

## Základy biochemie KBC / BCH

# Metabolismus sacharidů

**Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu**

CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky.



## Osnova

- Přehled strukturních forem sacharidů.
- Glykoproteiny a glykosylace.
- Transportéry glukosy přes plasmatickou membránu.
- Glykolýza. Regulace glykolýzy.
- Glukoneogeneze.
- Regulace glykolýzy a glukoneogeneze.
- Substrátové cykly.
- Coriho cyklus.
- Pentosafosfátová dráha.

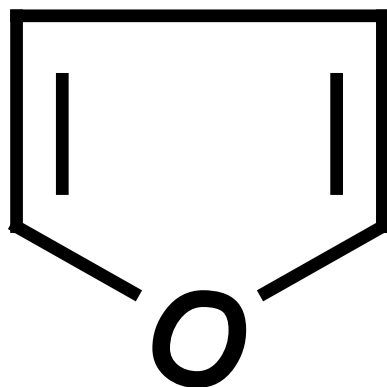
## Proč právě glukosa je univerzálním zdrojem energie ??

- 1. Pravděpodobně první sacharid tvořený z formaldehydových jednotek za prebiotických podmínek.
- 2. Glukosa má nízkou tendenci neenzymově glykosylovat proteiny díky preferenci cyklické formy.
- 3. K relativně vysoké stabilitě glukosy přispívá to, že všechny hydroxylové skupiny v  $\beta$ -D-glukose jsou v ekvatoriální poloze.

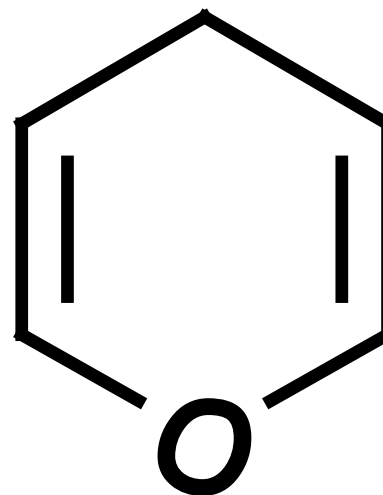
**Převládajícími formami monosacharidů v roztoku jsou cyklické.**

Aldehydy tvoří poloacetalové, ketony poloketalové.

Podle heterocyklů furanu - furanosy, pyranu - pyranosy.



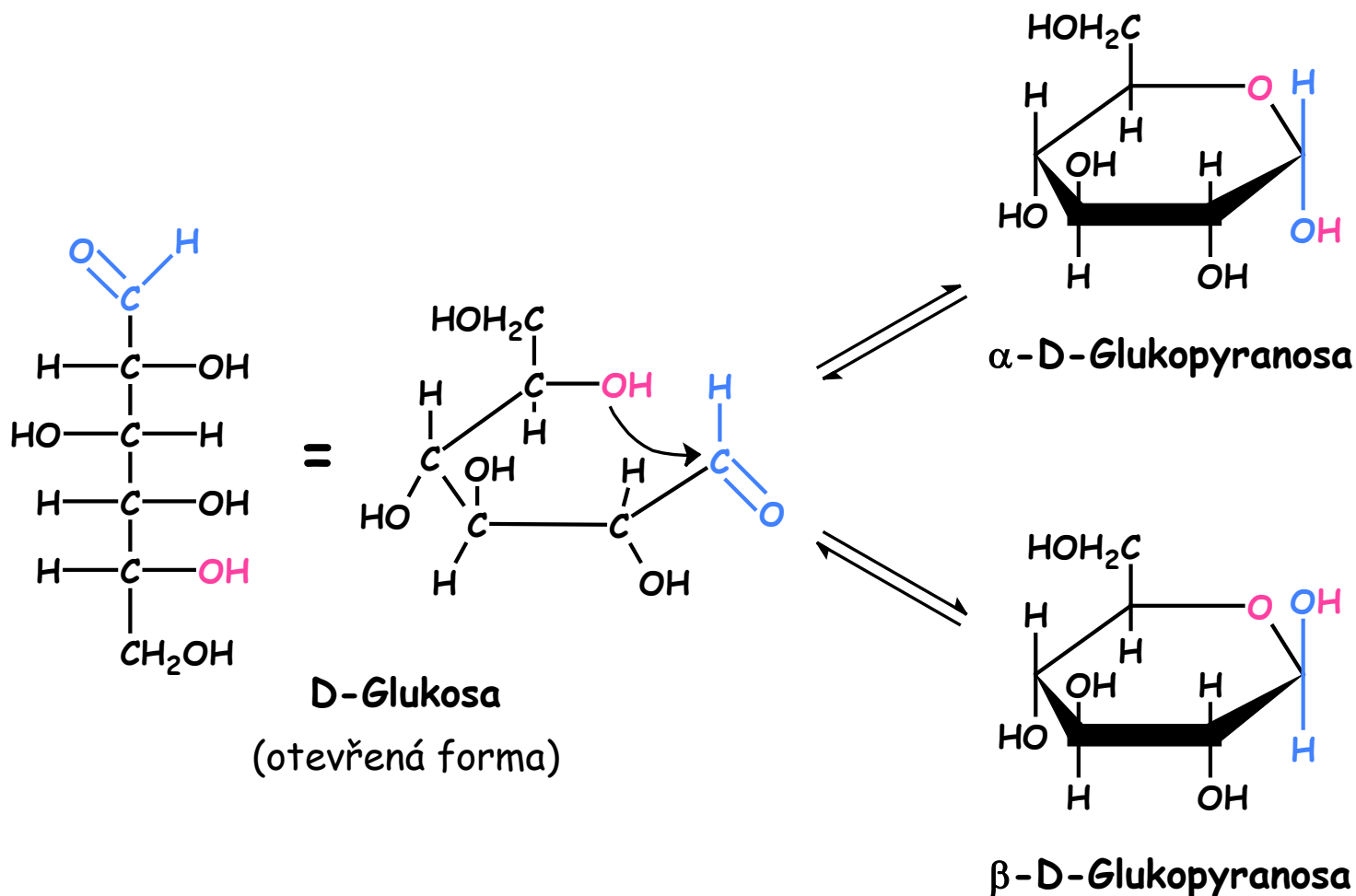
**Furan**



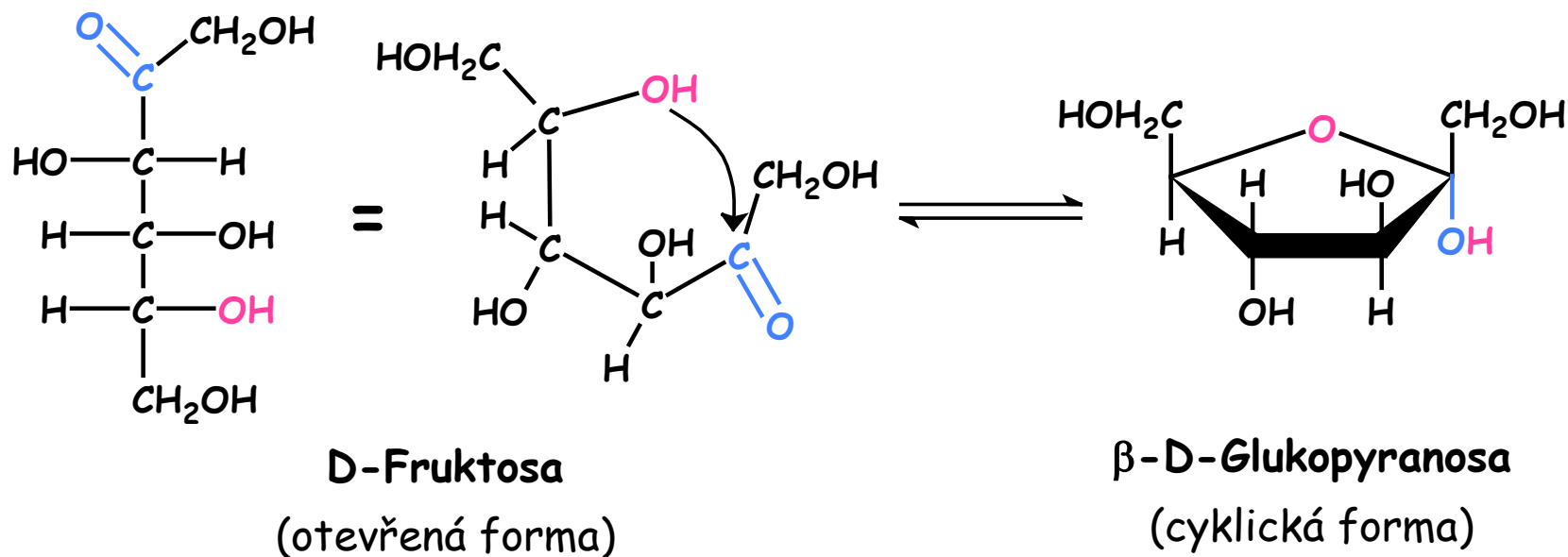
**Pyran**

## Formy D-glukosy.

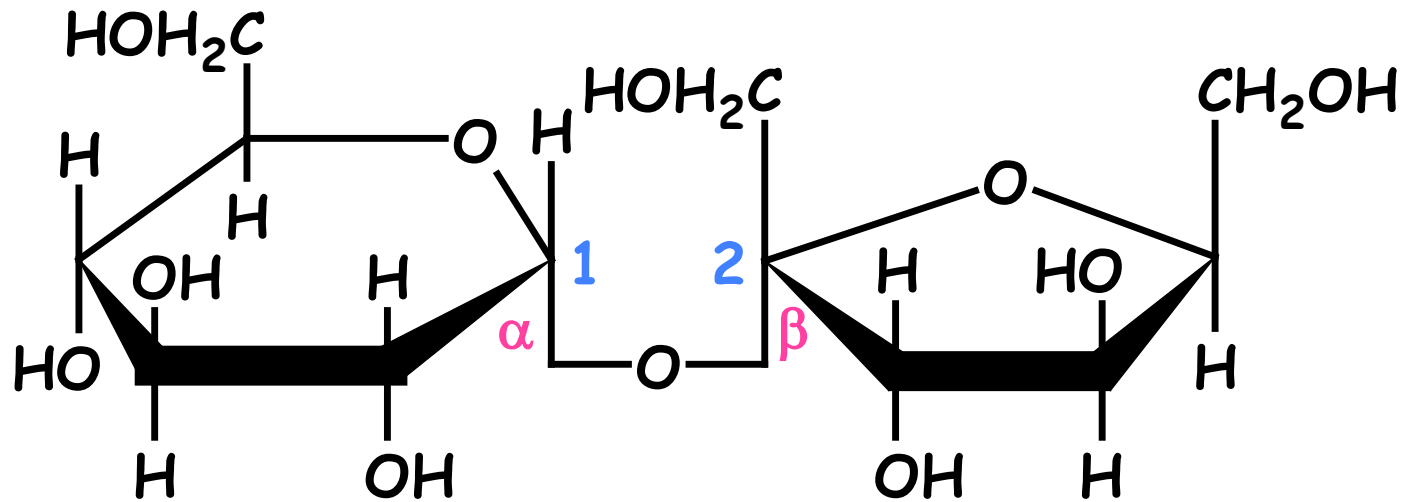
Uzavřením poloacetalového kruhu vzniká nové chirální centrum na uhlíku C1.  
Existují dva anomery D-glukosy -  $\alpha$  a  $\beta$ .



## Cyklická forma D-fruktosy



## Cyklická forma sacharosy

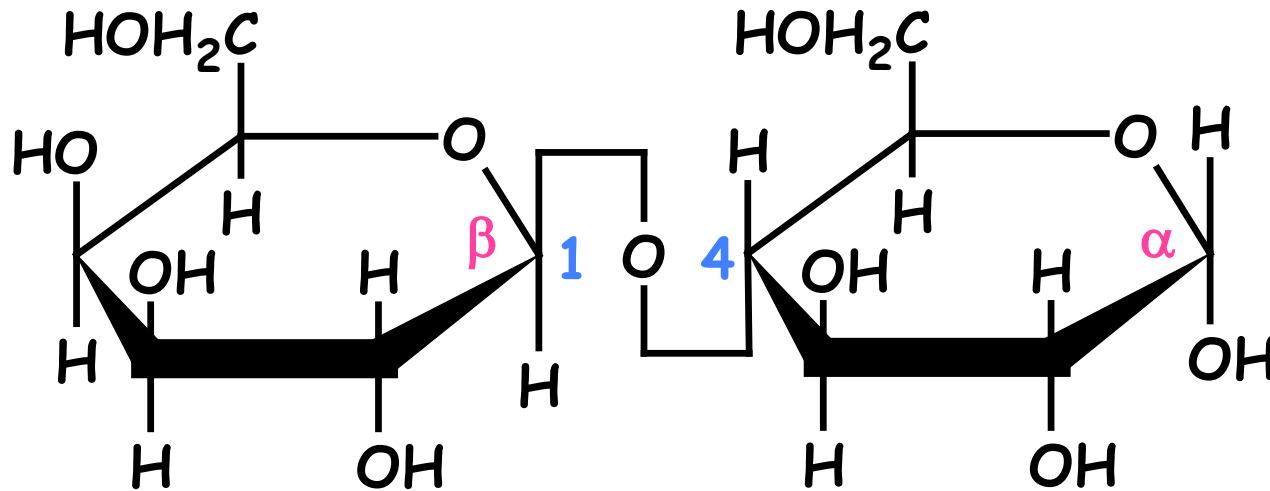


## Sacharosa

( $\alpha$ -D-Glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fruktofuranosa)

## Cyklická forma laktosy

Obsahuje galaktosu a glukosu spojené (1→4) glykosidovou vazbou.



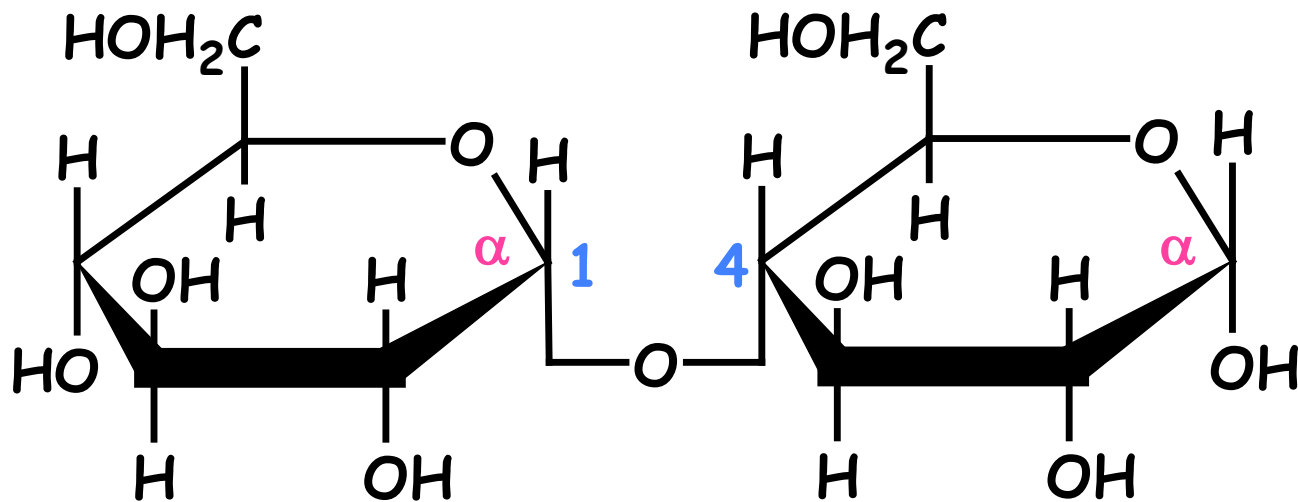
### Laktosa

( $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-(1→4)- $\alpha$ -D-glukopyranosa)



## Cyklická forma maltosy

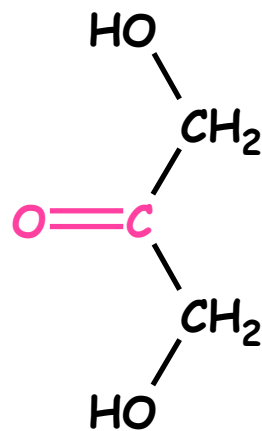
Obsahuje dvě molekuly glukosy spojené (1→4) glykosidovou vazbou.



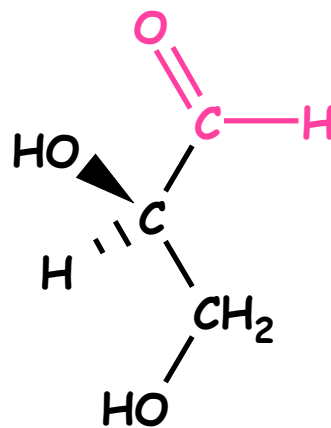
## Maltosa

( $\alpha$ -D-Glukopyranosyl-(1→4)- $\alpha$ -D-glukopyranosa)

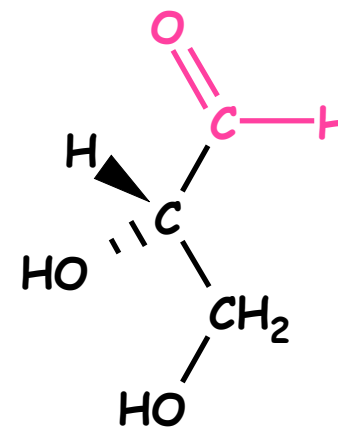
## Ketotriosa a aldotriosy



Dihydroxyaceton  
(ketosa)



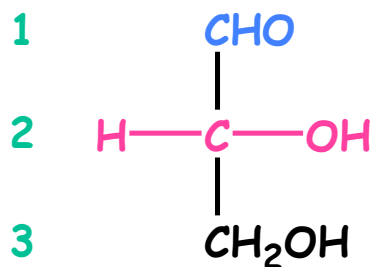
D-Glyceraldehyd  
(aldosa)



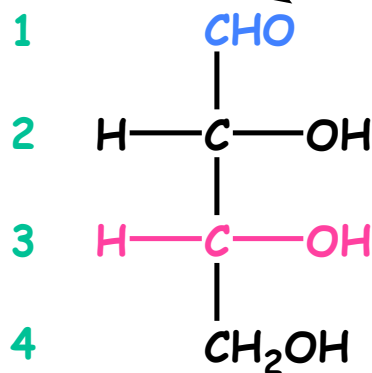
L-Glyceraldehyd  
(aldosa)

## D-Aldosy - se třemi až šesti uhlíky

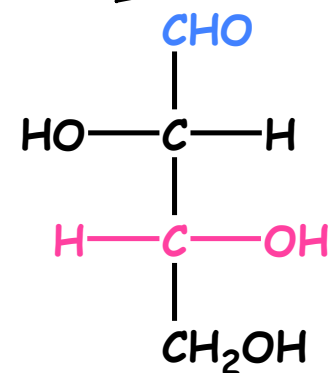
Konfigurace D se odvozuje od chirálního uhlíku, který je nejvzdálenější od aldehydové skupiny.



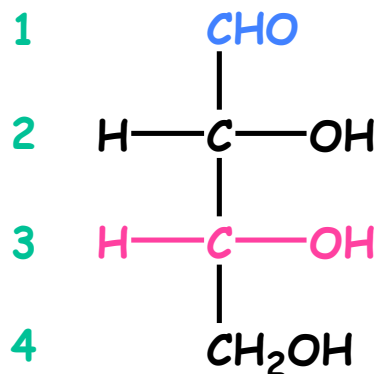
D-Glyceraldehyd



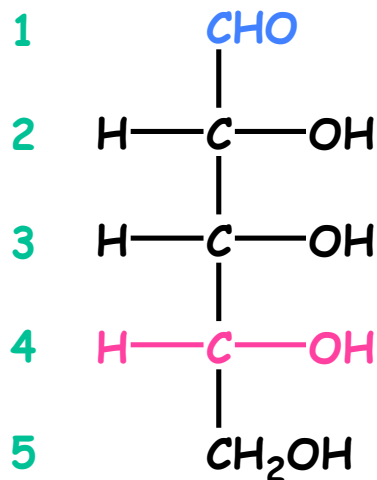
D-Erythrosa



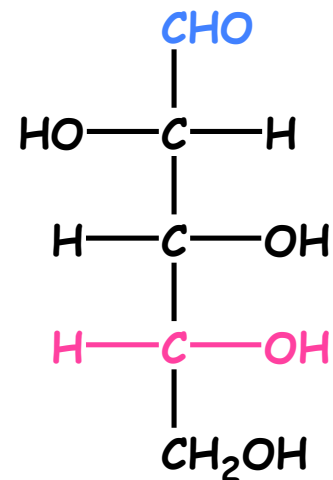
D-Threosa



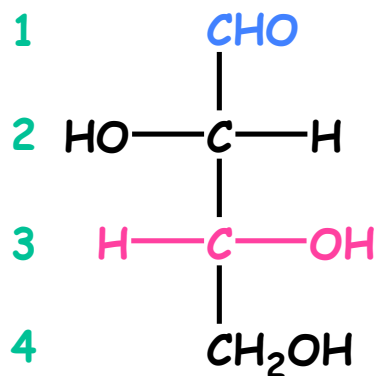
D-Erythrosa



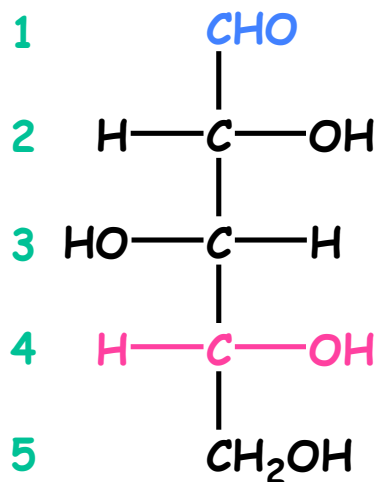
D-Ribosa



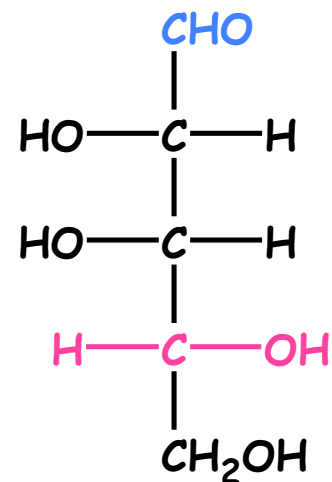
D-Arabinosa



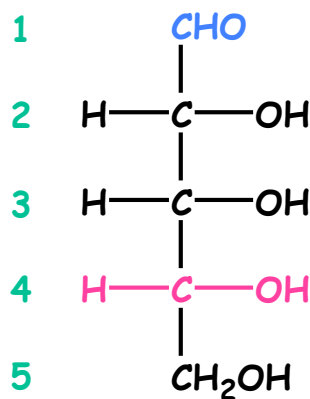
D-Threosa



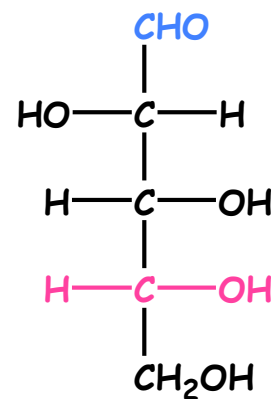
D-Xylosa



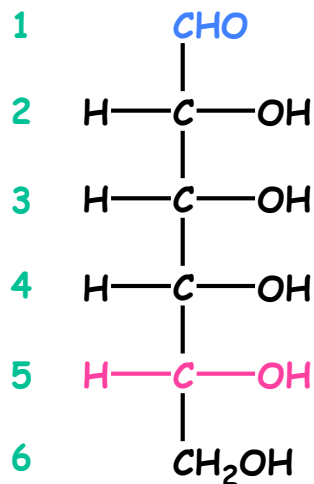
D-Lyxosa



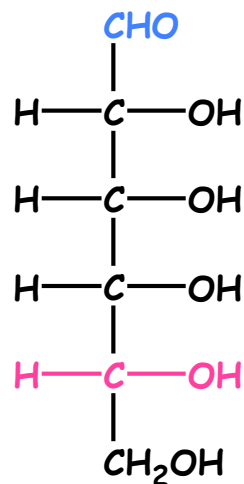
D-Ribosa



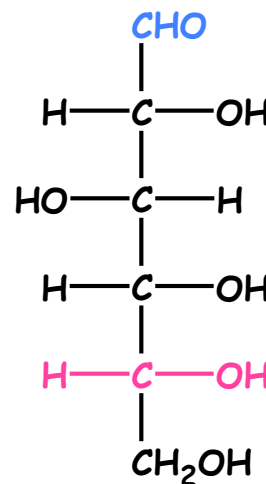
D-Arabinosa



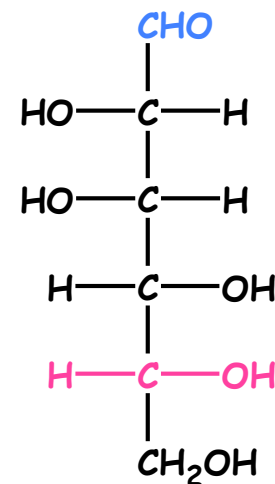
D-Allosa



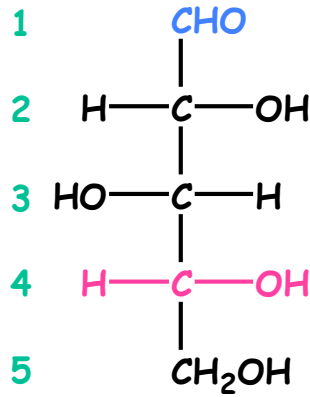
D-Altrosa



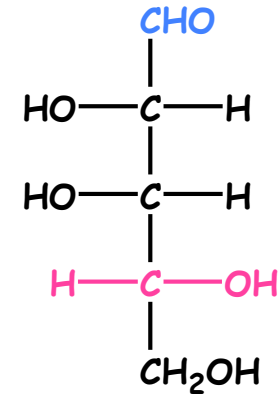
D-Glukosa



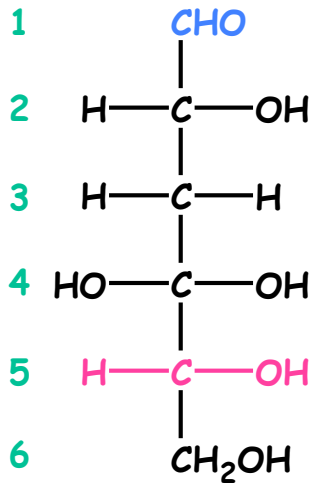
D-Mannosa



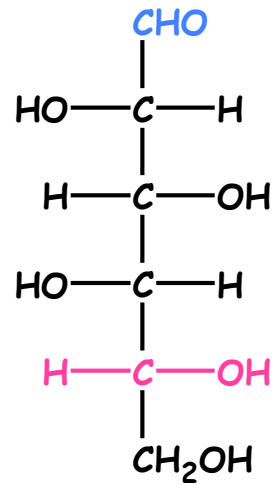
D-Xyloza



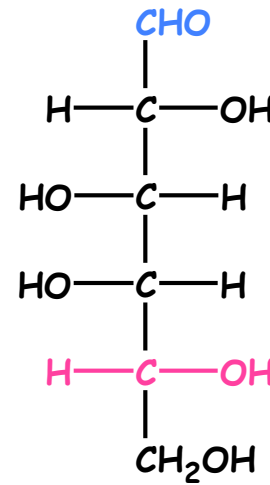
D-Lyxosa



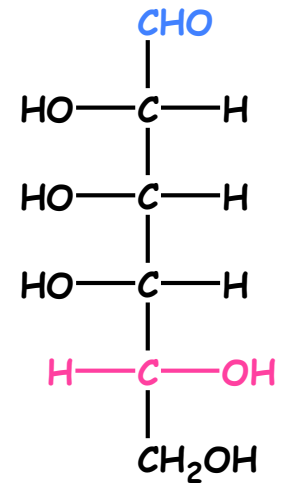
D-Gulosa



D-Idosa



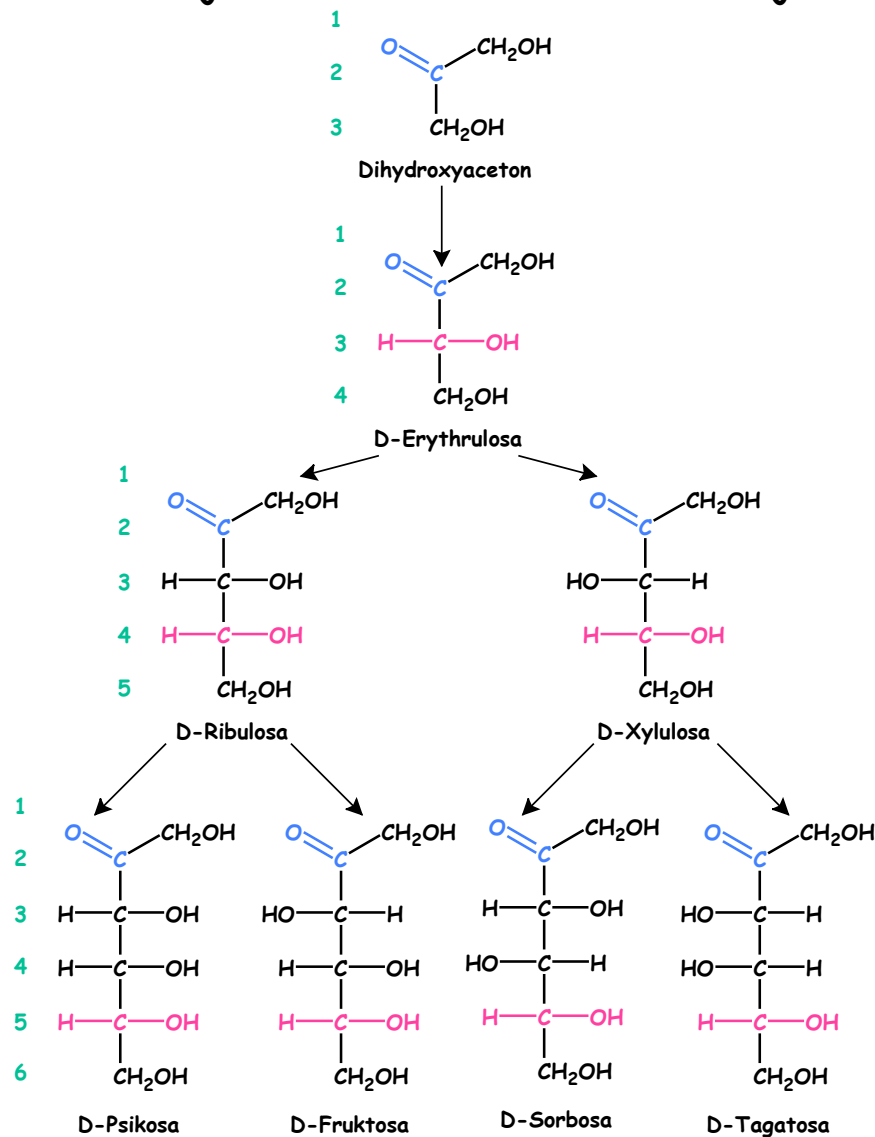
D-Galaktosa



D-Talosa

# D-Ketosy se třemi až šesti uhlíky

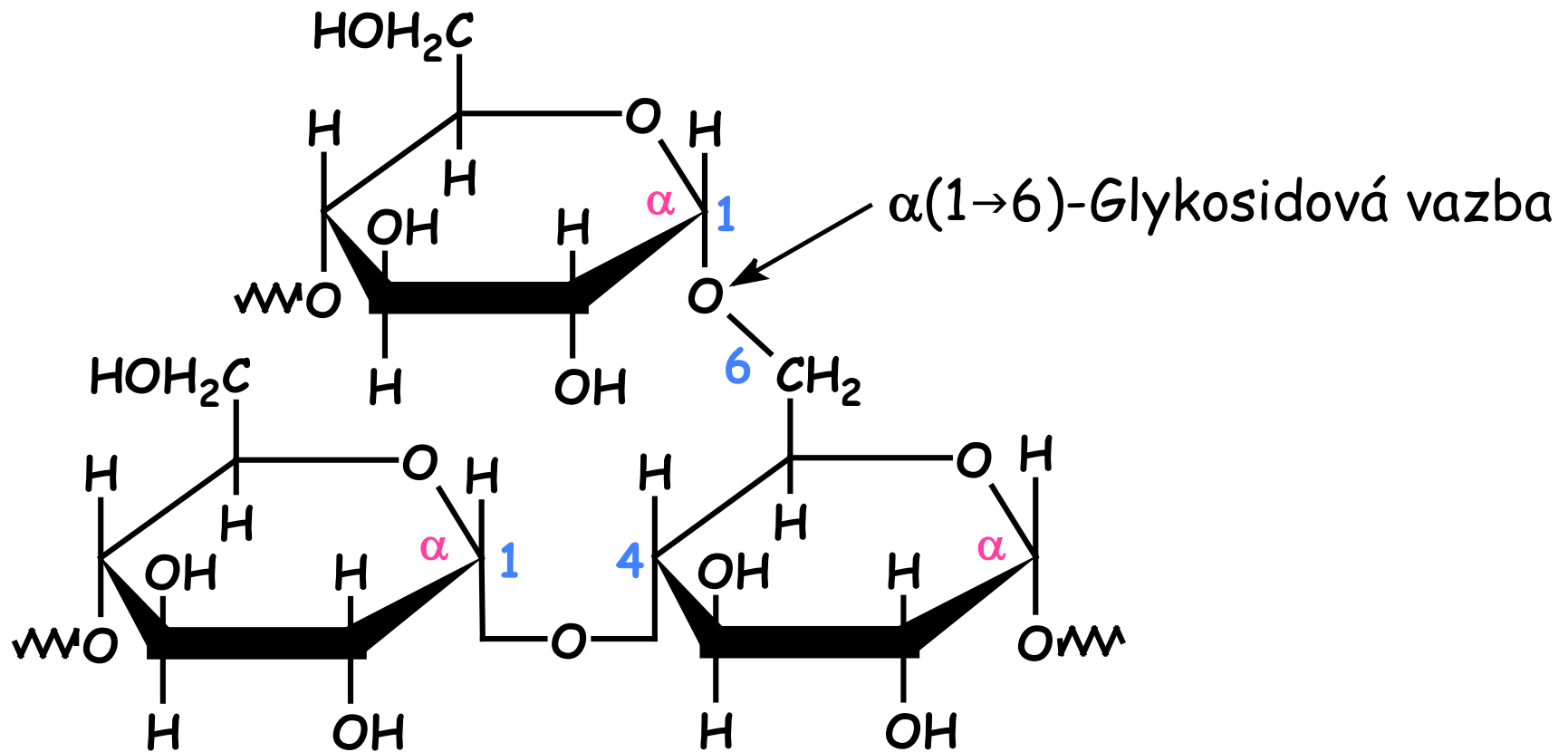
Konfigurace D se odvozuje od chirálního centra nejdále od ketoskupiny





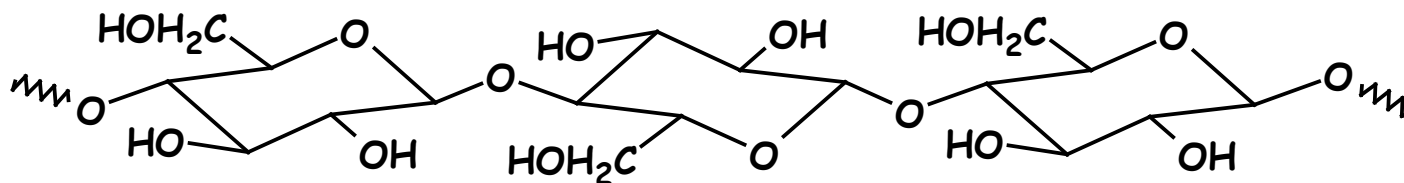
## Větvení glykogenu

Řetězce glukos spojených glykosidovou vazbou  $\alpha(1\rightarrow4)$  jsou po deseti glukosových jednotkách větveny glykosidovou vazbou  $\alpha(1\rightarrow6)$ .



