

## Rozdział 4

### ***Węglowodany i ich metabolizm***

*Andrzej Dżugaj*

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, ul. Przybyszewskiego 63/77,  
51-148 Wrocław, email dzugajan@biol.uni.wroc.pl

*Wprowadzenie + Struktura i właściwości cukrów + Odkrycie glikolizy + Reakcje glikolizy + Metabolizm glikogenu + Glukoneogeneza + Cykl pentozo-fosforanowy + Glikoneogeneza – nowy szlak metaboliczny + Rola cukrów w rozpoznawaniu komórek i przekazywaniu informacji + Uwagi końcowe*

#### ***Wprowadzenie***

Węglowodany to inna nazwa cukrów i obu tych nazw używa się zamiennie. Rola węglowodanów w codziennym pożywieniu jest powszechnie znana, chleba i igrzysk domagali się starożytni Rzymianie, a chrześcijanie do dnia dzisiejszego modlą się o chleb powszedni. O tym, że węglowodany są ważnym źródłem energii wiedziano od dawna, natomiast o tym jak złożoną rolę pełnią cukry w funkcjonowaniu żywych organizmów wiemy dopiero obecnie, dzięki wieloletnim badaniom licznych laboratoriów na całym świecie. Wiemy także, że ssaki i ptaki są wrażliwe zarówno na zbyt wysokie jak i zbyt niskie stężenie glukozy. Erytrocyty wyłącznie, a neurony niemal wyłącznie, czerpią swą energię z glikolizy, brak glukozy powoduje ich obumieranie. Zaledwie po trzech minutach braku glukozy zaczynają się nieodwracalne zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym. Natomiast nadmiar glukozy prowadzi do śpiączki cukrzycowej oraz do nieenzymatycznej glikozylacji białek. Dlatego też stężenie glukozy we krwi obwodowej musi być utrzymywane w ściśle określonych granicach. Glukostaza czyli utrzymywanie w miarę stałego stężenia glukozy w płynach ustrojowych wymaga precyzyjnej regulacji metabolizmu węglowodanów. Poznawanie mechanizmów tej regulacji było długotrwałym procesem, który praktycznie trwa

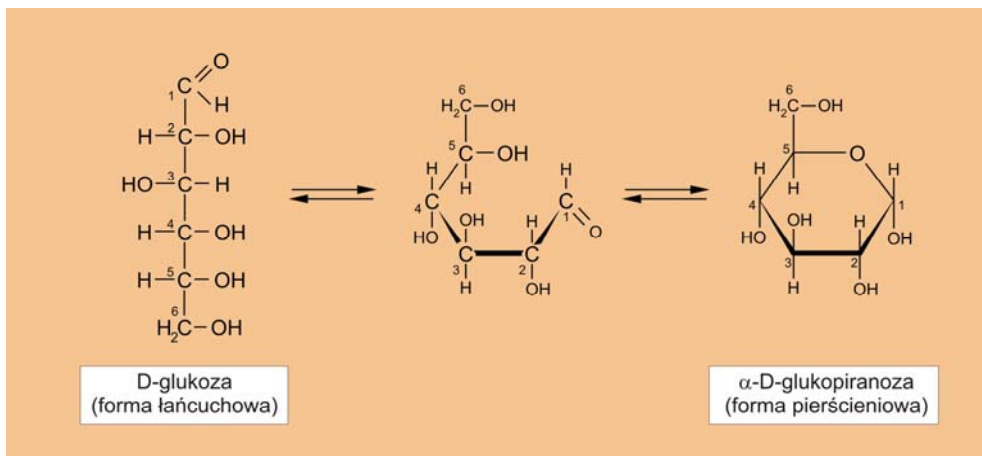
do dziś. Badania wykazały, że w glukostazie uczestniczy ośrodkowy, współczulny i przywspółczulny układ nerwowy, a także gruczoły wewnętrznego wydzielania, takie jak trzustka, kora i rdzeń nadnerczy, wydzielające hormony: insulinę, glukagon, kortyzol, czy adrenalinę. Warto dodać, że w regulacji glukostazy wciąż odkrywany jest udział nowych hormonów, jak np. leptyny i stosunkowo niedawno odkrytej, greliny. W niniejszym artykule zajmiemy się przede wszystkim regulacją metabolizmu węglowodanów za pośrednictwem enzymów. Regulacja glikolizy jest możliwa na trzech poziomach: heksokinazy, fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej.

### ***Struktura i właściwości cukrów***

Węglowodany, czyli cukry, są to aldehydy lub ketony zawierające w swojej cząsteczce grupy OH. Cukry z grupą aldehydową nazywamy aldozami, z grupą ketonową ketozami. W cukrach występuje węgiel asymetryczny, tj. węgiel, przy którym występują cztery różne podstawniki. W przypadku asymetrycznego węgla istnieją zawsze dwie możliwości ułożenia tych podstawników w przestrzeni. Klasycznym przypadkiem jest aldehyd glicerynowy. Istnieją dwie możliwe formy przestrzenne aldehydu glicerynowego, zostały one nazwane izomerami D i L. We wzorze, umieszczając grupę aldehydową u góry kartki, mamy dwie możliwości rozpisania aldehydu glicerynowego, grupę OH przy węglu drugim możemy umieścić po stronie prawej lub lewej. W pierwszym przypadku mamy formę nazwaną D, w drugim formę L.

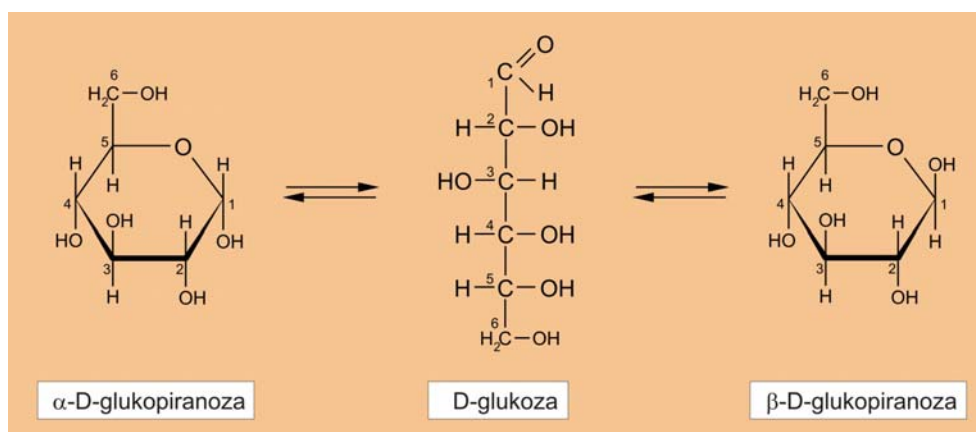
Odnosząc się do powyższego oznaczenia wszystkie cukry przyporządkowano do szeregu D lub L. Za podstawę kwalifikacji uznano najbardziej oddalony od grupy aldehydowej lub ketonowej asymetryczny atom węgla. Jeśli grupa OH jest po stronie prawej cukier należy do szeregu D, jeśli po stronie lewej do szeregu L. Jak łatwo policzyć istnieją cztery aldozy w szeregu D z pięcioma węglami w łańcuchu i osiem aldoz w szeregu D z sześcioma węglami w łańcuchu. Znajomość struktury cukrów zawdzięczamy badaniom Emila Fischera (Fischer, 1902). Z niewieloma wyjątkami, cukry występujące w żywych

organizmach należą do szeregu D. W wielu przypadkach istotna trudność w rozumieniu reakcji chemicznych wynika z zapisywania wzorów na kartce papieru, co sugeruje, że związki chemiczne są płaskie. Według takiego zapisu grupa aldehydowa w aldozie jest oddalona od grupy hydroksylowej znajdującej się przy czwartym lub piątym węglu. W rzeczywistości grupy te znajdują się w bliskim sąsiedztwie grupy aldehydowej. Umożliwia to reakcję pomiędzy grupą aldehydową i hydroksylową, co prowadzi do powstania hemiacetalu.



