



*mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii*

*CZ.1.07/2.2.00/28.0171*

# Obecný metabolismu. Cyklus trikarboxylových kyselin (citrátový cyklus, Krebsův cyklus) (8).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Mastné kyseliny a triacylglyceroly.

Mastné kyseliny mají čtyři fyziologické úlohy:

- a) Masné kyseliny jsou stavební jednotky fosfolipidů a glykolipidů
- b) Mnohé proteiny jsou modifikovány vazbou s mastnými kyselinami jako součást membrán.
- c) Mastné kyseliny jsou energeticky velmi bohaté. Jsou skladovány jako triacylglyceroly (triglyceridy - neutrální estery mastných kyselin s glycerolem).
- d) Deriváty mastných kyselin působí jako hormony nebo intracelulární poslové.

Odbourávání mastných kyselin probíhá v matrix mitochondrie ( $\beta$ -oxidace) za tvorby mnoha acetyl CoA, které vstupují do citrátového cyklu.

## Degradace a tvorba mastných kyselin.

Aktivovaná mastná kyselina je oxidována za tvorby dvojné vazby ( $\text{FADH}_2$ ).

Dvojná vazba je následně hydratována (vnese se kyslík z vody); vzniklý alkohol je oxidován na keton ( $\text{NADH}$ ) a konečně je čtyřuhlíkatý fragment štěpen za účasti  $\text{CoA}$ , vzniku acetyl  $\text{CoA}$  a mastné kyseliny kratší o dva uhlíky.

Syntéza mastných kyselin je obráceným postupem degradace. Probíhá v cytoplasmě a aktivními prekurzory jsou acetyl  $\text{CoA}$  a malonyl  $\text{CoA}$ . Malonyl se kondenzuje s acetylem za tvorby čtyřuhlíkatého fragmentu. Fragment je dále redukován ( $\text{NADPH}$ ), dehydratován a znova redukován. Karbonyl se tak převádí na methylenovou skupinu za tvorby butyryl  $\text{CoA}$ . Další malonyl  $\text{CoA}$  se kondenzuje s butyrylovou jednotkou a proces se opakuje do délky řetězce  $\text{C}_{16}$ .

Syntéza mastných kyselin u eukaryot probíhá na multifunkčním enzymovém komplexu.

## Triacylglyceroly.

Triacylglyceroly reprezentují velmi koncentrovanou formu skladované energie (savci - adiposní tkáň). Výsledkem kompletní oxidace mastných kyselin je zisk 38 kJ/g.

Ze sacharidů a proteinů získáme jen 17 kJ/g.

Jeden gram bezvodého triglyceridu skladuje 6x více energie než jeden gram hydratovaného glykogenu.

Kompletní oxidací palmitátu získáme 106 molekul ATP.

Štěpení triglyceridů na mastné kyseliny a glycerol katalyzují specifické pankreatické lipasy.

Acetyl CoA vzniklý degradací mastných kyselin vstupuje v první řadě do citrátového cyklu. Další možností jeho využití je tvorba ketolátek a cholesterolu a z něho odvozených steroidních hormonů a žlučových kyselin.

# Citrátový cyklus (cyklus trikarboxylových kyselin, Krebsův cyklus)

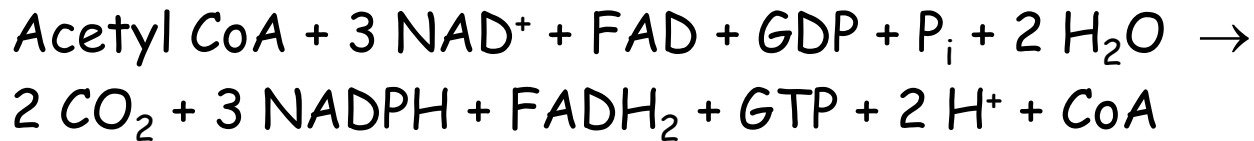
Citrátový cyklus (CC) je centrální cyklická metabolická dráha. Do citrátového cyklu vstupují degradační produkty ve formě dvouhlíkatého acetyl CoA ze sacharidů, proteinů a mastných kyselin).

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Lokalizace CC:               | matrix mitochondrie   |
| Proces:                      | aerobní a amfibolický   |
| Počet stupňů a meziproductů: | 8   |
| Produkty:                    | 1 GTP (ATP), 3 NADH,<br>1 FADH <sub>2</sub> , 2 CO <sub>2</sub> . |

Redukované koenzymy NADH a FADH<sub>2</sub> jsou bezprostředně reoxidovány ve vnitřní mitochondriální membráně za účasti kyslíku a tvorby ATP a vody.