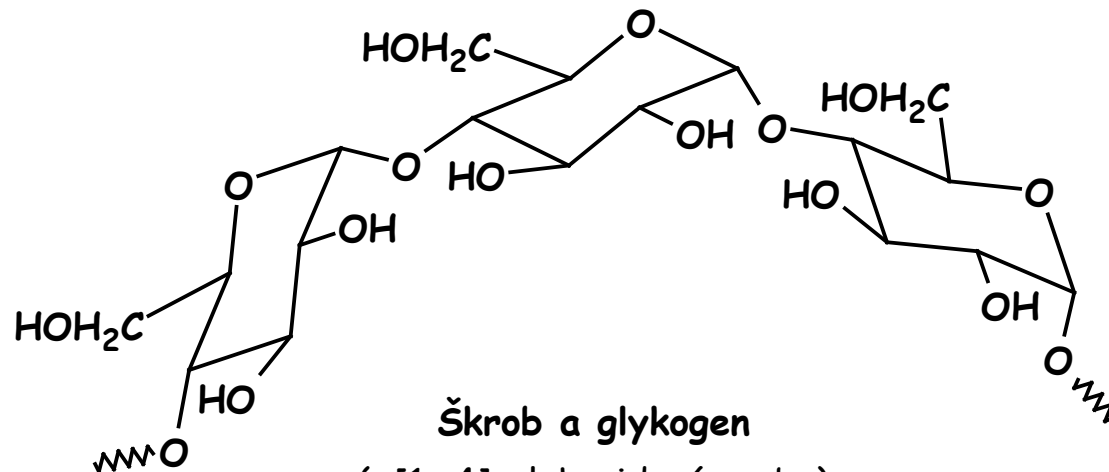
## Struktury celulosy, škrobu a glykogenu

Vazby  $\beta(1\rightarrow4)$  vedou k rovným řetězcům, kdežto vazby  $\alpha(1\rightarrow4)$  k prohnutým strukturám.



**Celulosa**

( $\beta[1\rightarrow4]$ -glykosidová vazba)

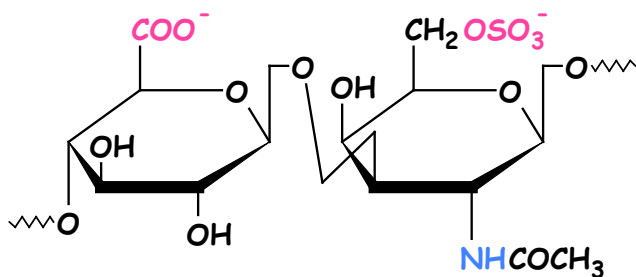


**Škrob a glykogen**

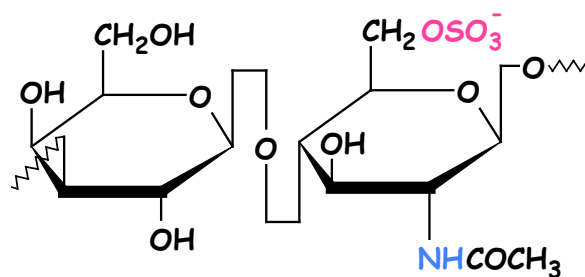
( $\alpha[1\rightarrow4]$ -glykosidová vazba)

# Glykosaminoglykany - aniontové polysacharidy

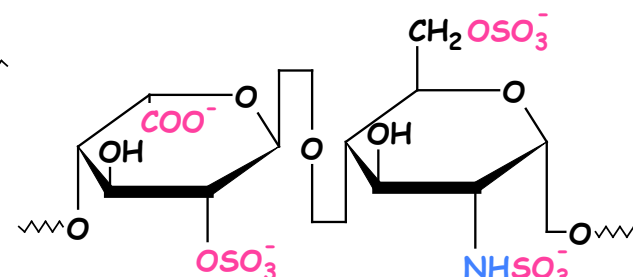
Opakující se disacharidové jednotky obsahující glukosamin nebo galaktosamin. Vazbou na proteiny tvoří proteoglykany.



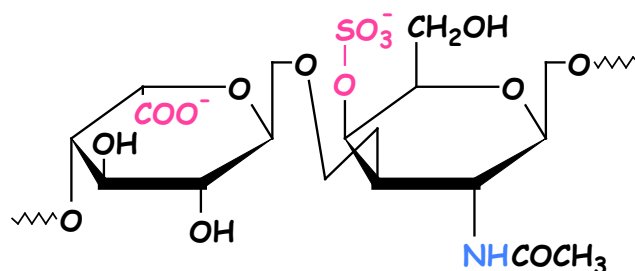
Chondroitin-6-sulfát



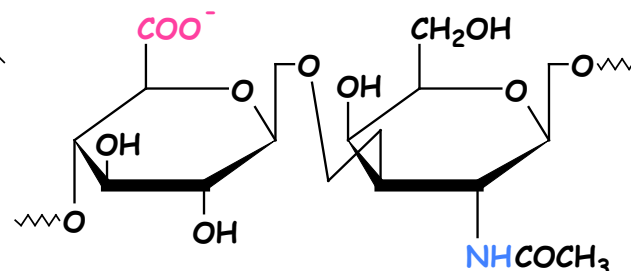
Keratansulfát



Heparin



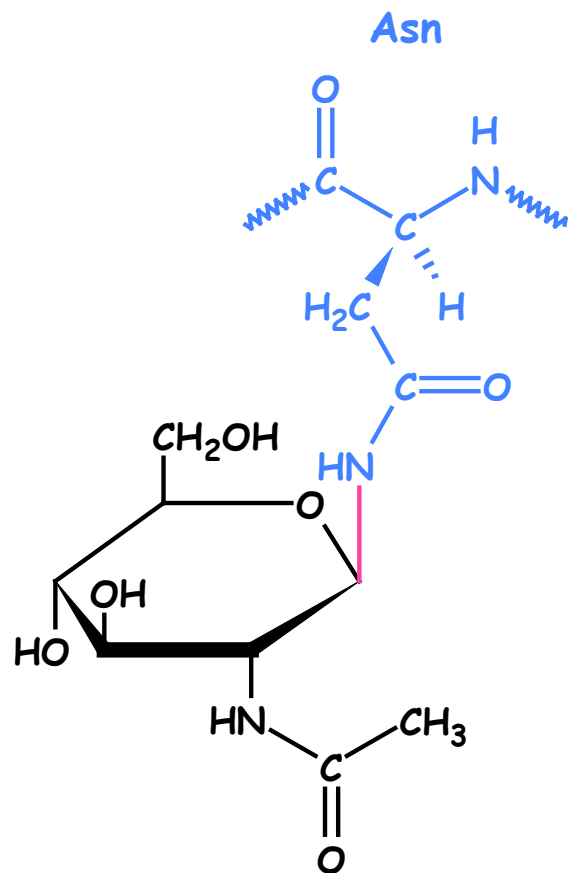
Dermatansulfát



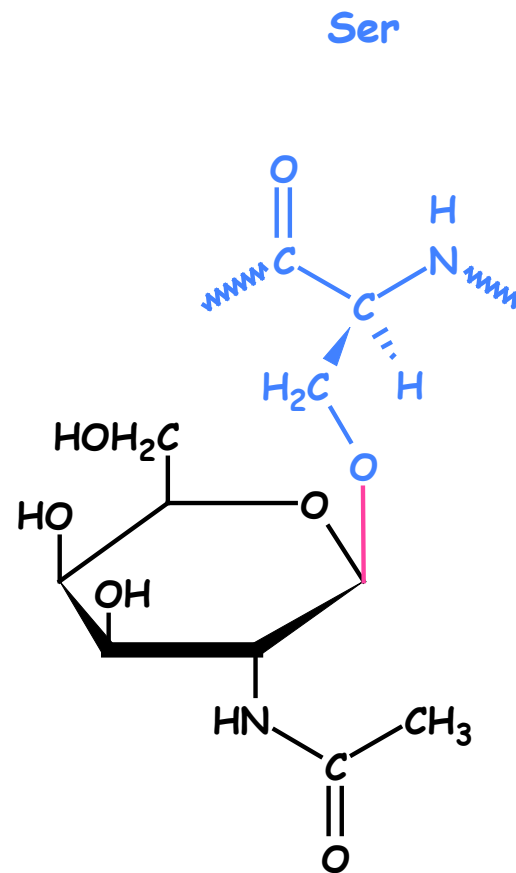
Hyaluronát

# Glykoproteiny

Glykosidové vazby mezi proteiny a sacharidy. Vazby přes Asn (N-glykosidy), vazby přes Thr nebo Ser (O-glykosidy). GlcNAc = N-Acetylglukosamin.



N-vázaný GlcNAc

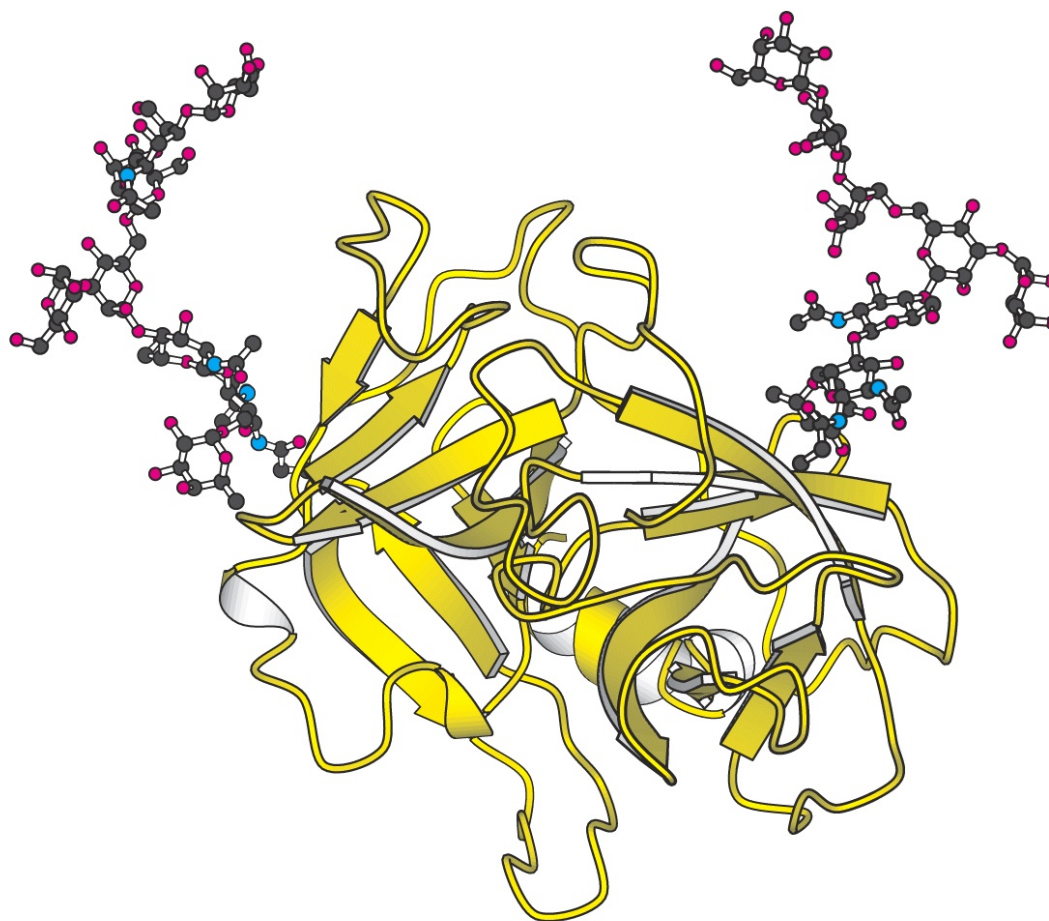


O-vázaný GalNAc

## Glykosylace

- Glykosylace proteinů probíhá v lumen endoplasmatického retikula (ER) a v Golgiho komplexu.
- Příkladem je pankreatická elastasa [ 3. 4. 21. 36] katalyzující hydrolýzu proteinů (elastin) na místě Ala - Xaa.
- Pankreatická elastasa- je uvolňována z pankreatu ve formě zymogenu. Je syntetizována ribosomy na cytoplasmatické straně membrány ER. Signální sekvence 29 aminokyselin navede proelastasu do lumen a poté se odštěpí. Volný zymogen je glykosylován a poté, k dokončení glykosylace, putuje do Golgiho komplexu.
- Obecně: N-glykosylace začíná v ER a pokračuje v Golgiho komplexu.
- O-Glykosylace probíhá pouze v Golgiho komplexu.

**Elastasa** - vylučovaný glykoprotein s hydrolytickými vlastnostmi. Nachází se v krevním séru. Oligosacharidové řetězce zaujímají podstatnou část molekuly.



**Transportéry glukosy přes plasmatickou membránu.**  
 Např. GLUT1 a GLUT3 jsou téměř ve všech savčích buňkách.  
 Hladina glukosy v krvi je od 4 mM do 8 mM.

**Rodina transportérů glukosy:**

Název	Tkáň	$K_m$ (glukosa)	Komentář
• GLUT1	Všechny savčí tkáně	1 mM	Základní vstup glukosy.
• GLUT2	Játra a $\beta$ -buňky pankreatu	15 - 20 mM	Regulace hladiny insulínu v pankreatu. V játrech odčerpává nadbytek glukosy z krve.
• GLUT3	Všechny savčí tkáně	1 mM	Základní vstup glukosy.
• GLUT4	Svaly a tukové buňky	5 mM	Množství se zvyšuje tréninkem.
• GLUT5	Tenké střevo	----	Primárně transportér fruktosy.

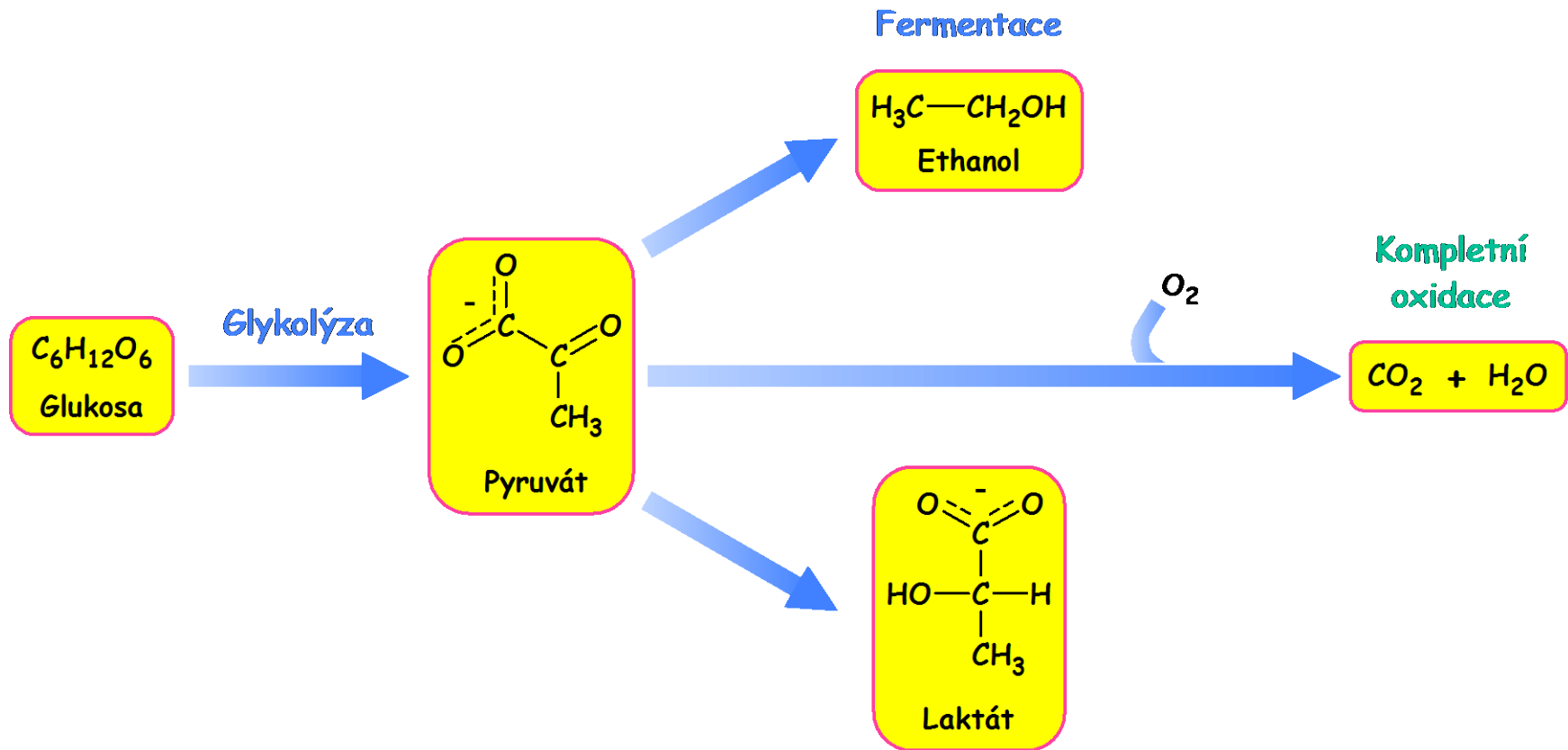
## Glykolýza.

- Hans Buchner a Eduard Buchner 1897
- Příprava bezbuněčného extraktu kvasinek pro terapeutické účely.
- Konzervace sacharosou - sacharosa byla rychle fermentována na ethanol.
- Nechtěně tak poprvé prokázali, že fermentace může probíhat mimo živou buňku.
- Od roku 1860 (Luis Pasteur) - fermentace může probíhat pouze v živých buňkách (vitalismus).
- Poté studována fermentace i ve svalech. Byly nalezeny naprosto shodné děje.
- Glykolýza byla plně objasněna v roce 1940. Gustav Embden, Otto Mayerhof, Carl Neuberg, Jacob Parnas, Otto Warburg, Gerty Cori a Carl Cori.
- Glykolýza bývá také označována jako Emden-Mayerhofova dráha.



- Glykolýza, také fermentace, probíhá anaerobně.  
Z Řečtiny Glyk- „sladký“, lysis, „rozpad“, ztráta sladkosti.
- Pochod společný pro prokaryotní i eukaryotní organismy.
- Glykolýzou se získává energie i bez přístupu kyslíku.
- U eukaryot probíhá glykolýza ve třech stupních v cytoplasmě:
  - a) Převedení glukosy na fruktosa-1,6-bisfosfát (F-1,6-bisP)
  - b) Štěpení F-1,6-bisP na dvě triosy
  - c) Tvorba ATP při oxidaci tříuhlíkatých sloučenin na pyruvát.
- Pyruvát může být dále převeden na laktát (ve svalech) nebo na produkty fermentace jako je ethanol např. kvasinkami.

# Katabolické dráhy glukosy

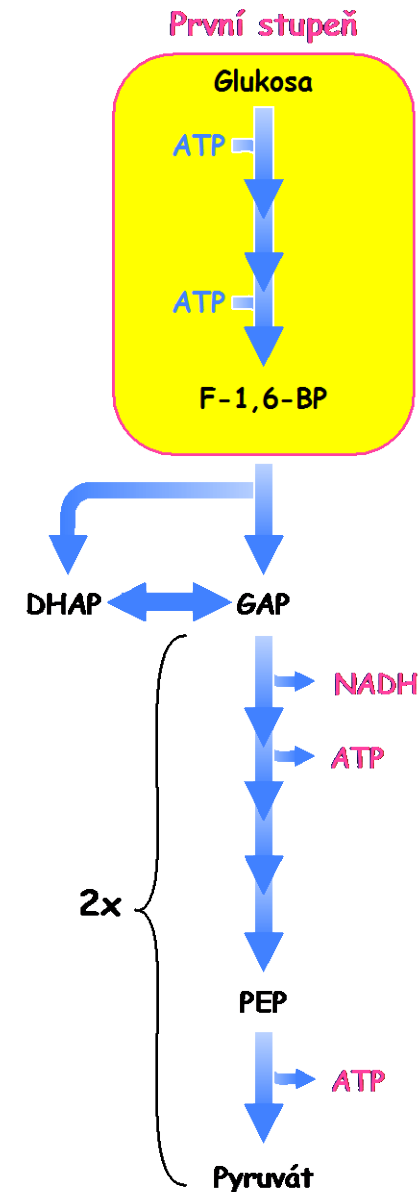


# Schematický průběh glykolýzy

V prvním stupni probíhají fosforylace,

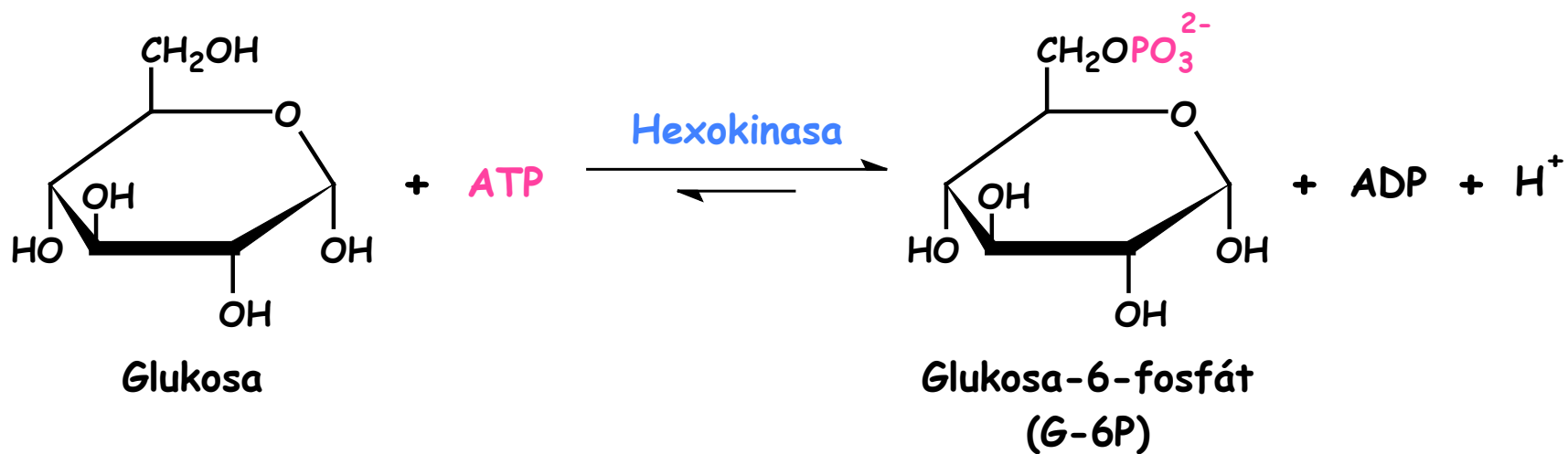
v druhém štěpení hexosy na dvě vzájemně převoditelné triosy

a v třetím, při oxidaci tříuhlíkatých fragmentů na pyruvát, se tvoří ATP.



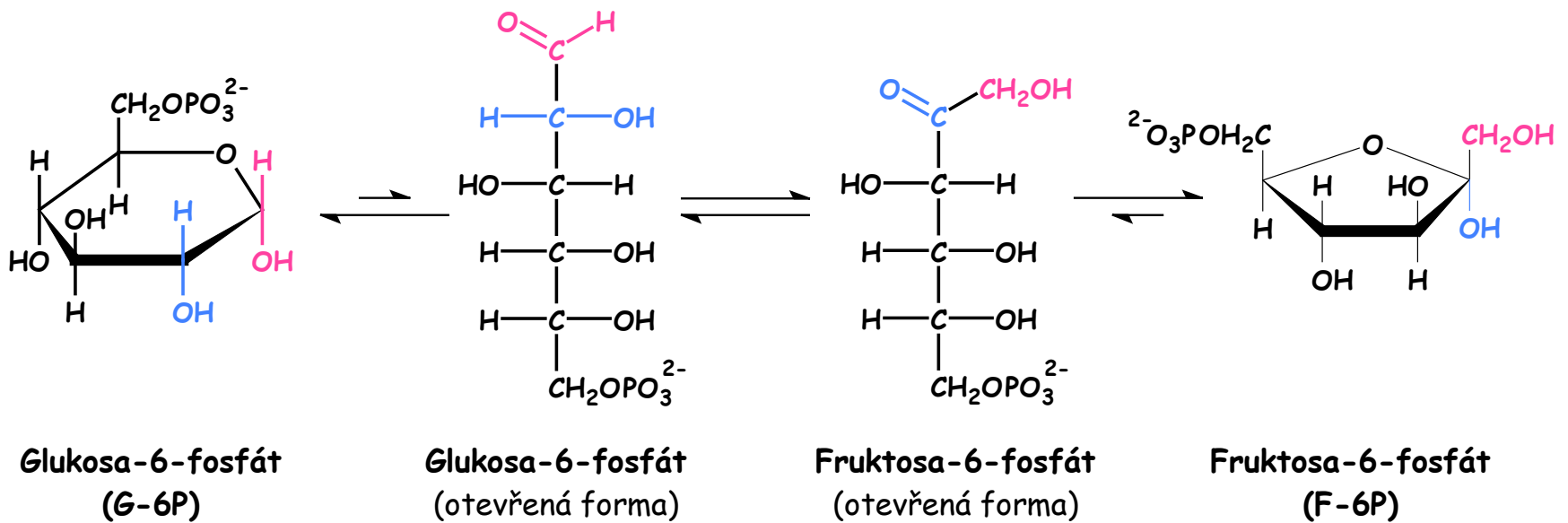
## Hexokinasa - fosforylace glukosy

Fosforylací se destabilizuje glukosa. Glukosa-6-fosfát neprochází buněčnou membránou.



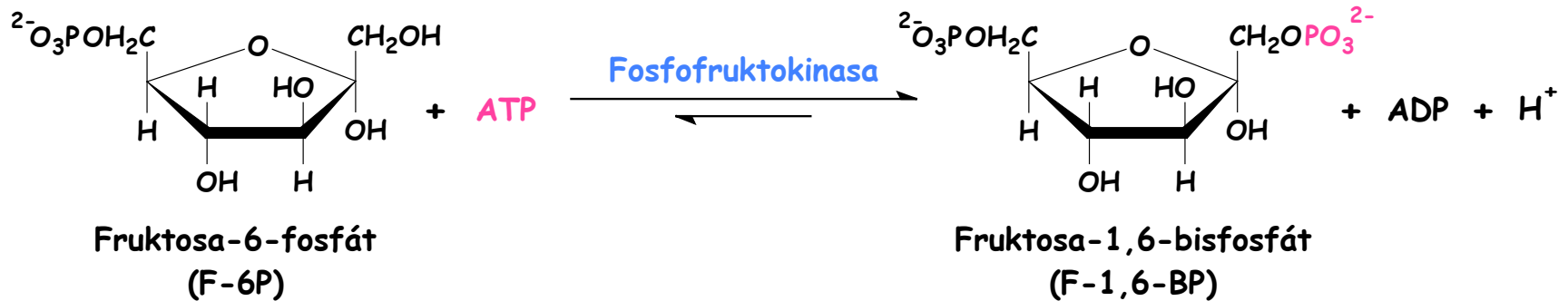
# Fosfoglukosaisomerasa

Izomerace: aldosa - ketosa



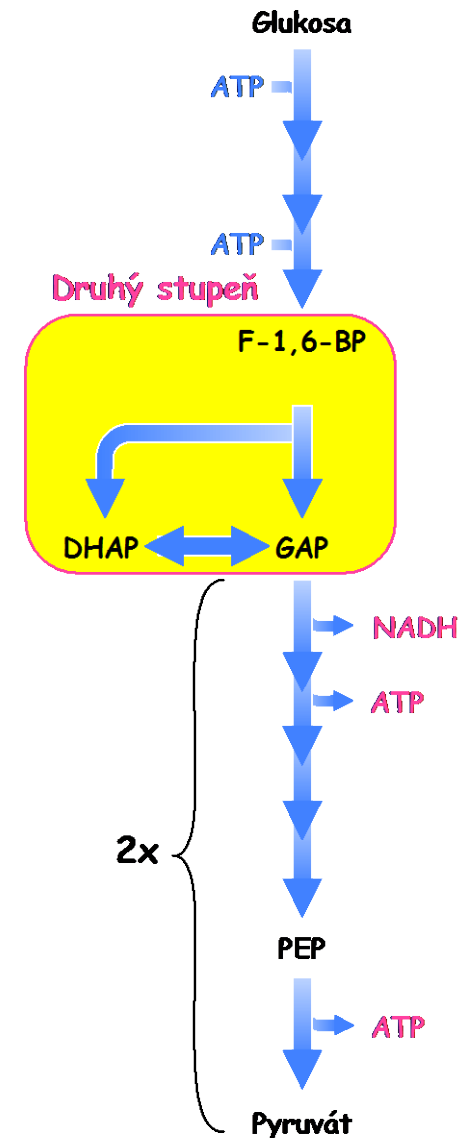
# Fosfofruktokinasa

Allosterický enzym. Klíčová reakce nejen glykolýzy.



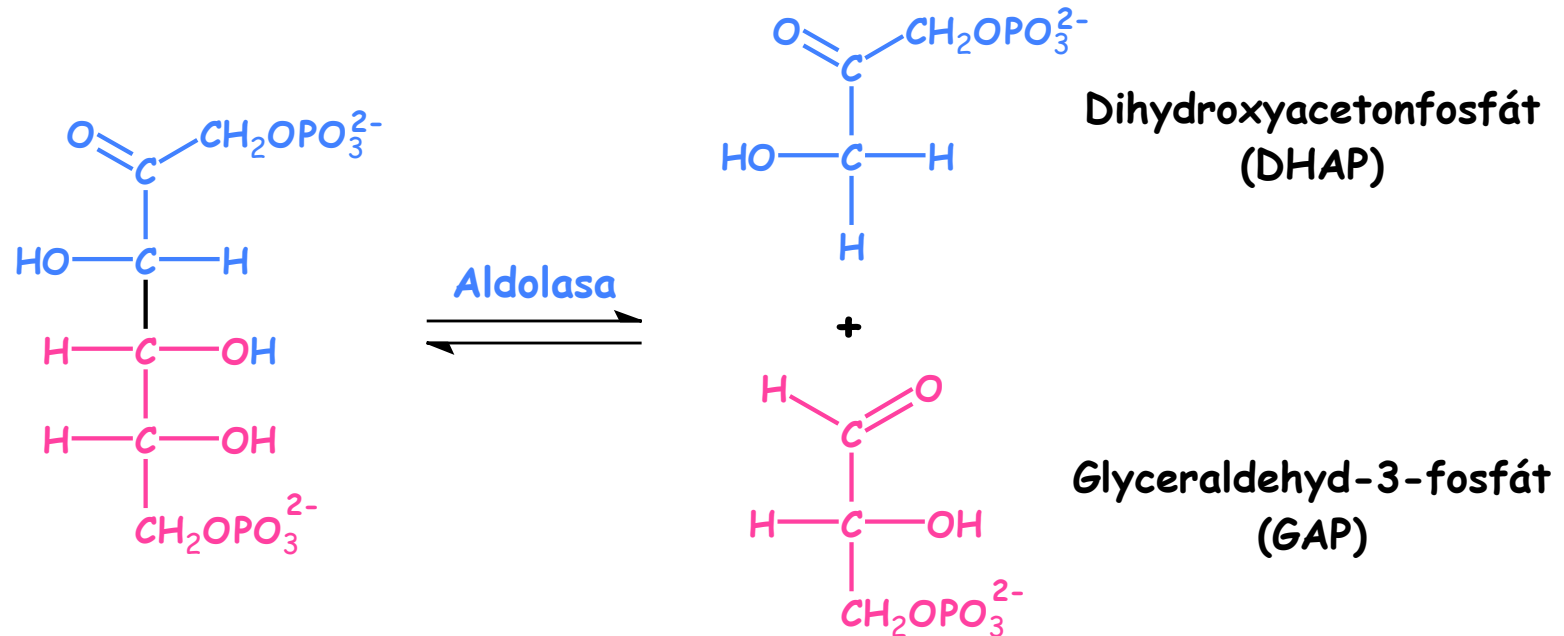
## Druhý stupeň glykolýzy

Vytváří se dva vzájemně převoditelné triosafosfáty z hexosabisfosfátu.