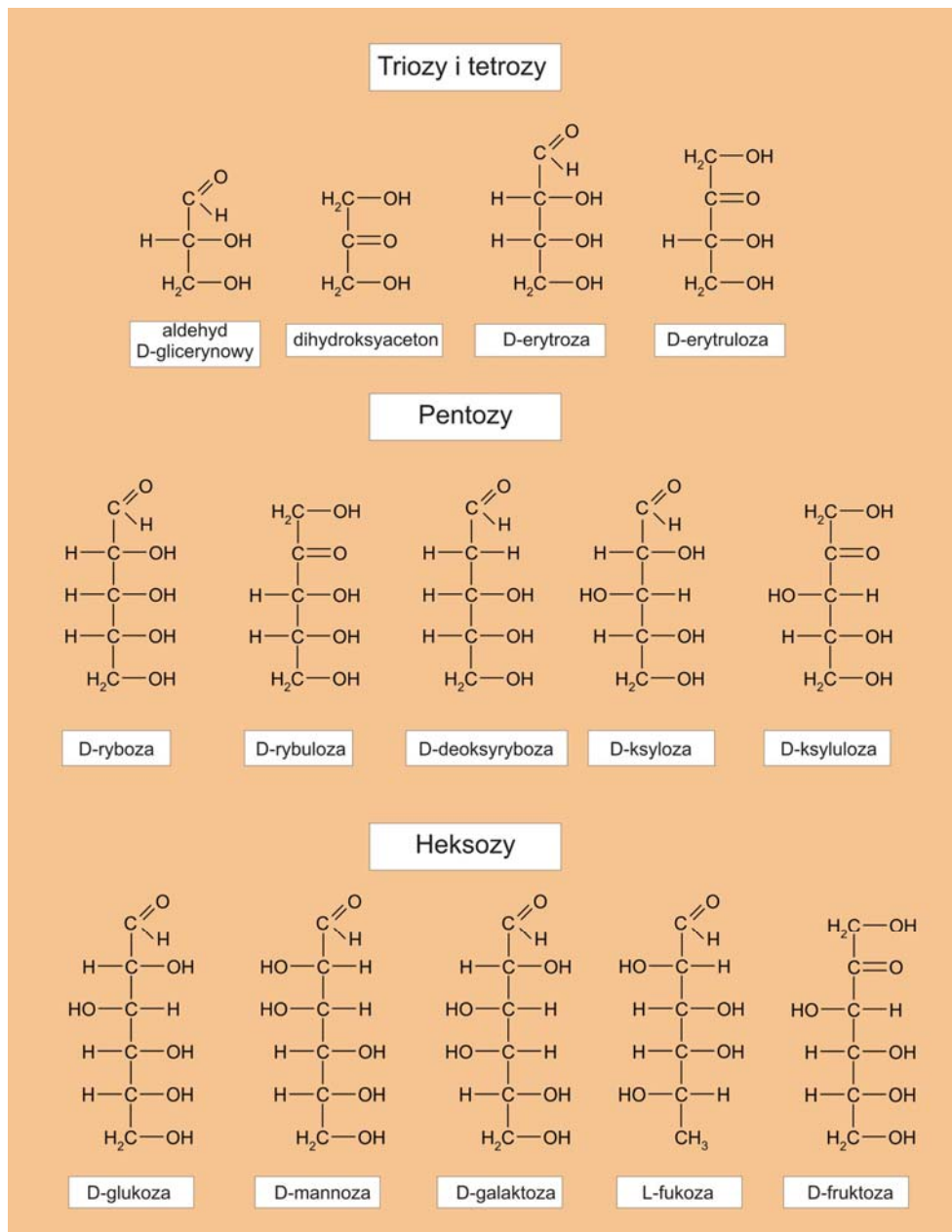
Ryc. 1. Reakcja grupy aldehydowej z alkoholowej; powstawanie hemiacetalu i formy pierścieniowej glukozy

Węgiel pierwszy łączy się z węglem czwartym lub piątym poprzez tlen, powstaje związek cykliczny, który przez analogię do furanu lub piranu nazywamy furanozą lub piranozą. Węgiel aldehydowy jest po tej reakcji połączony z czterema różnymi podstawnikami, a więc staje się węglem asymetrycznym.

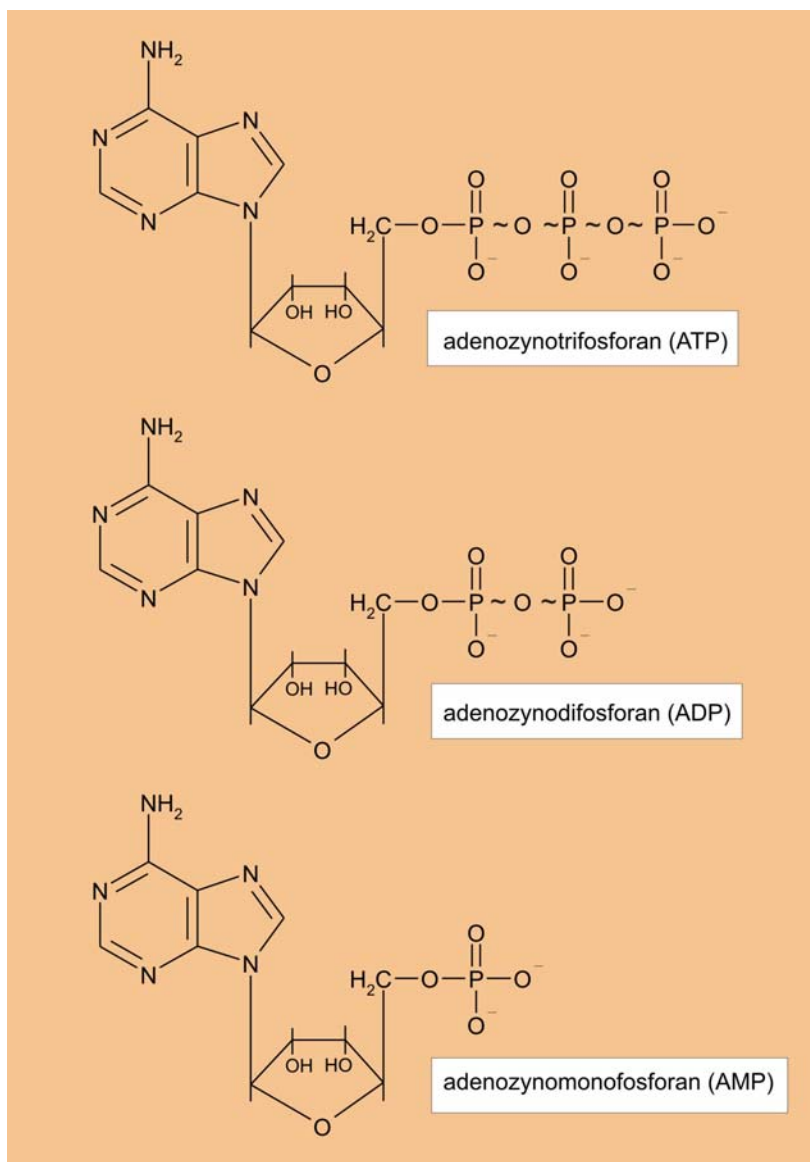


Ryc. 2. Dwie formy  $\alpha$  i  $\beta$  glukopiranozy

Możliwe są dwie formy optycznie czynne takiego związku, nazwane formą alfa i beta. Grupa OH semiacetalu jest grupą reaktywną reagującą z innymi grupami hydroksylowymi tworząc wiązanie glikozydowe. Reaktywna grupa semiacetalu reaguje też z grupami aminowymi i iminowymi tworząc wiązanie N-glikozydowe. Dzięki tym właściwościom semiacetalu możliwe jest tworzenie dwucukrów i wielocukrów. Równie ważne jest tworzenie wiązań N-glikozydowych występujących w kwasach nukleinowych. Analogicznie jak semiacetal tworzy się semiketal wykazując podobną do semiacetalu reaktywność. Zdolność cukrów do tworzenia zarówno dwucukrów jak i wielocukrów stanowi niezwykle istotną właściwość w funkcjonowaniu żywych organizmów. Występowanie w cukrach asymetrycznego węgla determinuje stereospecyficzność w reakcjach biochemicznych, jak również rozpoznawanie oddziaływań ligand-białko. W procesie powstawania życia na ziemi obok aminokwasów, zasad purynowych i pirymidynowych również cukry były tymi niezbędnymi elementami, bez których życie nie byłoby możliwe. Podstawową jednostką węglowodanów jest glukoza, która w czystej postaci została wyizolowana z rodzynek w połowie osiemnastego stulecia.



Ryc. 3. Wzory cukrów



Ryc.4. Wzory nukleotydów

W artykule podano wzory cukrów i nukleotydów biorących udział w metabolizmie i pełniących istotne funkcje biologiczne natomiast przy pisaniu reakcji powszechnie przyjęte jest posługiwanie się skrótami.

Używane skróty:

Glu – glukoza,

Fru – fruktoza,

GAPDH – aldehyd 3-fosfoglicerynowy,

DHAP – ester fosforanowy dihydroksyacetonu.