# Citrátový cyklus (cyklus trikarboxylových kyselin, Krebsův cyklus)

Stechiometrie CC:

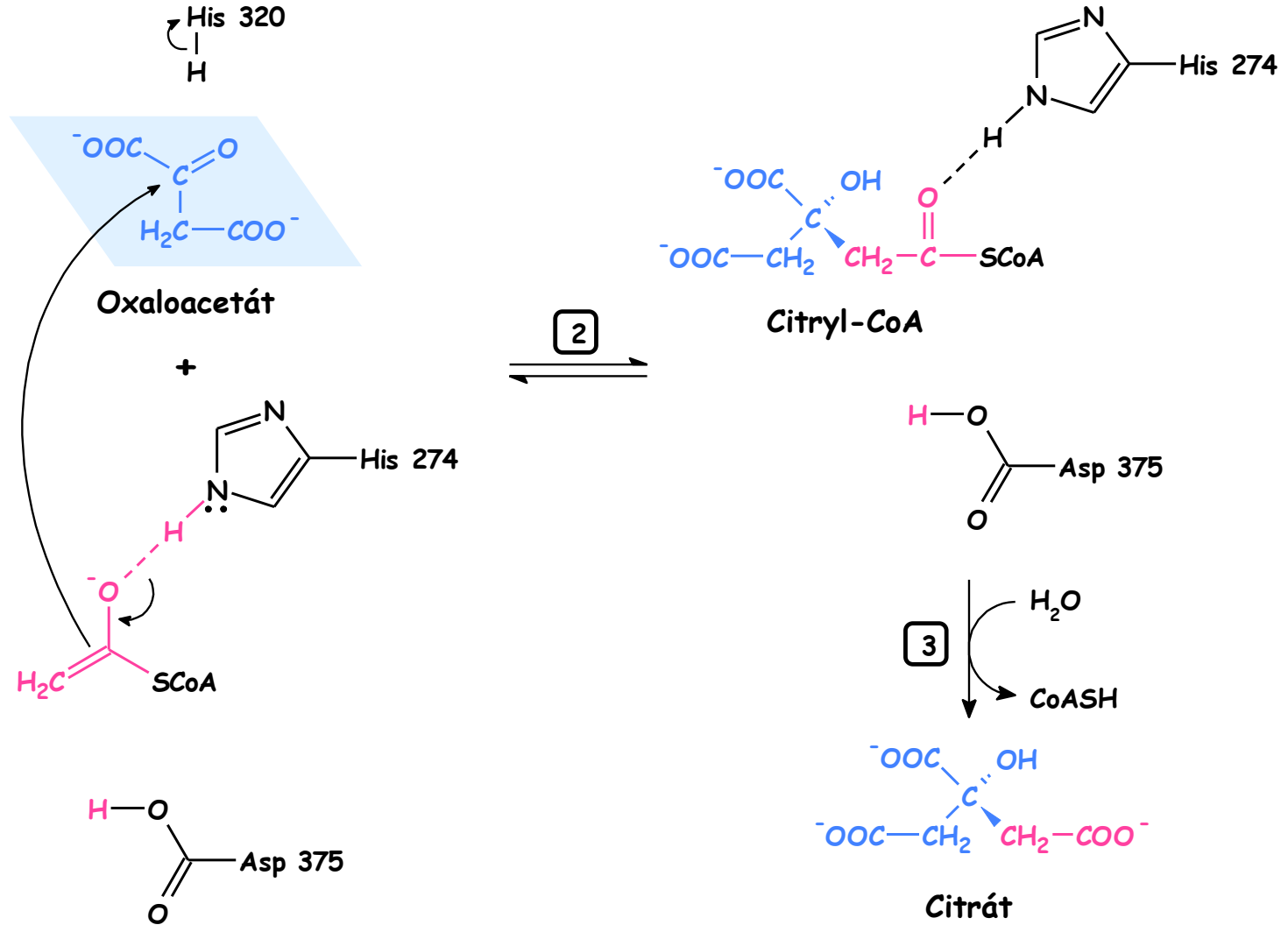


Citrátový cyklus je konečná společná metabolická dráha aerobní oxidace energeticky bohatých molekul.