# Aldolasa

Reakce je zvratem aldolové kondenzace.



Dihydroxyacetonfosfát  
(DHAP)

Glyceraldehyd-3-fosfát  
(GAP)

Fruktosa-1,6-bisfosfát  
(otevřená forma)



## Triosafosfátisomerasa

Izomerace aldosa - ketosa. Reakce je rychlá a reversibilní.  
V rovnováze se tvoří 96 % ketosy. V dalším průběhu se využívá aldosa.

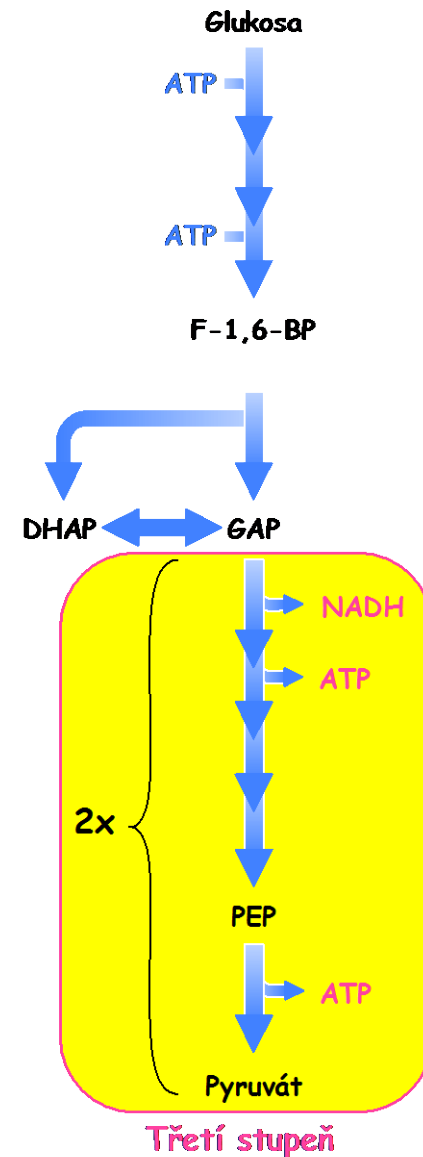


Dihydroxyacetonfosfát  
(DHAP)

Glyceraldehyd-3-fosfát  
(GAP)

## Třetí stupeň glykolýzy

Oxidací tříuhlíkatých fragmentů se tvoří ATP. Oxidují se obě triosy.



# Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

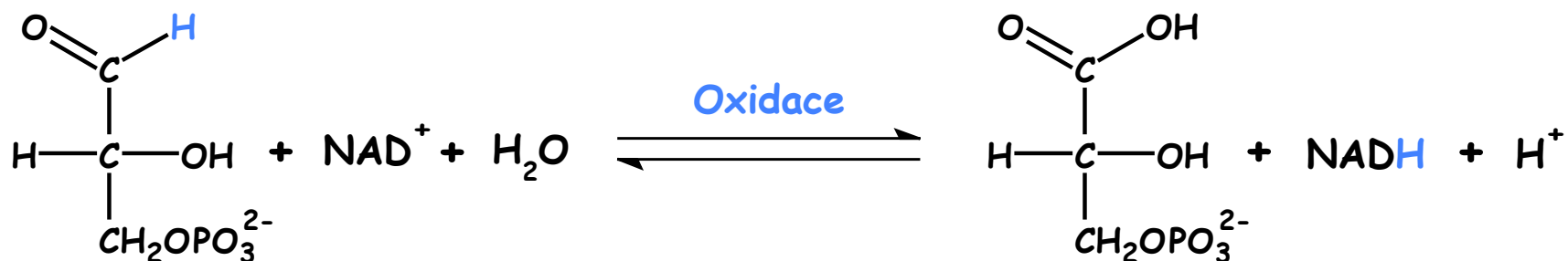


Glyceraldehyd-3-fosfát  
(GAP)

1,3-Bisfosfoglycerát  
(1,3-BPG)

## Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

1,3-bisfosfoglycerát je acylfosfát s vysokým potenciálem přenosu fosfátu na ADP za tvorby ATP.



## Fosfoglycerátkinasa

Fosforylace na úrovni substrátu. Vzhledem ke dvěma triosafosfátům se vytváří 2 x ATP.

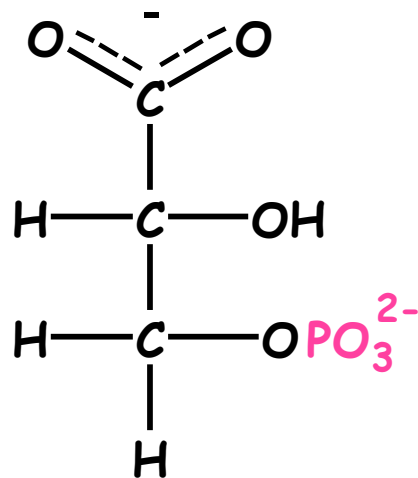


1,3-Bisfosfoglycerát

3-Fosfoglycerát

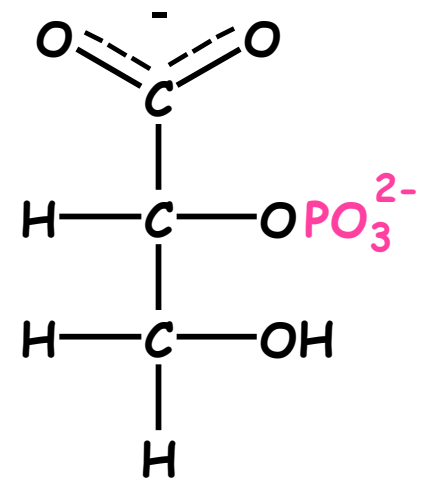
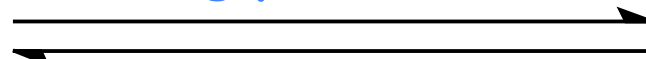
## Fosfoglycerátmutasa

Reakce vyžaduje katalytické množství 2,3-bisfosfoglycerátu.



3-Fosfoglycerát

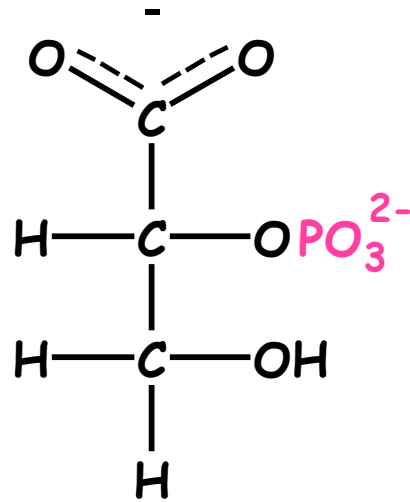
Fosfoglycerátmutasa



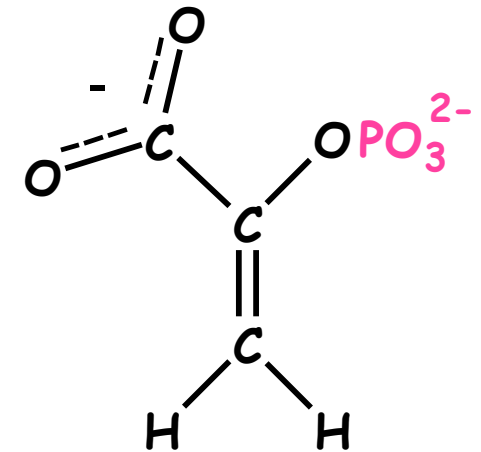
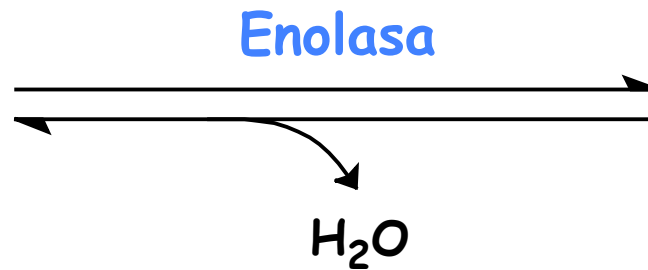
2-Fosfoglycerát

## Enolasa

Dehydratace 2-fosfoglycerátu za tvorby 2-fosfoenolpyruvátu.  
Fosfoenolpyruvát má vysoký potenciál přenosu fosfátu na ADP za tvorby ATP.



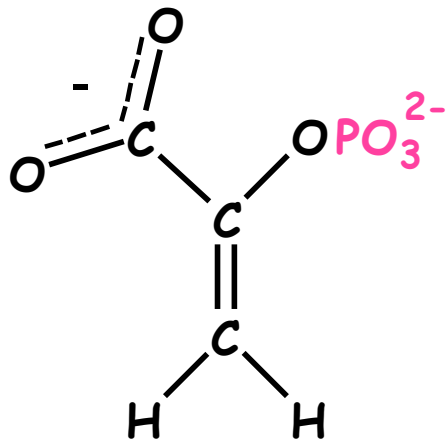
2-Fosfoglycerát



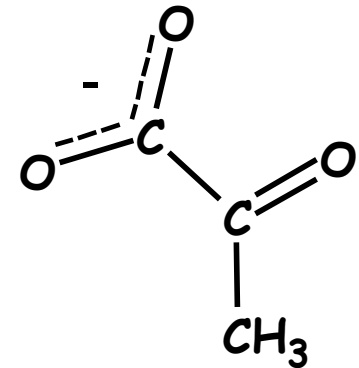
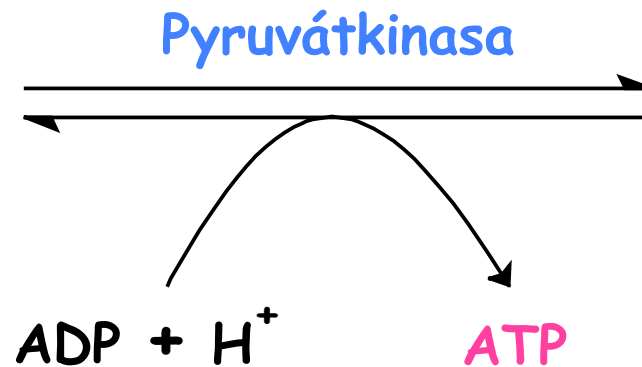
Fosfoenolpyruvát  
(PEP)

## Pyruvátkinasa

Dochází k přechodu enol-keto. Fosfát ve fosfoenolpyruvátu je vázán na nestabilní enol formu. Po přenosu fosfátu na ADP se stabilizuje keto forma.



Fosfoenolpyruvát  
(PEP)



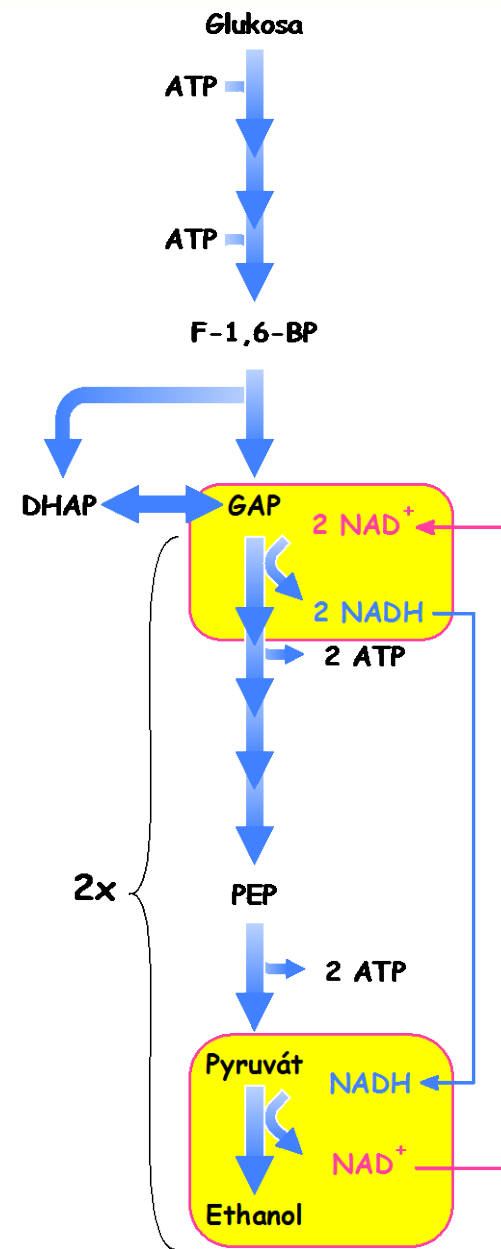
Pyruvát



# Zachování redoxní rovnováhy

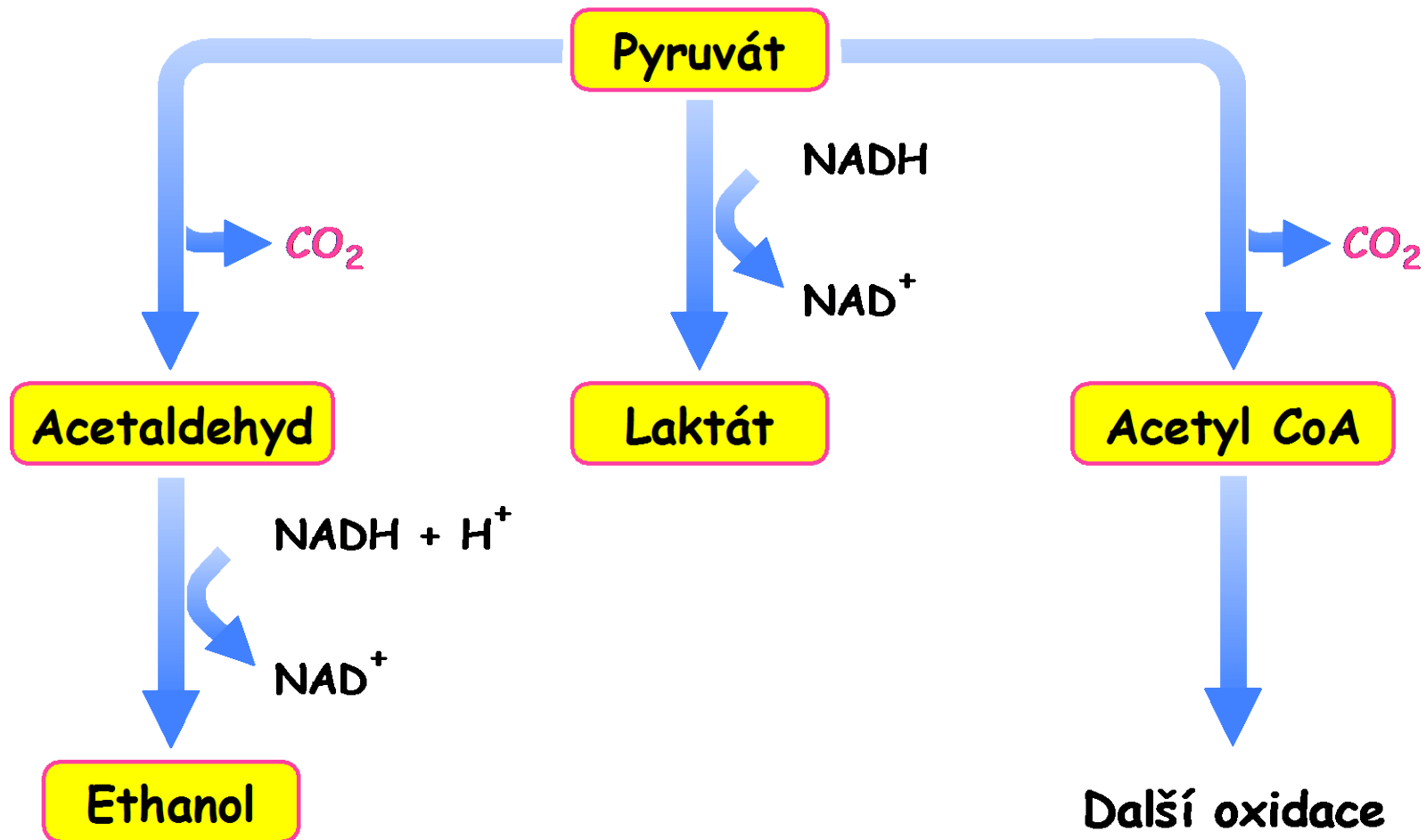
Reoxidace NADH ve svalech vede ke tvorbě laktátu, u kvasinek (*Sacharomyces*) ke tvorbě ethanolu.

Enzymy:                   laktátdehydrogenasa  
  
                              pyruvátdekarboxylasa  
                              alkoholdehydrogenasa



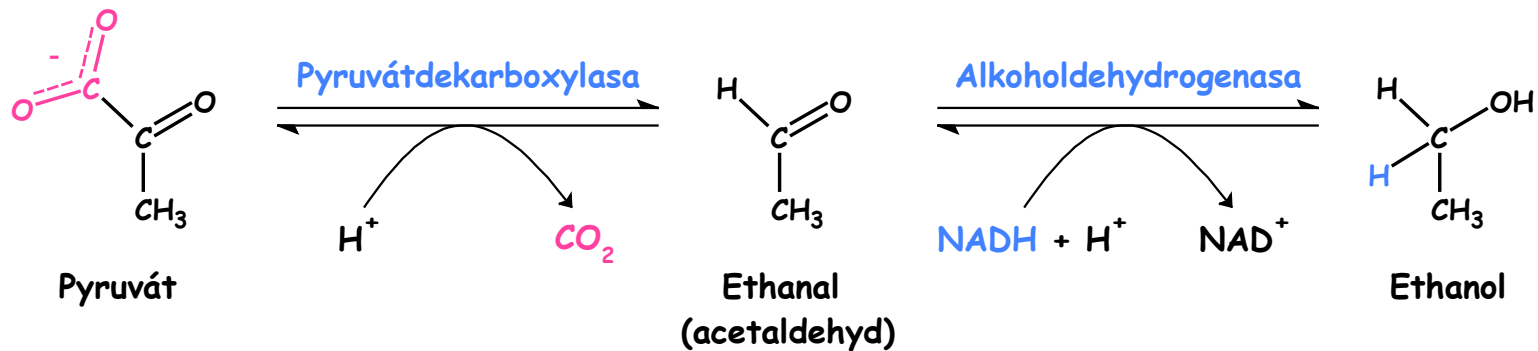
## Různé dráhy pyruvátu

Laktát a ethanol se tvoří za účasti NADH (anaerobně). Acetyl CoA se tvoří v mitochondrii v pyruvátdehydrogenasovém komplexu.



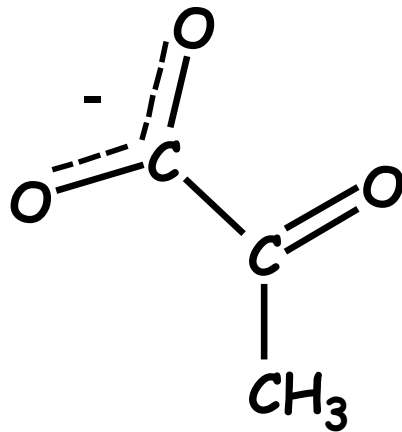
# Tvorba ethanolu kvasinkami a dalšími mikroorganismy

Pyruvátdekarboxylasa má jako koenzym thiaminpyrofosfát (z thiaminu, B<sub>2</sub>).  
Druhým stupněm je redukce ethanalu NADH alkoholdehydrogenasou.



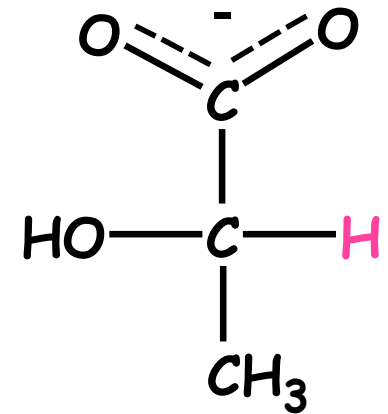
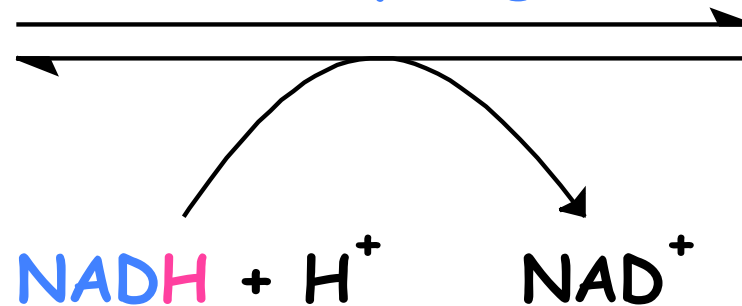
## Laktátdehydrogenasa

Enzym u řady mikroorganismů (laktátová fermentace).  
Ve svalech za nedostatku kyslíku - anaerobní stav.



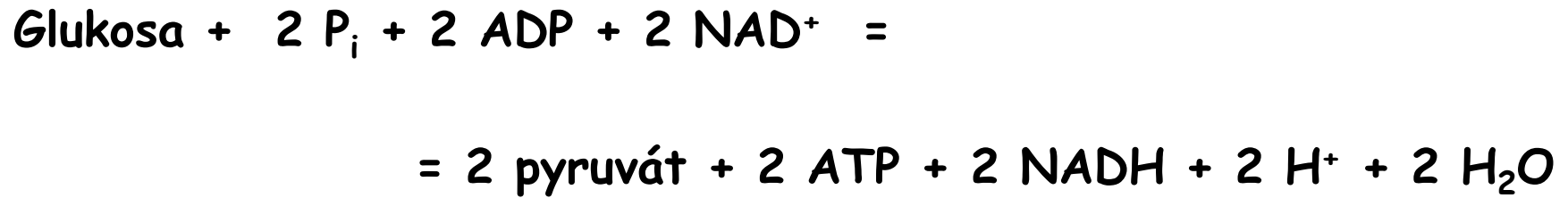
Pyruvát

Laktátdehydrogenasa



Laktát

## Energetický výtěžek konverze glukosy na pyruvát

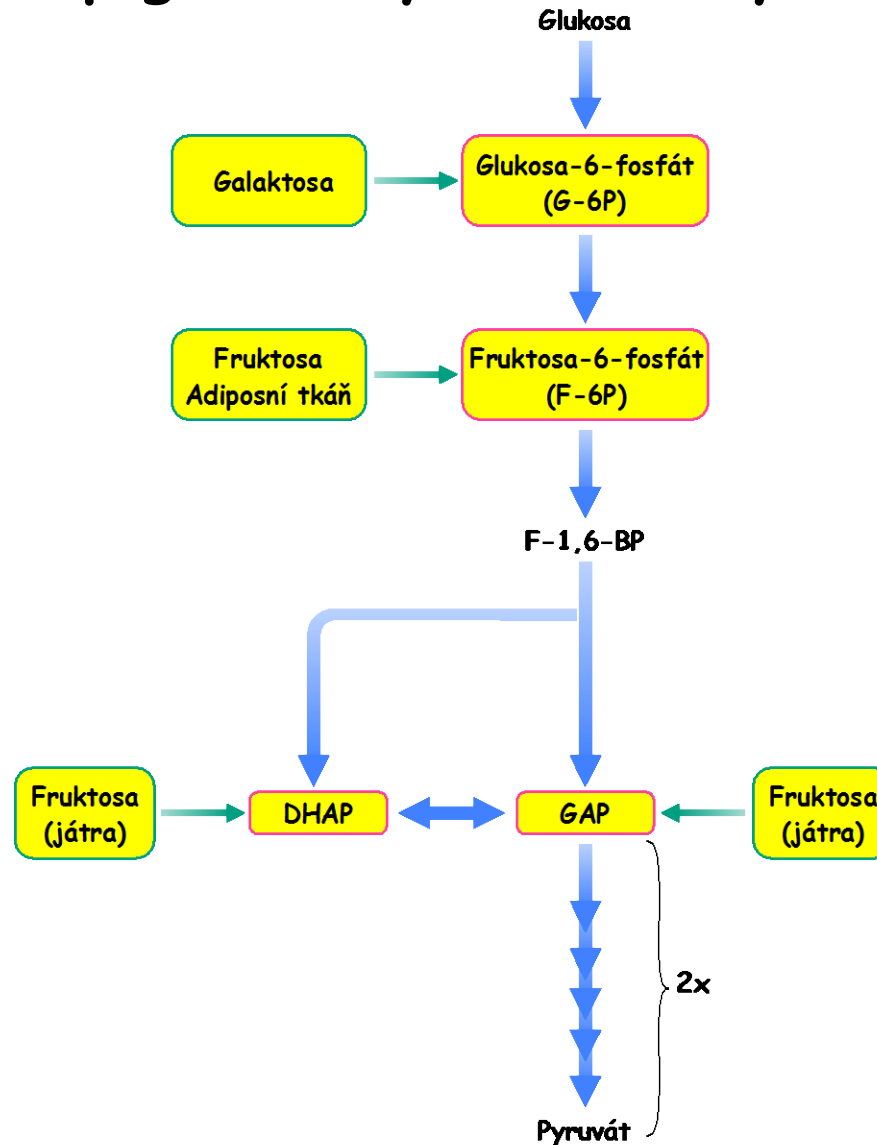


Za anaerobních podmínek je energetický výtěžek:  $-197 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžek je jen zlomkem energie, kterou je možné získat z glukosy.

Později srovnáme s aerobním výtěžkem.

# Vstup galaktosy a fruktosy do glykolýzy



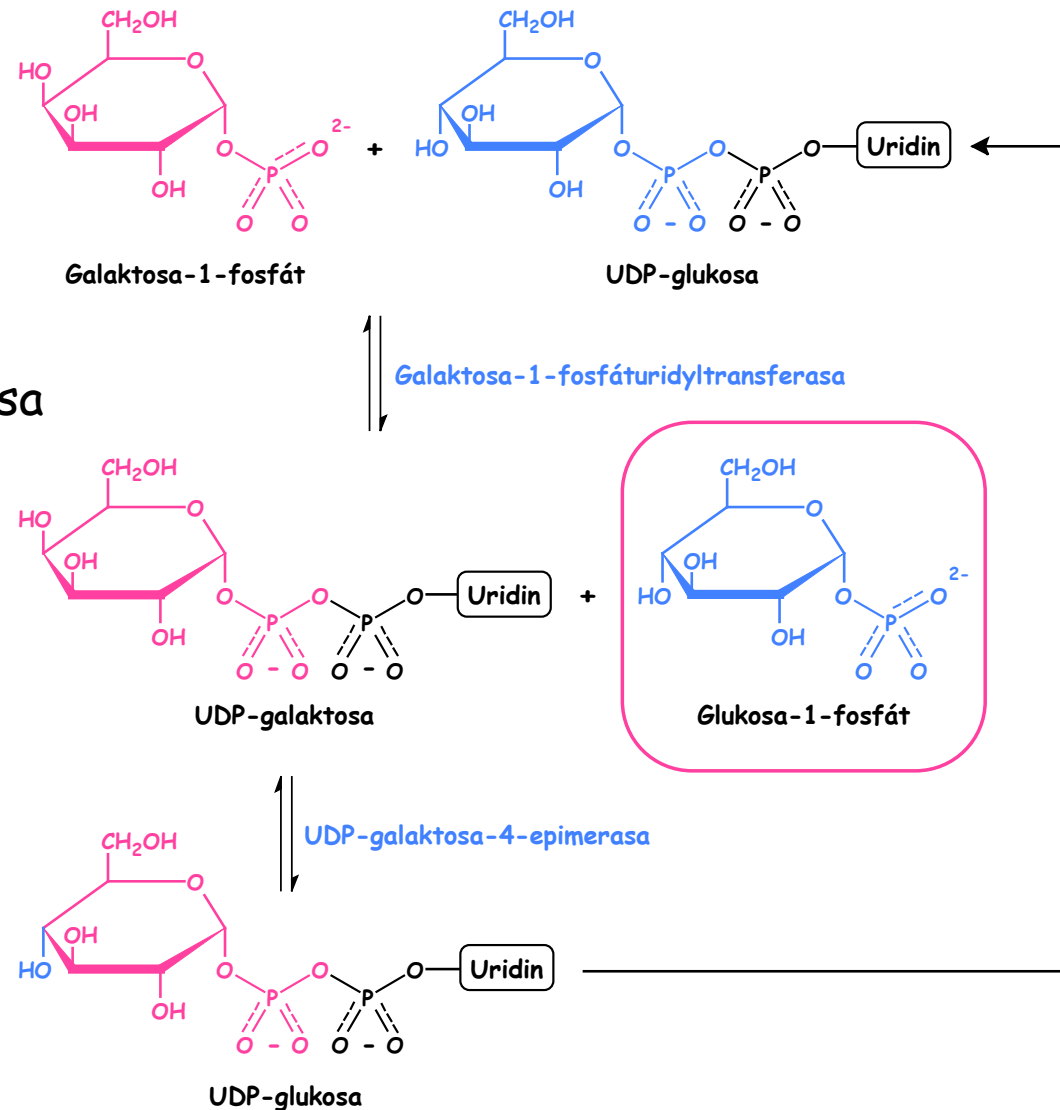
# Převod galaktosa-1-fosfátu na glukosa-1-fosfát

**Enzymy:**

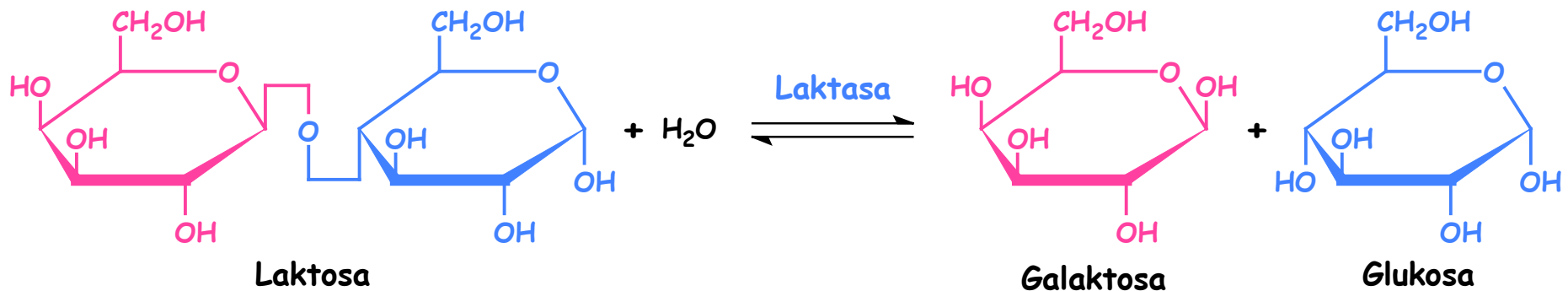
galaktosa-1-fosfáturidylyltransferasa

UDP-galaktosa-4-epimerasa

UDP-glukosa se regeneruje.



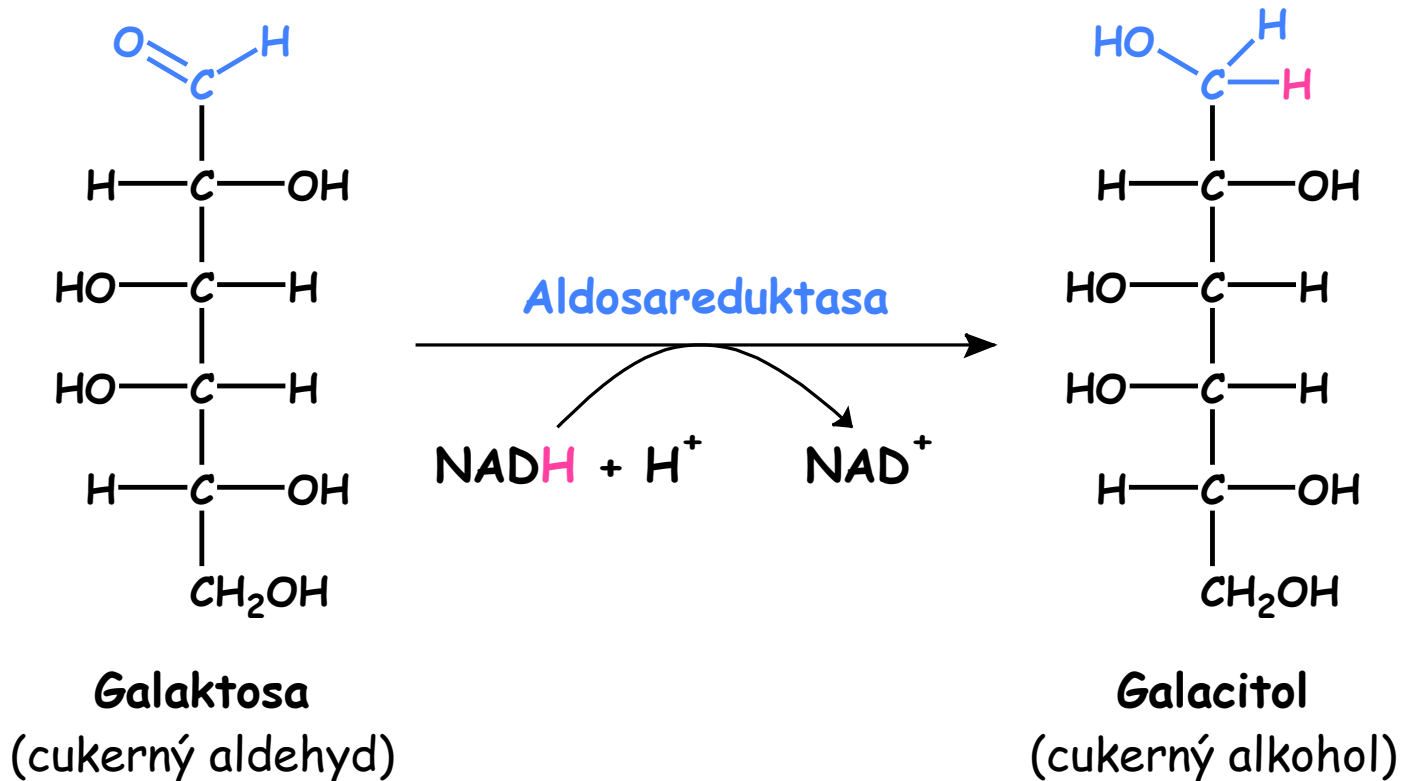
# Laktasa štěpí laktosu na glukosu a galaktosu





## Katarakt - šedý zákal

Porucha aktivity galaktosa-1-fosfáturidyltransferasy.  
Prezence aldosareduktasy v oční čočce vede ke tvorbě galacitolu, který je osmoticky aktivní a vtahuje do čočky vodu.