BPG – bisfosfoglicerynian,

PG – fosfoglicerynian,

PEP – fosfoenolopirogronian

### ***Odkrycie glikolizy***

Odkrycie glikogenu przez Bernarda w roku 1857 można przyjąć umownie za początek badań metabolizmu węglowodanów. Odkrycie metabolizmu glukozy, czyli glikolizy, nastąpiło jednak dopiero w latach trzydziestych minionego stulecia. Odkrycie to stanowi fascynujący przykład jednoczesnych badań prowadzonych w wielu europejskich laboratoriach, których cząstkowe wyniki umożliwiły złożenie w jedną całość kolejnych etapów przemiany glukozy, a których końcowym produktem jest pirogronian. Sądzę, że jest to ważna informacja, że w tym swoistym wyścigu istotną rolę odegrał zespół kierowany przez polskiego uczonego, Jakuba Karola Parnasa. W badaniach, w których brało udział dziesiątki uczonych najbardziej istotną rolę przypisuje się trzem, Meyerhofowi, Embdenowi i właśnie Parnasowi (Barańska i wsp. 2007, 2008). Badania obejmowały wiele etapów i jednym z pierwszych było wykazanie ścisłej zależności pomiędzy pochłanianiem tlenu a powstawaniem mleczanu, za co w 1922 roku Meyerhof otrzymał nagrodę Nobla.

W latach trzydziestych minionego stulecia laboratorium Parnasa na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie było dobrze wyposażone. Współpracownikami Parnas byli młodzi znakomicie wykształceni ludzie, głównie lekarze o dobrej znajomości chemii, którzy umieli syntetyzować estry fosforanowe cukrów, prawdopodobne metabolity glikolizy, jak również kwas adenylanowy i ATP, oraz umieli zidentyfikować je w homogenatach mięśniowych. Kwas

adenylanowy wytwarzany w laboratorium Parnasa był wysokiej jakości; prawdopodobnie w tamtym czasie był najlepszy na świecie.

Parnas i jego współpracownicy prowadzili badania na mięśniach szkieletowych kręgowców takich jak żaby, króliki, psy i konie. Prowadzono również badania na drożdżach piwowarskich. Prowadzenie badań na tak szerokim spektrum organizmów okazało się bardzo korzystne. Identyfikacja tego samego metabolitu u różnych zwierząt wskazywała na uniwersalny charakter metabolizmu glikolizy.

Mięśnie szkieletowe były rozdrabniane przy użyciu maszynki do mięsa i zawieszane w wodzie. Następnie zawieszinę odsączano i otrzymywano wodny roztwór wszystkich rozpuszczalnych w wodzie substancji, w tym enzymy oraz estry fosforanowe cukrów pochodnych glikozy, jak również nukleotydy takie jak ATP. Enzymy glikolizy są białkami globularnymi rozpuszczalnymi w wodzie i zachowującymi zdolność do katalizowania reakcji. Po dodaniu kwasu trichlorooctowego następowała denaturacja i wytrącanie enzymów, natomiast niskocząsteczkowe związki pozostawały w roztworze wodnym. Z roztworu wodnego w sposób selektywny wytrącano poszczególne estry i nukleotydy. A ATP wytrącano w postaci soli barowej.

Parnas i jego zespół byli pionierami w badaniach nad fosforylacją. W badaniach tych stosowali radioaktywny fosfor. Współpracowali w tej dziedzinie z Hevesym. Radioaktywny fosfor otrzymywali z laboratorium Nielsa Bohra z Kopenhagi. Z uwagi na krótki okres półtrwania fosforu (14 dni), konieczne było przesyłanie go samolotem do Lwowa. Radioaktywny fosfor służył do otrzymywania estrów fosforanowych metabolitów glikolizy oraz do śledzenia losów fosforanu w kolejnych etapach glikolizy. Estry fosforanowe wytrącano i spalano otrzymując kwas ortofosforowy, z którego otrzymywano mieszane fosforany magnezowo-amonowe. Następnie wysyłano je do Kopenhagi gdzie mierzono ich radioaktywność. Zastosowanie radioaktywnego fosforu miało ogromne znaczenie dla dalszego rozwoju biochemii. Hevesy za swoje prace otrzymał w 1943 roku nagrodę Nobla.

Współcześnie wiadomo, że pirogronian z glukozy powstaje na drodze kolejnych 10 reakcji enzymatycznych. W owym czasie ani Parnas ani jego



współpracownicy o tym nie wiedzieli, niemniej jednak domyślali się, że przemiany glukozy są wieloetapowym procesem. Stosując inhibitory poszczególnych enzymów mogli zatrzymywać proces glikolizy na określonym etapie.

Kwas jodooctowy jest inhibitorem dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, natomiast fluorek inhibitorem enolazy. Stosując te inhibitory Parnas i jego współpracownicy byli w stanie wykazać, że w obecności kwasu jodooctowego nie powstaje ATP, natomiast pojawia się, gdy w roztworze są fluorki. Umożliwiło to określenie, na jakim etapie glikolizy powstaje ATP. Wiążąc w całość otrzymane wyniki Parnas w swej pracy opublikowanej w *Nature* w 1934 roku stwierdził, że syntezie mleczanu w mięśniach towarzyszy synteza ATP, a końcowa konkluzja brzmiała: „glikoliza jest to rozpad glukozy do mleczanu, w wyniku tego procesu powstaje ATP”.

Badania wykazały, że ten szlak metaboliczny występuje niemal we wszystkich komórkach i że jest jedynym źródłem energii w anaerobowych warunkach. W komórkach poszczególnych tkanek np. takich jak mięśnie i wątroba znaleziono różne izoenzymy glikolizy, które katalizują te same reakcje. Badania wykazały również, że glikoliza jest precyzyjnie regulowana. Stwierdzono, że trzy enzymy regulują glikolizę: heksokinaza, 1,6-fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa. Heksokinaza została odkryta przez Meyerhofa, dwa pozostałe enzymy regulatorowe przez Parnasa i jego współpracowników. Ostern, Guthke i Terszakowec odkryli fosfofruktokinazę w 1936 r. (Ostern i wsp., 1936), natomiast odkrycie kinazy pirogronianowej przypisuje się przede wszystkim Parnasowi (Parnas, Ostern, Man, 1934).

Według wspomnień uczniów, praca z Parnasem nad rozszyfrowaniem glikolizy była fascynującą przygodą intelektualną. Izolowano z badanych materiałów fosforanowe pochodne cukrowe, zidentyfikowano ich budowę, którą często potwierdzano syntezą chemiczną, a następnie otrzymane elementy usiłowano złożyć w jedną całość, w jeden szlak metaboliczny. Przypominało to układanie puzzli z poszczególnych elementów.

W czasie Kongresu (Congress of Biological Chemistry) w Brukseli w 1935 roku, Parnas przedstawił wyniki badań swego zespołu, które następnie opublikował w roku 1936. Ich przesłaniem była rewelacyjna informacja, że ATP może być

syntetyzowany w wyniku przeniesienia reszty fosforanowej z glikolitycznego metabolitu na ADP i że w tej reakcji drugim produktem jest pirogronian. Doniesienie Parnasa zostało potwierdzone przez Lehmana, który wykazał, że reszta fosforanowa zostaje przeniesiona z fosfoenolopirogronianu. Badania glikolizy obejmowały zarówno odkrywanie poszczególnych metabolitów jak i enzymów katalizujących poszczególne etapy

Podobne badania, jakie prowadzono w laboratorium Parnasa, prowadzono jednocześnie w wielu innych europejskich ośrodkach badawczych.

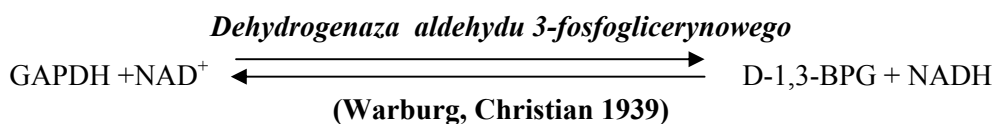
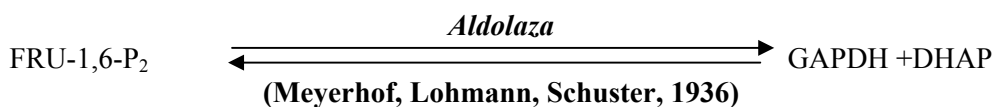
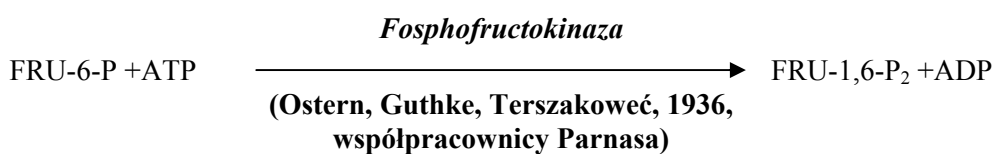
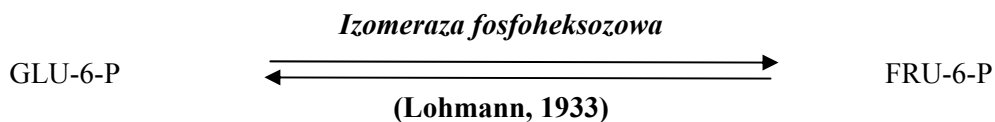
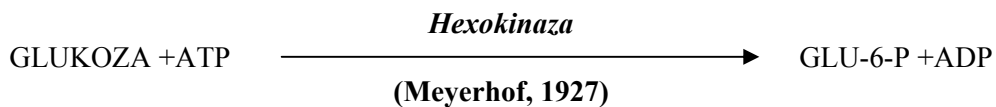
W oparciu o badania własnego zespołu jak również biorąc pod uwagę wyniki badań innych uczonych, Parnas w 1938 r. zaproponował w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Enzymologia* szlak metaboliczny glikolizy powszechnie zaakceptowany przez innych badaczy.