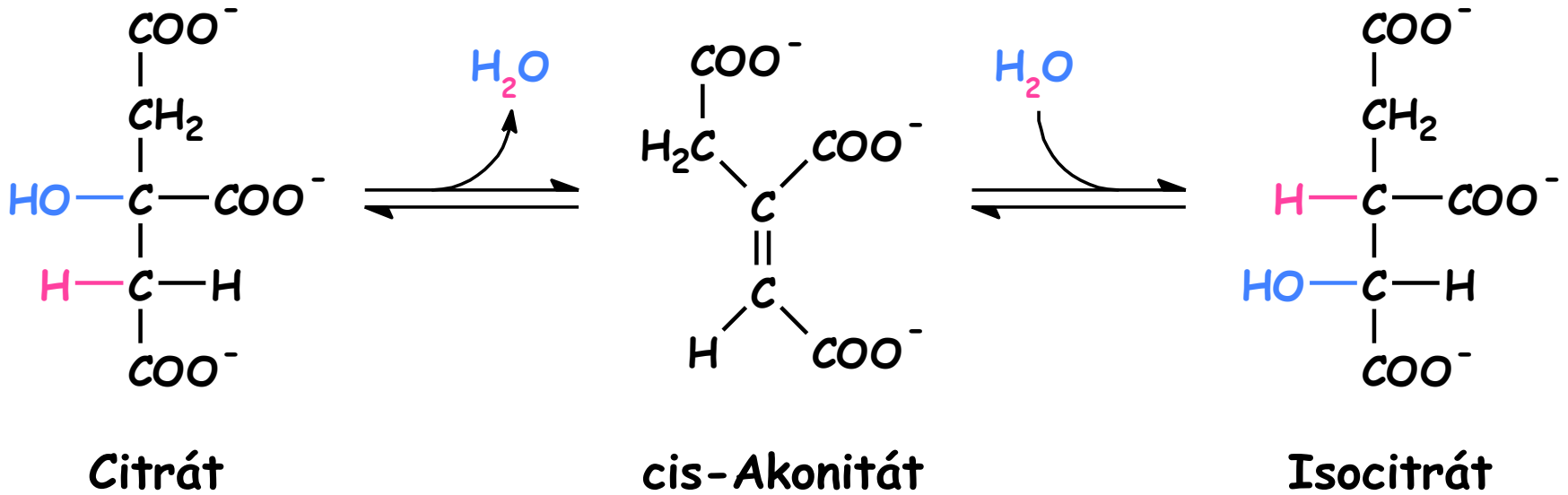
Cyklus je důležitý zdroj stavebních jednotek pro tvorbu řady důležitých molekul.

Cyklus je kontrolován na řadě stupňů.