## Laktosová intolerance

- Deficit laktasy, která štěpí laktosu na galaktosu a glukosu.
- Důsledky: U dětí klesá aktivita laktasy po odstavení na 10% hodnot po narození.
- Laktosa je zdroj energie pro střevní mikroorganismy, které ji fermentují na laktát a plyny (methan a vodík). Způsobuje to nadýmání. Vzniklý laktát je osmoticky aktivní, což způsobuje, že voda je vtahována do střev - průjem.
- Způsobuje to také, že nejsou tráveny tuky a proteiny.
- Narušení metabolismu galaktosy - galaktosemie.
- Kromě průjmů a možnosti narušení funkce jater, znamená zvýšená hladina galaktosy možnost tvorby očního zákalu.

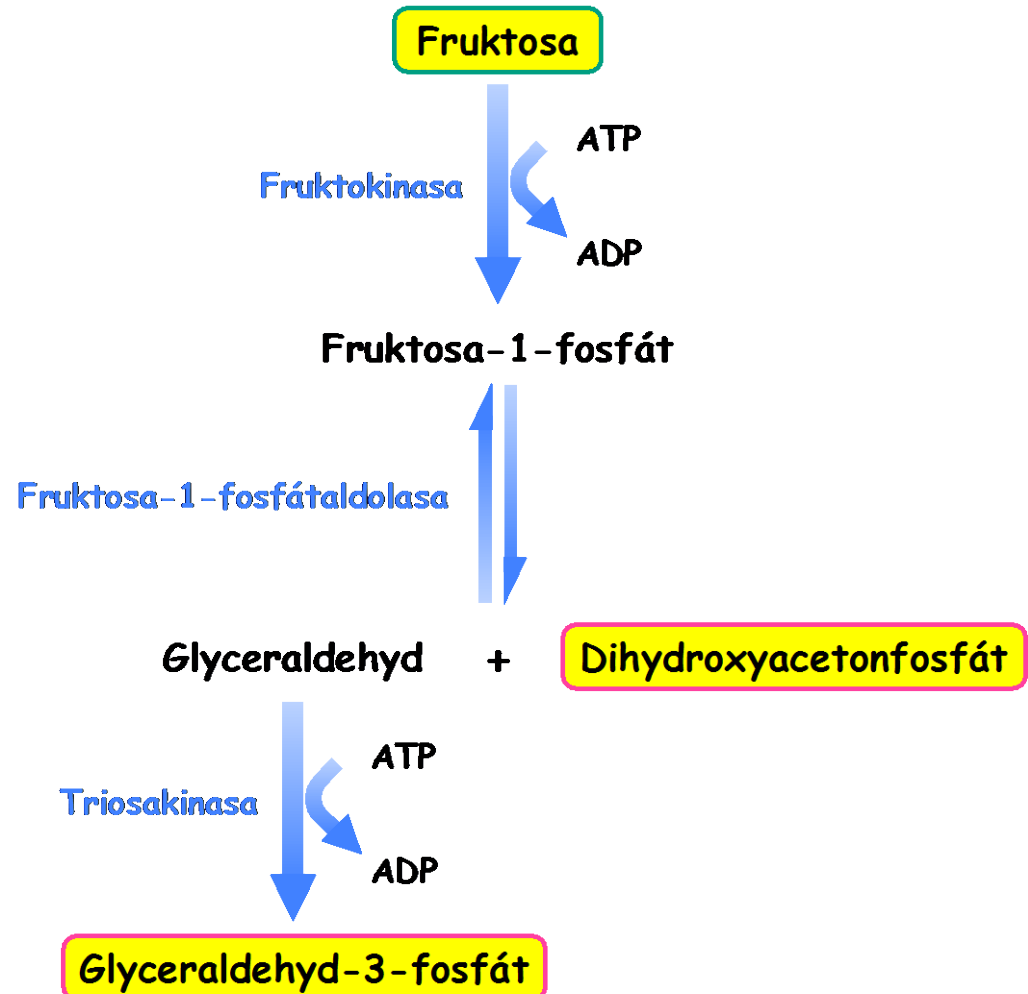
# V játrech vstupuje fruktosa do glykolýzy cestou fruktosa-1-fosfátu

Enzymy:

Fruktokinasa

Fruktosa-1-fosfátaldolasa

Triosakinasa.



## Alternativní fosforylace fruktosy adiposní tkáni

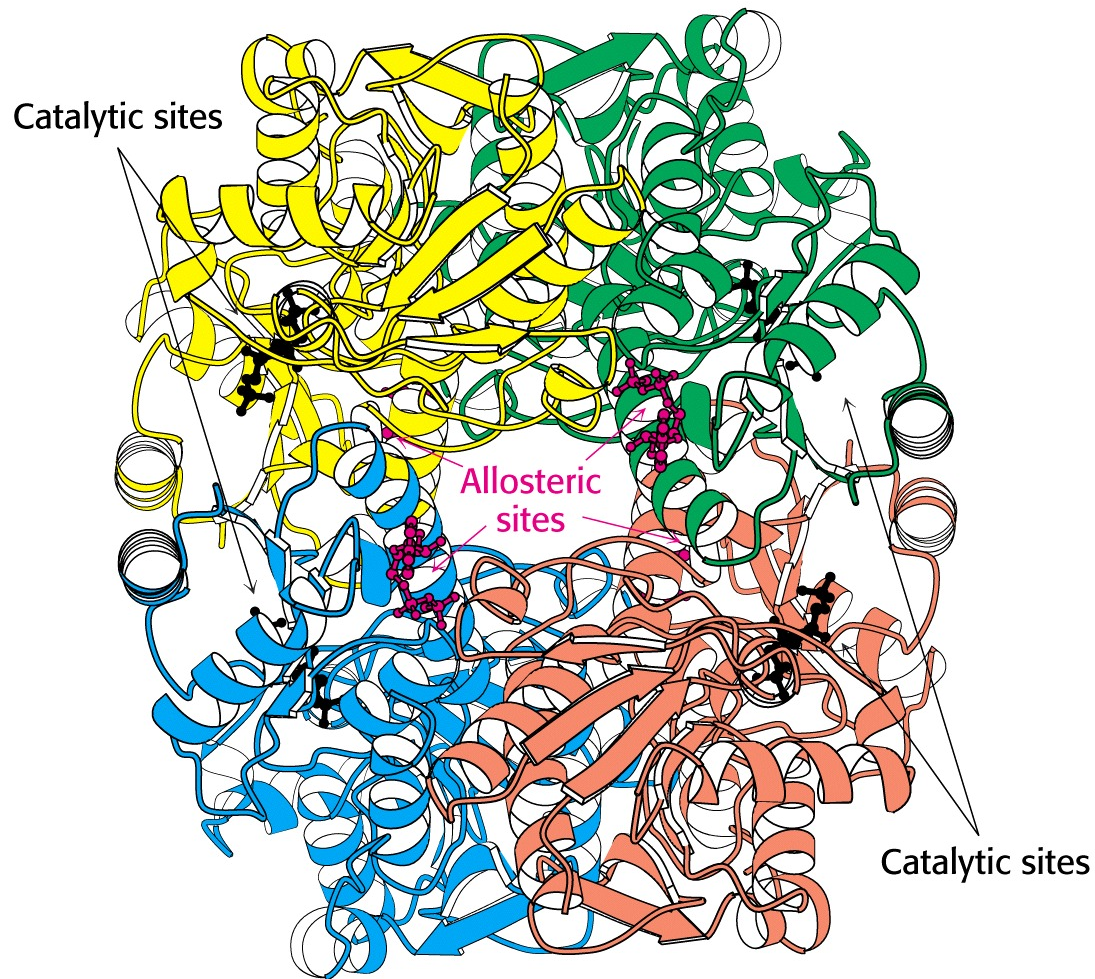
- Alternativně může být fruktosa fosforylována na fruktosa-6-fosfát hexokinasou. Afinity hexokinasy ke glukóze je však 20x vyšší než k fruktóze. V játrech se proto může tvořit jen malé množství fruktosa-6-fosfátu. Analogické je to ve svalech.
- Fosforylace fruktosy na fruktosa-6-fosfát probíhá v adiposních buňkách, kde je převaha fruktosy.

## Kontrolní mechanismy glykolýzy

- Kontrola glykolýzy je důležitá z těchto dvou důvodů:
  1. Tvoří se ATP rozkladem glukosy na pyruvát
  2. Tvoří se stavební jednotky k syntéze, např. mastných kyselin.
- V metabolických drahách jsou vhodným místem kontroly enzymy katalyzující prakticky ireversibilní reakce.
- Glykolýza:
  - hexokinasa
  - fosfofruktokinasa
  - pyruvátkinasa

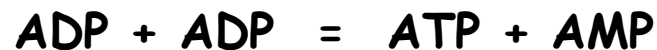
# Fosfofruktokinasa - klíčový enzym regulace savčí glykolýzy

Jaterní enzym je 340 kDa homotetramer obsahující katalytická a allosterická místa.

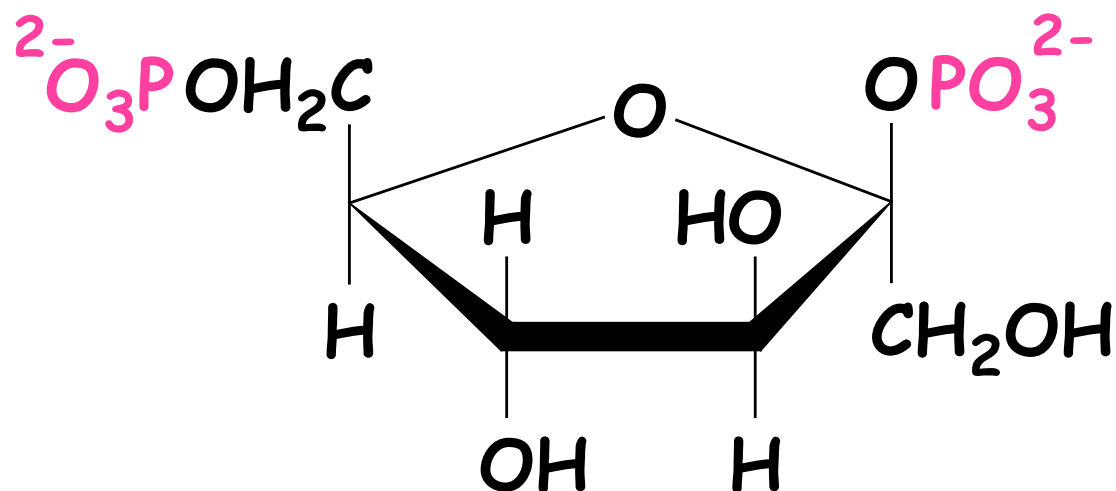


## Inhibice a aktivace fosfofruktokinasy

- ATP je allosterický inhibitor; AMP ruší inhibiční účinek ATP. Aktivita enzymu roste, když poměr ATP / AMP klesá.
- Proč AMP a ne ADP ? Při rychlém úbytku ATP se vznikající ADP rychle přeměňuje adenylátkinasou.



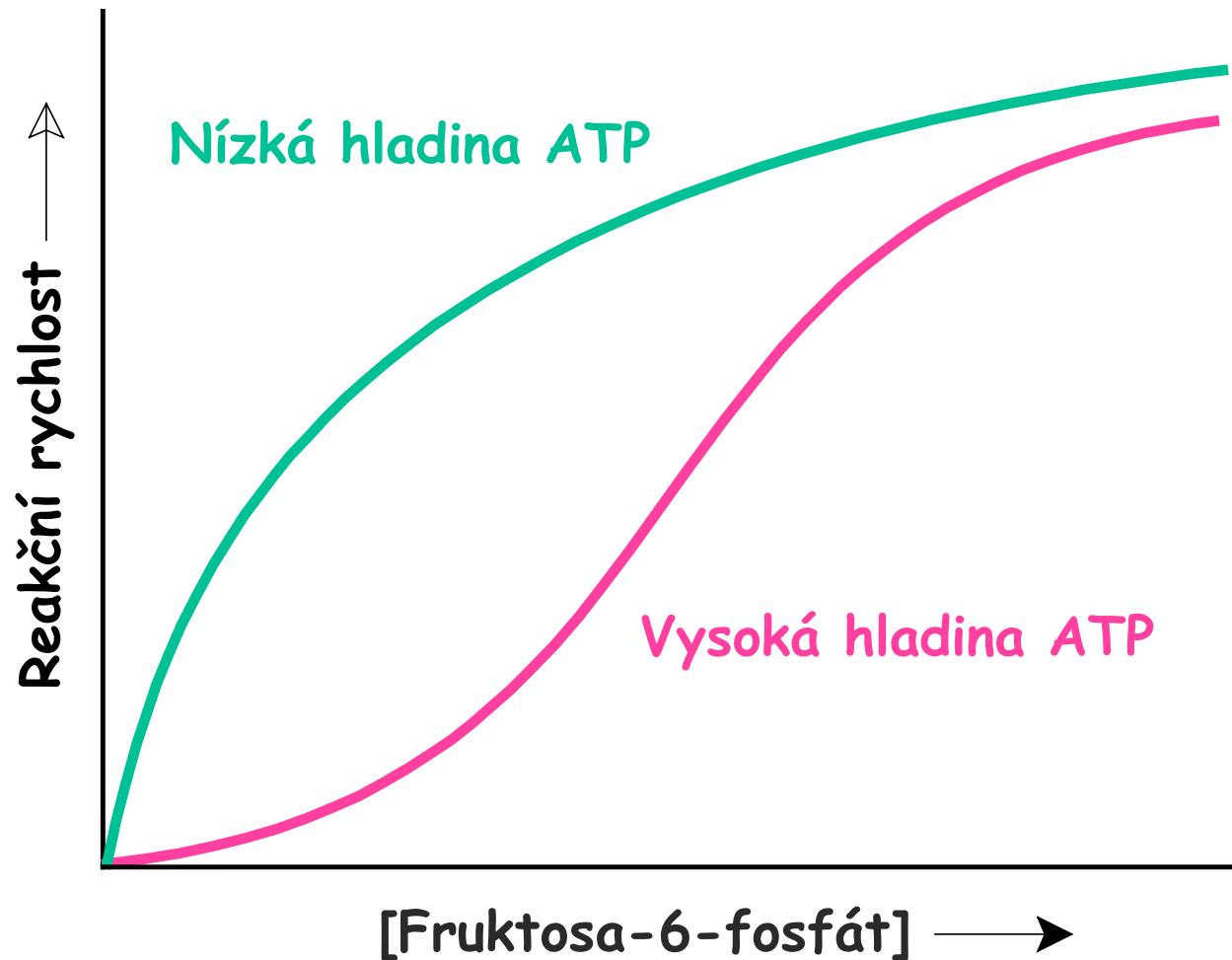
- Malé změny v koncentraci ATP vedou k velkým změnám koncentrace AMP a tím ke zvýšení citlivosti regulace fosfofruktokinasy.
- Fosfofruktokinasa je také inhibována snížením pH. Je to prevence tvorby nadbytku laktátu.
- Fosfofruktokinasa je inhibována citrátem. Nadbytek citrátu je znamením nadbytku biosyntetických prekurzorů. Není nutné odbourávat další glukosu.
- Aktivátorem fosfofruktokinasy je **fruktosa-2,6-bisfosfát** (F-2,6-bP). Aktivuje enzym tím, že zvyšuje jeho afinitu pro substrát. F-2,6-bP je allosterický aktivátor, který posouvá tetramerní enzym ze stavu T do stavu R.



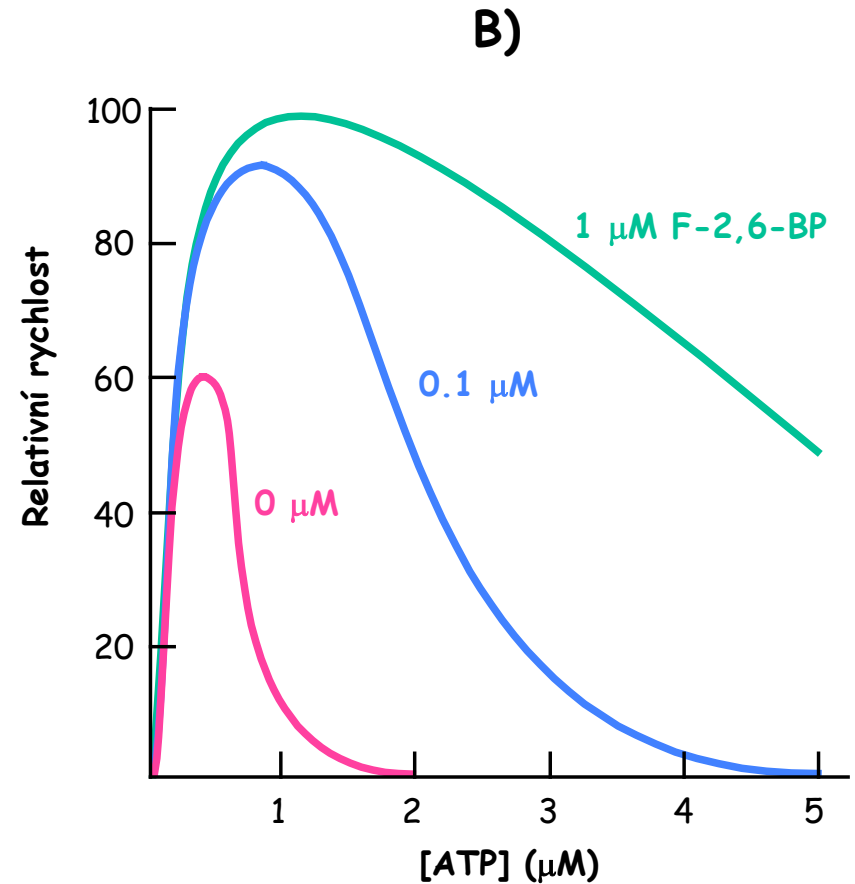
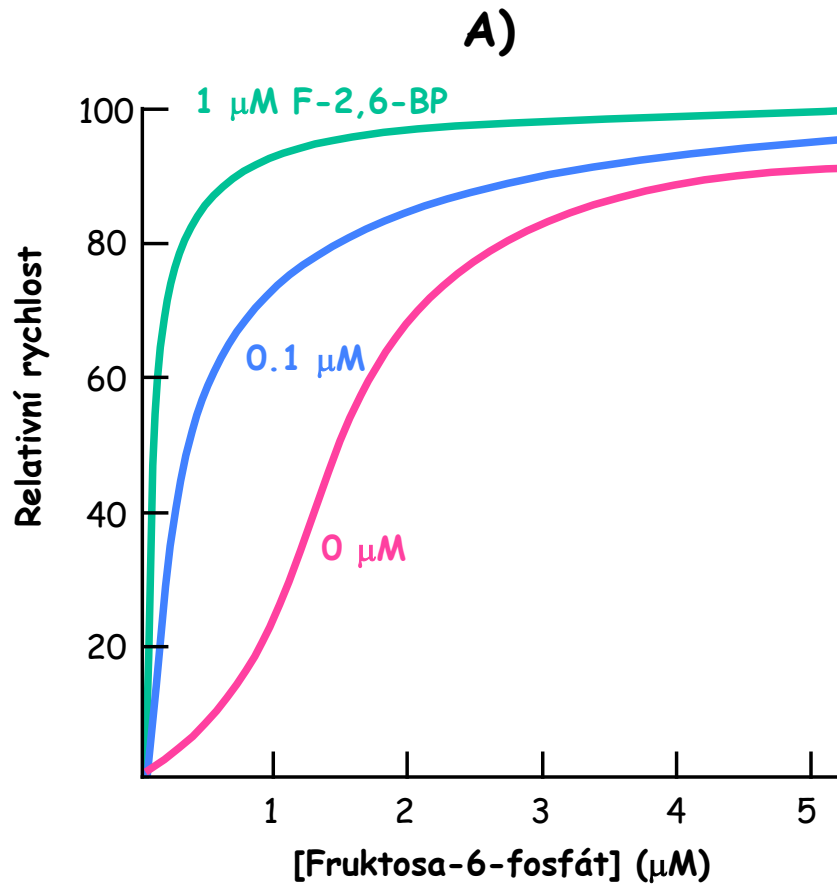
**Fruktosa-2,6-bisfosfát  
(F-2,6-BP)**



# Allosterická inhibice fosfofruktokinasy ATP



- A) Aktivace fosfofruktokinasy fruktosa-2,6-bisfosfátem  
 B) ATP jako substrát, nadbytek inhibuje, přidání F-2,6-bP ruší inhibiční účinek ATP



## Kontrola hladiny F-2,6-BP

- Fruktosa-2,6-bisfosfát se tvoří za katalýzy fosfofruktokinasou 2 (PFK2) a je hydrolyzována fruktosabisfosfátasou 2 (FBPasa2), což je bifunkční enzym. Existuje v pěti isoenzymových formách. Forma L převažuje v játrech a forma M ve svalech. Forma L se podílí na udržování homeostázy krevní glukosy.
- **Při vysoké hladině glukosy** v krvi (insulin) se současně zvyšuje hladina fruktosa-6-fosfátu v játrech, což vede ke zvýšené tvorbě F-2,6-BP a tím ke zvýšení aktivity fosfofruktokinasy.
- Jaké kontrolní mechanismy fungují v játrech ve vztahu PFK2 a FBPasy2 ?
- Aktivity PFK2 a FBPasy2 jsou recipročně kontrolovány fosforylací Ser zbytků.
- **Při nízké hladině glukosy** (signalizuje glukagon přes proteinkinazovou kaskádu s cAMP) dojde k fosforylaci bifunkčního enzymu proteinkinazou A, což má za následek aktivaci FBPasy2 a inhibici PFK2. Snižuje se hladina F-2,6-BP a zpomaluje se glykolýza.
- **Při vysoké hladině glukosy**, ztrácí bifunkční enzym fosfát, aktivuje se PFK2 a inhibuje FBPasa2, zvyšuje se hladina fruktosa-2,6-bisfosfátu a zrychluje glykolýza.

## Úloha hexokinasy při regulaci glykolýzy

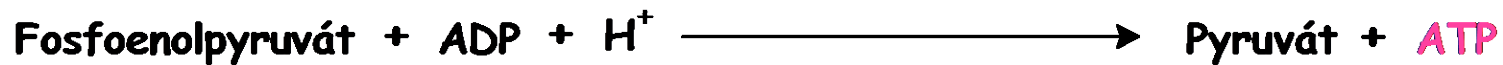
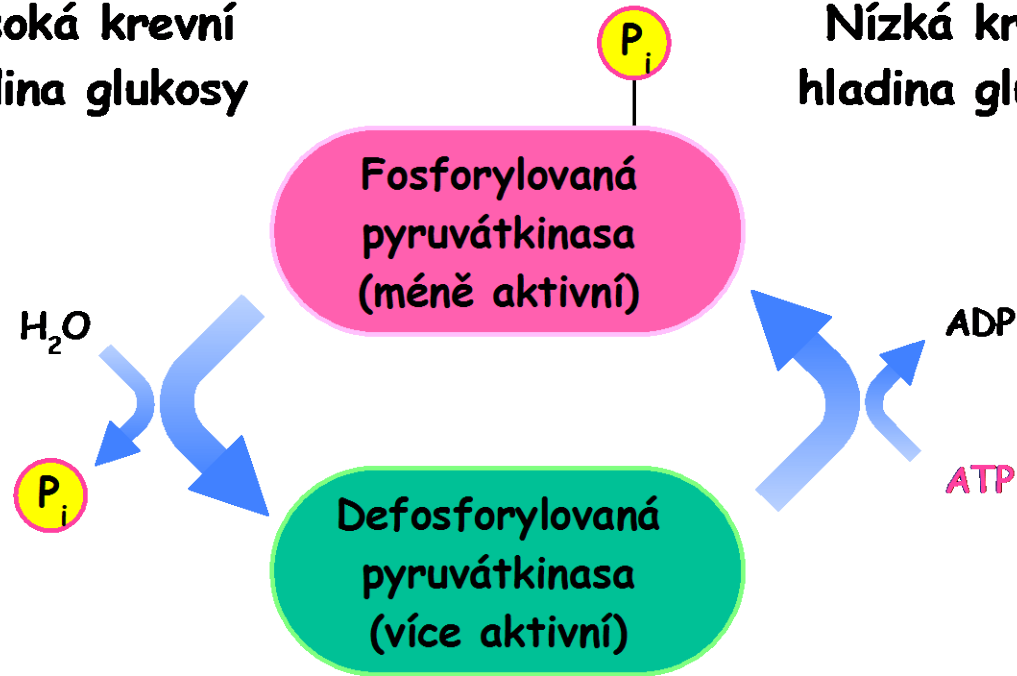
- Hexokinasa je inhibována produktem - glukosa-6-fosfátem.
- Inhibice fosfofruktokinasy vede také k inhibici hexokinasy.
- Když je fosfofruktokinasa inaktivní, roste hladina fruktosa-6-fosfátu a tím i glukosa-6-fosfátu.
- V játrech je glukokinasa, která fosforyluje glukosu při vysokých koncentracích (glukokinasa je 60 x méně afinní ke glukose). Proto je rolí glukokinasy spíše fosforylovat glukosu pro tvorbu glykogenu a mastných kyselin.
- Dalším důvodem proč je klíčovým enzymem regulace glykolýzy fosfofruktokinasa a ne hexokinasa je, že glukosa-6-fosfát není pouze meziproduktem glykolýzy. Může přecházet na glykogen nebo se katabolizovat v pentosafosfátové dráze.

# Úloha pyruvátkinasy při regulaci glykolýzy.

Regulace pyruvátkinasy a regulace prostřednictvím F-2,6-BP brání při nízké hladině spotřebu glukosy játry ve prospěch mozku.

Vysoká krevní  
hladina glukosy

Nízká krevní  
hladina glukosy



+

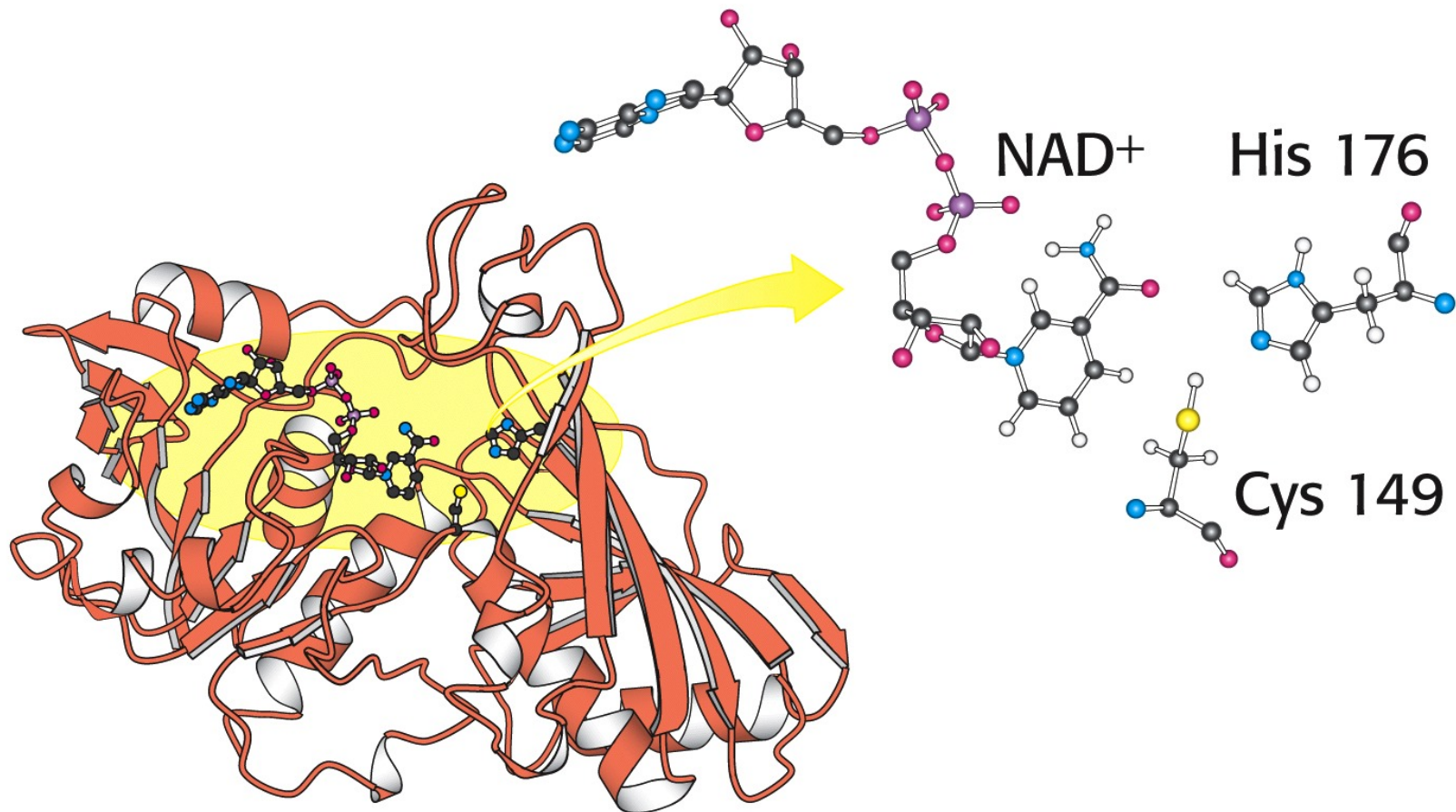
Fruktosa-1,6-bisfosfát

-

ATP  
Alanin

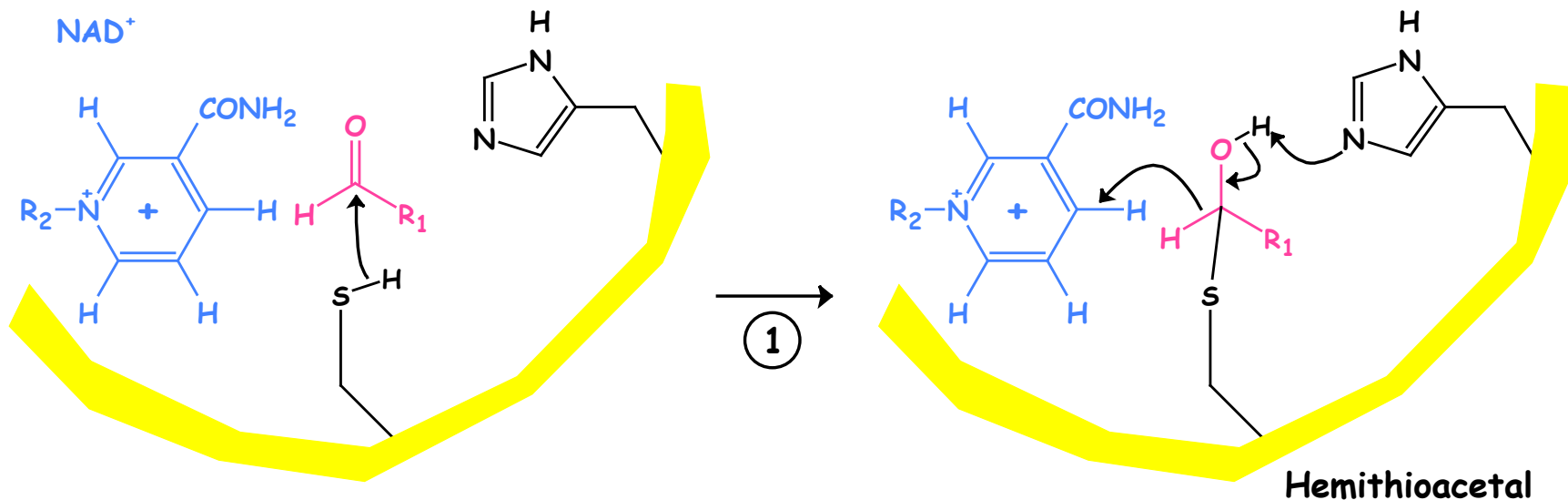
# Reakční mechanismus glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

