarrow$  fruktosa-1,6-bisfosfát + ADP + H<sup>+</sup>
4. Fruktosa-1,6-bisfosfát  $\leftrightarrow$  glyceronfosfát + glyceraldehyd-3-fosfát
5. Glyceronfosfát  $\leftrightarrow$  glyceraldehyd-3-fosfát
6. Glyceraldehyd-3-fosfát + P<sub>i</sub> + NAD<sup>+</sup>  $\leftrightarrow$  1,3-bisfosfoglycerát + NADH
7. **1,3-Bisfosfoglycerát + ADP  $\leftrightarrow$  3-fosfoglycerát + ATP (2x)**
8. 3-Fosfoglycerát  $\leftrightarrow$  2-fosfoglycerát
9. 2-Fosfoglycerát  $\leftrightarrow$  2-fosfoenolpyruvát + H<sub>2</sub>O
10. **2-Fosfoglycerát + ADP + H<sup>+</sup>  $\rightarrow$  pyruvát + ATP (2x)**

# Souhrn reakcí glykolýzy

Stupeň	Reakce	Enzym	( $\Delta G$ v kJ/mol)
1.	Přenos fosfátu	hexokinasa	(-33,5)
2.	Izomerizace	fosfoglukosaisomerasa	(-2,5)
3.	Přenos fosfátu	fosfofruktokinasa	(-22,2)
4.	Aldolové štěpení	aldolasa	(-1,3)
5.	Izomerizace	triosafosfátisomerasa	(+2,5)
6.	Oxidační fosforylace	glyceraldehyddehydrogenasa	(-1,7)
7.	Přenos fosfátu	fosfoglycerátkinasa	(+1,3)
8.	Posun fosfátu	fosfoglycerátmutasa	(+0,8)
9.	Dehydratace	enolasa	(-3,3)
10.	Přenos fosfátu	pyruvátkinasa	(-16,7)

# Kontrolní a regulační stupně glykolýzy

Účelem glykolýzy je tvorba ATP a stavebních jednotek pro syntetické reakce jako je např. tvorba mastných kyselin.

Rychlost konverze glukosy na pyruvát je regulována tak, aby se dosáhlo těchto dvou buněčných potřeb.

V metabolických drahách jsou potenciálními místy kontroly a regulace enzymy katalyzující ireversibilní reakce.

V glykolýze to jsou: hexokinasa, fosfofruktokinasa a pyruvátkinasa.

Enzymy mohou být ovlivňovány reversibilní vazbou allosterických efektorů nebo kovalentní modifikací.

Množství těchto enzymů je regulováno transkripcí jako odpověď na metabolické potřeby buňky.

Regulace allosterickými efektory a kovalentní modifikací (např. fosforylací) probíhá časově v řádu milisekund, transkripce v hodinách.

## Regulace glykolýzy ve svalech.

Primární funkcí glykolýzy ve svalech je tvorba energie pro svalové stahy vyjádřená energetickým nábojem buňky - poměr ATP/AMP.

Můžeme posoudit jak výše uvedené klíčové enzymy reagují na změny koncentrací ATP a AMP.

Fosfofruktokinasa.

Allosterický enzym (340 kD tetramer) inhibuje vysoká hladina ATP. Vazba ATP do specifického regulačního místa odlišného od místa vazby substrátu snižuje afinitu enzymu k fruktosa-6-fosfátu (substrátu).

Původní hyperbolická závislost rychlosti fosfofruktokinase reakce na koncentraci substrátu se mění na sigmoidní (esovitou).

AMP potlačuje inhibiční účinek ATP.

Anaerobní sval se sníženým pH, tvorba kyselin, způsobuje inhibici enzymu (inhibice snížením pH je ochrana před poškozením buněk).

## Regulace glykolýzy ve svalech

Proč je pozitivním regulátorem fosfofruktokinasy AMP a ne ADP ?

Při rychlém úbytku ATP katalyzuje enzym **adenylátkinasa** reakci:



Kontrola koncentrací [AMP] je velmi citlivá. Proč ?