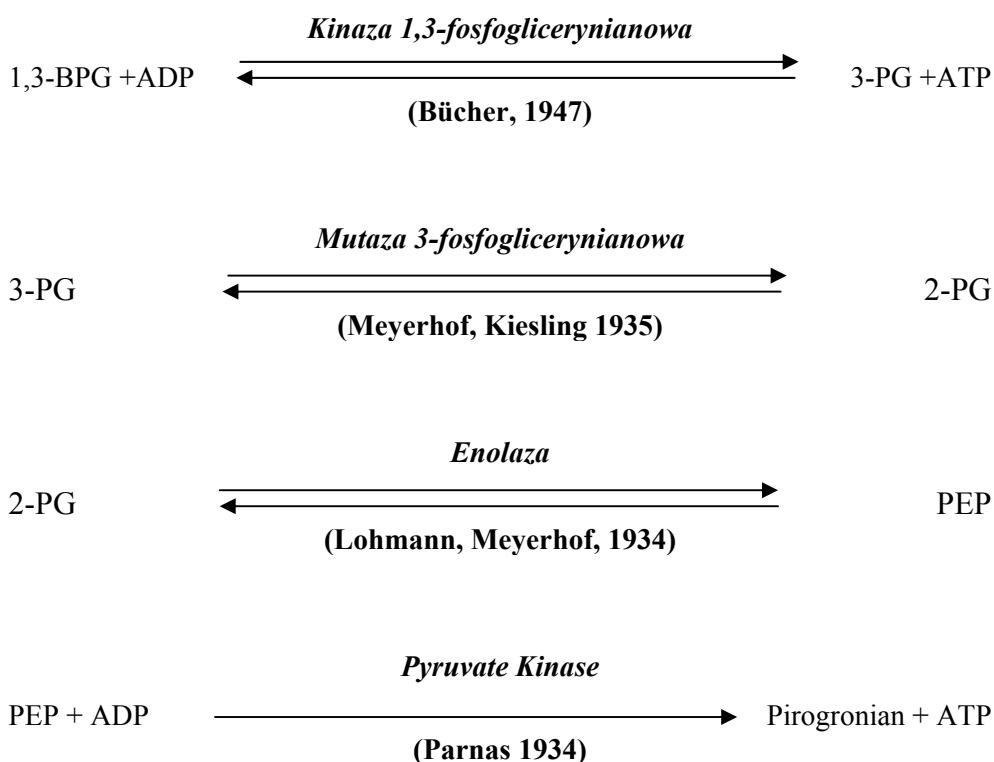
Badania wykazały, że w metabolizmie glukozy można wyróżnić sześć typów reakcji:

1. Fosforylacje – przeniesienie reszty fosforanowej z ATP na cukier lub z metabolitu na ADP, katalizowane przez kinazy;
2. Izomeryzacje aldozy do ketozy oraz ketozy do aldozy katalizowane przez izomerazy;
3. Mutacje – przeniesienie reszty fosforanowej w obrębie tej samej cząsteczki z jednego tlenu na inny, katalizowane przez mutazy;
4. Rozszczepienie wiązania kowalencyjnego węgiel-węgiel pomiędzy 3 a 4 węglem fruktozo-1,6-bisfosforanu katalizowane przez aldolazę, jak również katalizowane przez ten sam enzym reakcje kondensacji aldehydu 3-fosfoglicerynowego i fosfohydroksyacetonu;
5. Utlenianie aldehydu katalizowane przez dehydrogenazę przy udziale NAD;
6. Pozbawienie 2-fosfoglicerynianu cząsteczki wody katalizowane przez enolazę;

**Reakcje glikolizy**

Poniżej lista poszczególnych reakcji glikolizy z nazwiskami odkrywców:





Powyższa lista pokazuje, że odkrycie glikolizy było możliwe dzięki jednoczesnej pracy wielu ośrodków badawczych, wśród których zespół Parnasa odegrał niezwykle istotną rolę.

Glikoliza przebiega w cytosolu bez udziału tlenu, końcowym produktem glikolizy jest pirogronian. W warunkach tlenowych, pirogronian jest utleniany do acetylokoenzymu A przez wieloenzymatyczny kompleks, w warunkach beztlenowych powstający w mięśniach pirogronian jest redukowany do mleczanu. Około 50% mleczanu transportowane jest do wątroby, gdzie w procesie opisanym w podrozdziale *Glukoneogeneza* jest on użyty do syntezy glukozy, która może ponownie być przetransportowana do mięśni poprzez krew (Cykl Corich).

Kolejnym etapem pracy były badania enzymów, poznawanie ich struktury i właściwości kinetycznych. Dla badaczy poznanie mechanizmów regulacji glikolizy, było dobrze rozumianą przez wszystkich koniecznością. Stopniowo odkrywano jak aktywność enzymatyczna jest regulowana. Kinetyka michaelisowska była już wówczas znana i było możliwe zbadanie zarówno

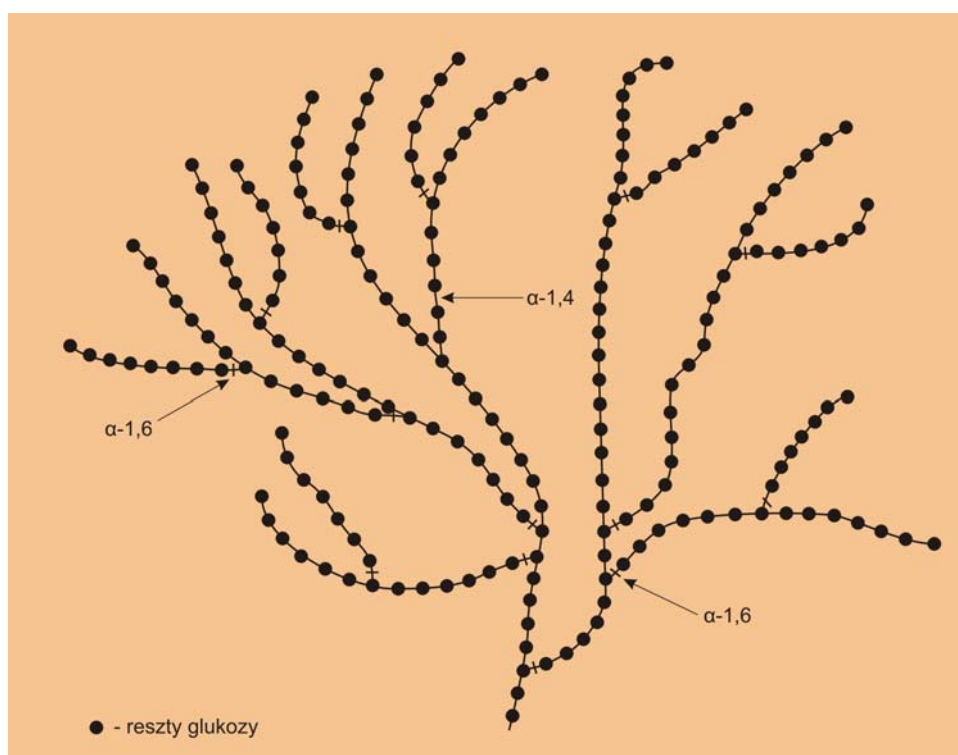
aktywatorów jak i inhibitorów poszczególnych enzymów. Szczególnym zainteresowaniem badaczy cieszyły się enzymy regulatorowe: heksokinaza, fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa. Odkrycie, iż fosfofruktokinaza jest hamowana przez ATP i cytrynian wyjaśniało przynajmniej częściowo zjawisko Pasteura, czyli zahamowanie glikolizy w warunkach tlenowych. W warunkach tlenowych następuje intensyfikacja cyklu kwasów trójkarboksylowych i oksydatywnej fosforylacji w wyniku czego wzrasta stężenie cytrynianu i ATP, co powoduje hamowanie fosfofruktokinazy, a co za tym idzie, glikolizy. Poznawanie właściwości enzymów: (i) pojawienie się hipotezy, że substrat jest czymś w rodzaju klucza do zamka, którym jest enzym, (ii) indukowanej zgodności, w której założono, iż enzym pod wpływem substratu zmienia swoją konformację na taką, która umożliwia katalizowanie reakcji chemicznej, (iii) odkrycie zjawiska allosterii - umożliwiło lepsze rozumienie regulacji metabolizmu. W coraz większym stopniu rozumiano złożoność zjawiska homeostazy glukozy, czyli glukostazy. Dalsze etapy w poznawaniu regulacji metabolizmu węglowodanów to odkrycie mechanizmów przenoszenia informacji, w tym odkrycie wtórnego przekaźnika informacji, jakim jest cykliczne AMP oraz białek G uczestniczących w przekazywaniu informacji przez receptory metabotropowe (patrz: *Rozdział 6. Przekazywanie sygnałów w komórce*). Ważnym wydarzeniem w poznawaniu regulacji glikolizy było odkrycie fruktozo-2,6-bisfosforanu, silnego aktywatora fosfofruktokinazy i inhibitora fruktozo-1,6-bisfosfatazy, enzymu katalizującego hydrolizę fruktozo-1,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu i ortofosforanu. Enzym ten zostanie omówiony w podrozdziale poświęconym glukoneogenezie. Fruktazo-2,6-bisfosforan jest syntezowany przez bifunkcyjny enzym, jakim jest fosfofruktokinaza 2/fruktozo-2,6-bisfosfataza. Aktywność tego enzymu jest regulowana na drodze odwracalnej fosforylacji. Ufosforylowana forma ma aktywność fosfatazy, nieufosforylowana kinazy, a więc nieufosforylowana postać będzie katalizować syntezę 2,6-bisfosforanu, czyli aktywować glikolizę. W glukostazie biorą udział nie tylko enzymy, nie tylko hormony, czy efekторы takie jak fruktozo-2,6-bisfosforan ale również białka GLUT. Początkowo przypuszczano, że glukoza w przeciwieństwie do fosforanowych estrów glukozy może swobodnie przechodzić przez błonę komórkową. Dopiero w latach