# CC - citrátsynthesa.

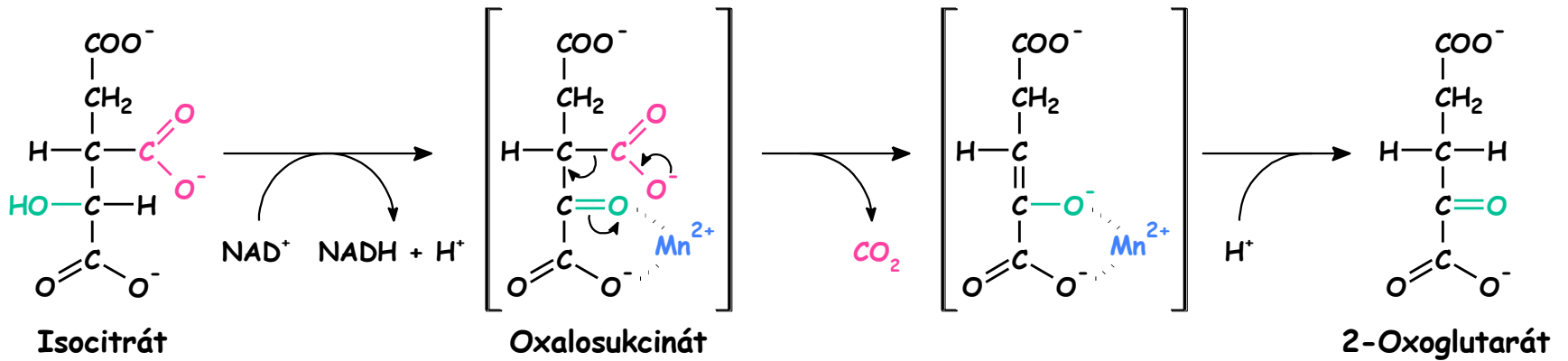


# CC- akonitasa.

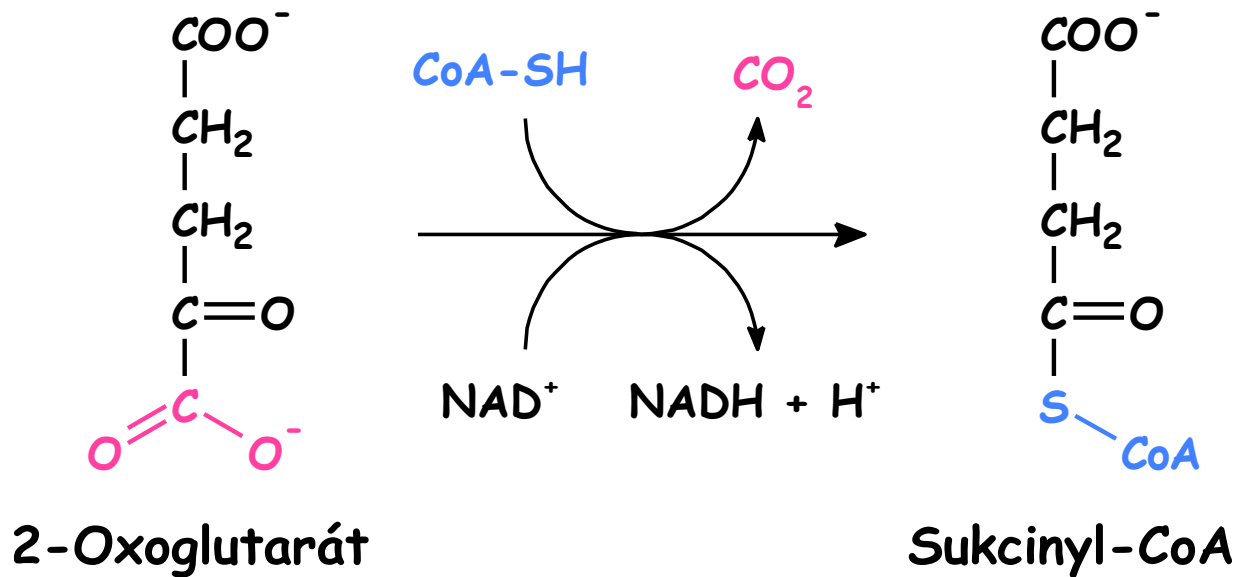




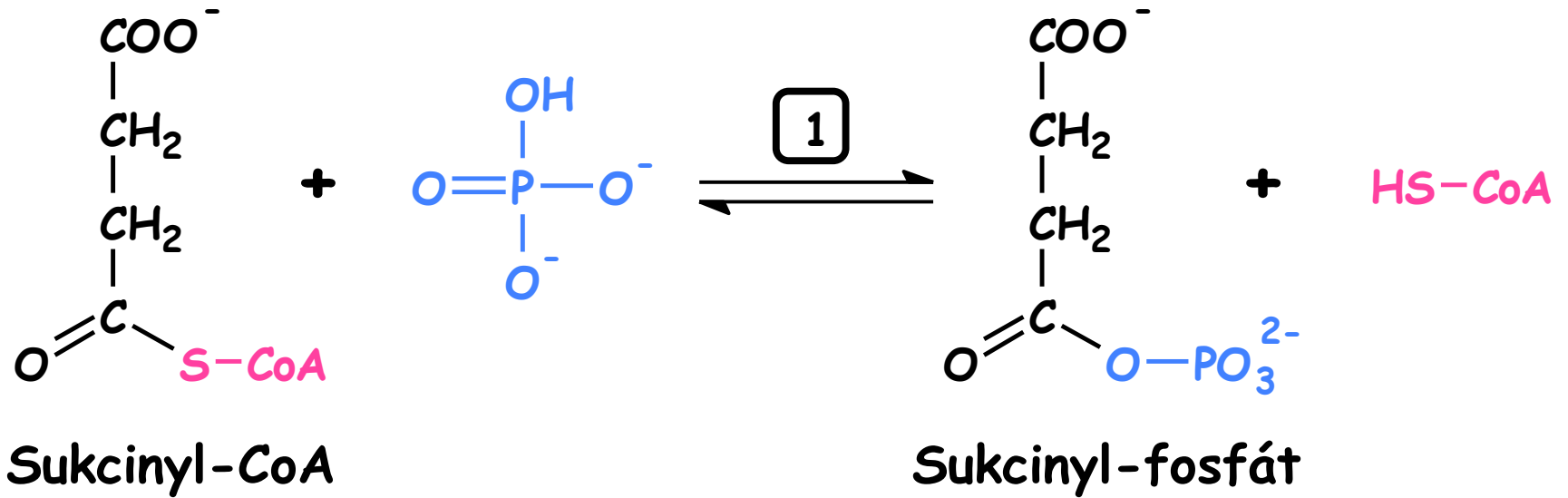
# CC - isocitrátdehydrogenasa.



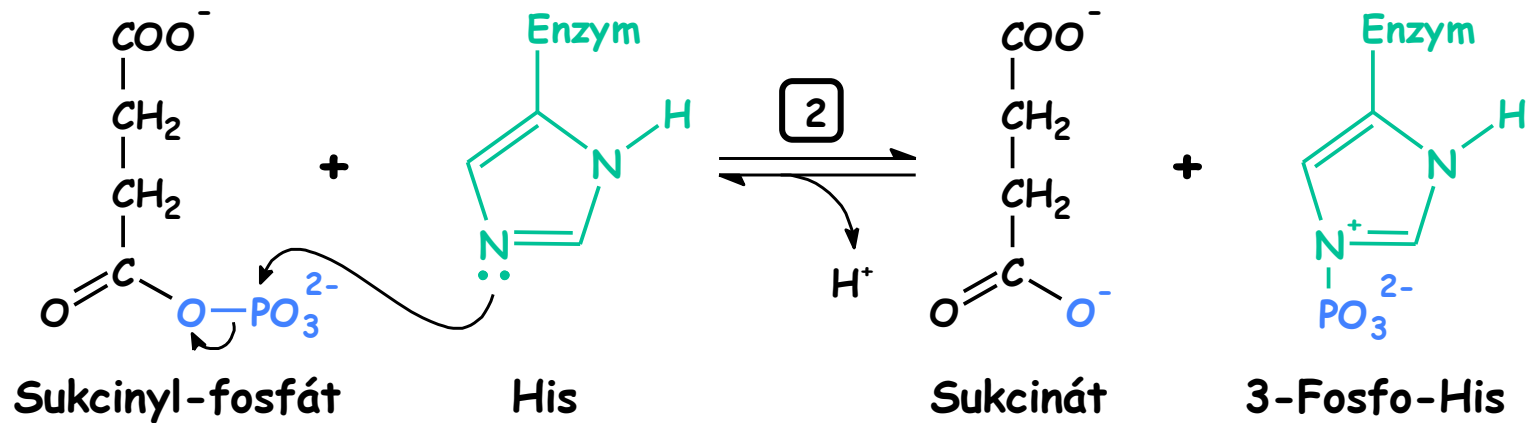
# CC - 2-oxoglutarátdehydrogenasa.