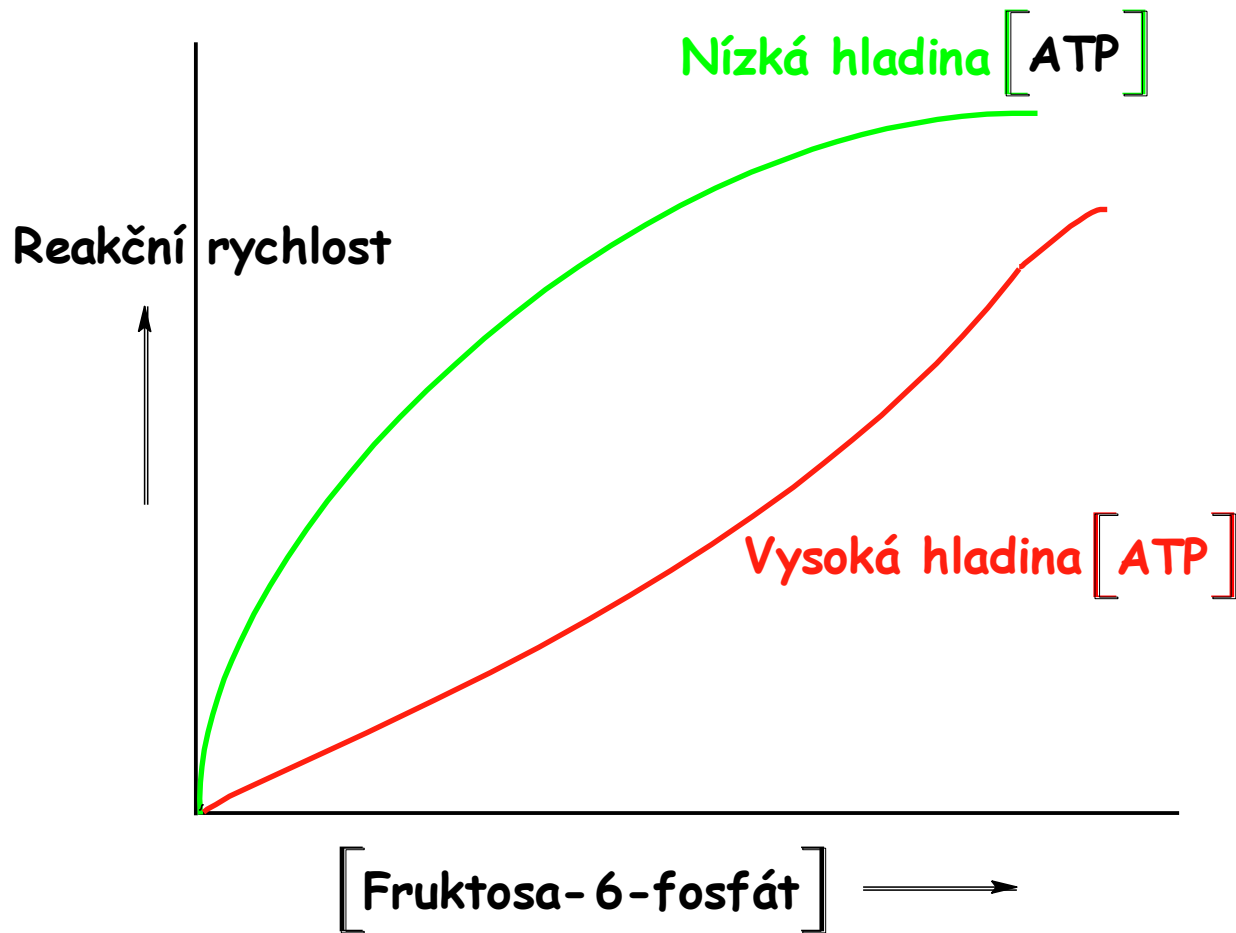
Koncentrace adenylátových nukleotidů v buňce je prakticky konstantní (pool).

Koncentrace [ATP] je vyšší než konc. [ADP] a ta je daleko nižší než [AMP].

**To znamená, že malá změna koncentrace [ATP] vede k velkým změnám koncentrace [AMP].**

# Regulace glykolýzy ve svalech

## Allosterická regulace fosfofruktokinasy



# Regulace glykolýzy ve svalech.

## Hexokinasa

Hexokinasa je enzym katalyzující první stupeň glykolýzy. Enzym je inhibován svým produktem, tj. glukosa-6-fosfátem.

Vysoká koncentrace glukosa-6-fosfátu je známkou, že buňka nepotřebuje další glukosu jako zdroj energie.

Zvýšená hladina glukosa-6-fosfátu je také známkou komunikace mezi fosfofruktokinásou a hexokinásou.

Za stavu, kdy je fosfofruktokinasa neaktivní, roste hladina fruktosa-6-fosfátu. Roste také hladina glukosa-6-fosfátu, protože fruktosa-6-fosfát je v izomerní rovnováze s glukosa-6-fosfátem.

Inhibice fosfofruktokinasy vede k inhibici hexokinasy.



## Regulace glykolýzy ve svalech.

Proč je klíčovým enzymem glykolýzy fosfofruktokinasa a ne hexokinasa ?

Glukosa-6-fosfát není jen substrátem glykolýzy, ale ve svalech slouží také jako prekurzor glykogenu a substrát pentosafosfátové dráhy.

Klíčovým ireversibilním krokem glykolýzy je fosforylace fruktosa-6-fosfátu na fruktosa-1,6-bisfosfát.

Platí pravidlo, že dominantním enzymem v metabolické dráze je ten, který katalyzuje klíčový krok dráhy.

Kdyby byla zablokována hexokinasová reakce glykolýzy, netvořil by se glykogen ani NADPH a pentosy.

# Regulace glykolýzy ve svalech. Pyruvátkinasa.

Pyruvátkinasa katalyzuje třetí ireversibilní krok glykolýzy, který vede k produkci pyruvátu a ATP.