osiemdziesiątych ubiegłego stulecia odkryto system GTS, białek błonowych umożliwiających swobodny przepływ glukozy przez błony komórkowe, znajdujących się pod kontrolą insuliny.

### ***Metabolizm glikogenu***

Parnas i jego współpracownicy byli pionierami w badaniach biologicznych fosforylacji. Jedną z odkrytych przez nich reakcji fosforylacji nie dotyczyła glikolizy, a fosforolizy glikogenu do glukozo-1-fosforanu, zachodzącej w obecności ortofosforanu. Dalsze doświadczenia dotyczące metabolizmu glikogenu zostały przeprowadzone przez małżeństwo Carla i Gerty Corich początkowo pracujący w Pradze, a od 1928 roku w St Louis USA. Odkryli oni, że enzymem katalizującym fosforolizę, czyli rozpad glikogenu do estrów glukozo-1-fosforanowych jest fosforylaza. Cori zakładali, że fosforylaza katalizuje odwracalną reakcję zarówno fosforolizy jak i syntezy glikogenu, gdyż istotnie w przypadku dużego nadmiaru substratu reakcja biegnie w kierunku syntezy. Za swoje odkrycie Cori dostali w 1947 roku nagrodę Nobla. Warto wspomnieć, że w mowie, którą wygłasza każdy z laureatów, Cori wymienili dwa nazwiska - Jakuba Karola Parnasa i Tadeusza Baranowskiego - jako tych, którzy pierwsi reakcję fosforolizy zaobserwowali. Był to niewątpliwie bardzo ładny gest. Relacje, pomiędzy Cori a Parnasem i Baranowskim musiały być bardzo dobre, o czym świadczy fakt, że w Baranowski po otrzymaniu w 1948 stypendium WHO spędził rok w laboratorium Corich w St Louis. Kontynuował badania enzymów glikolizy, wyizolował i opisał właściwości aldolazy z mięśni królika oraz dehydrogenazy alfa-glicerolofosforanu, enzymu łączącego metabolizm glukozy z metabolizmem tłuszczu. Enzym ten przez wiele lat był nazywany enzymem Baranowskiego. Ponownie losy ich splotły się w 1957 roku. W roku tym ukazała się praca, której pierwszym autorem był Baranowski, a współautorem Cori. Autorzy odkryli, że w fosforylazie jest obecny fosforan pirydoksalu. Nikt wówczas nie umiał wyjaśnić roli tego koenzymu w fosforylazie, dopiero po latach odkryto, że fosforan pirydoksalu bierze udział w reakcji katalizowanej przez fosforylazę.

Dalsze badania prowadzone przez wiele zespołów badawczych doprowadziły do w miarę pełnego poznania poszczególnych reakcji syntezy i rozkładu glikogenu oraz regulacji tych procesów. Wbrew przypuszczeniom Corich, okazało się, że glikogen nie jest syntetyzowany przez fosforylazę, a przez syntazę. W reakcji tej substratem jest urydylodifosforan, który zostaje przyłączony do 4 węgla łańcucha w wyniku czego następuje wydłużenie łańcucha o jedną resztę glikozydową. Oprócz wiązań 1-4 występują wiązania 1-6 glikozydowe. Jest to wynikiem działania enzymu rozgałęziającego, 1,4-1,6 transglukozydazy, który przenosi 5 do 8 reszt glikozydowych z liniowego łańcucha i wiąże ten fragment do grupy hydroksylowej 6, jednej z reszt glikozydowych łańcucha.



Ryc. 5. Glikogen, zaznaczone wiązania 1,4 i 1,6 glikozydowe

Rozkład glikogenu na drodze fosforolizy jest katalizowany przez fosforylazę, enzymem katalizujący fosforolizę końcowej reszty glukozy w wyniku czego powstaje glukoza-1-fosforan. Oprócz fosforylazy w rozkładzie glikogenu bierze

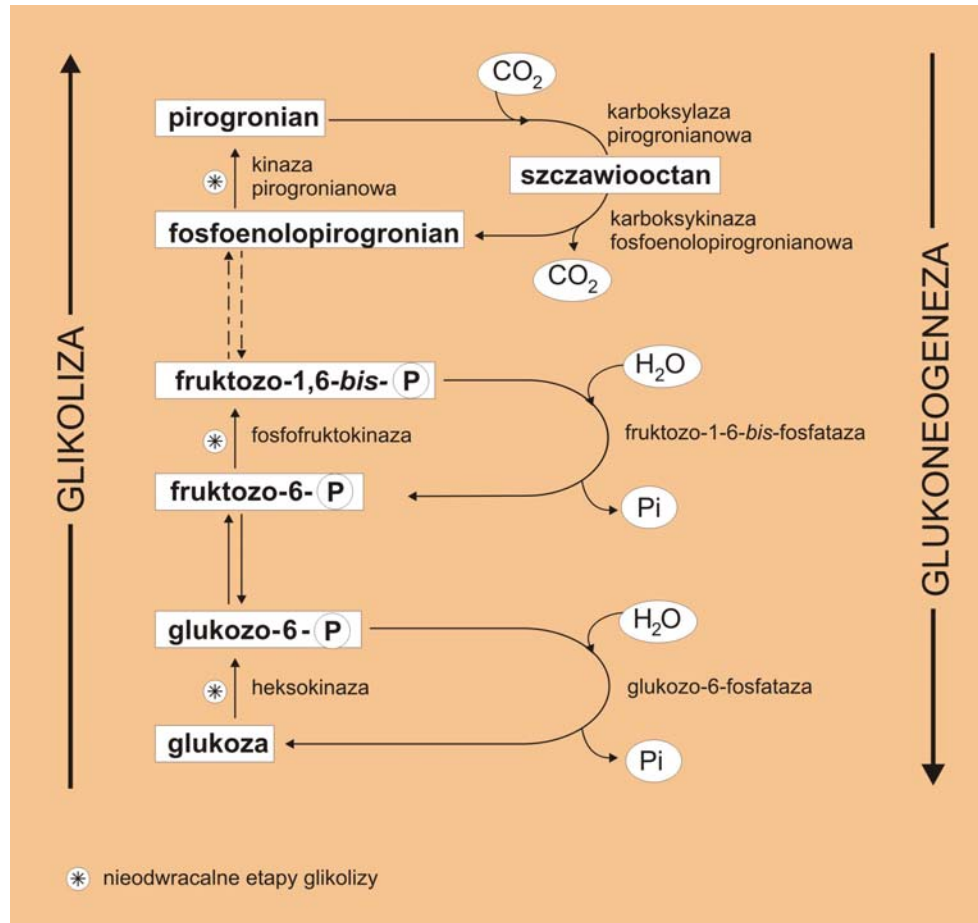
udział enzym odgałęziający, katalizujący przeniesienie reszt glukozywych łańcucha bocznego, połączonego wiązaniem 1-6 glikozydowym do wydłużonego łańcucha, zawierającego wiązania 1-4 glikozydowe. Reakcja następuje, gdy w łańcuchu bocznym pozostają 4 reszty glukozy. Enzym odgałęziający przenosi 3 reszty cukrowe do łańcucha głównego. Ostatnia reszta glikozydowa połączona w miejscu rozgałęzienia wiązaniem 1-6 glikozydowym jest uwalniana przez 1,6-glikozydazę hydrolitycznie, uwalnia się wolna glukoza. W efekcie z glikogenu oprócz przeważającej ilości glukozy-1-fosforanu uwalnia się mała ilość wolnej glukozy. Niezwykle było odkrycie w glikogenie glikogeniny, białka niezbędnego przy syntezie glikogenu *de Novo*. Synteza zaczyna się od reakcji katalizowanej przez syntezę startera glikogenu, w której semiacetalowa grupa OH glukozy wiąże się z grupą OH tyrozyny glikogeniny. Następne glukozy są przyłączane wg znanego schematu do grupy OH na czwartym węglu glukozy. Współodkrywcami glikogeniny było pochodzące z Wrocławia małżeństwo Jozefa i Wiesławy Łomako, odkrycia dokonali w Polsce natomiast opublikowali je wraz z amerykańskim szefem w czasie pobytu na stypendium w USA (Łomako i wsp., 2001).