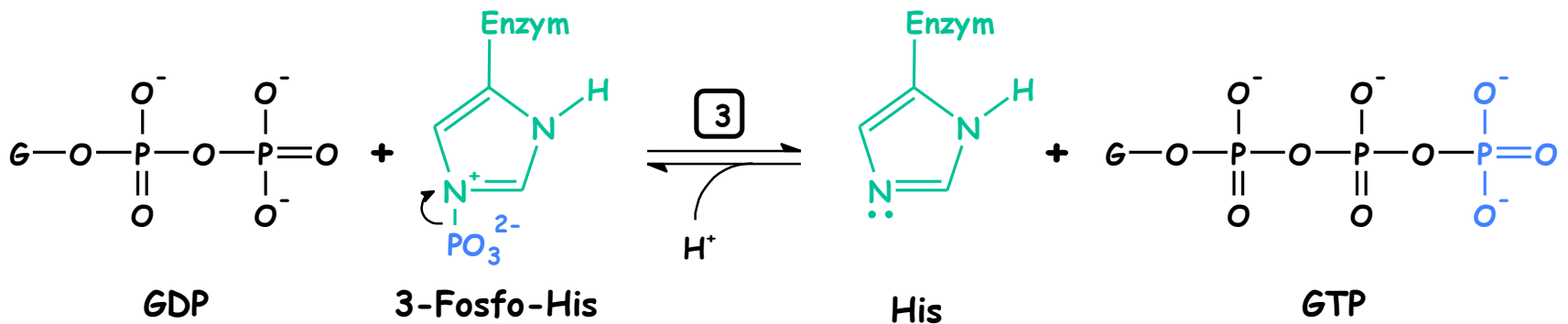
# První fáze sukcinyl-CoA syntetasové reakce.



# Druhá fáze sukcinyl-CoA syntetasové reakce.



# Třetí fáze sukcinyl CoA syntetasové reakce CC.



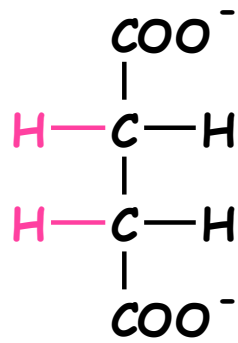
# Sukcinyl-CoA syntetasa (sukcinátthiokinasa).

- Savčí enzym obvykle katalyzuje tvorbu GTP z GDP a  $P_i$ .
- U rostlin a bakterií je to ATP z ADP a  $P_i$ .
- ATP a GTP jsou energeticky ekvivalentní, díky enzymu **nukleosiddifosfátkinasa** dochází k přechodu:
  - $GTP + ADP \rightarrow GDP + ATP \quad \Delta G^\circ = 0 !!$
- Reakce katalyzovaná sukcinyl-CoA syntetasou je další příklad fosforylace na úrovni substrátu (nezávisí na přítomnosti kyslíku).

Reakce probíhá ve třech stupních:

- A) Sukcinyl-CoA reaguje s  $P_i$  za tvorby sukcinylfosfátu a CoA.
- B) Transfer fosfátu z sukcinylfosfátu na His enzymu za uvolnění sukcinátu.
- C) Fosfát z enzymu je přenesen na GDP za tvorby GTP.
- V tomto bodě citrátového cyklu je acetyl kompletně oxidován na dvě  $CO_2$ , dva NADH a GTP. Další část cyklu je převod sukcinátu na oxaloacetát

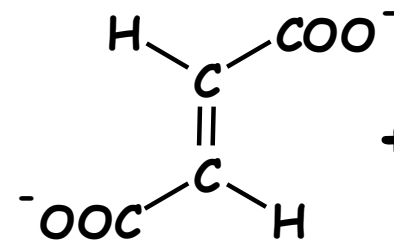
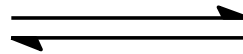
# CC - sukcinátdehydrogenasa.