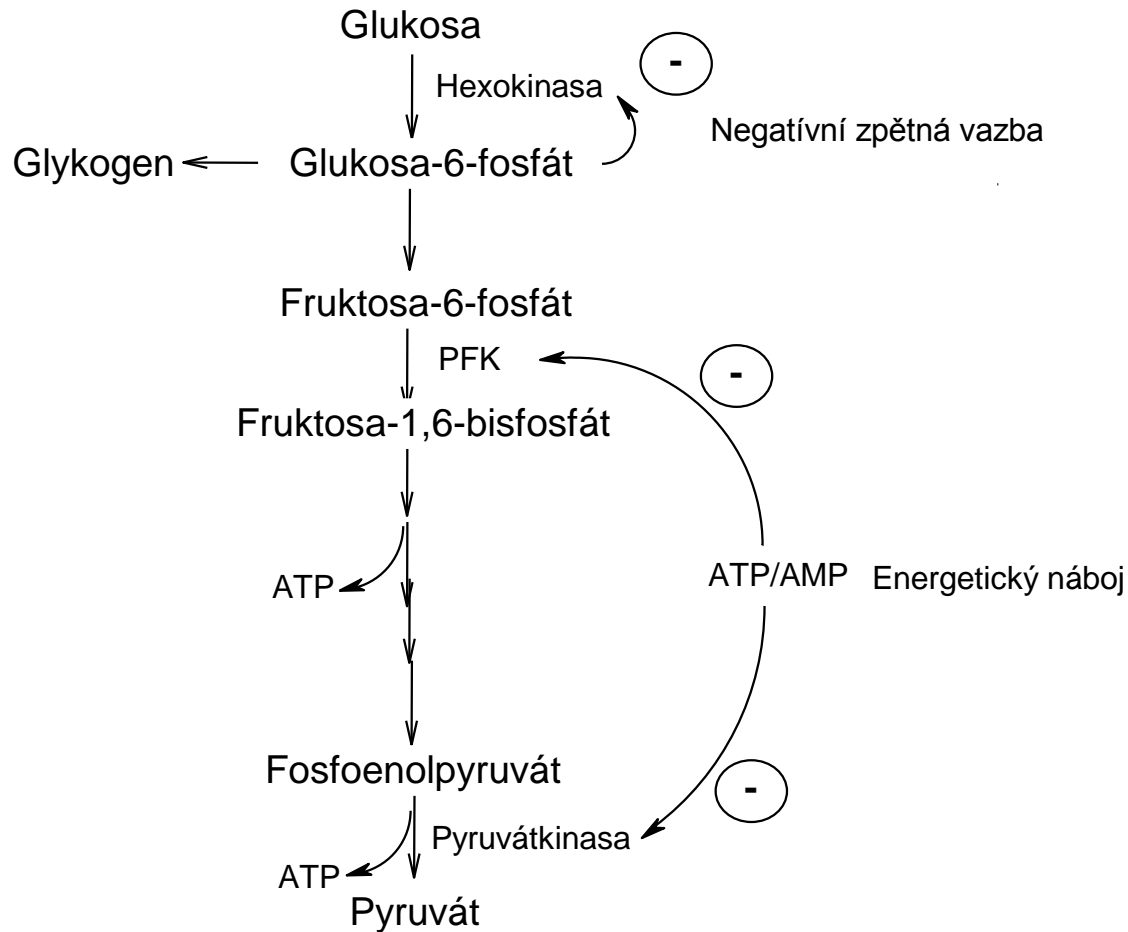
Enzym allostericky inhibuje produkt - ATP.

Alanin syntetizovaný aminotransferázovou reakcí z pyruvátu také allostericky inhibuje pyruvátkinasu (inhibice modifikovaným produktem).

Pyruvátkinasu aktivuje fruktosa-1,6-bisfosfát. Proč ?

# Celkové schéma regulace glykolýzy ve svalech (sval v klidu a v pohybu).

**Sval v klidu (glykolýza je inhibována)**



## Regulace glykolýzy v játrech.

Regulace glykolýzy v játrech je mnohem komplexnější. Funkce jater spočívá zejména v udržování hladiny glukosy v krvi. V játrech je skladována glukosa ve formě glykogenu.

### Fosfofruktokinasa.

Regulace hladinou ATP je stejná jako ve svalech.

Nízké pH nemá vliv na jaterní enzym, protože laktát za normálních podmínek v játrech nevzniká. Laktát, který je do jater transportován je přeměněn na glukosu.