### ***Glukoneogeneza***

W 1943 roku, Gomori odkrył w tkankach wątrobowych fruktozo-1,6-bisfosfatazę. Fosfatazy, czyli enzymy hydrolizujące wiązanie fosforanowe były już w tym czasie znane, natomiast enzym odkryty przez Gomoriego katalizował hydrolizę fruktozo-1,6-bisfosforanu. Związek ten, jeden z metabolitów glikolizy, jest produktem reakcji katalizowanej przez fosfofruktokinazę. Badania wykazały, że obok glikolizy w organizmach zwierząt przebiega również synteza glukozy, czyli glukoneogeneza, zlokalizowana głównie w wątrobie i częściowo w nerce. Większość enzymów glikolizy katalizuje reakcje odwracalne mogące brać udział zarówno w glikolizie jak i glukoneogenezie, natomiast heksokinaza, fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa - regulatorowe enzymy glikolizy, katalizują reakcje nieodwracalne. Enzymem katalizującym reakcję hydrolizy glukozy-6-fosforanu jest glukozy-6-fosfataza. Synteza fosfoenolopirogronianu z



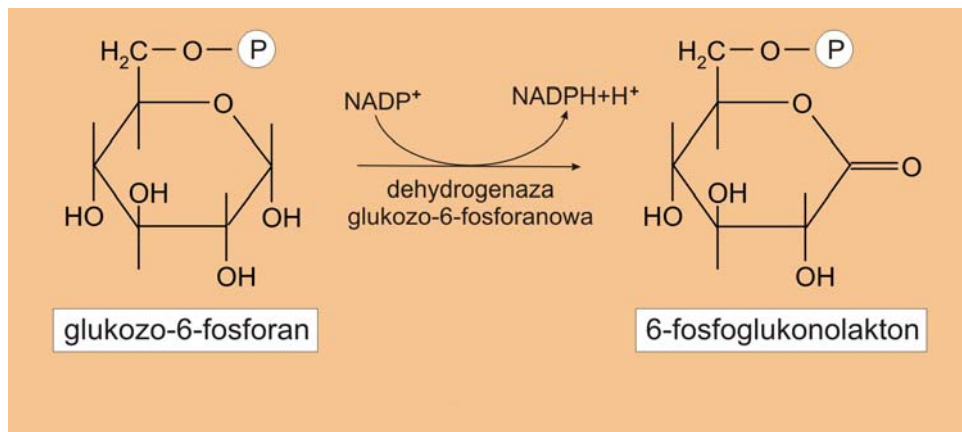
pirogonianu nie jest prostym odwróceniem reakcji katalizowanej przez kinazę pirogonianową. Synteza ta przebiega w dwóch etapach: w pierwszym etapie karboksylaza katalizuje reakcję przyłączenia dwutlenku węgla do pirogonianu. W wyniku tej reakcji powstaje szczawiooctan, reakcja jest endoergiczna i wymaga energii w postaci ATP. Dopiero produktem drugiej reakcji, katalizowanej przez karboksykinazę z udziałem GTP, jest fosfoenolpirogonian. Pierwsza reakcja przebiega w mitochondriach. Powstający szczawiooctan nie przechodzi przez błonę mitochondrialną, musi zostać zredukowany do jabłczanu, który może przejść przez błonę. Jabłczan zostaje przetransportowany do cytosolu, gdzie ponownie zostaje utleniony do szczawiooctanu i może zostać użyty do syntezy fosfoenolpirogonianu. Coraz więcej odkryć zbliżało nas do poznania mechanizmów homeostazy glukozy, czyli glukostazy. Waga badań prowadzonych do odkrycia glukostazy była w pełni doceniana i dlatego też odkrycie insuliny zostało nagrodzone nagrodą Nobla (Banting i Macleod, 1923). Biochemicy zdawali sobie sprawę, że wszystkie przemiany węglowodanów muszą być precyzyjnie regulowane. Droga do pełnego poznania mechanizmów regulacji metabolizmu była długa. Warto wspomnieć, że kluczowy regulator glikolizy i glukoneogenezy, fruktozo-2,6-bisfosforan został odkryty blisko 50 lat po odkryciu glikolizy, a hormon leptyna został doceniony dopiero w ostatnim dziesięcioleciu. Współcześnie wiadomo, że aktywność enzymu może być regulowana poprzez niskocząsteczkowe regulatory, inhibitory konkurencyjne, niekonkurencyjne lub akonkurencyjne, jak również inhibitory allosteryczne. Regulacja może przebiegać poprzez postranslacyjną modyfikację enzymu, np. odwracalną fosforylację. Regulacja enzymu może występować na poziomie ekspresji genu.



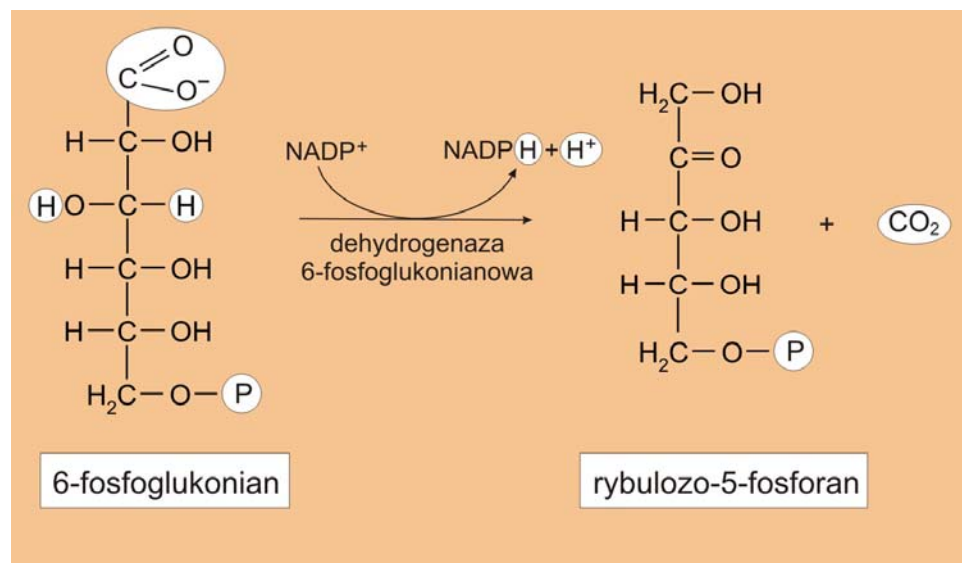
Ryc. 6. Nieodwracalne reakcje glikolizy i glukoneogenezy

### *Cykl pentozo-fosforanowy*

Oprócz glikolizy, glukoneogenezy, syntezy i rozkładu glikogenu, w organizmie zwierząt występuje proces metaboliczny zwany cyklem pentozo-fosforanowym. W tym procesie glukozo-6-fosforan jest utleniany przy udziale NADP do 6-fosfoglukonianu przez dehydrogenazę, a 6-fosfoglukonian jest utleniany do rybulozo-5-fosforanu również przy udziale NADP.