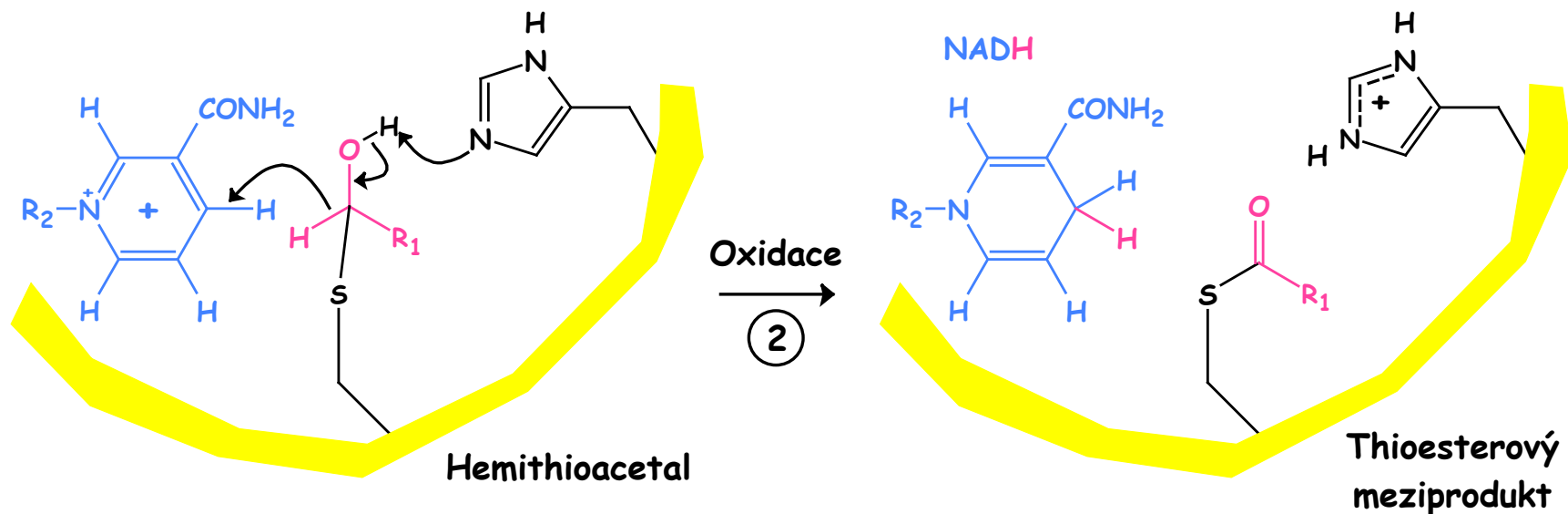
V aktivním místě jsou Cys a His zbytky vázané nekovalentně na NAD<sup>+</sup>



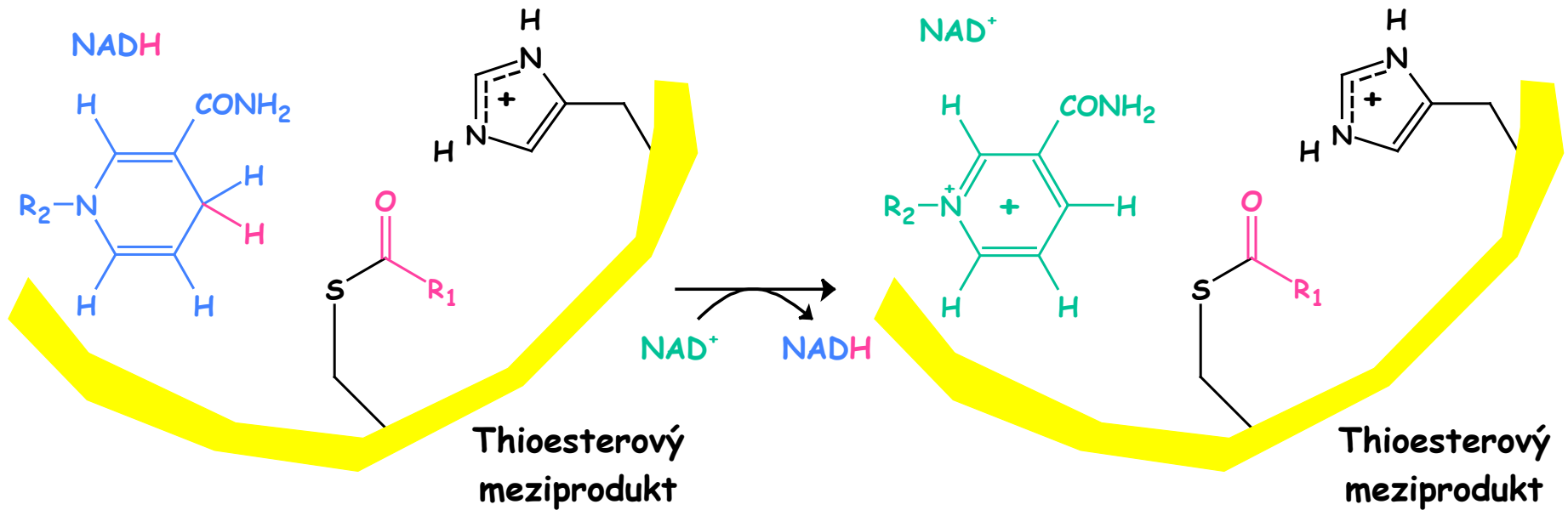
# Katalytický mechanismus glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

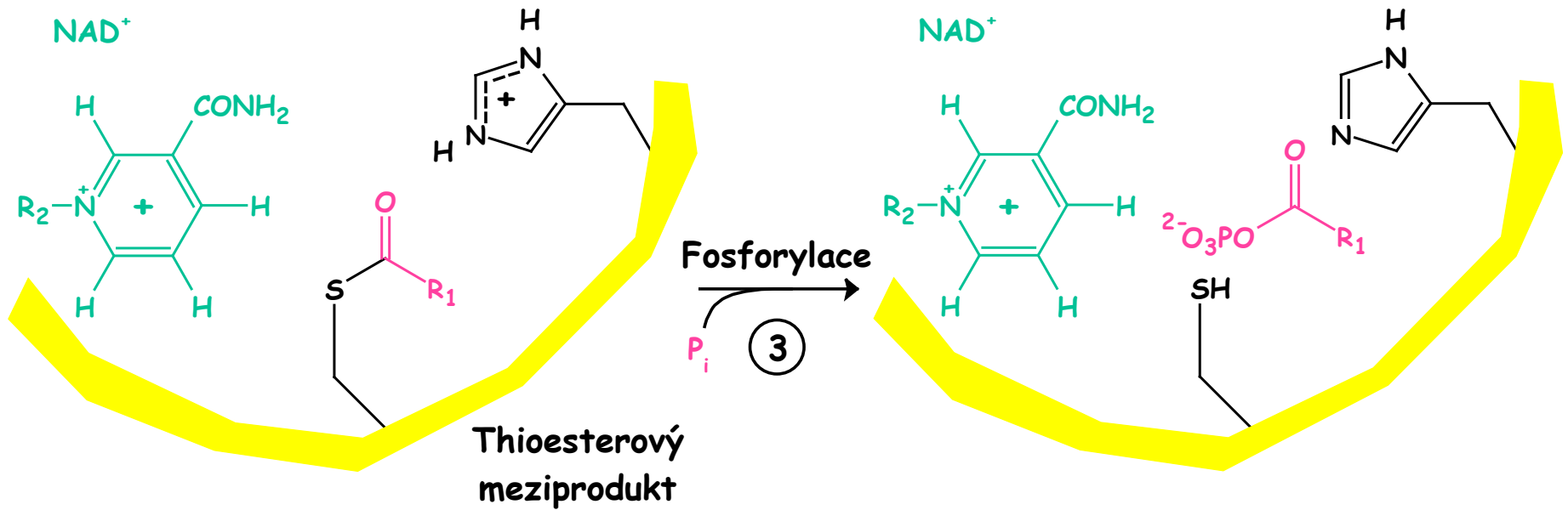
Glyceraldehyd-3-fosfát











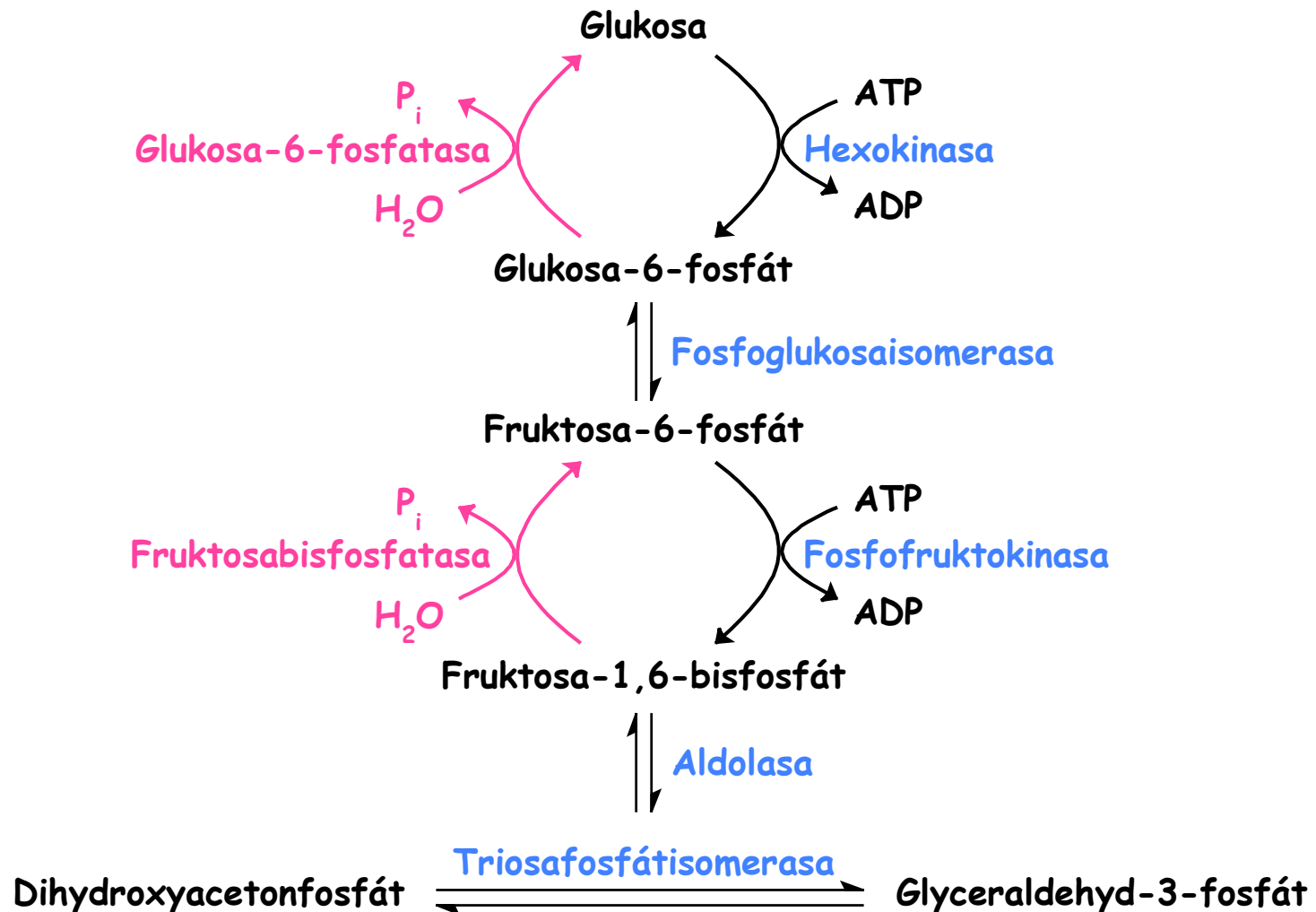
# GLUKONEOGENEZE

- Syntéza glukosy z **necukerných** prekurzorů:
- Laktát, aminokyseliny (uhlíkatý řetězec glukogenních aminokyselin při hladovění) a glycerol.
- Hlavním místem glukoneogeneze jsou játra, malé množství v ledvinách, něco málo v mozku, kosterních svalech a srdečním svalu.
- Glukoneogeneze není zvratem glykolýzy.
- Denní spotřeba glukosy mozkiem u dospělého člověka je 120 g, což je většina spotřeby těla (160 g). V tělních tekutinách je 20 g glukosy a zásoba ve formě glykogenu je 190 g.
- Celkově je v těle zásoba glukosy asi na jeden den.

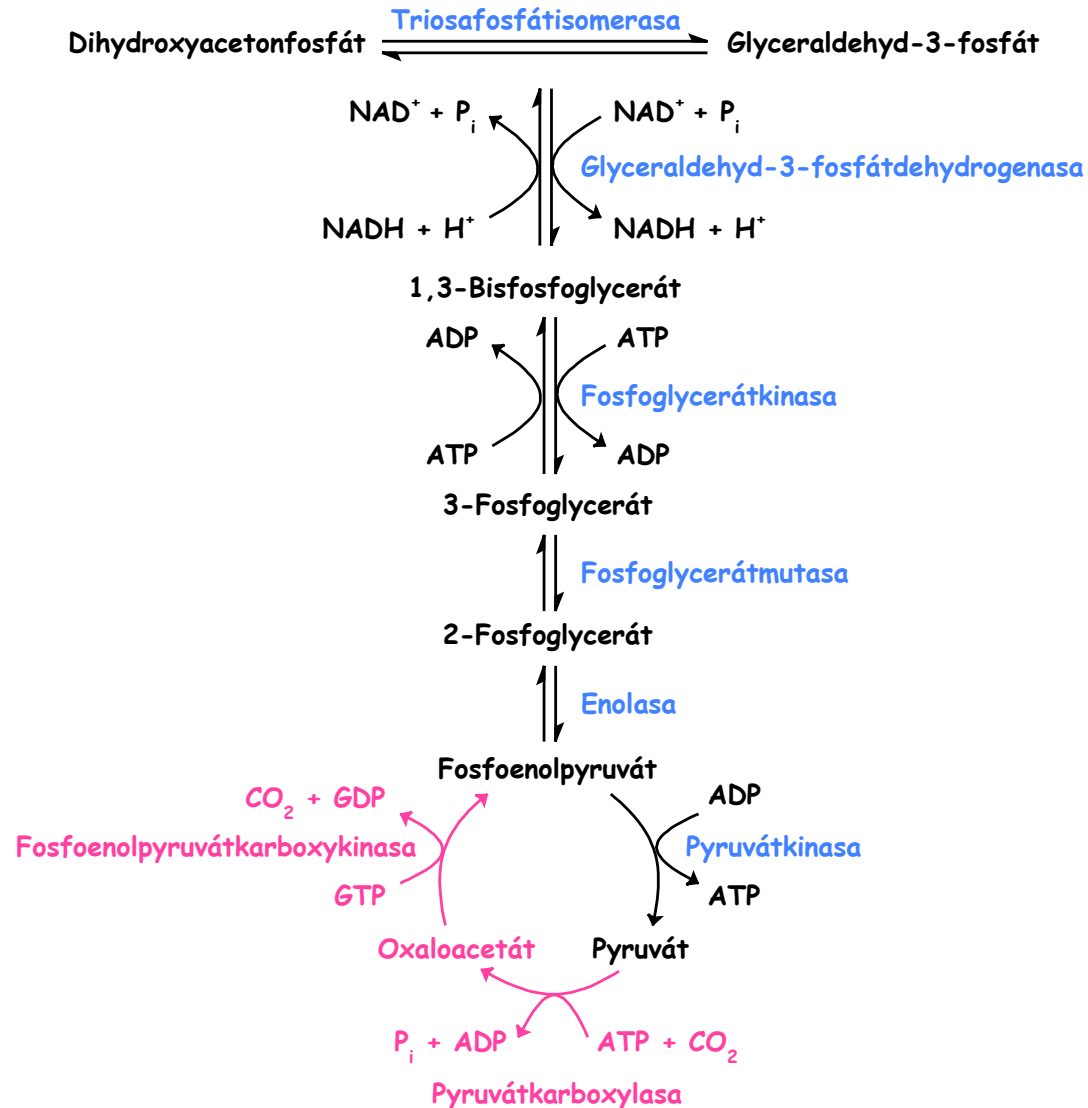
## Ireversibilní kroky glykolýzy

- Aktuální  $\Delta G$  tvorby pyruvátu z glukosy je - 84 kJ/mol.
- Tři kroky jsou kritické (ireversibilní):
  - a) Hexokinasa ( $\Delta G = - 33$  kJ/mol)
  - b) Fosfofruktokinasa ( $\Delta G = -22$  kJ/mol)
  - c) Pyruvátkinasa ( $\Delta G = - 17$  kJ/mol)

# Srovnání glykolýzy a glukoneogeneze I.



# Srovnání glykolýzy a glukoneogeneze II.

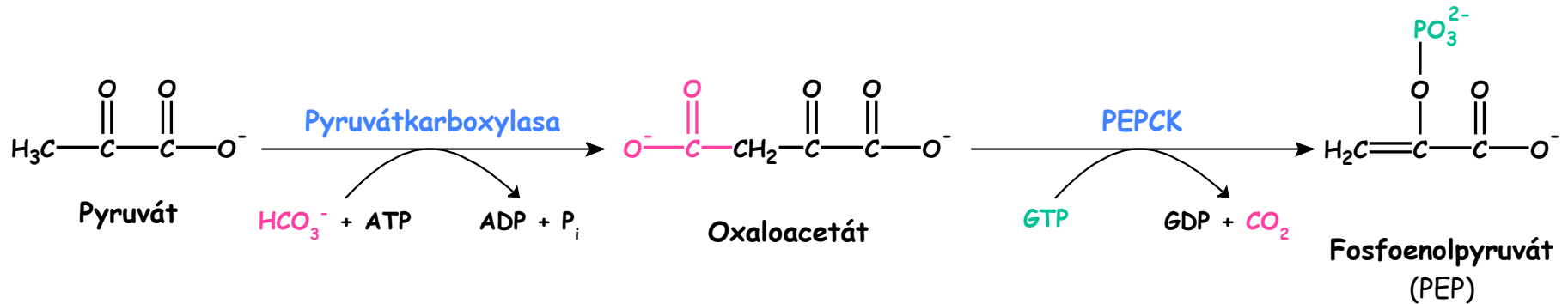


## Karboxylace pyruvátu

- Překonání prvního ireversibilního kroku - anaplerotická reakce pro cyklus trikarboxylových kyselin.
- Probíhá v matrix mitochondrie.
- Účastní se biotin jako prosthetická skupina pyruvátkarboxylasy (vázáno na koncovou aminoskupinu Lys).
- Pyruvátkarboxylasa je mitochondriální enzym, zatímco ostatní enzymy glukoneogeneze jsou cytoplasmatické.
- Reakce probíhá jen za přítomnosti acetylCoA, který se na pyruvátkarboxylasu váže.
- AcetylCoA allostericky aktivuje pyruvátkarboxylasu. Proč ?

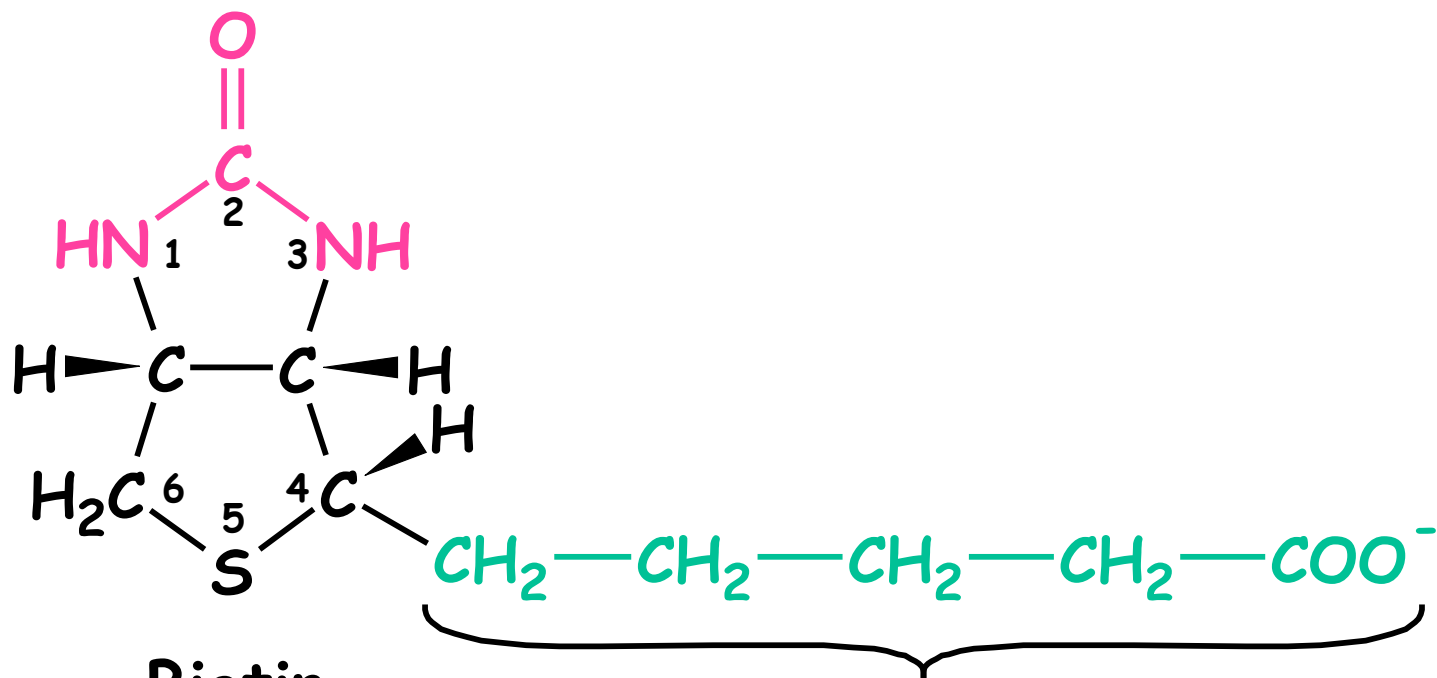
# Pyruvátkarboxylasa a fosfoenolpyruvátkarboxykinasa (PEPCK)

Karboxylace probíhá v matrix. Oxaloacetát je redukován NADH malátdehydrogenasou na malát, který je transportován do cytosolu, kde je dekarboxylován a fosforylován. Dekarboxylace pohání jinak endergonní reakci.





# Biotin

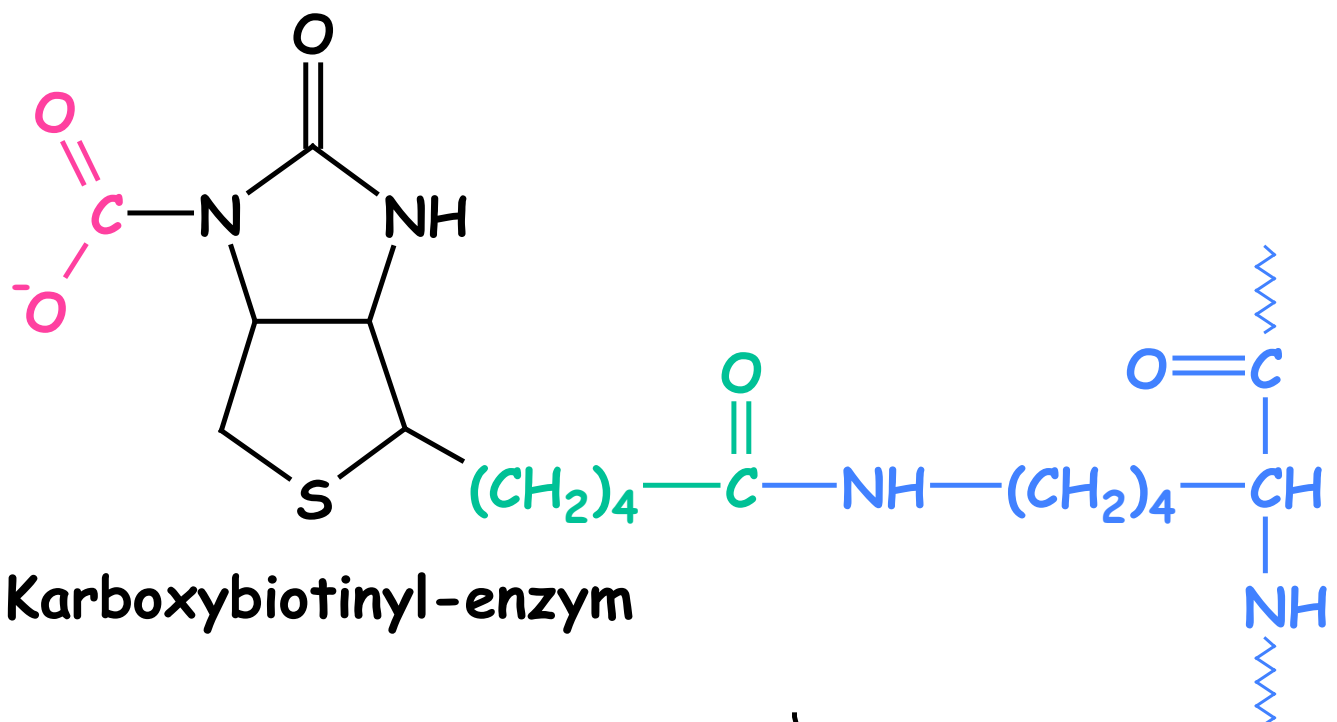


Biotin

Postranní řetězec  
(kyselina valerová)

# Karboxybiotinylpyruvátkarboxylasa

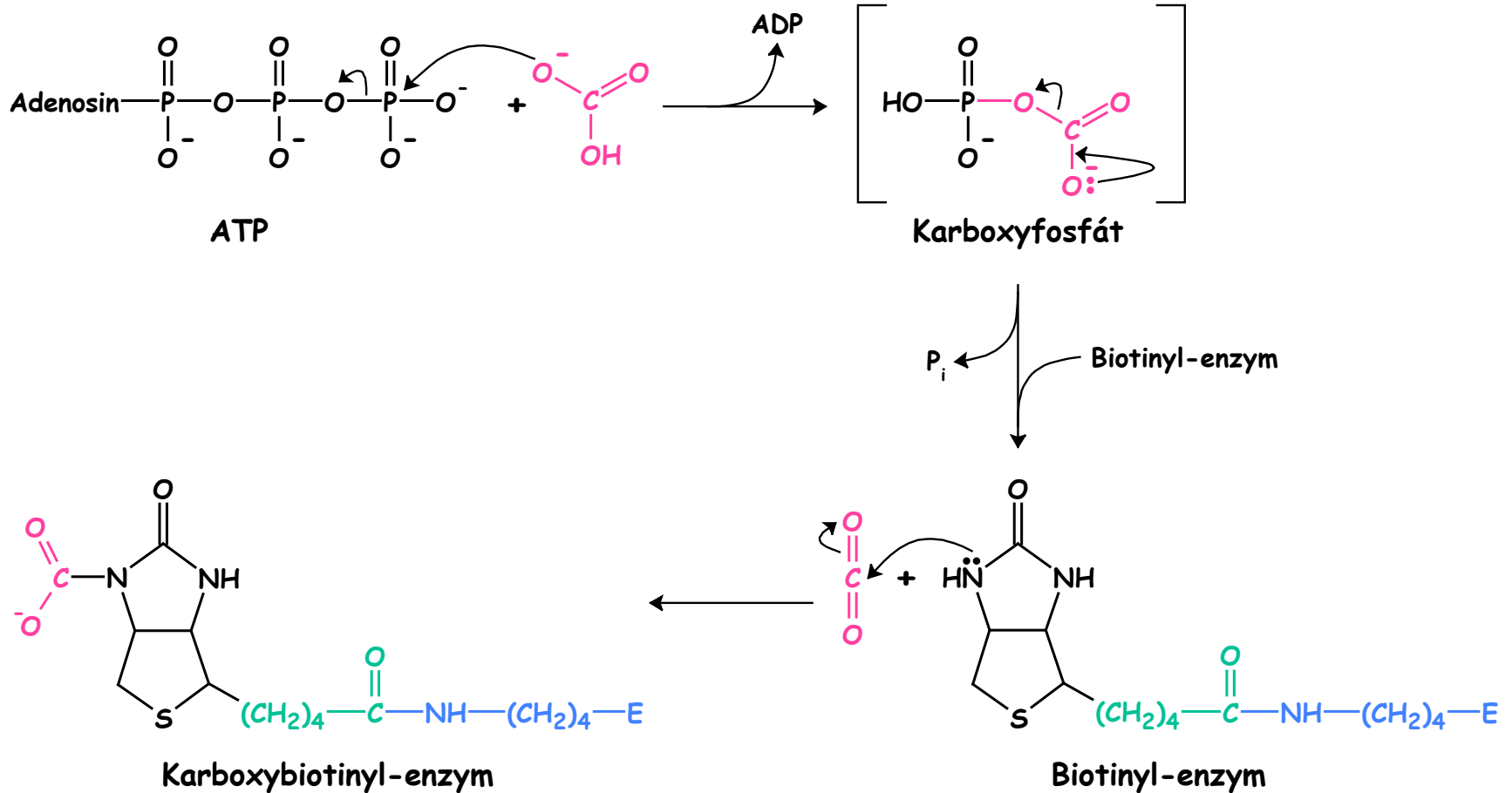
(biotin jako prosthetická skupina)



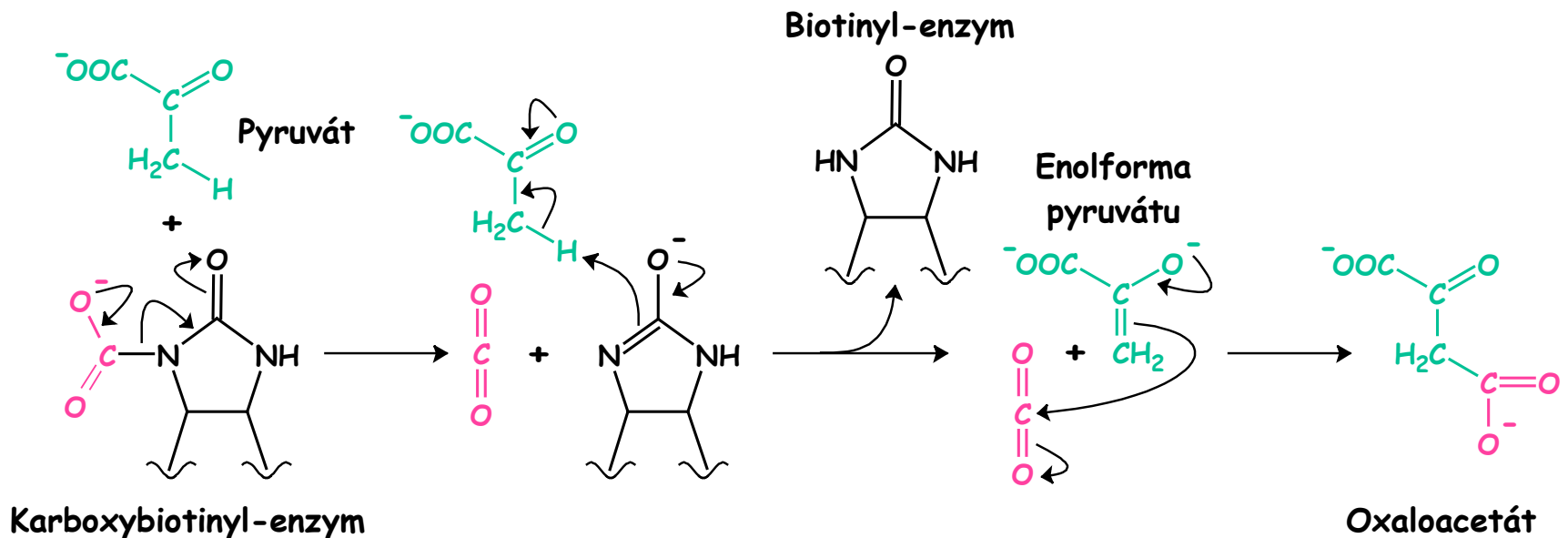
Karboxybiotinyl-enzym

Postranní řetězec  
lysinu

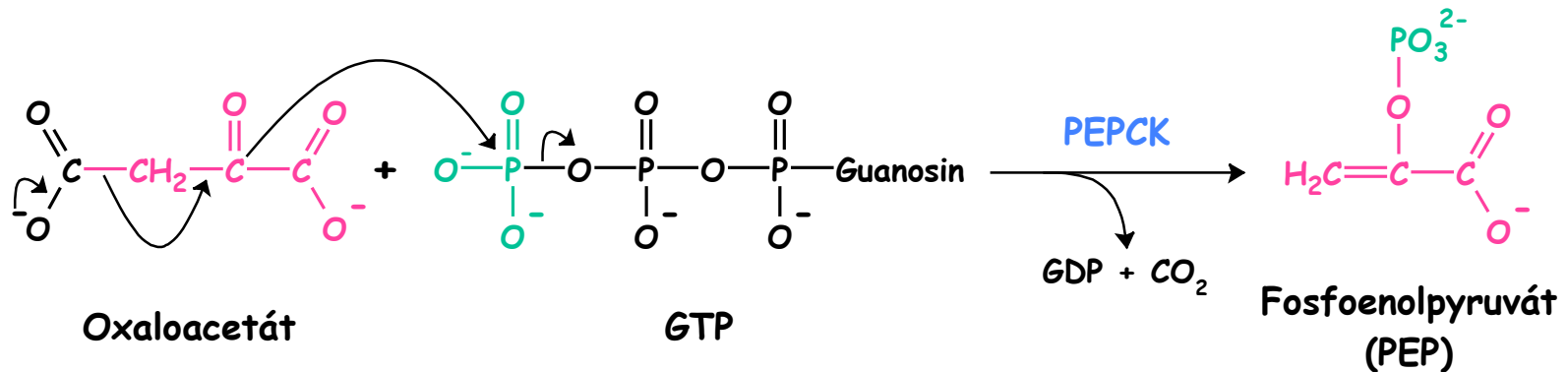
# Mechanismus tvorby karboxybiotinu reakcí hydrogenuhličitanu s ATP.



## Reakce karboxybiotinu s pyruvátem za tvorby oxaloacetátu přes enolformu pyruvátu jako meziprojektu (matrix).

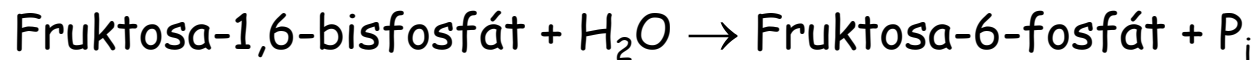


Reakce oxaloacetátu s *GTP* za katalýzy fosfoenolpyruvátkarboxykinasy je v cytosolu poháněna dekarboxylací oxaloacetátu.