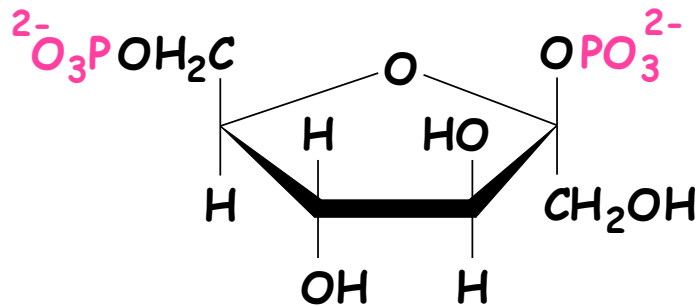
Fosfofruktokinasa je inhibována zvýšenou hladinou citrátu, který potlačuje inhibici ATP. Jednou z funkcí glykolýzy je také produkce stavebních jednotek. Citrát, první meziprodukt citrátového cyklu, představuje uhlíkaté stavební jednotky. Jeho zvýšená hladina v cytoplasmě signalizuje dostatek stavebních jednotek pro biosyntézu.

# Inhibice jaterní glykolýzy fruktosa-2,6-bisfosfátem.

Fruktosa-2,6-bisfosfát je signálem vysoké hladiny glukosy v krvi. V játrech je dostatek fruktosa-6-fosfátu (izomerace glukosa-6-fosfátu), který akceleruje tvorbu fruktosa-2,6-bisfosfátu.

Vazba fruktosa-2,6-bisfosfátu na fosfofruktokinasu akceleruje glykolýzu, tak, že snižuje inhibiční efekt ATP.

Takový efekt nazýváme *dopředná stimulace*.



Fruktosa-2,6-bisfosfát  
(F-2,6-BP)

## Hexokinasa.

Hexokinasová reakce v játrech je kontrolována stejně jako ve svalech.

V souvislosti s jaterní funkcí kontroly hladiny krevní glukosy je v játrech **isoenzym hexokinasy - glukokinasa**.

Glukokinasa není inhibována glukosa-6-fosfátem (produktem).

Glukokinasa fosforyluje glukosu jen při vysokých hladinách krevní glukosy. Její afinita ke glukose je asi 50x nižší než afinita hexokinasy.

Glukokinasa se tak účastní tvorby glykogenu a mastných kyselin (skladovatelná energie).

Nízká afinita glukokinasy ke glukose umožňuje funkci mozku a svalů za situace, kdy je přísun glukosy omezen.

## Pyruvátkinasa.

Pyruvátkinasa je tetramer, podjednotka 57 kD existující jako řada isoenzymů.

Jaterní podjednotky isoenzymu se označují L, svalové a mozkové M.

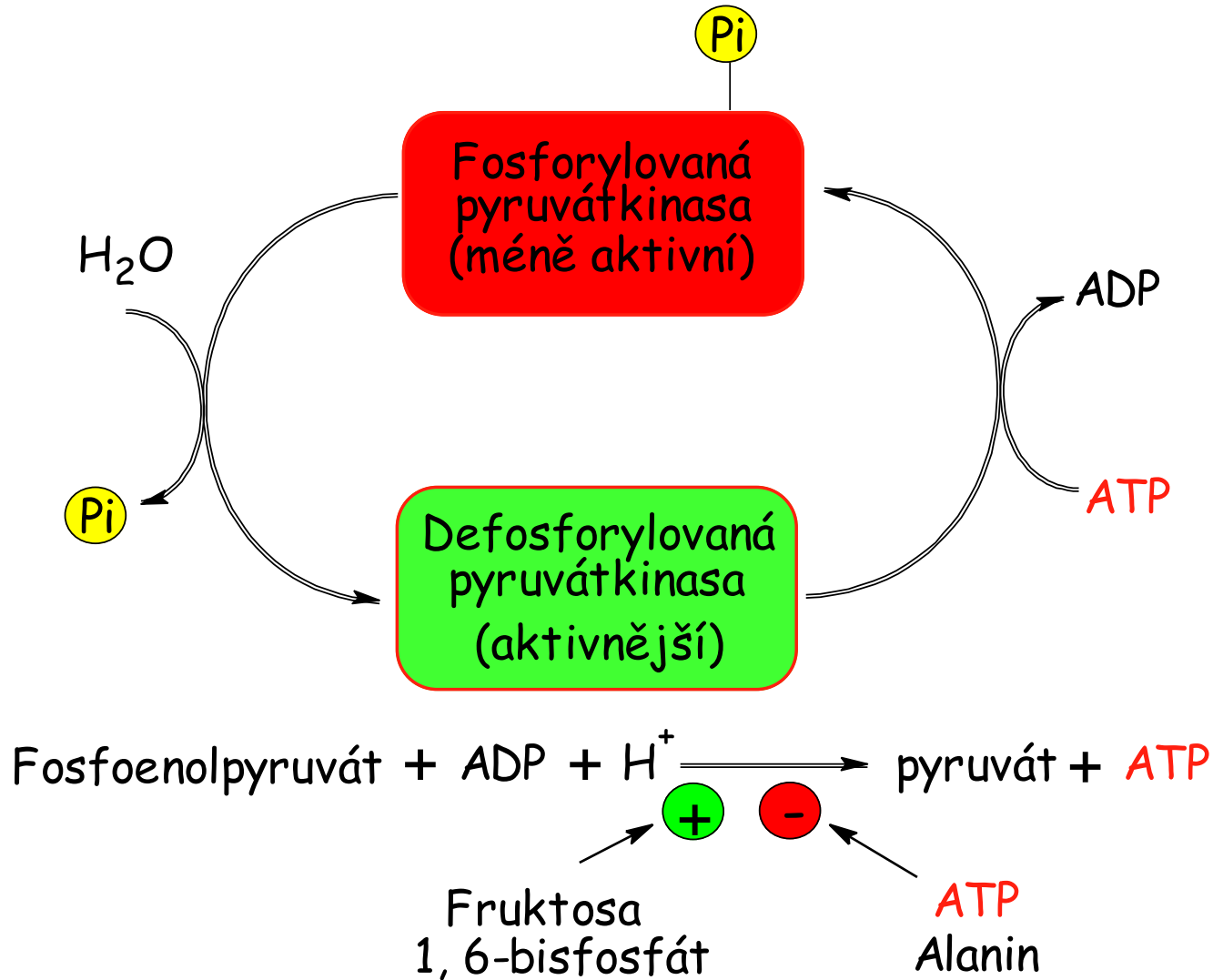
Tetramery tvořené oběma podjednotkami jsou funkčně shodné. Jaterní enzym je citlivější k allosterické regulaci.