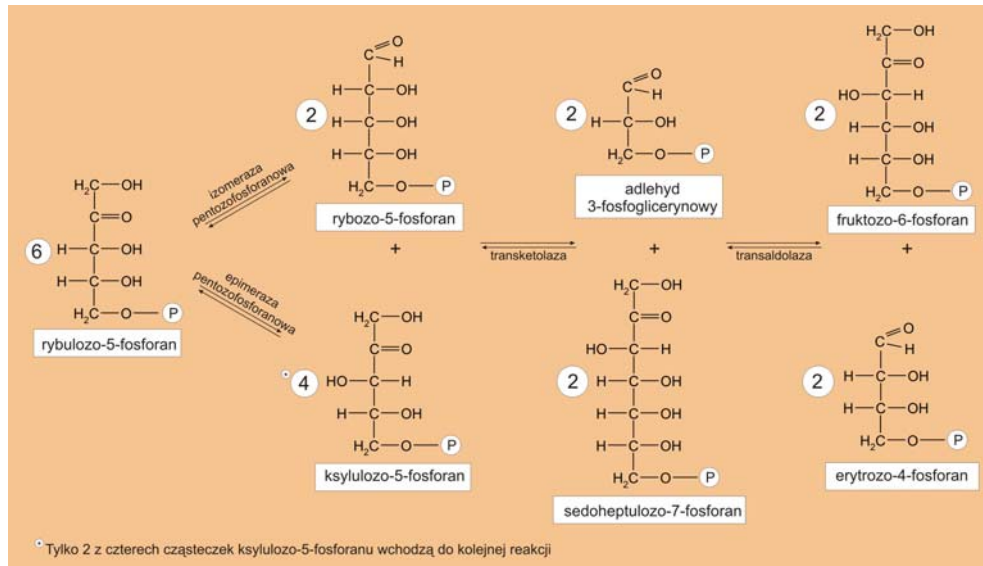


Ryc.7. Utlenianie glukozy-6-fosforanu

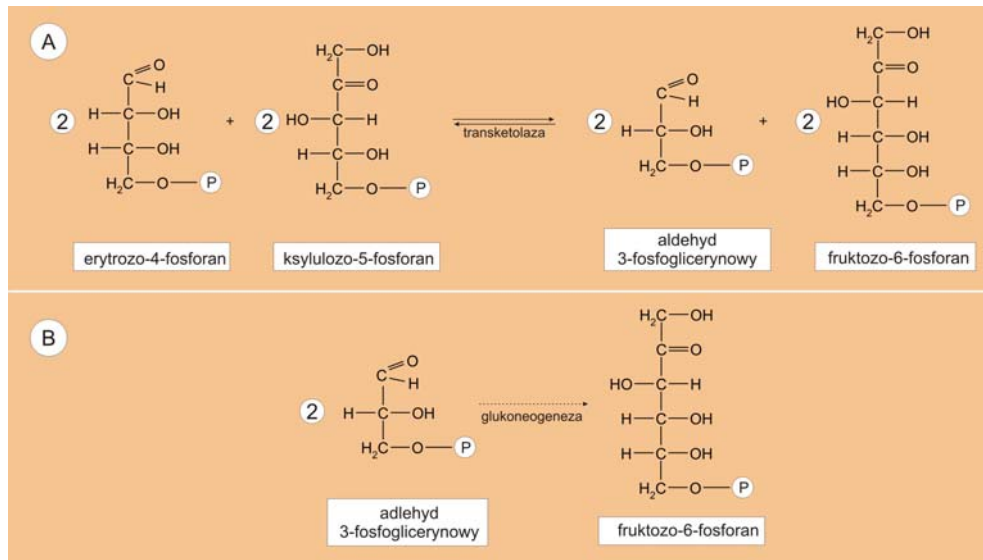


Ryc. 8. Utlenianie i dekarboksylacja 6-fosfoglukonianu

Powstający rybulozo-5-fosforan jest izomeryzowany do rybozo-5-fosforanu i epimeryzowany do ksylulozo-5-fosforanu. Rybulozo-5-fosforan i ksylulozo-5-fosforan łączą się z sobą w wyniku czego powstaje sedoheptulozo-7-fosforan i aldehyd 3-fosfoglicerynowy. Sedoheptulozo-7-fosforan i aldehyd-3-fosfoglicerynowy dają erytrozo-6-fosforan i fruktozo-6-fosforan.



Ryc. 9. Powstawanie sedoheptulozo-7-fosforanu i aldehydu -3-fosfoglicerynowego oraz fruktozo6-fosforanu i erytrozo-4-fosforanu



Ryc. 10. Reakcja erytrozo-4-fosforanu z ksylulozo 5-fosforanem

Powyższy szlak metaboliczny jest źródłem rybozy, niezbędnego elementu w budowie RNA oraz NADP biorącego udział w utrzymywaniu właściwego potencjału redoks np. w erytrocytach. Skoro mowa o rybozach, to warto nadmienić, że współpracownica Parnasa, Wanda Meybaum-Katzenelebogen opracowała doskonałą metodę oznaczania rybozy i dezoksyrybozy, była też członkiem elitarnego klubu „tysiączników”, bowiem jej prace były cytowane ponad 5 000 razy. Po wojnie utworzyła Instytut Biochemii na Uniwersytecie Wrocławskim, do dziś jeden z najlepszych ośrodków w kraju.

### ***Glikoneogeneza, nowy szlak metaboliczny***

Według Corich, mleczan produkowany w mięśniach miał być transportowany wraz z krwią do wątroby, gdzie w wyniku glukoneogenezy służył jako substrat do syntezy glukozy. Glukoza dyfundująca do krwi mogła być transportowana do mięśni, gdzie służyła jako substrat w glikolizie. Ten Cykl został nazwany Cyklem Corich.

W latach dziewięćdziesiątych minionego stulecia pojawiło się szereg artykułów postulujących, że blisko 50% mleczanu powstającego w warunkach beztlenowych w mięśniach może być użyta do syntezy glikogenu. Możliwość glukoneogenezy, czyli takiego szlaku metabolicznego, jaki występuje w wątrobie, została wykluczona ze względu na brak w mięśniach glukozo-6-fosfatazy, co uniemożliwia uwalnianie glukozy z mięśni do krwi. Brak fosfatazy nie wyklucza syntezy glikogenu. Mimo licznych kontrowersji nowy szlak metaboliczny został przez większość uczonych zaakceptowany i dla odróżnienia od glukoneogenezy został nazwany glikoneogenezą (Dżugaj, 2006). Oponenty hipotezy glikoneogenezy wysuwali argument, że mięśniowa fruktozo-1,6-bisfosfataza, enzym katalizujący hydrolizę fruktozo-1,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu i ortofosforanu a niezbędny w syntezie glukozo-6-fosforanu, jest praktycznie nieaktywny w mięśniach z powodu wrażliwości na hamowanie przez AMP.  $I_{0.5}$  tego enzymu wynosi 0,1 mikromola, co przy 10 mM stężeniu AMP jakie panuje w mięśniach powoduje, że fruktozo-1,6-bisfosfataza powinna być całkowicie zahamowana. Autor tego rozdziału, wraz z kierowanym przez siebie zespołem

wykazał, że w warunkach *in vivo* fruktozo-1,6-bisfosfataza tworzy kompleks z mięśniową aldolazą i że w takim kompleksie fruktozo-1,6-bisfosfataza jest niewrażliwa na hamowanie przez AMP, a więc wbrew wysokiemu stężeniu AMP - glikoneogeneza może przebiegać. Prowadząc badania nad regulacją glikoneogenezy wykazano również, że izoenzym mięśniowy fruktozo-1,6-bisfosfatazy jest silnie hamowany przez jony wapnia, w przeciwieństwie do izoenzymu wątrobowego, który praktycznie nie jest na nie wrażliwy. W czasie skurczu mięśniowego, gdy wzrasta stężenie tych jonów enzym jest zahamowany, natomiast w stanie spoczynku stężenie jonów wapnia spada i glikoneogeneza jest wznawiana. Biorąc pod uwagę fakt, że u 70 kg mężczyzny masa mięśni to blisko 15 kg, udział glikoneogenezy w glukostazie jest niezwykle istotny. Współcześnie badania metabolizmu obejmują wewnątrzkomórkową lokalizację enzymów biorących udział w poszczególnych przemianach; badania wyżej wymienionego zespołu wykazały, że glikoneogeneza jest zlokalizowana w miocytach na lini Z (Dżugaj, 2006).