## Další dva ireversibilní kroky:

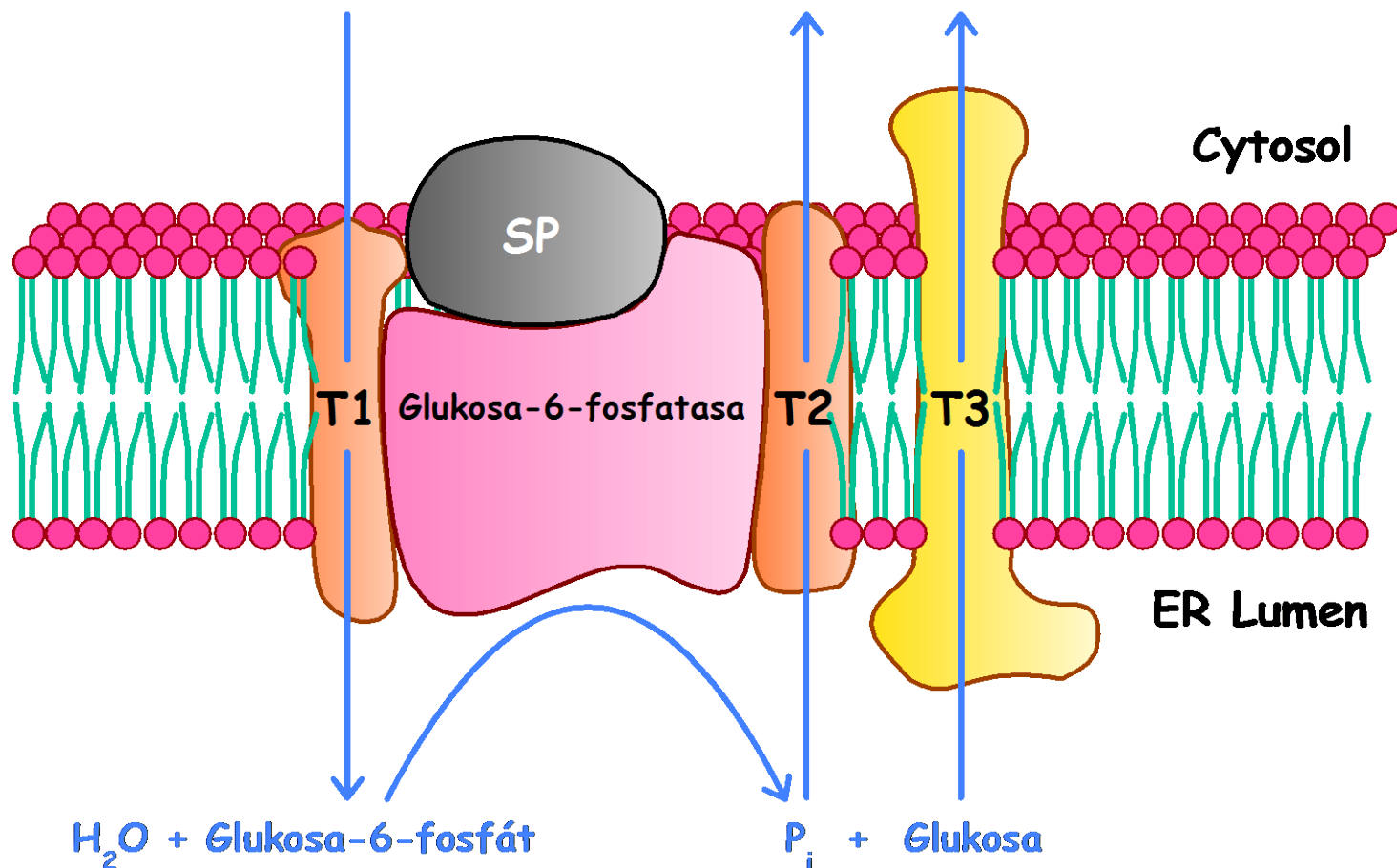
- 2. Převedení fruktosa-1,6-bisfosfátu na fruktosa-6-fosfát:



- Enzym: Fruktosa-1,6-bisfosfatasa. **Allosterický enzym-aktivován citrátem, inhibován fruktosa-2,6-bisfosfátem a AMP.**
- 3. **Glukosa-6-fosfát - tvorba volné glukosy.** Ve většině tkání končí glukoneogeneze na tomto stupni (syntéza glykogenu atd.).
- Tvorba volné glukosy vyžaduje regulaci enzymu **glukosa-6-fosfatasy**. Enzym je přítomen jen ve tkáních, které udržují fyziologickou hladinu glukosy v krvi - **játra a částečně ledviny.**

## Tvorba volné glukosy v dutinkách endoplasmatického retikula (ER) působením glukosa-6-fosfatasy

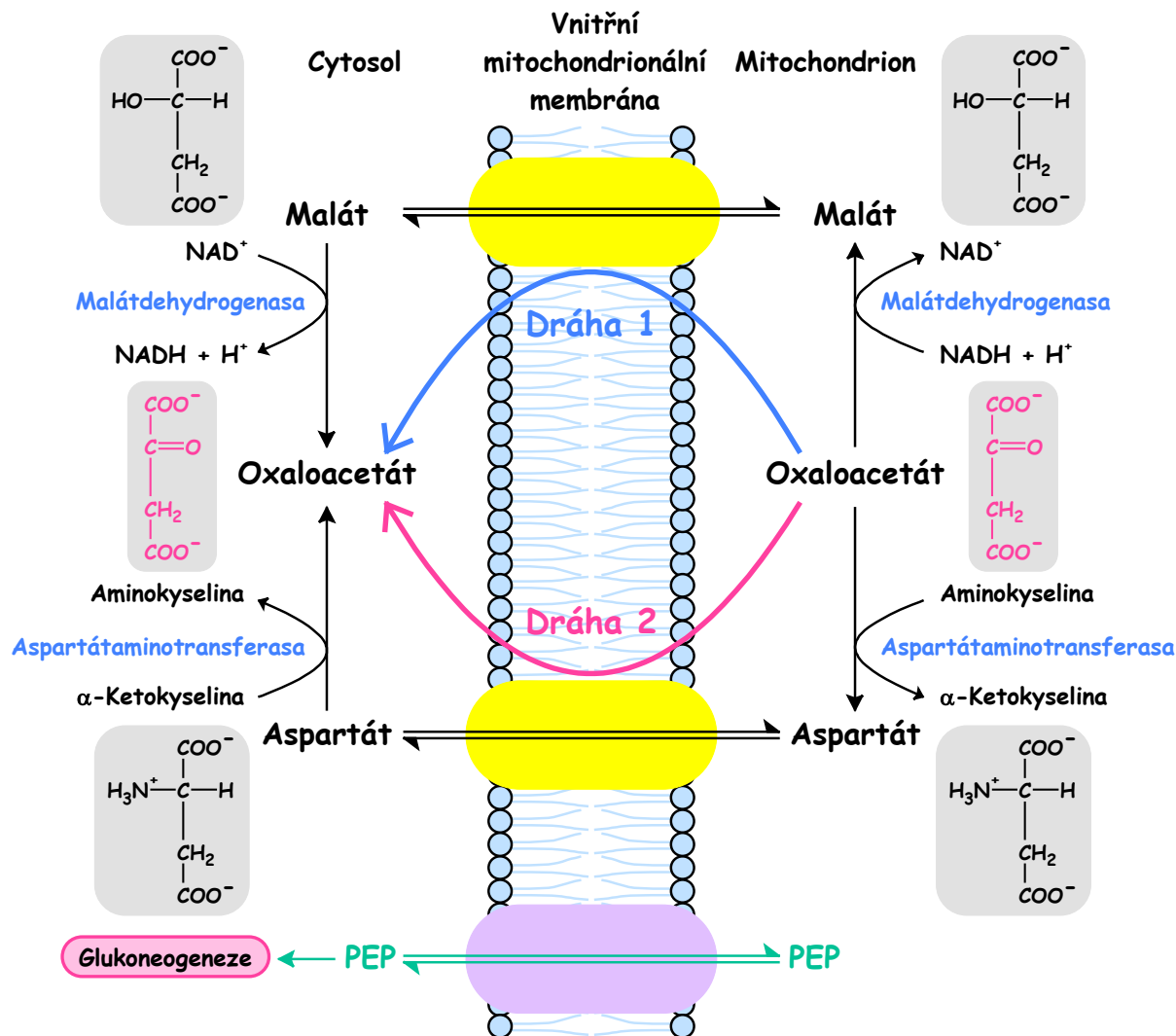
T1 transportuje G-6-P do ER, T2 a T3 transportují  $P_i$  a glukosu zpět do cytosolu. Glukosa-6-fosfatasa je stabilizována  $Ca^{2+}$ -vazebným proteinem (SP)



# Dráhy transportu oxaloacetátu

Malát - aspartátový člunek (shuttle). Srdeční sval a játra.

Univerzální člunek - směr toku elektronů závisí na NADH / NAD<sup>+</sup>



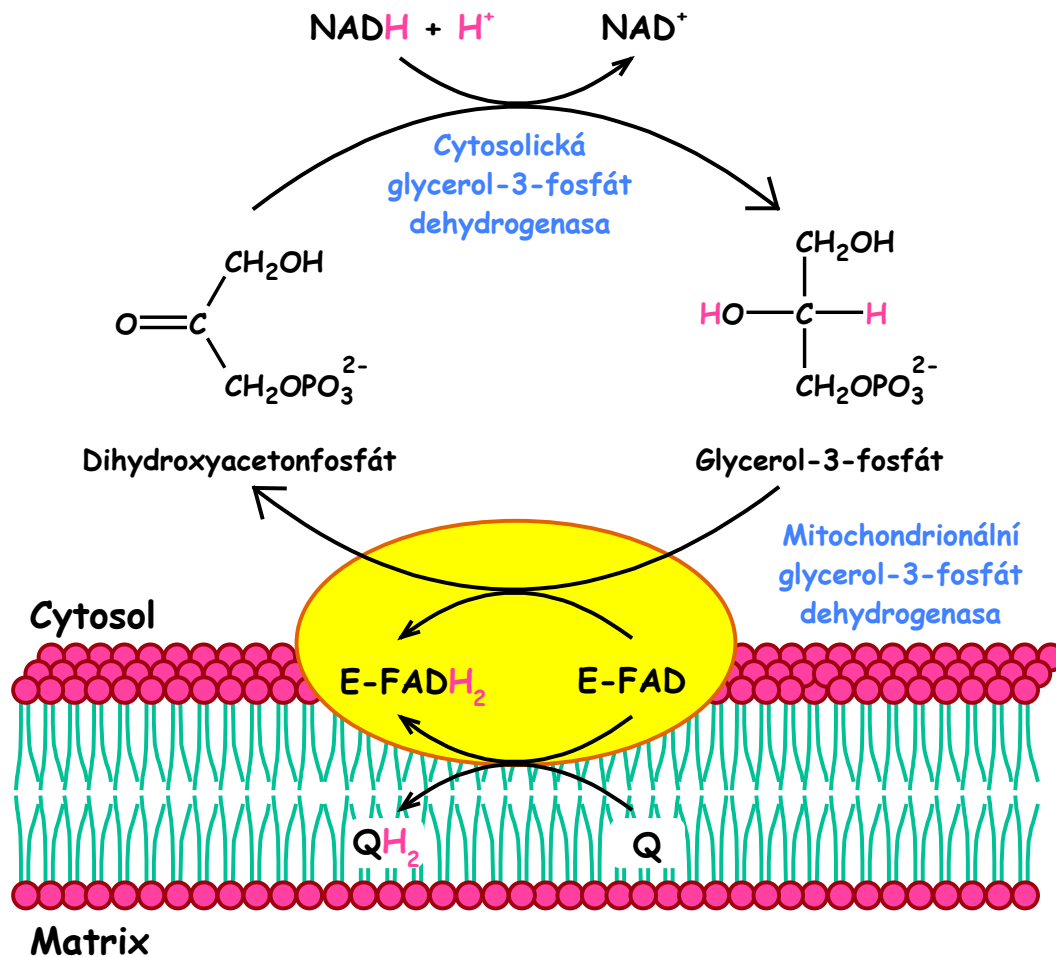


## Glycerol-3-fosfátový člunek - reoxidace NADH z glykolýzy za aerobních podmínek.

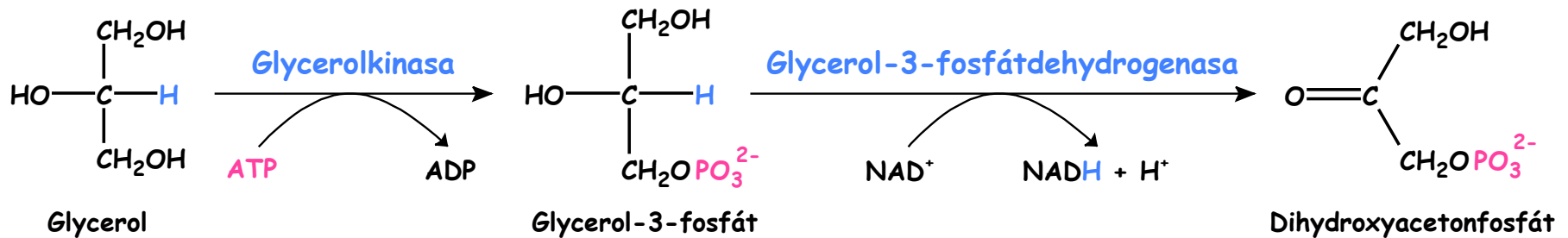
Typické pro intenzivně pracující sval.

Enzym je cytosolární glycerol-3-fosfátdehydrogenasa. Akceptorem elektronů FAD.

Elektrony se transportují proti NADH koncentračnímu gradientu.



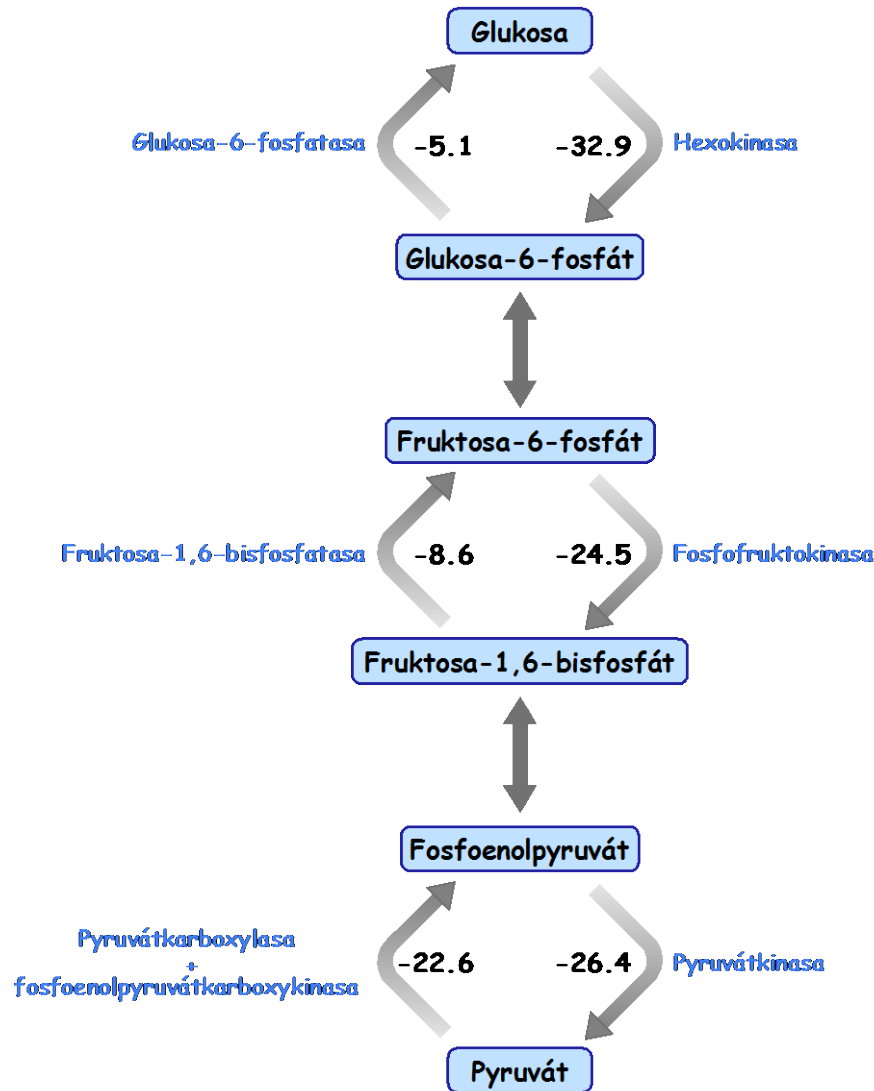
**Cesta glycerolu, který se tvoří hydrolýzou komplexních (zmýdelnitelných) tuků do glykolýzy / glukoneogeneze.**



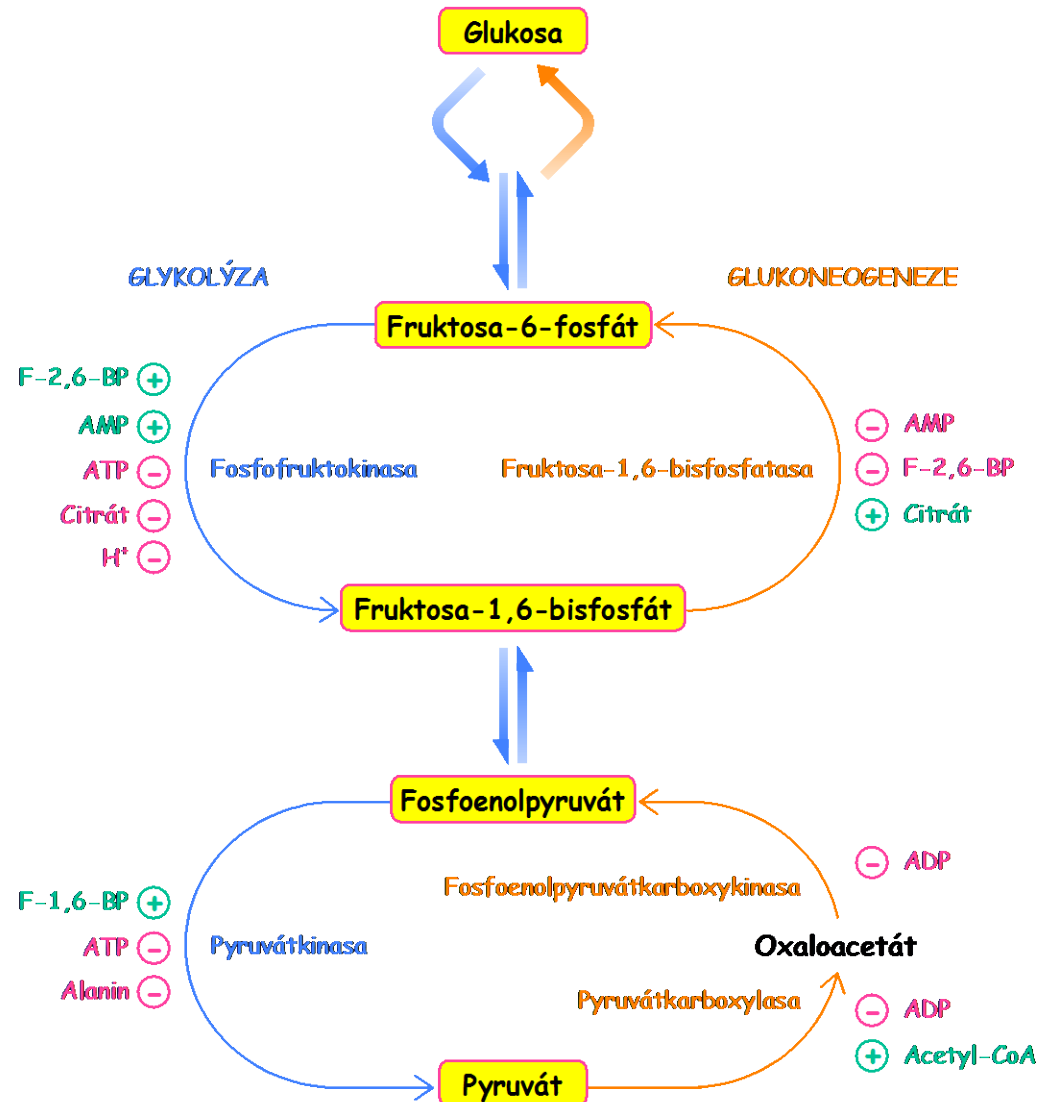
## Reciproká regulace glykolýzy a glukoneogeneze

- Glukoneogeneze a glykolýza jsou dva protichůdné pochody - ideální regulace = jeden pochod aktivní a druhý neaktivní.
- Teoreticky mohou být oba pochody aktivní, protože jsou za podmínek v buňce exergonické.
- Množství a aktivity různých enzymů obou drah jsou pod kontrolou a proto nejsou obě dráhy současně vysoce aktivní. Rychlost glykolýzy je také dána koncentrací glukosy a rychlost glukoneogeneze koncentrací laktátu a dalších prekurzorů glukosy.
- Množství enzymů je kontrolováno hormonálně. Hormony ovlivňují expresi genů a regulují degradaci mRNA.
- **Insulin, signál sytosti, stimuluje expresi fosfofruktokinasy, pyruvátkinasy a bifunkčního enzymu, který vede k tvorbě a degradaci fruktosa-2,6-bisfosfátu.**
- **Glukagon, signál hladovění, inhibuje expresi těchto enzymů a stimuluje tvorbu fosfoenolpyruvátkarboxykinasy a fruktosa-1,6-bisfosfatasy.**
- **Kontrola přes transkripci je pomalá.**

# Tři klíčové kroky glykolýzy a glukoneogeneze s vyznačením změn Gibbsovy energie v $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$



# Reciproká regulace glykolýzy a glukoneogeneze v játrech



# Hormonální regulace glukoneogeneze při hladovění

Nízká hladina glukosy v krvi (hladovění)



Zvýšená sekrece glukagonu



Zvýšená hladina [cAMP]



Zvýšená rychlost fosforylace bifunkčního enzym



- Fosforylace bifunkčního enzymu proteinkinasou A, což má za následek aktivaci FBPasy2 a inhibici PFK2. Snižuje se hladina F-2,6-BP a zpomaluje se glykolýza.



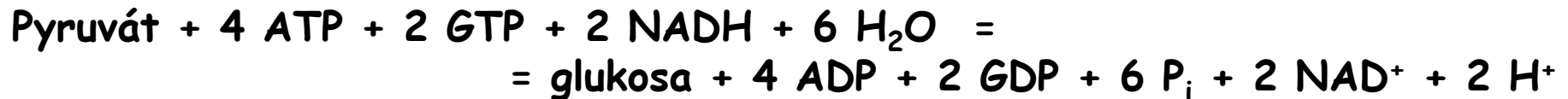
Inhibice fosfofruktokinasy a aktivace fruktosabisfosfatasy



**Zvýšená glukoneogeneze**

# Stechiometrie glukoneogeneze a zvratu glykolýzy

## Glukoneogeneze:



$$\Delta G^{\circ} = - 38 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Na syntézu glukosy je spotřebováno 6 nukleosidtrifosfátů.  
 Energeticky nevýhodnou (endergonní) reakci pohání hydrolýza ATP a GTP.

## Zvrat glykolýzy:



$$\Delta G^{\circ} = + 84 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Při odbourávání glukosy se získají jen 2 ATP.

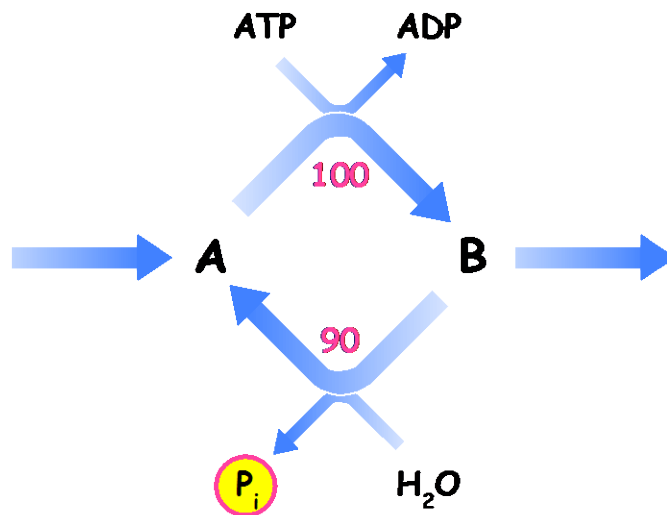
## Substrátové cykly

- Dvojice reakcí jako jsou fosforylace fruktosa-6-fosfátu na fruktosa-1,6-bisfosfát a jeho hydrolýza zpět na fruktosa-6-fosfát se nazývají **SUBSTRÁTOVÉ CYKLY**. Obě nebývají současně plně aktivní. Přesto dochází často současně k oběma reakcím - je to nedokonalost těchto reakcí - cyklují - tyto cykly se také nazývají **JALOVÉ (futile cycles)**. Jsou biologicky zajímavé.
- Jednou z jejich možných funkcí je zesílení metabolických signálů.
- Druhou možnou funkcí je produkce tepla hydrolýzou ATP. Příkladem je čmelák, který může za potravou již při 10° C. Je schopen dosáhnout potřebnou teplotu v hrudi současnou vysokou aktivitou fosfofruktokinasy a fruktosa-1,6-bisfosfatasy. Hydrolýza ATP vytváří teplo. Tato bisfosfatasa není inhibována AMP !! To znamená, že enzym je určen k produkci tepla. Včela, která nemá v létacích svalech bisfosfatasa, nemůže při nízkých teplotách létat.
- U lidí existuje onemocnění maligní hypertermie, kdy dochází ke ztrátě kontroly, oba procesy probíhají současně plně a generují TEPLO.

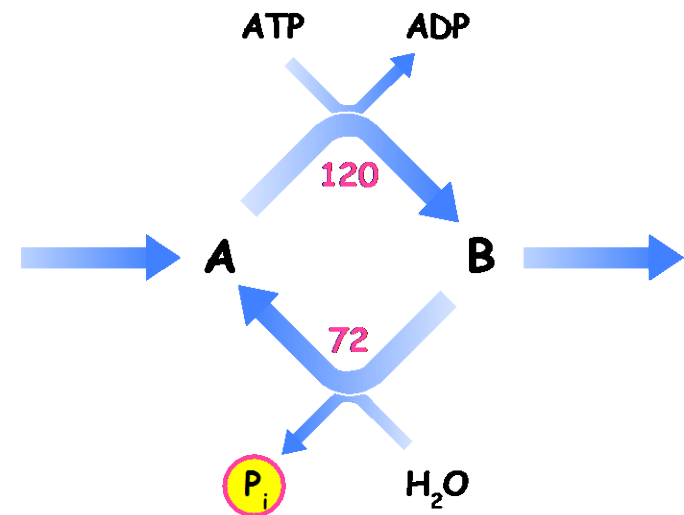


## Substrátové cykly

Cykly poháněné ATP probíhají dvěma různými rychlostmi. Malá změna v rychlostech opačných reakcí vede k velké výsledné změně rychlosti.

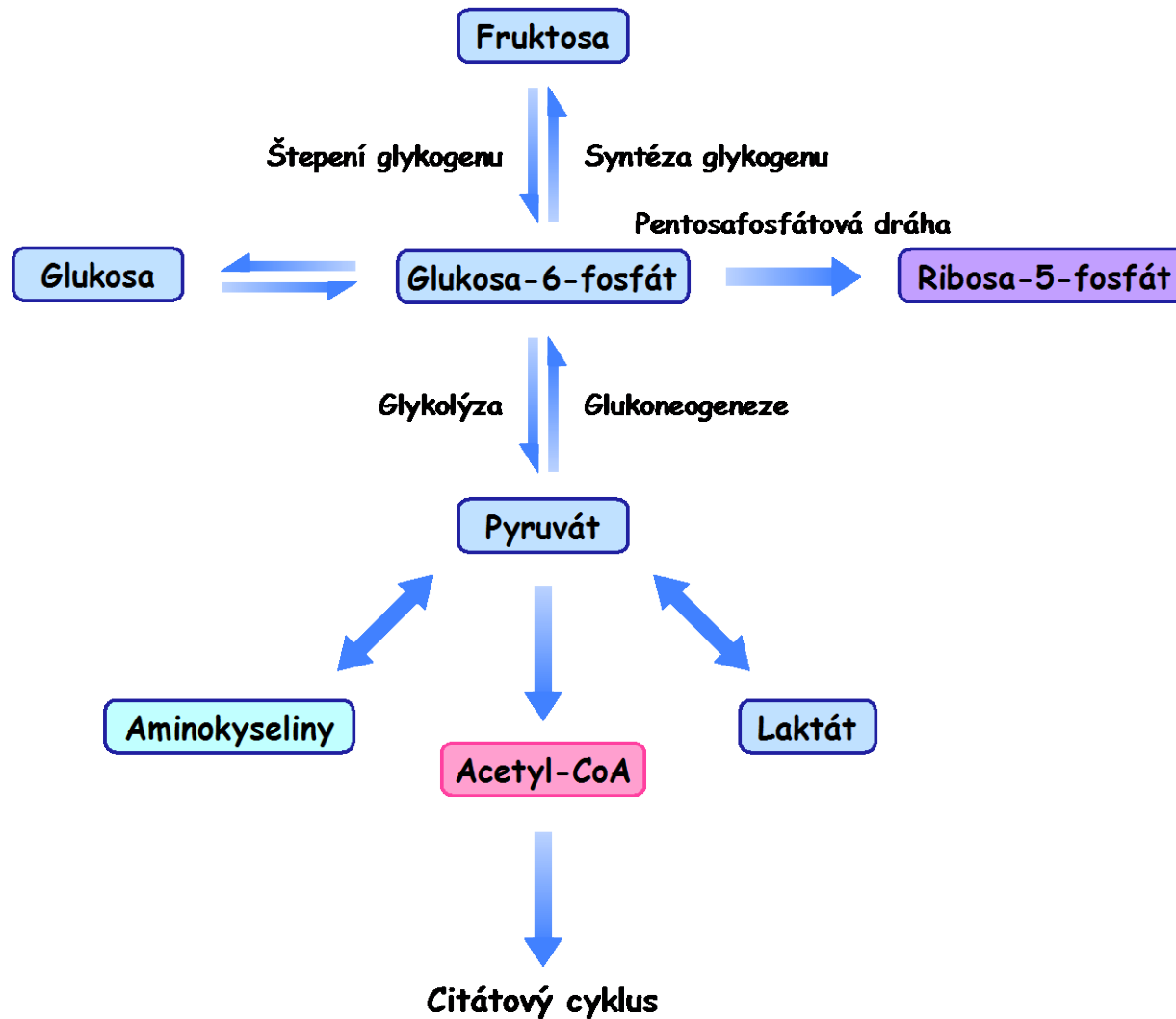


Výsledná rychlost tvorby B = 10



Výsledná rychlost tvorby B = 48

# Přehled možných drah glukosa-6-fosfátu

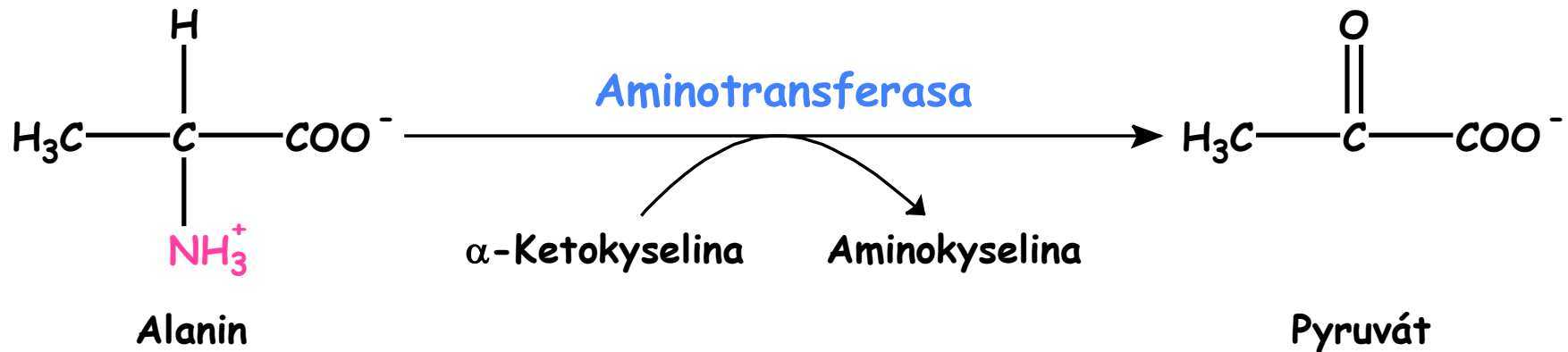


## Coriho cyklus

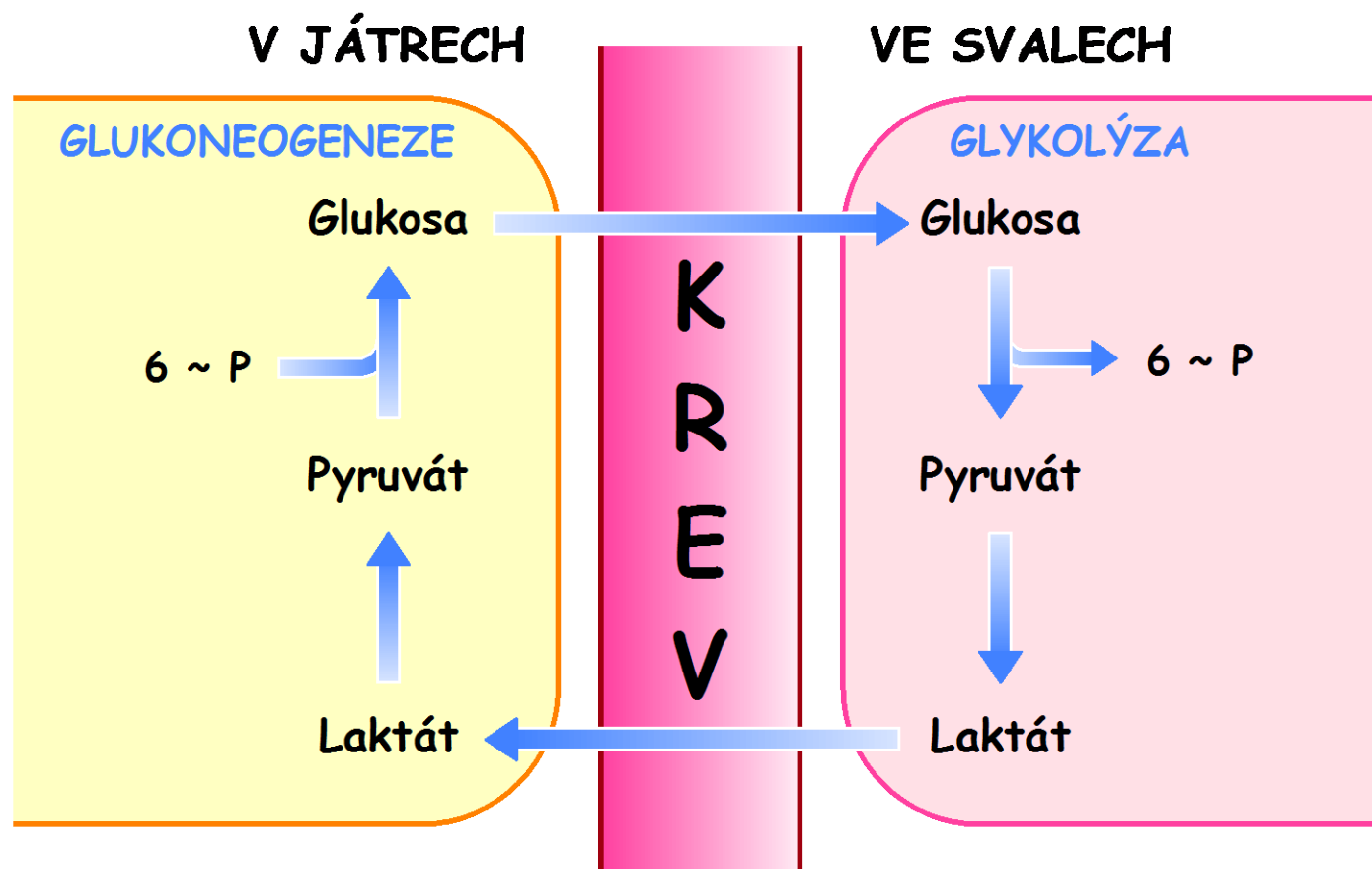
- Laktát a alanin tvořící se v kontraktilním svalstvu jsou zdrojem energie pro jiné orgány.
- Tvořící se pyruvát ve svalech při intenzivním cvičení se nestačí odbourat aerobně a pokračování glykolýzy závisí na dostupnosti  $\text{NAD}^+$ . Tvoří se laktát.
- Laktát je transportován krví do jater a zde je resyntetizována glukoneogenezí glukosa, která putuje do svalů.
- Alanin je druhým zdrojem uhlíku pro syntézu glukosy. Ve svalech je tvořen transaminací z pyruvátu, v játrech probíhá opačný proces. Alanin tak pomáhá udržovat rovnováhu dusíku v organismu.
- Erythrocyty postrádají mitochondrie a proto nemohou oxidovat kompletně glukosu.