Oba se liší citlivostí ke kovalentní modifikaci. Fosforylací je ovlivňována jen L forma.

Při nízké hladině glukosy, dochází k produkci hormonu glukagonu, který spouští v buňkách cAMP kaskádu vedoucí k fosforylaci pyruvátkinasy, která snižuje svoji aktivitu.

Játra nevyužívají glukosu, která je tak šetřena pro svaly a mozek.

# Schéma kontroly katalytické aktivity pyruvátkinasy.





# Glukosové transportéry.

Existuje pět typů glukosových transportérů (GLUT1 až GLUT5). Transportéry umožňují pohyb glukosy přes plasmatickou membránu.

Každý z transportérů je složen z jednoduchého polypeptidového řetězce o 500 AMK, který tvoří 12 transmembránových helixů.

## Glukosové transportéry-12 TM (transmembránové proteiny) (500 AMK).

GLUT	Distribuce	$K_m$	Poznámka
GLUT1	Všechny savčí tkáně.	1 mM	Základní transportní systém glukosy.
GLUT2	Játra a pankreatické $\beta$ buňky.	15-20 mM	V pankreatu reguluje hladinu insulinu.
GLUT3	Všechny savčí tkáně.	1 mM	Základní transportní systém glukosy.
GLUT4	Svaly a adipocyty	5 mM	Množství ve svalové plasmatické membráně se zvyšuje tréninkem.
GLUT5	Tenké střevo.	-	Primárně fruktosový transportér.

# Glukoneogeneze - syntéza glukosy z nesacharidových prekurzorů.

Udržování potřebné hladiny krevní glukosy je pro život velmi důležité. Na přísunu glukosy je závislý hlavně mozek.

Denní potřeba glukosy mozkiem je 120 g, tělo celkem 160 g.

V tělních tekutinách je asi 20 g glukosy, v glykogenu je skladem 190 g.

**Glukosa vystačí na jeden den!** Při hladovění nebo půstu je nutné syntetizovat potřebnou glukosu.

**Glukoneogeneze převádí pyruvát na glukosu. Nesacharidové prekurzory glukosy jsou nejdříve převáděny na pyruvát nebo vstupují do dráhy později jako oxaloacetát nebo glyceronfosfát.**

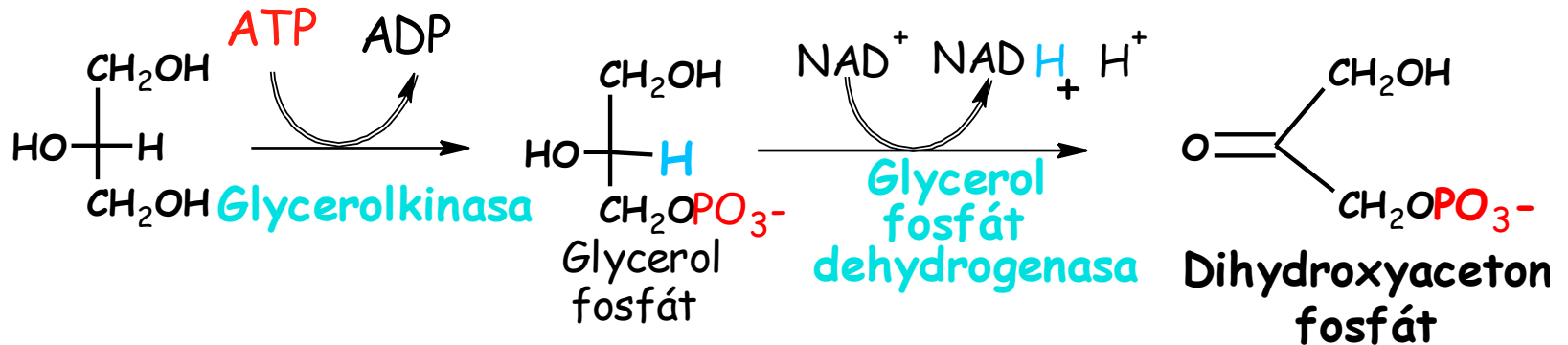
**Hlavními nesacharidovými prekurzory glukosy jsou laktát, aminokyseliny (glukogenní a glukó i ketogenní) a glycerol.**