Sukcinát

+

E-FAD

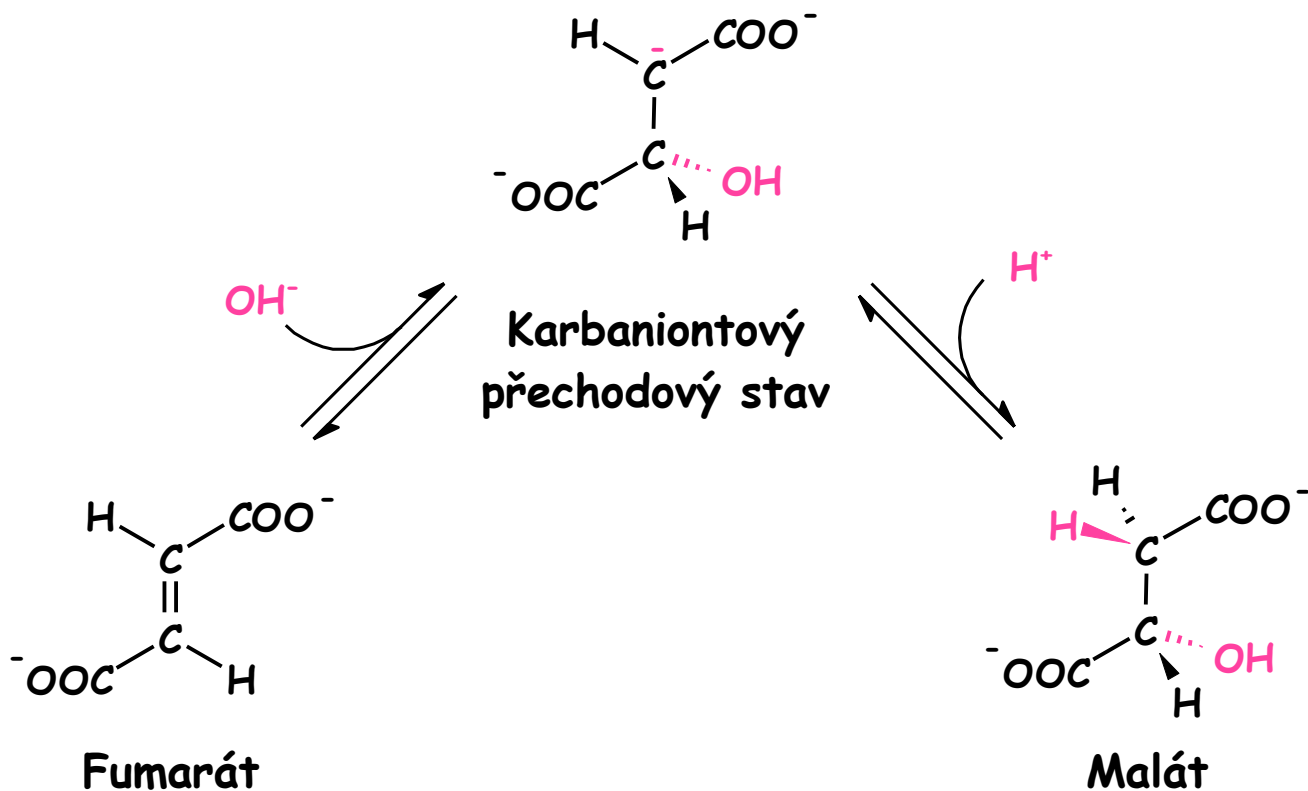


+

E-FADH<sub>2</sub>

Fumarát

# Mechanismus sukcinátdehydrogenasy.





# Pyruvátdehydrogenasový komplex.

Lokalizace komplexu: játra

Přenos dvouhlíkatých produktů mezi komponentami komplexu: alifatická raménka s SH koncem.

Koenzymy: FAD, NAD<sup>+</sup>, CoA, lipoamid (amid kys. lipoové), thiamindifosfát(TPP)