# Aminotransferasová reakce alanin - pyruvát

Koenzymem je pyridoxal-5-fosfát (PALP).



# Coriho cyklus



## Isoenzymové formy laktátdehydrogenasy

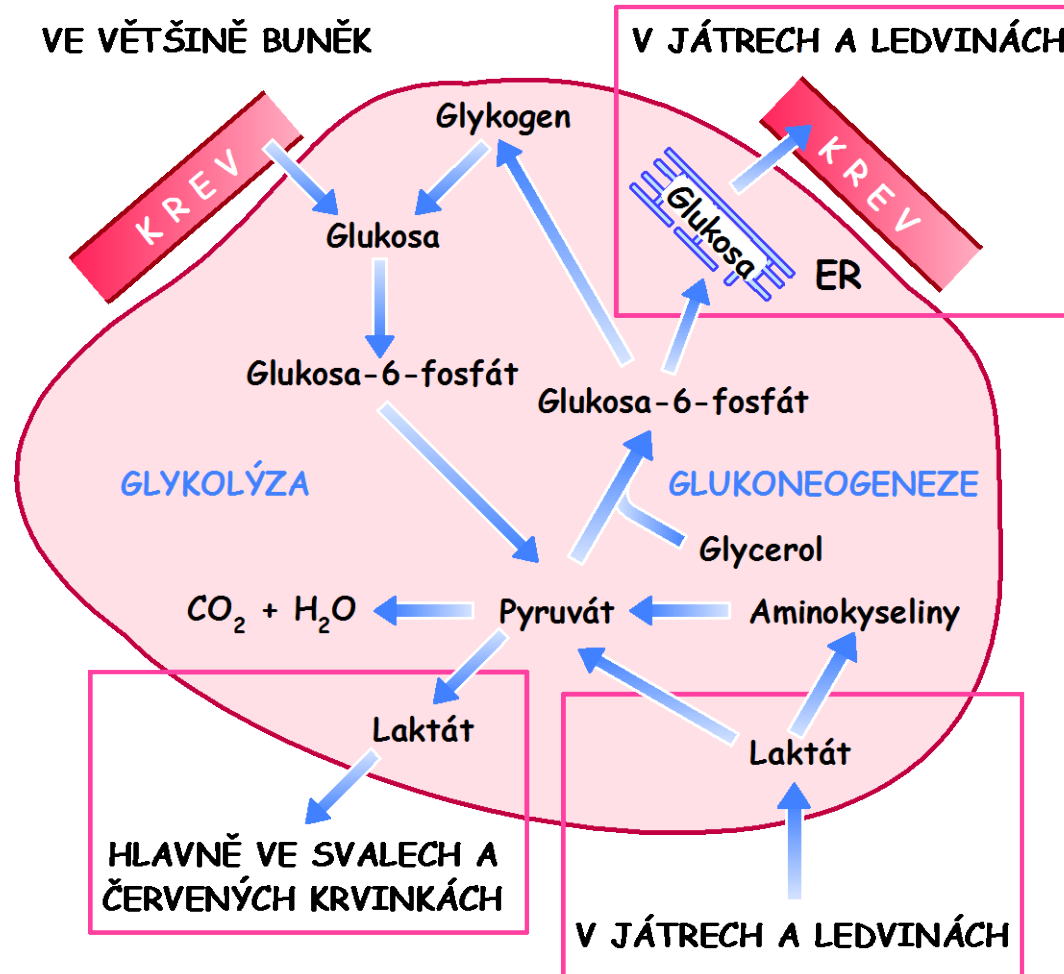
Laktátdehydrogenasa katalyzuje vzájemný převod laktát - pyruvát.

- LDH je tetramer dvou typů 35 kD podjednotek.
- **H (heart)** typ převažuje v srdečním svalu a **M (muscle)** v kontraktilním svalstvu a játrech.
- Podjednotky asociují tak, že vytvářejí pět typů tetramerů:



- $H_4$  isoenzym má vyšší afinitu k substrátu než  $M_4$ , který je allostericky inhibován vysokou hladinou pyruvátu.
- $H_4$  oxiduje laktát na pyruvát, který využívá srdeční sval za aerobních podmínek. Srdeční sval je vždy aerobní!
- $M_4$  funguje opačně - převádí pyruvát na laktát což je v souladu s glykolýzou za anaerobních podmínek. Ostatní isoenzymy mají vlastnosti mezi těmito dvěma krajními.

## Vzájemná interakce glykolýzy a glukoneogeneze na úrovni tělesných orgánů



# Pentosafosfátová dráha



## V pentosafosfátové dráze se tvoří NADPH a syntetizují se pentosy

- Pentosafosfátová dráha je pro všechny organismy zdrojem NADPH pro reduktivní biosyntézy.
- Pentosafosfátová dráha má dvě fáze:
  - A) Oxidační tvorbu NADPH
  - B) Neoxidační přeměnu sacharidů. Přeměna  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$  a  $C_7$  sacharidů na pentosy (nukleotidy) a přebytku  $C_5$  na meziprodukty glykolýzy.
- Tkáně s aktivní pentosafosfátovou dráhou (cytosol):  
nadledvinky, játra, varlata, adipozní tukové buňky, vaječníky, mléčná žláza a červené krvinky (erythrocyty).
- Základní schéma:  

$$\text{Glukosa-6-fosfát} + 2 \text{ NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ribosa-5-fosfát} + 2 \text{ NADPH} + 2 \text{ H}^+ + \text{CO}_2$$

## Metabolické dráhy s potřebou NADPH:

- **Syntézy:**

  - Mastné kyseliny

  - Cholesterol

  - Neurotransmitery

  - Nukleotidy

- **Detoxifikace:**

  - Redukce oxidovaného glutathionu

  - Cytochrom P450 monooxygenasa

## Biochemické reakce vzájemné přeměny sacharidů.

- 1. **Izomerace** - aldosa / ketosa.  
Např. glukosa / fruktosa.
- 2. **Epimerace** - změna konfigurace na chirálním uhlíku.  
Např. galaktosa / glukosa na C4.
- 3. **Transketolasa** - přenos dvouuhlíkatého štěou z ketosy na aldosu.
- 4. **Transaldolasa** - přenos tříuhlíkatého štěpu z ketosy na aldosu.
- 5. **Aldolasa** - štěpení resp. syntéza na principu aldolové kondenzace.

# Celkové schéma pentosafosfátové dráhy

FÁZE 1  
(oxidativní)

Glukosa-6-fosfát

2 NADP<sup>+</sup>  
2 NADPH + CO<sub>2</sub>

Ribulosa-5-fosfát

Ribosa-5-fosfát (C<sub>5</sub>)

Xylulosa-5-fosfát (C<sub>5</sub>)

GAP (C<sub>3</sub>)

Sedoheptulosa-7-fosfát (C<sub>7</sub>)

Fruktosa-6-fosfát (C<sub>6</sub>)

Erythrosa-4-fosfát (C<sub>4</sub>)

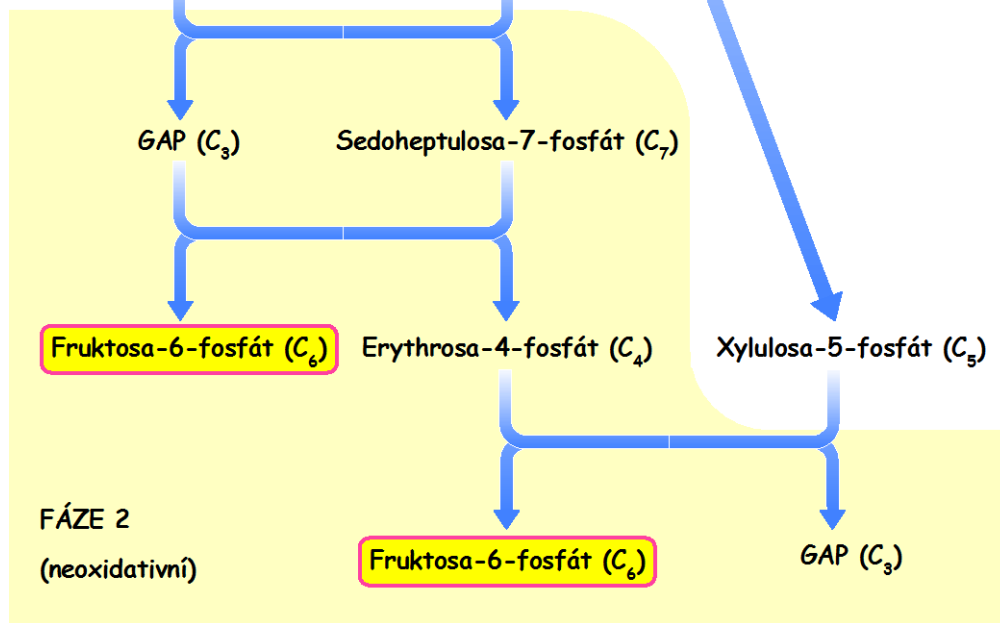
Xylulosa-5-fosfát (C<sub>5</sub>)

FÁZE 2  
(neoxidativní)

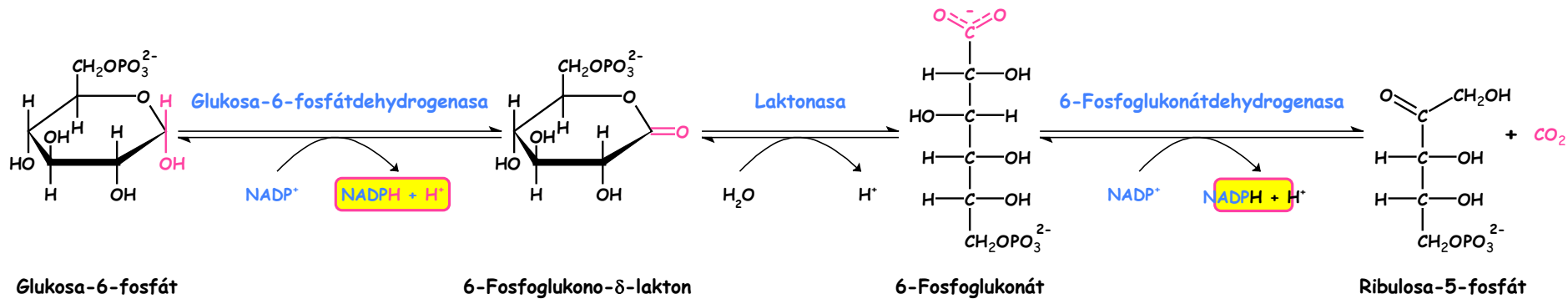
Fruktosa-6-fosfát (C<sub>6</sub>)

GAP (C<sub>3</sub>)

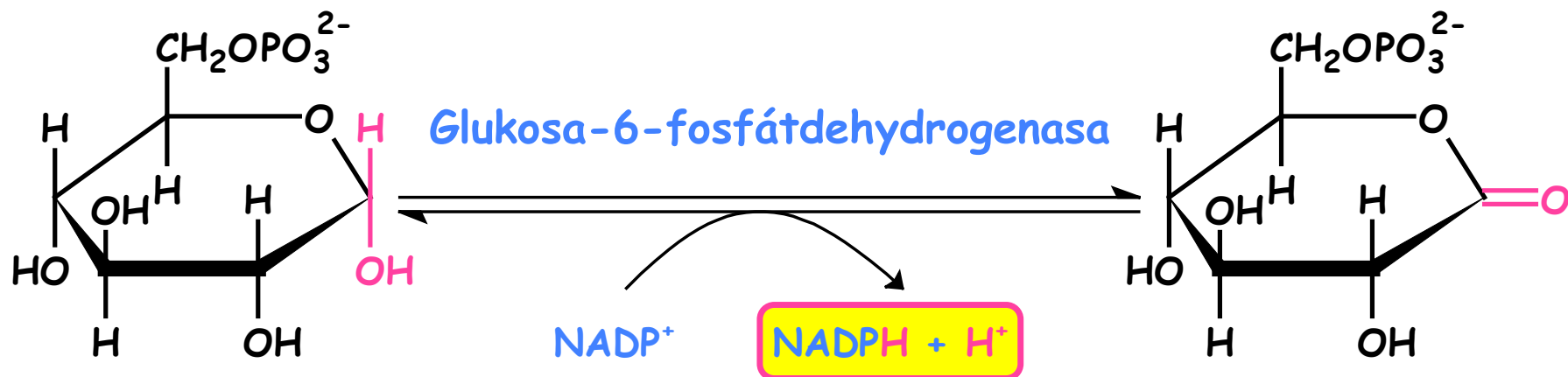
Ribulosa-5-fosfát je epimerován fosfopentosaepimerasou na xylulosa-5-fosfát a izomerován na ribosa-5-fosfát.



# Celkové schéma oxidační fáze pentosafosfátové dráhy:



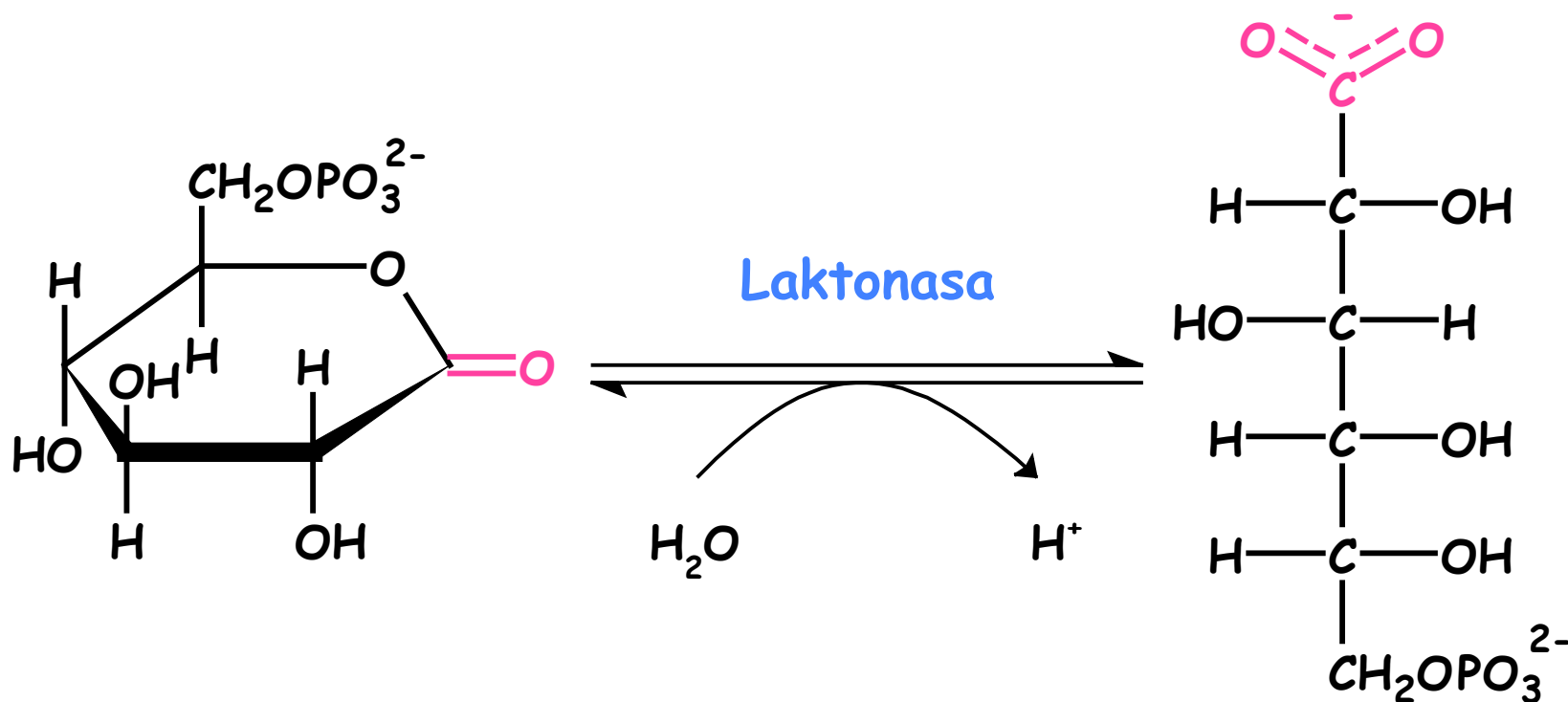
# Reakce katalyzovaná glukosa-6-fosfátdehydrogenasou



Glukosa-6-fosfát

6-Fosfoglukono- $\delta$ -lakton

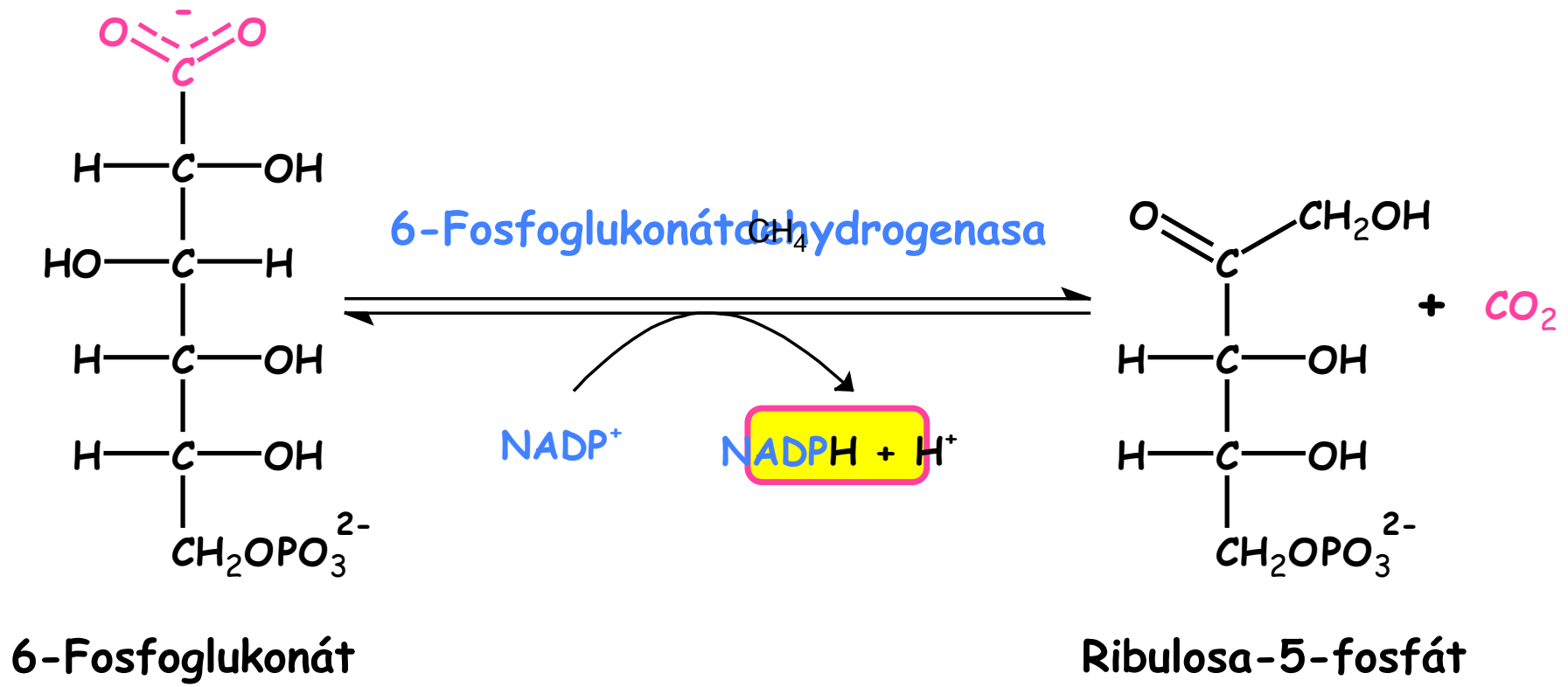
## Reakce katalyzovaná laktonasou



6-Fosfoglukono- $\delta$ -lakton

6-Fosfoglukonát

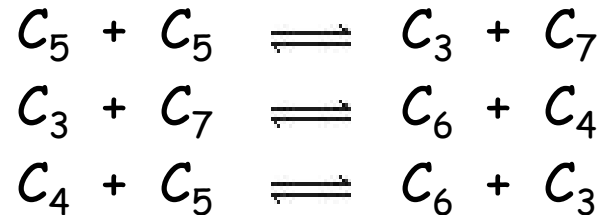
# Druhá oxidace za katalýzy 6-fosfoglukonátdehydrogenasou



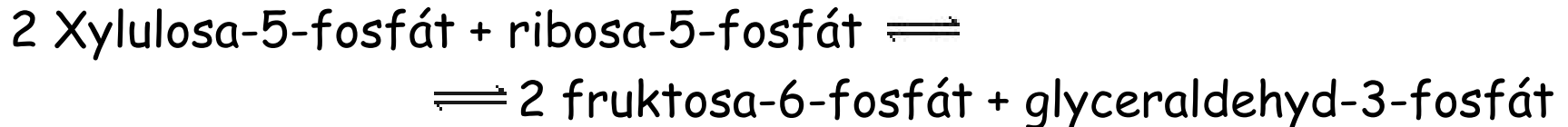
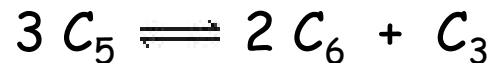


**Propojení pentosafosfátové dráhy s glykolýzou.**  
 Nadbytek pentos je přeměněn na meziprodukty glykolýzy.

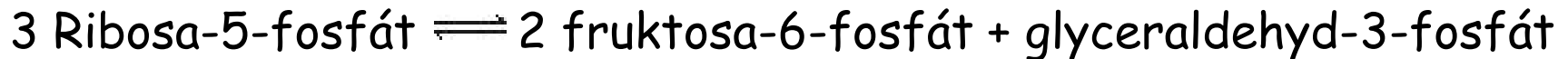
**Schematicky:**



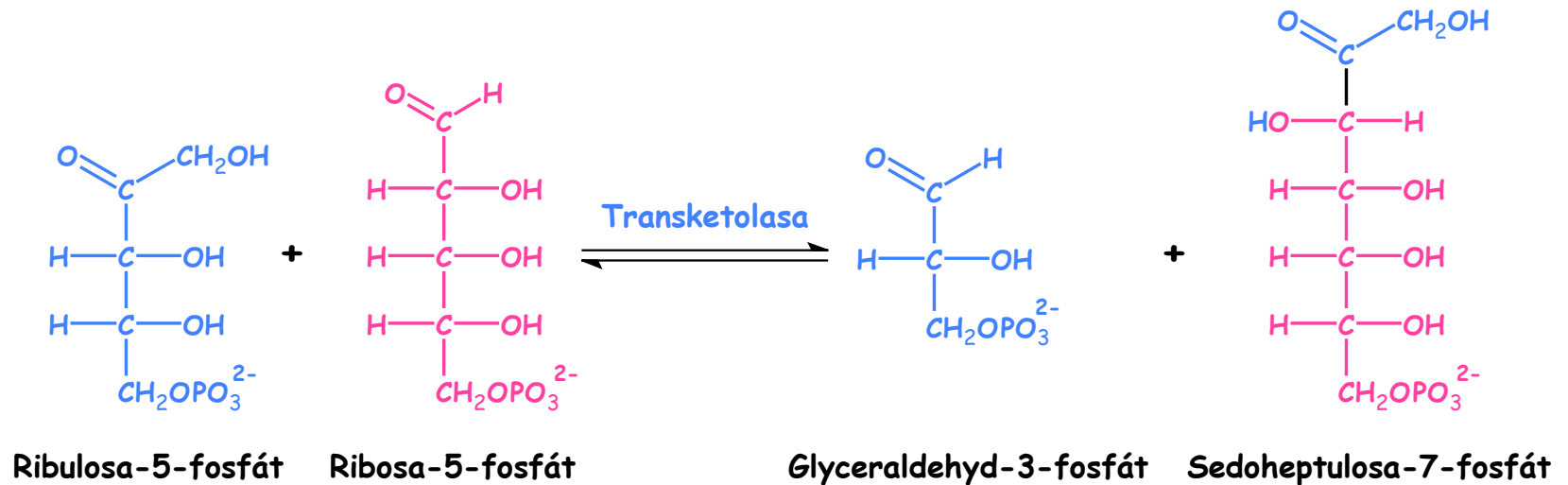
**Výsledná suma reakcí:**



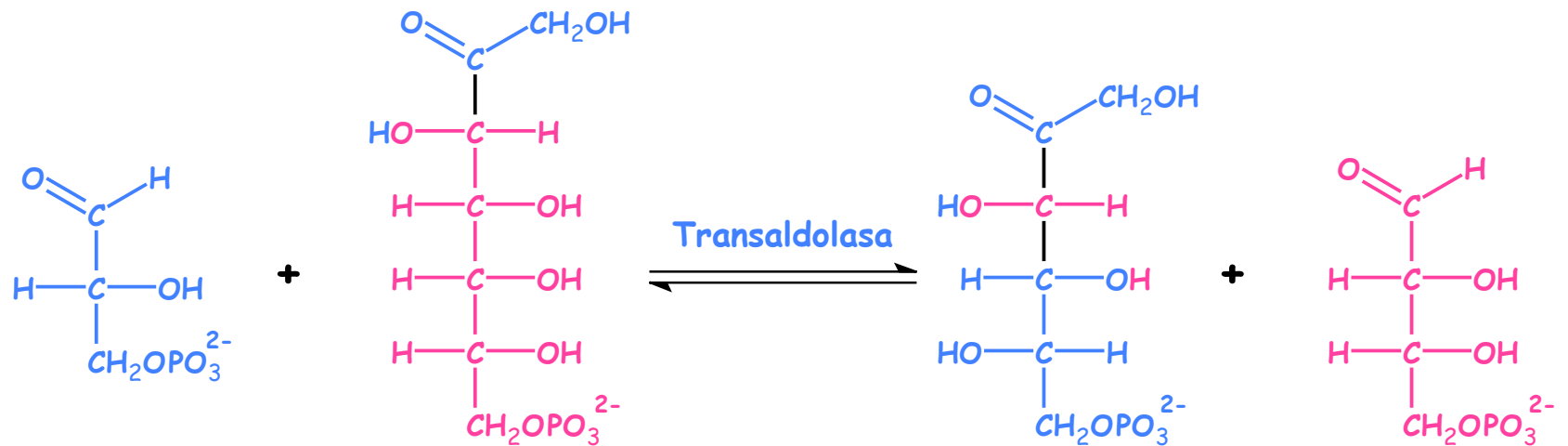
**Analogicky:**



## Neoxidační fáze pentosafosfátové dráhy za účasti transketolasy



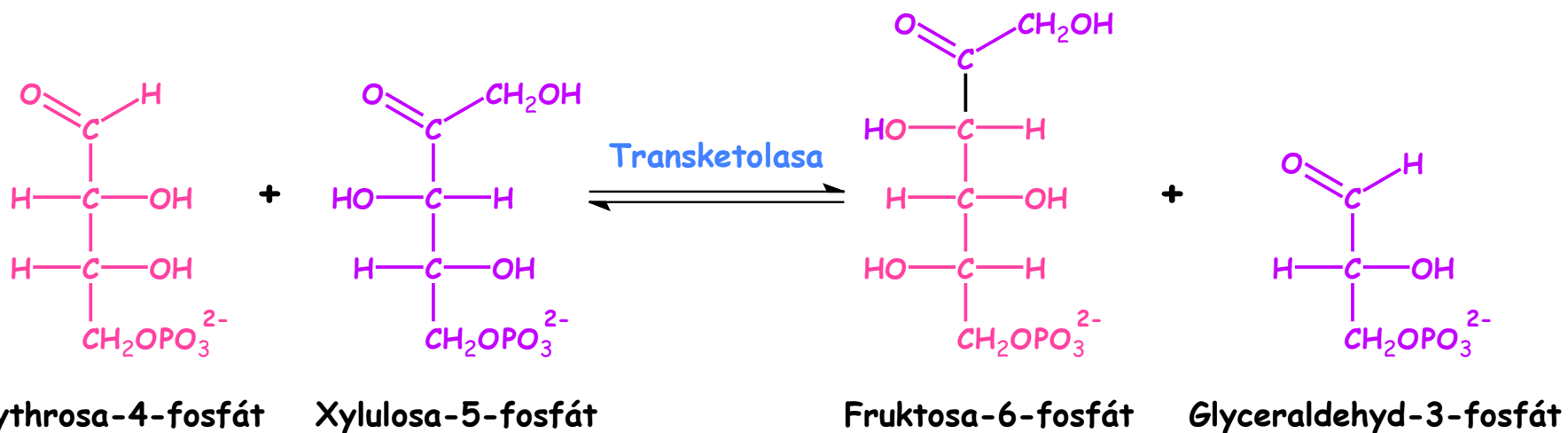
## Neoxidační fáze pentosafosfátové dráhy za účasti transaldolasy