# Glukoneogeneze - syntéza glukosy z nesacharidových prekurzorů.

Glycerol je prekurzor glukosy, ale živočichové nemohou převést mastné kyseliny na glukosu !!

Glycerol může vstoupit do glykolýzy nebo glukoneogeneze jako glyceronfosfát (dihydroxyacetonfosfát).

Hlavním místem glukoneogeneze jsou játra, částečně ledviny.



# Glykolýza a glukoneogeneze.

Glukoneogeneze není zvrát glykolýzy.

Celkem tři reakce se liší, protože rovnováha glykolýzy leží daleko na straně tvorby pyruvátu (jsou prakticky ireversibilní).

Za typických buněčných podmínek je aktuální  $\Delta G$  tvorby pyruvátu  $-84$  kJ/mol.

Ireversibilní stupně jsou katalyzovány hexokinasou, fosfofruktokinasou a pyruvátkinasou.

Při glukoneogenezi musí být tyto tři stupně obejity:

1. Fosfoenolpyruvát je tvořen z pyruvátu cestou přes oxaloacetát (anaplerotická reakce citrátového cyklu) působením **pyruvátkarboxylasy (mitochondriální enzym) a fosfoenolpyruvátkarboxykinasy.**

Všechny ostatní enzymy jsou v cytoplasmě.

## Glykolýza a glukoneogeneze.

2. Fruktosa-6-fosfát je tvořena z fruktosa-1,6-bisfosfátu hydrolýzou fosforečného esteru na uhlíku 1. Katalyzuje **fruktosa-1,6-bisfosfátfosfatasa**.
3. Volná glukosa se tvoří hydrolýzou glukosa-6-fosfátu v reakci katalyzované **glukosa-6-fosfátfosfatasou**.

Tvorba volné glukosy je důležitý kontrolní bod. V mnoha tkáních končí glukoneogeneze na tomto místě. Glukosa-6-fosfát je využita např. na tvorbu glykogenu.

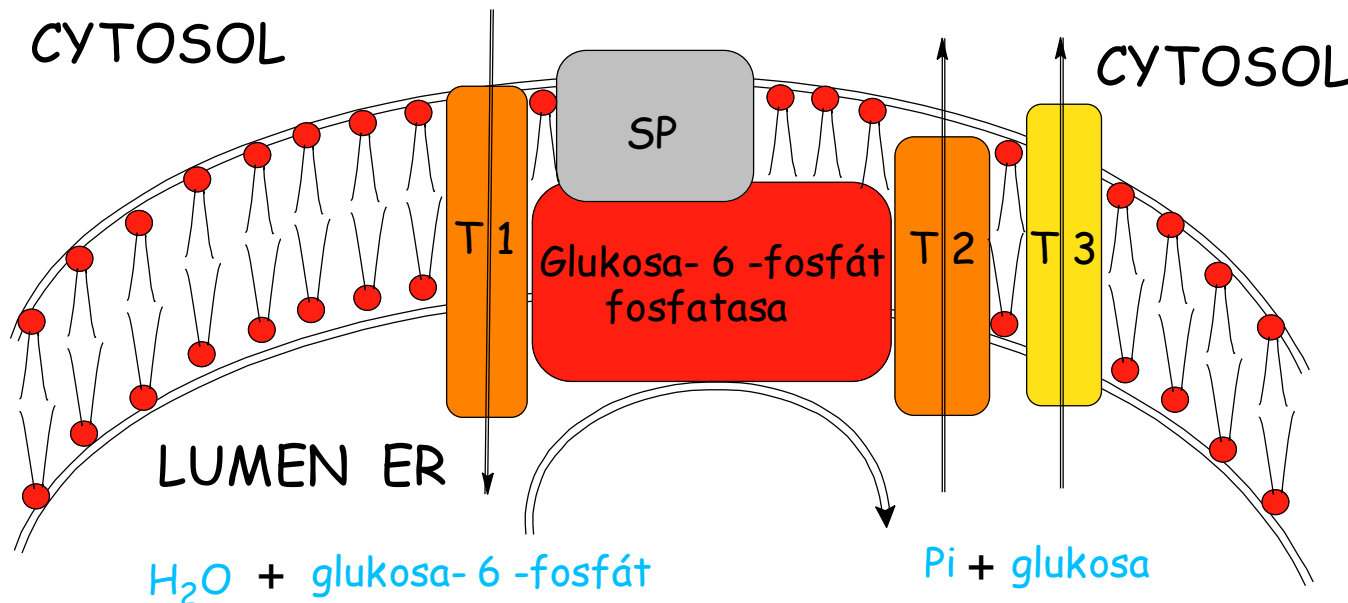
Udržení glukosa-6-fosfátu uvnitř buňky nebo tvorba volné glukosy je regulováno.