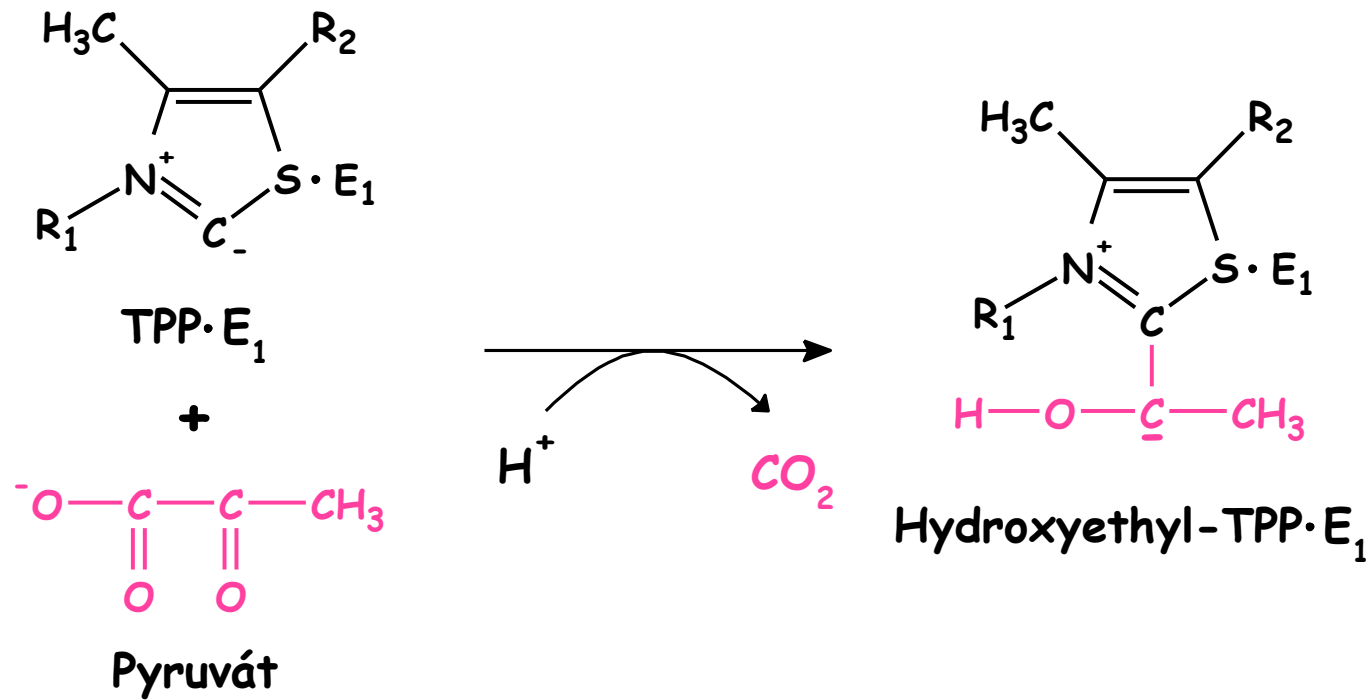
Komponenty enzymového komplexu:

E<sub>1</sub> pyruvátdehydrogenasa (oxidativní dekarboxylace pyruvátu)

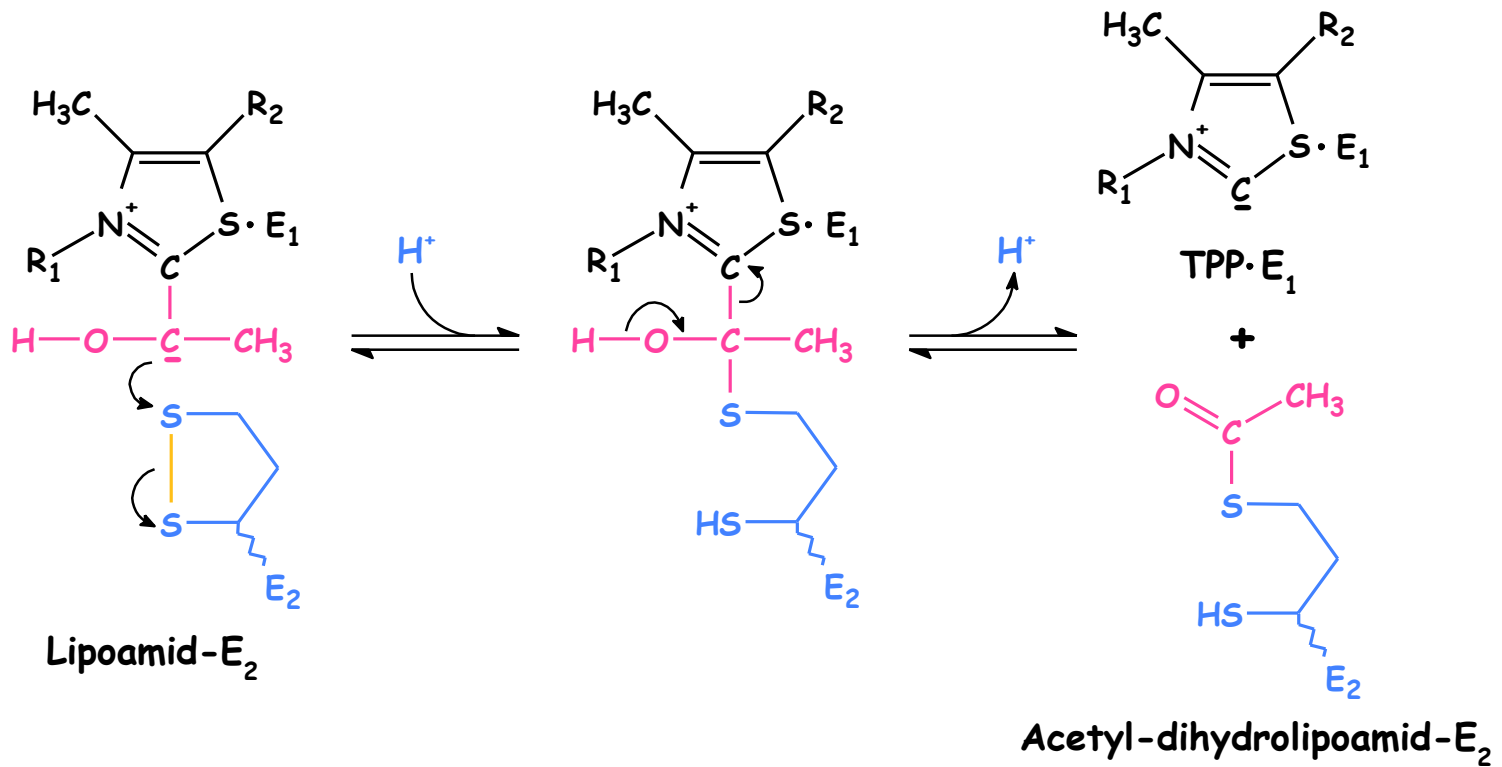
E<sub>2</sub> dihydrolipoyltransacetylasa (přenos acetylu na CoA)