### ***Rola cukrów w rozpoznawaniu komórek i przekazywaniu informacji***

Pod koniec lat pięćdziesiątych ubiegłego stulecia grupa młodych współpracowników Baranowskiego rozpoczęła prace nad rolą cukrów w rozpoznawaniu komórek i przenoszeniu informacji. Można tu wyróżnić dwie osoby, Elwirę Lisowską i Elżbietę Romanowską. Prace obu uczonych zasługują na wyróżnienie. Obie mają na swoim koncie bogaty dorobek publikacyjny. Szczególnie godne uznania są prace nad układem M i N erytrocytów. Lisowska wraz ze współpracownikami wykazała, że antygeny M i N są zawarte w głównej sialoglikoproteinie błon erytrocytów. Badania Lisowskiej dostarczyły dowodów na to, że antygeny M i N różnią się łańcuchem polipeptydowym. Badania te zostały uwieńczone odkryciem, że antygeny M i N różnią się resztami aminokwasowymi w pozycjach 1 i 5 łańcucha polipeptydowego (M: Ser1, Gly5; N: Leu1, Glu5) i są bezpośrednimi produktami genów. Stosując przeciwciała monoklonalne anti-M i anti-N, Lisowska wykazała, że różnią się one szczegółową swoistością, tzn.

rozpoznają różne reszty cukrowe i aminokwasowe N-końcowego fragmentu glikoforyny A, w tym zawsze resztę aminokwasową w pozycji 1 lub 5 decydującą o swoistości grupowej (Wasniowska i wsp., 1976). Antygeny M i N stały się więc dogodnym modelem do badania wpływu glikozylacji na właściwości antygenowe białek. Ponadto, wyjaśnienie podstaw strukturalnych układu grupowego MN stanowiło przełom w poglądach na grupy krwi. Prace Lisowskiej były wielokrotnie cytowane. Lisowska też należy do klubu „tysiączników”, w sumie jej prace osiągnęły ponad 1000 cytowań. Lisowska zyskała uznanie na arenie międzynarodowej, o czym świadczy fakt, że wielokrotnie wygłaszała plenarne referaty na Zjazdach poświęconych glikokoniugatom i była przez wiele lat w zespole redakcyjnym *European Journal of Biochemistry*. Na wyróżnienie zasługują również następcy Elżbiety Romanowskiej i Elwiry Lisowskiej reprezentujący obecnie średnie pokolenie uczonych: Andrzej Gamian, Czesław Ługowski i Hubert Krotkiewski. Ługowski prowadzi badania nad charakterystyką biochemiczną makrocząsteczek zaangażowanych w procesach odpornościowych – badania immunochemiczne endotoksyn bakteryjnych (Jachymek i wsp, 1999).

### ***Uwagi końcowe***

Jakub Karol Parnas był naszym wybitnym biochemikiem, niestety tragicznie zmarłym w moskiewskim więzieniu w 1948 roku, w do tej pory niewyjaśnionych okolicznościach (Barańska i wsp., 2007, 2008). Odkrycie glikolizy było kamieniem milowym w rozwoju biochemii w XX wieku, a udział Parnasa i jego zespołu w tym odkryciu jest bezsporny. Parnas jest słusznie uważany za twórcę polskiej szkoły biochemii. W powojennej Polsce badanie enzymów glikolitycznych było kontynuowane przez Tadeusza Baranowskiego, kierownika Zakładu Biochemii na Akademii Medycznej we Wrocławiu oraz jego współpracowników. Na uwagę zasługują prace Mariana Kochmana wykonane w czasie jego pobytu na stypendium w Seattle w Stanach poświęcone strukturze i właściwościom aldolazy, należące obecnie do klasycznych prac enzymologicznych, wielokrotnie cytowanych w publikacjach naukowych. Marian Kochman, wybitny biochemik i biolog

molekularny, należy również do elitarnego klubu „tysięczników”, uczonych, których prace były ponad 1000 - krotnie cytowane w literaturze naukowej.

Jakub Karol Parnas wywarł głęboki wpływ na polskich i ukraińskich biochemików. Mimo upływu lat pamięć o nim pozostaje wciąż żywa. W roku 1995, Polskie Towarzystwo Biochemiczne wystąpiło z inicjatywą organizowania wspólnych Polsko-Ukraińskich Konferencji poświęconych pamięci Parnasa. Inicjatywa spotkała się z entuzjastycznym przyjęciem polskich i ukraińskich biochemików i od 1996, co dwa lata, na przemian w Polsce i na Ukrainie, organizowane są Konferencje Parnasa, w których uczestniczą nie tylko Polacy i Ukraińcy, ale również uczeni z całego świata. Odkrycie fosfofruktokinazy w laboratorium Parnasa miało wymiar symboliczny. Odkrywcami byli obywatele polscy trzech narodowości: Guthke był Polakiem, Ostern Żydem, a Terszakowec Ukraińcem. Nawiązując do tego odkrycia Polskie Towarzystwo Biochemiczne postanowiło w roku 2011 zorganizować w Warszawie, trójstronną, Polsko-Ukraińsko-Izraelską, Konferencję Parnasa.

### ***Lektura uzupełniająca***

#### ***Książki:***

Bańkowski E. (2009): Biochemia. Elsevier, Wrocław.

#### ***Czasopisma i Inne źródła:***

Banting G.F., Macleod J. (1923): The Nobel Prize in Physiology or Medicine.

Baranowski T. (1949): Crystalline glycerophosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J. Biol. Chem. 180: 535-541.

Barańska J., Dżugaj A, Kwiatkowska-Korczak J. (2007): Embden-Meyerhof-Parnas, the first metabolic pathway: The fate of prominent Polish biochemist Jakub Karol Parnas. Comprehensive Biochem. 45: 157-207. (Stories of Success – Personal recollections X., G. Semenza Ed.) Elsevier, Amsterdam.



- Barańska J., Dżugaj J., Kwiatkowska-Korczak J. (2008): Życie i tragiczna śmierć Jakuba Karola Parnasa, wybitnego polskiego biochemika, współodkrywcy glikolizy. *Kosmos* 57: 278-279.
- Cori C.F., Cori G.T. (1947): The Nobel Prize in Physiology or Medicine.
- Dżugaj A. (2006): Localization and regulation of muscle fructose-1,6-bisphosphatase the key enzyme of glycogenesis. *Advances of Enzyme Regulation* 46: 51-71.
- Fischer E. (1902): Nobel Prize In Chemistry.
- Jachymek W., Niedziela T., Petersson C., Lugowski C., Czaja J., Kenne L. (1999): Structures of the O-Specific Polysaccharides from *Yokenella regensburgei* (*Koserella trabulsii*) Strains PCM 2476, 2477, 2478, and 2494: High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Investigation of the O-Specific Polysaccharides in Native Lipopolysaccharides and Directly on the Surface of Living Bacteria. *Biochemistry* 38: 11788–11795.
- Lomako J., Lomako W., Whelan W.J. (1990): Substrate specificity of the autocatalytic protein that primes glycogen synthesis. *FEBS Letters* 264: 13-16.
- de Hevesy G (1943): Nobel Prize in Chemistry.
- Meybaum W. (1939): Über die Bestimmung kleine Pentosemenge insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Z. Physiol. Chem.* 258: 117-120.
- Meyerhof O. F. (1922): Nobel Prize in Physiology or Medicine.
- Ostern P. Guthke J.A., Terszakowec J. (1936): Über die Bildung des Hexosemonophosphorsäure Esters Und dessen umwandlung In Fructose diphosphorsäure-ester in Muskel. *Z. Physio. Chem.* 243: 9-37.
- Parnas J.K., Ostern P. (1934): Chemistry of anaerobic recovery in muscle. *Nature (London)* 134: 627.
- Parnas J.K. Ostern P., Man T. (1934): Über die Verkettung. der Chemische Vorgänge in Muskel. *Biochem. Z.* 272: 64-70, 23-25.
- Parnas J.K. (1936): L'enchainement des processus enzymatiques dans le tissu musculaire. V Congress de Chemie Biologique, Bruxelles, 23-25, Octobre 1935. *Bull. Soc. Chim. Biol. France* 18: 53-95.

Wasniowska K., Drzeniek Z., Lisowska E., (1976) The amino acids of M and N blood group glycopeptides are different. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 206-211.

Autor bardzo dziękuje Panu Profesorowi Bańkowskiemu oraz wydawnictwu Elsevier-Wrocław za możliwość użycia w artykule rysunków pochodzących z podręcznika: Bańkowski E. 2009 *Biochemia*, Elsevier, Wrocław