Enzym glukosa-6-fosfátfosfatasa je regulován.

Enzym je přítomen jen v játrech a ledvinách.

# Glykolýza a glukoneogeneze. Hydrolyzá glukosa-6-fosfátu glukosa-6-fosfátfosfatasou.

Glukosa-6-fosfát vytvořená glukoneogenezí v cytoplasmě je transportována do lumen endoplasmatického retikula, kde je hydrolyzována **glukosa-6-fosfátfosfatasou**, vázanou na membránu, na fosfát a glukosu. Systém aktivuje tzv. stabilizační protein (SP) s vázaným  $\text{Ca}^{2+}$ . Obě formy glukosy, (T1 a T3) a fosfát (T2), mají v membráně transportéry.



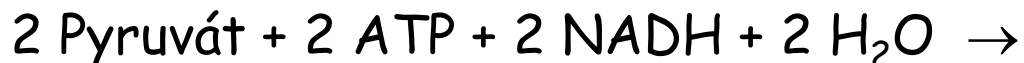
# Glukoneogeneze je energeticky náročná dráha

## Stechiometrie glukoneogeneze:



$$\Delta G^{\circ'} = - 38 \text{ kJ/mol}$$

## Stechiometrie zvratu glykolýzy:



$$\Delta G^{\circ'} = + 84 \text{ kJ/mol}$$

Oproti zvratu glykolýzy je pro glukoneogenezi, aby byl energeticky schůdná, nutno přidat čtyři molekuly s vysokým potenciálem transferu fosfátu (spřažené reakce).



## Reciproká regulace glykolýzy a glukoneogeneze.

Dráhy glykolýzy a glukoneogeneze jsou koordinovány tak, že jedna dráha je aktivní a druhá inaktivní.

Kdyby obě dráhy probíhaly současně, pak by čistý výtěžek jednoho cyklu byla hydrolýza čtyř nukleosidtrifosfátů (2 ATP a 2 GTP).

Obě dráhy jsou za podmínek v buňce exergonní což je termodynamická bariéra.

Zabraňuje tomu také množství enzymů jednotlivých drah a jejich různá aktivita a regulace ve stejném časovém úseku.

Regulace na úrovni fosfofruktokinasy a fruktosa-1,6-bisfosfátfosfatasy:

Hladina fruktosa-2,6-bisfosfátu je vysoká po jídle a nízká při hladovění.

# Reciproká regulace glykolýzy a glukoneogeneze.

Fruktosa-2,6-bisfosfát a AMP aktivují glykolýzu a inhibují glukoneogenezi.

Citrát aktivuje glukoneogenezi, ATP, citrát a kyselé prostředí inhibují glykolýzu.

Regulace na úrovni pyruvátkinasy a pyruvátkarboxylasy a fosfoenolkarboxykinasy:

Pyruvátkinasa je inhibována allosterickými efektory ATP a alaninem, což značí že energie i stavebních jednotek je dost.

Opačně pyruvátkarboxylasa je inhibována ADP (?), stejně jako fosfoenolkarboxykinasa.

Pyruvátkarboxylasa je aktivována acetyl CoA (ukazovatel dostatku energie).

Obecně je glukoneogeneze upřednostněna za situace, kdy je buňka bohatá na biosyntetické prekurzory a ATP.

## Rovnováha mezi glykolýzou a glukoneogenezi v játrech.

Obě dráhy se podílí na udržování hladiny glukosy v krvi. Podstatná je regulace prostřednictvím fruktosa-2,6-bisfosfátu. Na regulaci hladiny fruktosa-2,6-bisfosfátu se podílí dva enzymy: vstup fosfátu na fruktosa-6-fosfát (fosfofruktokinasa 2, PFK2) a hydrolýza fruktosa-2,6-bisfosfátu (fruktosabisfosfatasa 2, FBP2).

Oba enzymy jsou na jednom jednoduchém polypeptidovém řetězci (55 kD).

Bifunkční enzym obsahuje N-terminální regulační doménu, následuje kinasová doména a fosfatasová doména.

Aktivita obou enzymů je regulována fosforylací jednoho vedlejšího řetězce serinu.

Při hladovění se zvedne hladina glukagonu, což vede k signální kaskádě, v buňkách se tvoří cAMP, které aktivuje proteinkinasu A, která fosforyluje bifunkční enzym. Aktivuje FBP 2 a inhibuje PFK 2. Převládá glukoneogeneze.