Glyceraldehyd-3-fosfát   Sedoheptulosa-7-fosfát

Fruktosa-6-fosfát   Erythrosa-4-fosfát

## Neoxidační fáze pentosafosfátové dráhy - transketolasa.

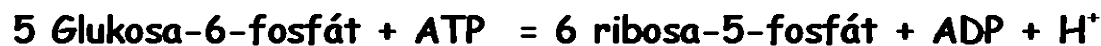
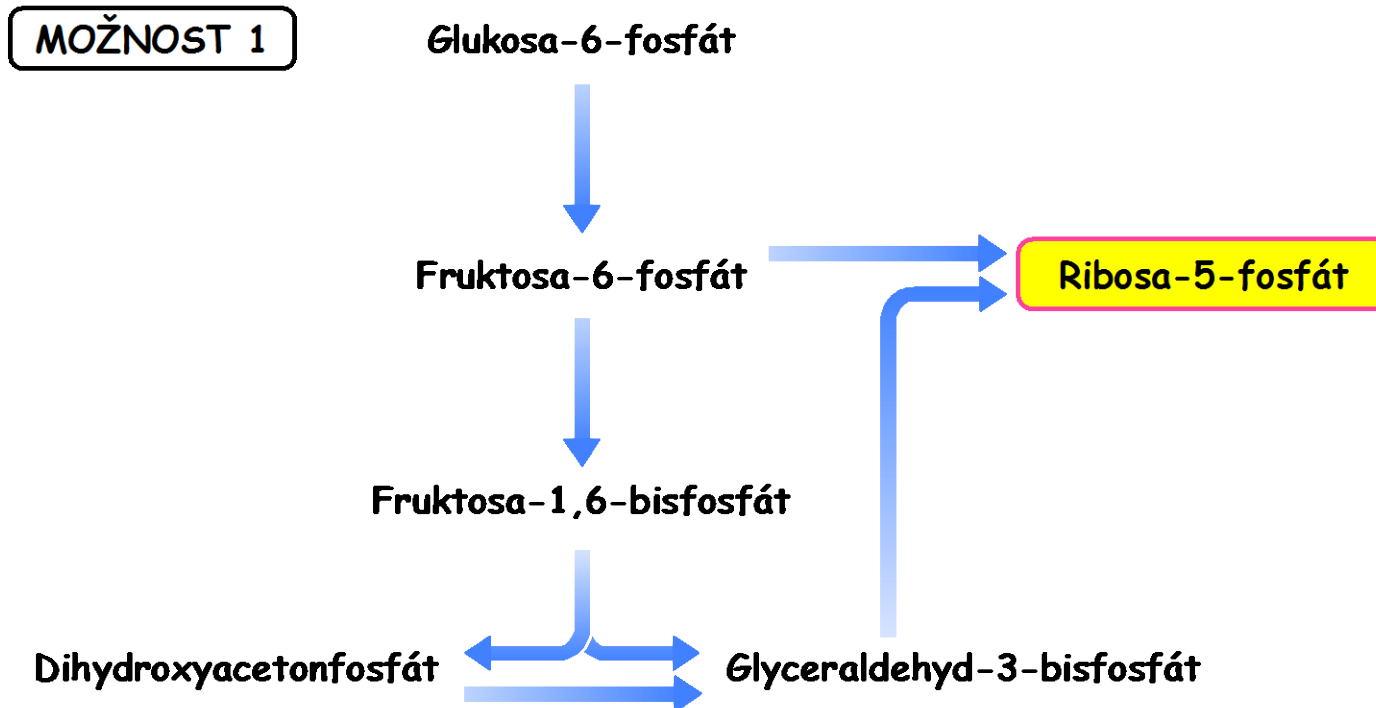


**Glukosa-6-fosfát je spotřebována jak glykolýzou, tak pentosa-fosfátovou drahou. Klíčovou roli v regulaci obou procesů hraje hladina  $\text{NADP}^+$  v cytoplasmě.**

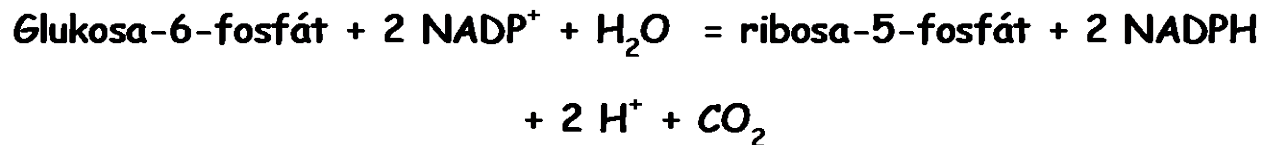
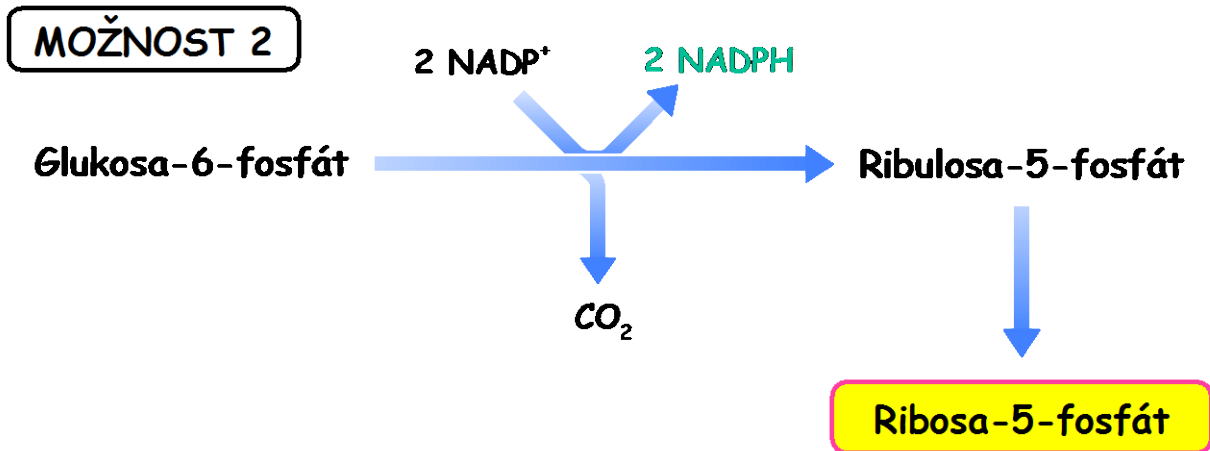
- Dehydrogenace glukosa-6-fosfátu je ireversibilní proces. Nutná přítomnost  $\text{NADP}^+$  jako příjemce elektronů.
- Z toho důvodu vyvolávají **nízké hladiny  $\text{NADP}^+$  inhibiční efekt** dehydrogenace. Efekt je prohlubován skutečností, že  $\text{NADPH}$  kompetuje s  $\text{NADP}^+$  o aktivní místo enzymu.
- Poměr  $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$  v jaterním cytosolu dobře živených krys je 0,014, několika řádů nižší než poměr  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  za stejných podmínek je 700.
- $\text{NADPH}$  musí být bezprostředně spotřebován k syntézám.
- **Neoxidační fáze pentosafosfátové dráhy je regulována dostupností substrátů.**

Vstup glukosa-6-fosfátu do pentosafosfátové dráhy závisí na potřebě NADPH, ribosa-5-fosfátu a ATP.

**Možnost 1 - je třeba mnohem více ribosa-5-fosfátu než NADPH.**

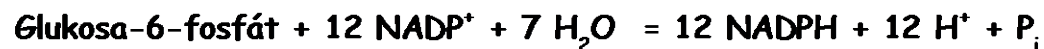
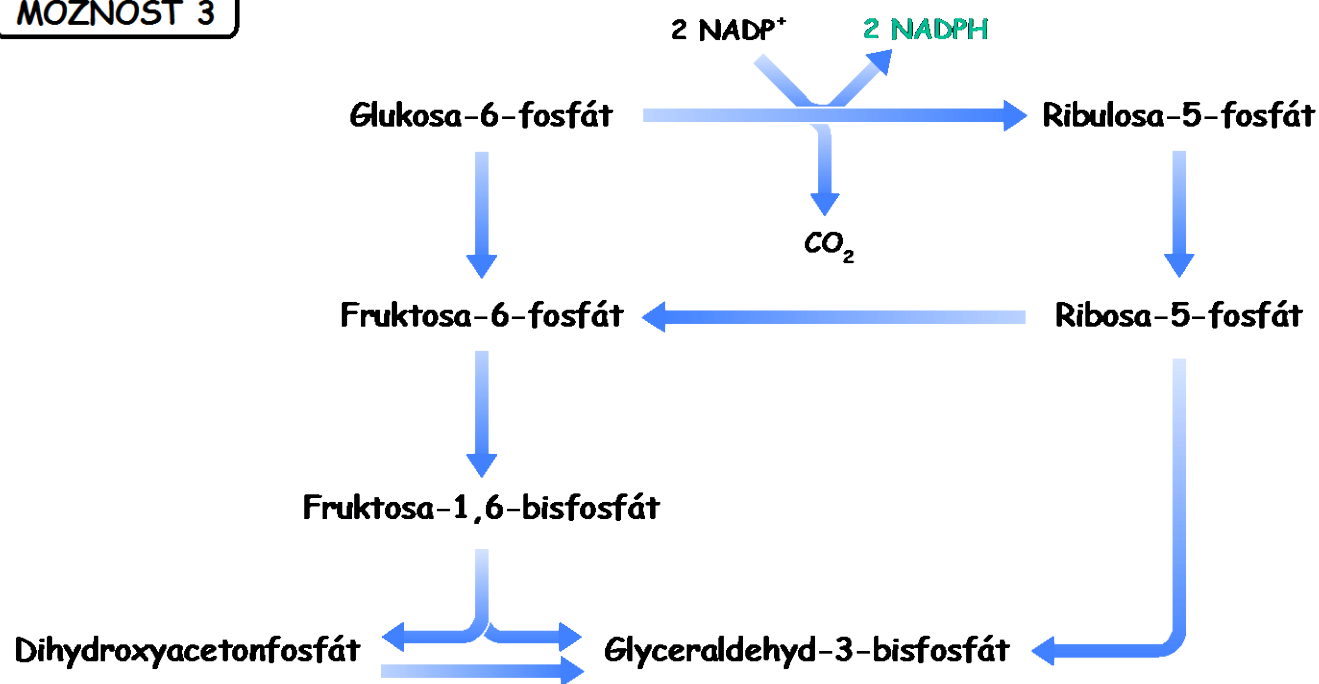


## Potřeba NADPH a ribosa-5-fosfátu je vyvážená



Potřeba NADPH je mnohem vyšší než potřeba ribosa-5-fosfátu.

MOŽNOST 3



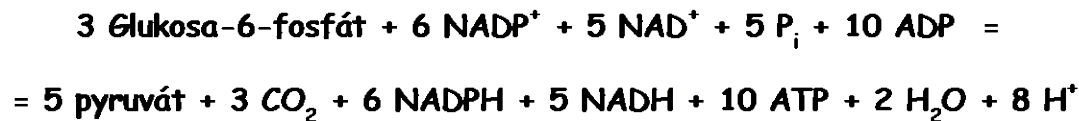
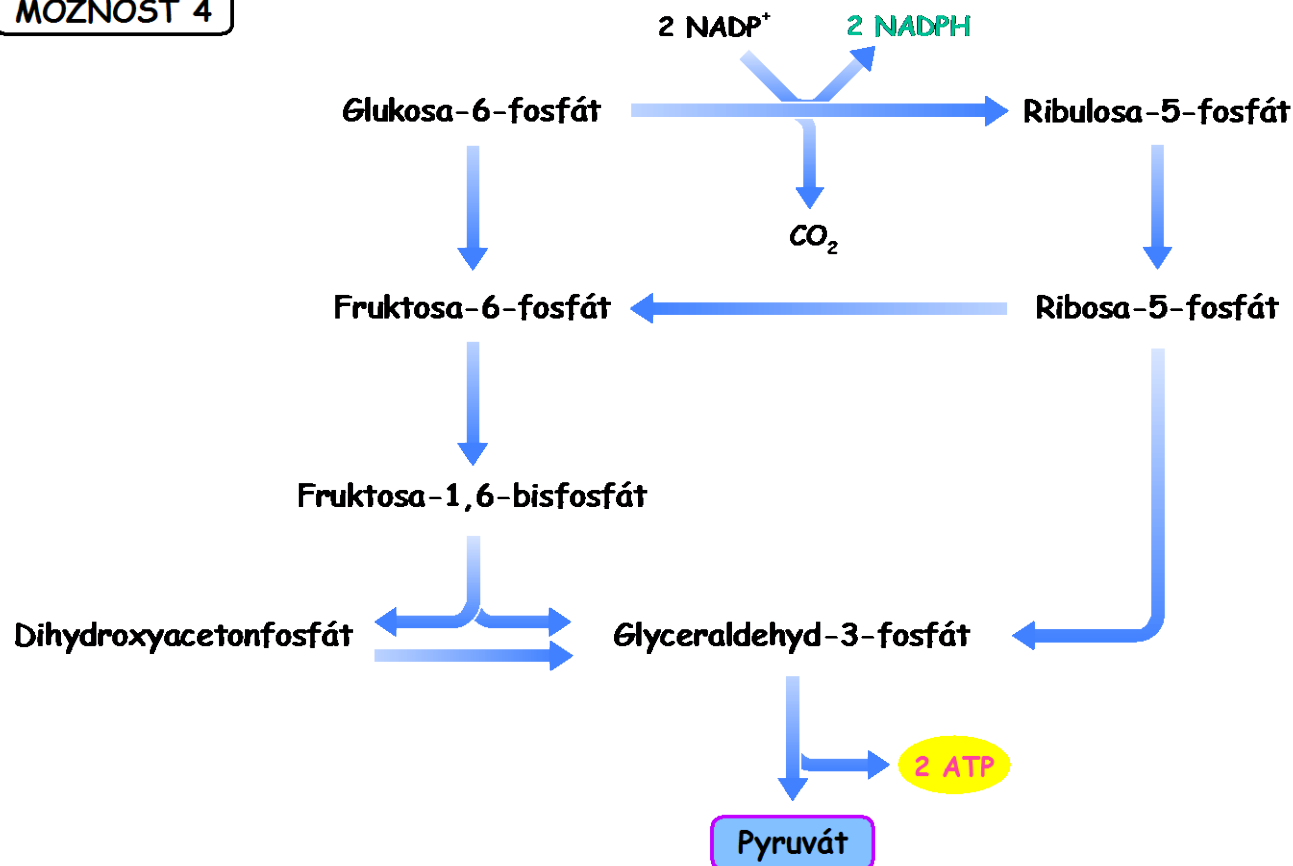


## Možnost 3

- Glukosa-6-fosfát je kompletně oxidována na  $CO_2$ .
- Aktivní jsou tři skupiny reakcí:
- **1.** Oxidativní fáze produkuje dvě molekuly NADPH a jednu molekulu ribosa-5-fosfátu.
- $6 \text{ Glukosa-6-fosfátů} + 12 \text{ NADP}^+ + 6 \text{ H}_2\text{O} = 6 \text{-ribosa-5-fosfátů} + 12 \text{ NADPH} + 12 \text{ H}^+ + 6 \text{ CO}_2$
- **2.** Ribosa-5-fosfát je převedena na fruktosa-6-fosfát a glycerinaldehyd-3-fosfát transketolasou a transaldolasou.
- $6 \text{ Ribosa-5-fosfátů} = 4 \text{ fruktosa-6-fosfáty} + 2 \text{ GAP}$
- **3.** Glukosa-6-fosfát je resyntetizována z fruktosa-6-fosfátu a glycerinaldehyd-3-fosfátu glukoneogenezí.
- $4 \text{ Fruktosa-6-fosfáty} + 2 \text{ GAP} + \text{H}_2\text{O} = 5 \text{ G-6-P} + \text{H}^+$

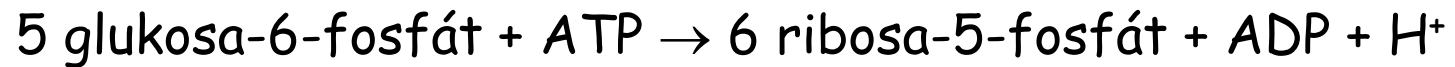
## Potřeba NADPH a ATP je vyrovnaná

MOŽNOST 4

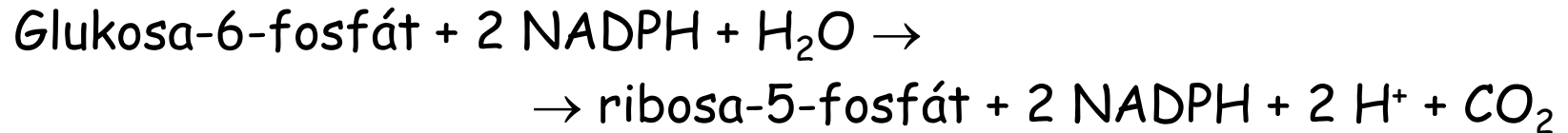


## Stechiometrie možností 1 a 2

- **Možnost 1 :**

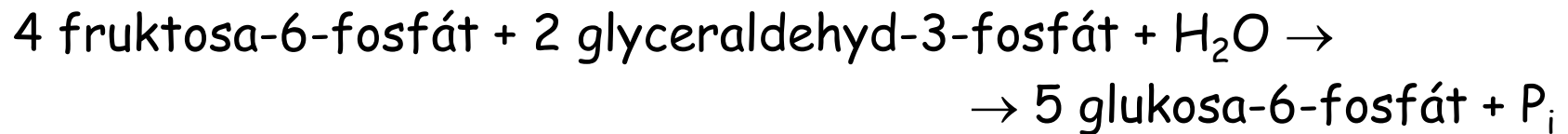
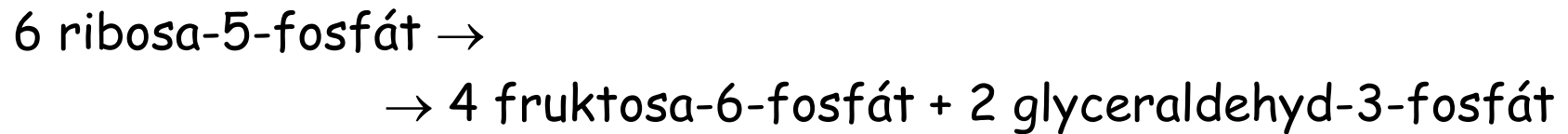
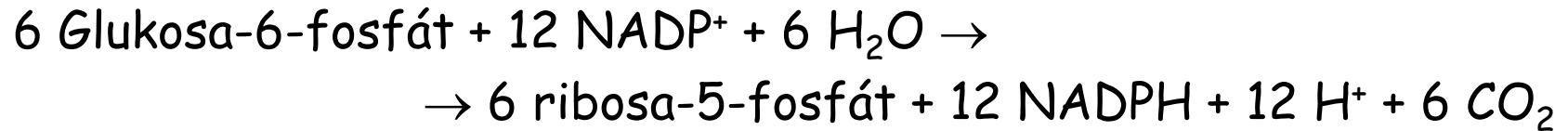


- **Možnost 2 :**

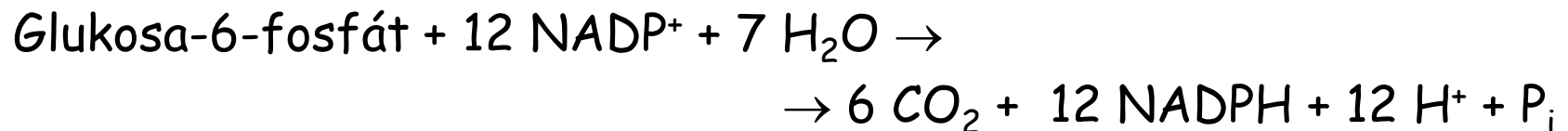


## Rovnice možnosti 3.

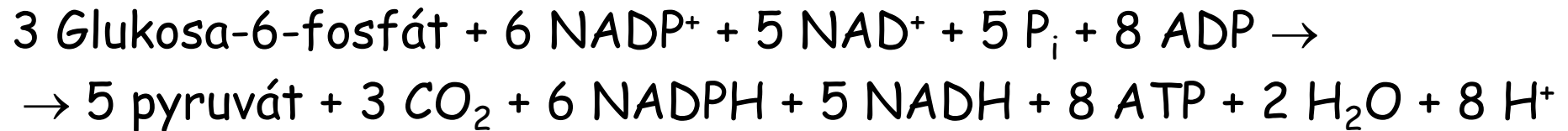
- **Možnost 3 :**



- **Suma tří reakcí:**



## Rovnice možnosti 4.



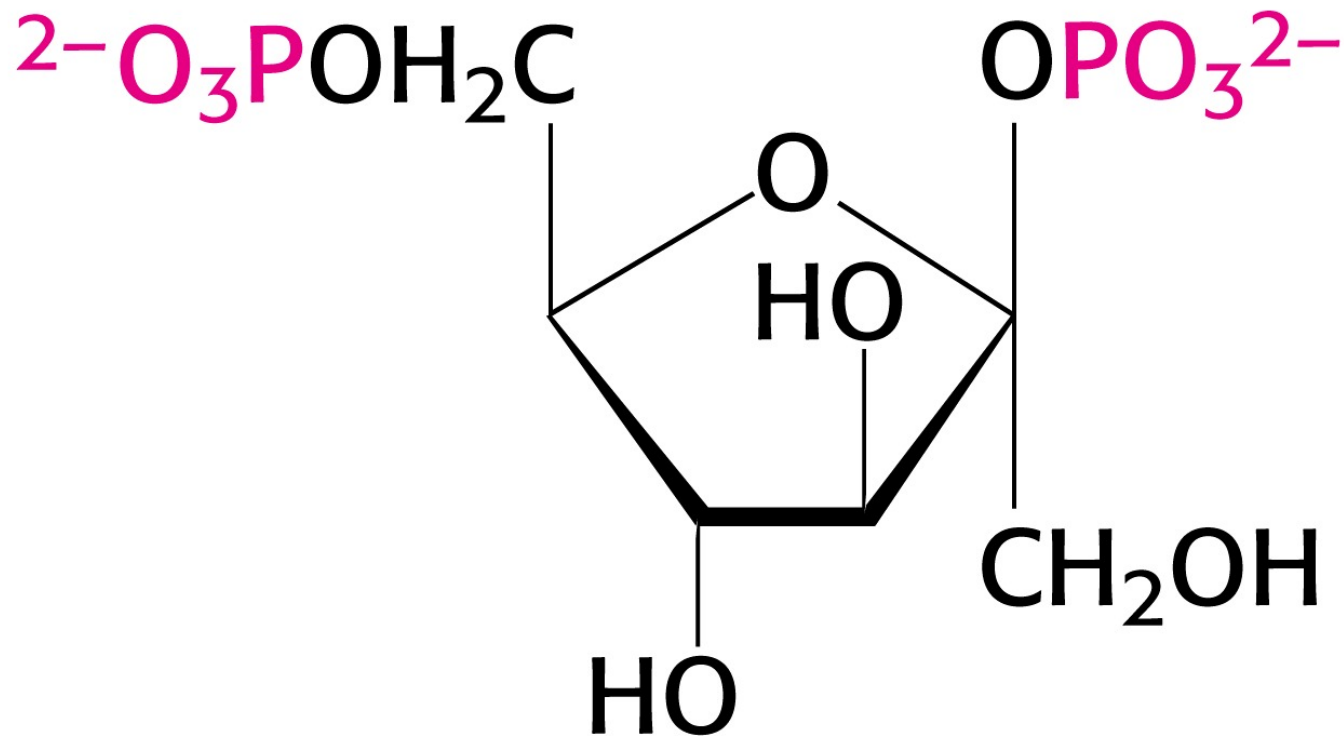
## K mechanismu transketolasy a transaldolasy

- Při transketolasové reakci je dvojuhlíkatý štěp vázán na koenzym, kterým je thiaminpyrofosfát (TPP).
- Transketolasa je homologní s enzymem  $E_1$  pyruvátdehydrogenasového komplexu. Na aldosu se přenáší aktivovaný glykolaldehyd.
- Transaldolasa přenáší tříuhlíkatý dihydroxyaceton a na rozdíl od transketolasy, nemá prosthetickou skupinu. Zde se vytváří Schiffova báze mezi karbonylem ketosy (substrát) a  $\epsilon$ -aminoskupinou Lys v aktivním místě enzymu. Tříuhlíkatý štěp vázaný na Lys je přenesen na aldosu.
- Je to analogie mechanismu aldolasy, enzymy jsou homologní.

## Rovnováha mezi glykolýzou a glukoneogenezí v játrech - vliv hladiny glukosy v krvi.

- Hlavním regulátorem glykolýzy a glukoneogeneze v játrech je fruktosa-2,6-bisfosfát.
- **Fruktosa-2,6-bisfosfát aktivuje fosfofruktokinasu a inhibuje fruktosa 2,6-bisfosfatasu !!!**
- Proč ??
- **Při nízké hladině glukosy v krvi se z fruktosa-2,6-bisfosfátu uvolňuje fosfát za tvorby fruktosa-6-fosfátu.**
- **Fruktosa-6-fosfát se neváže jako aktivátor fosfofruktokinasu fosfofruktokinasu (váže se jen do akt. místa).**
- Jakým způsobem je kontrolována koncentrace fruktosa-2,6-bisfosfátu ???
- Na kontrole hladiny fruktosa-2,6-bisfosfátu se podílejí dva enzymy.

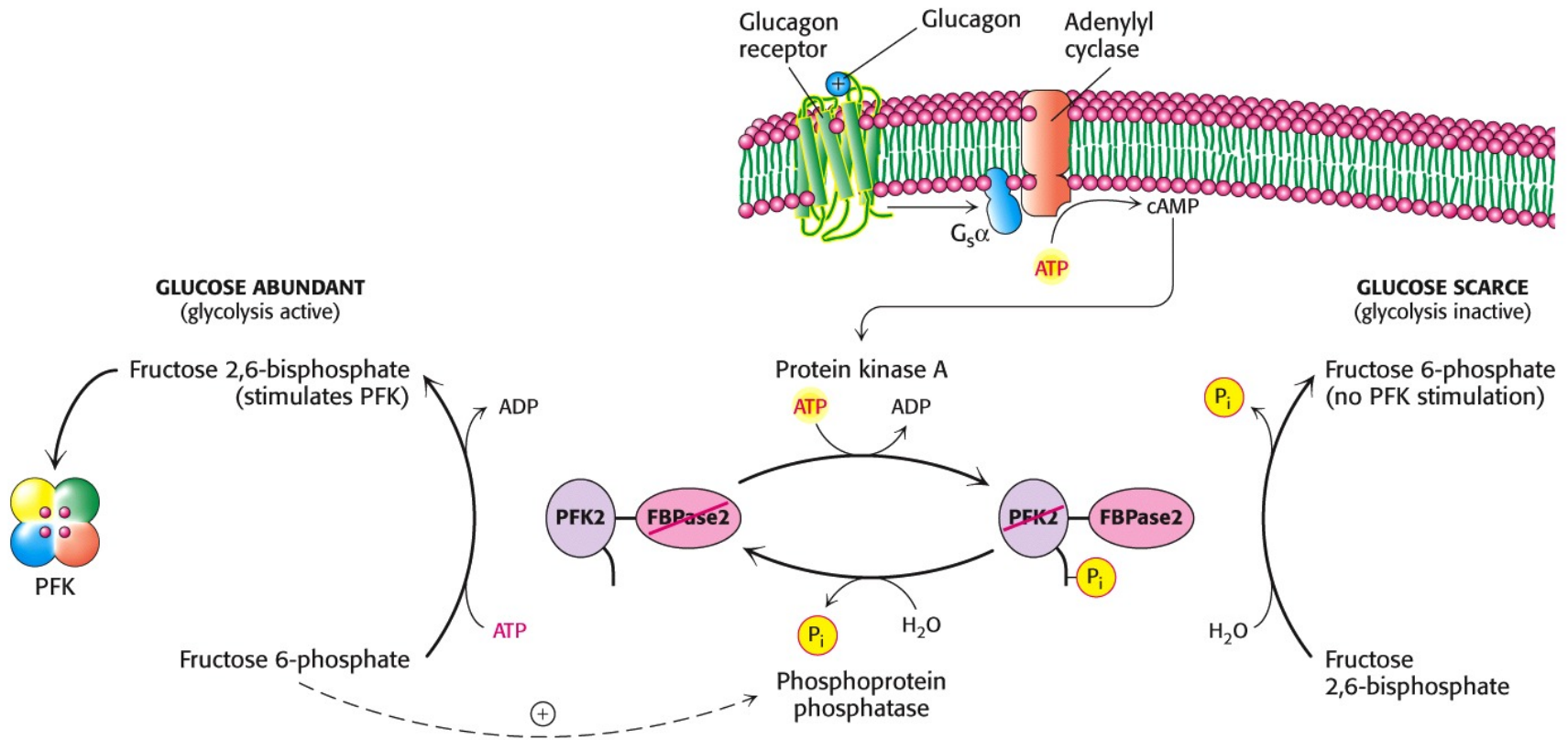
Fruktosa-2,6-bisfosfát.



**Fructose 2,6-bisphosphate  
(F-2,6-BP)**



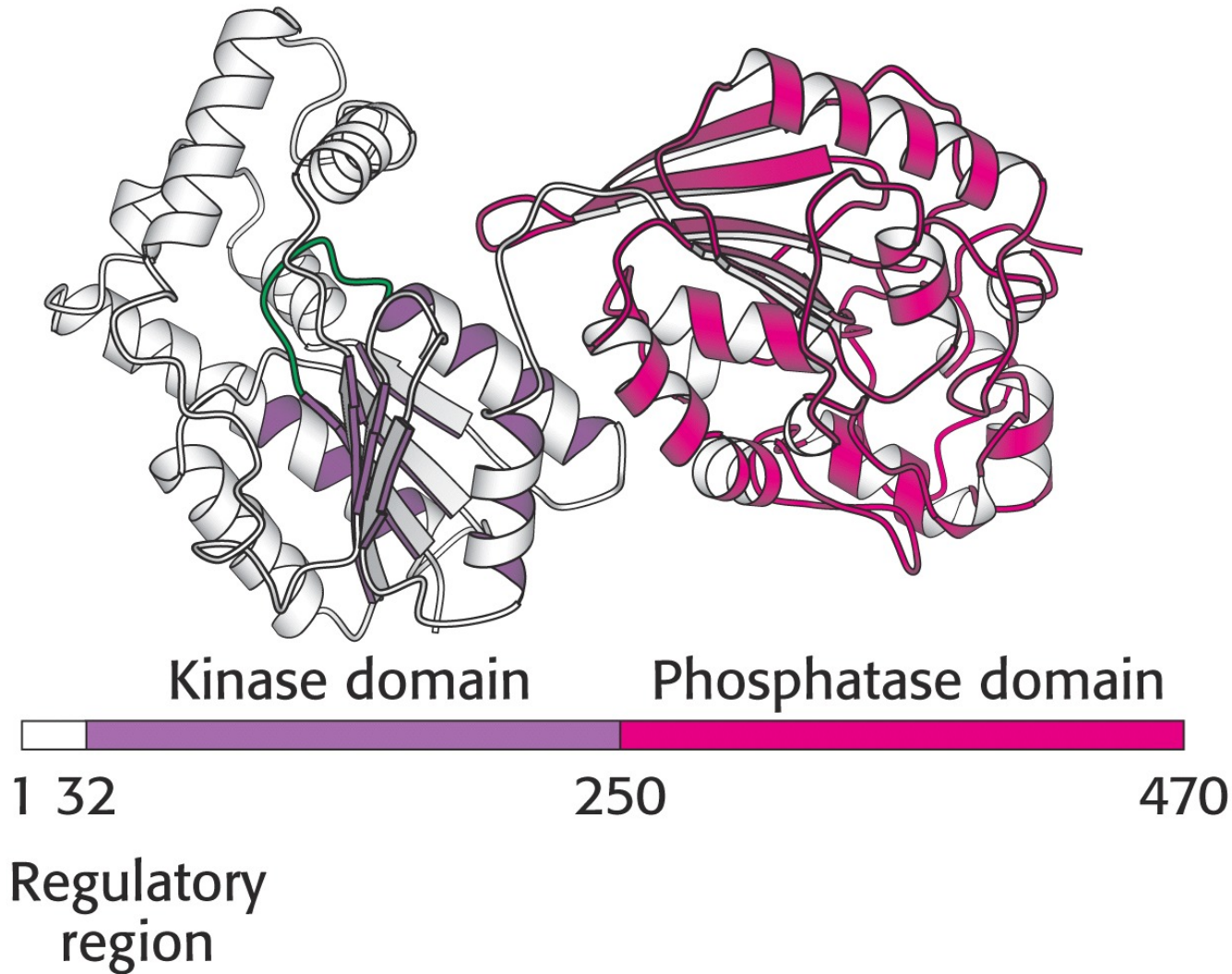
# Kontrolní mechanismus syntézy a odbourání fruktosa-2,6-bisfosfátu.



## Rovnováha mezi glykolýzou a glukoneogenezí v játrech - vliv hladiny glukosy v krvi.

- Fruktosa-2,6-bisfosfát je produktem reakce katalyzované **fosfofruktokinásou 2** (PFK2).
- Odštěpení fosfátu je katalyzované enzymem **fruktosabisfosfatasa2** (FBPasa2)
- Oba enzymy jsou součástí jednoho proteinového řetězce o délce 55 kD - **bifunkční enzym !!!**
- Co kontroluje zda bude aktivní PFK2 nebo FBPasa2 ?
- **Za situace hladovění:** Při nízké hladině glukosy je vylučován slinivkou hormon glukagon, který spouští uvnitř buněk cAMP kaskádu vedoucí k fosforylaci bifunkčního enzymu
- proteinkinásou A. Tato kovalentní modifikace aktivuje FBPasu2 a inhibuje PFK2.
- **Převládá glukoneogeneze.**
- Glukagon také aktivuje pyruvátkinasu v játrech.
- **V opačném případě,** při dostatku glukosy, je fosfát odštěpen, aktivuje se PFK2 a inhibuje FBAsa2. **Urychluje se glykolýza!!!**
-

# Bifunkční enzym fosfofruktokinasa-fosfofruktobisfosfataza.



## Pyruvátkinasa.

- Pyruvátkinasa je tetramer (57 kD podjednotka). Existuje řada izoenzymových forem kódovaných různými geny.
- L typ převažuje v játrech a M ve svalech a mozku.
- Jaterní enzym podléhá na rozdíl od svalového allosterické regulaci.
- **Katalytická aktivita L formy je kontrolována reversibilní fosforylací. Aktivita M formy ne.**
- Při nízké hladině glukosy funguje glukagon. Spouští se cAMP kaskáda - dochází k fosforylaci pyruvátkinasy a tím ke snížení její aktivity. Tato hormonální regulace zabraňuje spotřebě glukosy játry !!! Glukosa je nutně potřebná k činnosti mozku a svalstva.

# Kontrolní systém katalytické aktivity pyruvátkinasy. Regulace allosterickou kontrolou aktivátory, inhibitory a kovalentní modifikací.