## Rovnováha mezi glykolýzou a glukoneogenezi v játrech.

- Opačně, když je hladina krevní glukosy vysoká, je fosfátová skupina hydrolyzována z bifunkčního enzymu.
  - Aktivuje se PFK 2 a inhibuje FBP 2.
  - Výsledkem je zvýšená hladina fruktosa-2,6-bisfosfátu urychlující glykolýzu.
  - Hormony insulin a glukagon regulují množství esenciálních enzymů na úrovni transkripce.
  - Insulin stimuluje expresi fosfofruktokinasy, pyruvátkinasy a bifunkčního enzymu, který tvoří a odbourává fruktosa-2,6-bisfosfát.
  - Glukagon naopak inhibuje expresi tří regulačních enzymů glykolýzy a stimuluje tvorbu dvou glukoneogenetických enzymů - fosfoenolpyruvátkarboxykinasy a fruktosa-1,6-fosfatasy.

# Laktát a alanin tvořené svaly jsou zdrojem energie pro jiné orgány.

Laktát tvořený ve svalech skeletu a erythrocytech je zdrojem energie pro jiné orgány.

Erythrocyty nemají mitochondrie a proto nemůžou kompletně oxidovat glukosu.

Pyruvát a laktát v krevním oběhu mají dvě možnosti dalšího zpracování.

Plasmatická membrána buněk některých orgánů (hlavně srdce) obsahuje transportéry, které umožňují vstup laktátu a pyruvátu.

Laktát je poté v oxygením prostředí převeden přes pyruvát na acetyl CoA a dále odbourán v citrátovém cyklu za tvorby energie (oxidativní fosforylace). Využívá se laktát namísto glukosy.

Druhou možností zpracování nadbytku laktátu jsou játra.

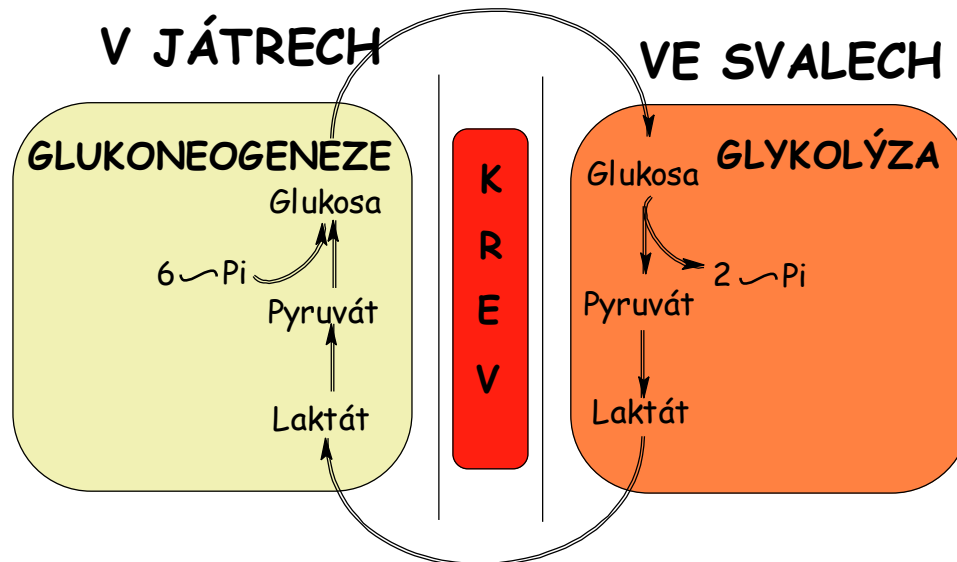
V játrech je laktát převeden přes pyruvát glukoneogenezí na glukosu. Glukosa se vrací do svalů (Coriho cyklus).

# Laktát a alanin tvořené svaly jsou zdrojem energie pro jiné orgány (Coriho cyklus).

Dalším hlavním prekurzorem glukosy v játrech je alanin.

Alanin se tvoří ve svalech aminotransferasovou reakcí z pyruvátu za situace, kdy se uhlíkatá kostra aminokyselin tvořených štěpením svalových proteinů využívá ke glukoneogenezi.

Proces také slouží k vyrovnané dusíkové bilanci mezi svaly a játry.



## Isoenzymy laktátdehydrogenasy

Laktátdehydrogenasa je heterotetramer, dvou typů 35 kD podjednotek kódovaných podobnými geny:

H typ převládá v srdečním svalu, homologní M typ v játrech a kosterním svalstvu.

Existuje pět typu asociovaných tetramerů:  $H_4$ ,  $H_3M$ ,  $H_2M_2$ ,  $H_1M_3$ , a  $M_4$ .

Typ  $H_4$  má větší afinitu k substrátům než  $M_4$ . Typ  $M_4$  je allostericky inhibován vysokou hladinou pyruvátu. Ostatní izozymy mají vlastnosti mezi těmito krajními.

Isozym oxiduje  $H_4$  oxiduje laktát na pyruvát. Srdce funguje pouze aerobně.

Isozym  $M_4$  převádí ve svalech pyruvát na laktát a umožňuje tak glykolýzu za anaerobních podmínek.