E<sub>3</sub> dihydrolipoyldehydrogenasa (regenerace oxid. formy lipoamidu)

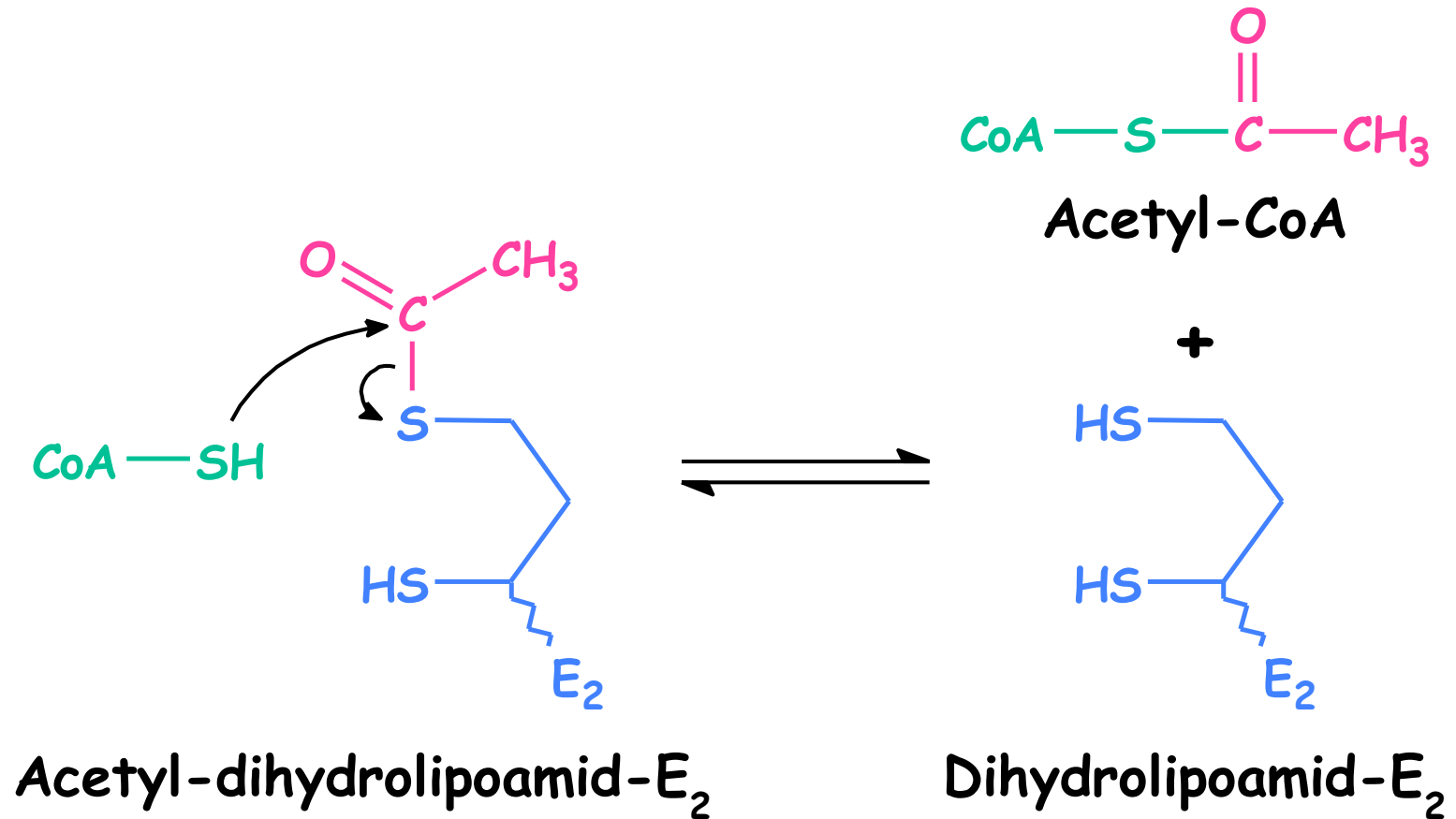
# Pyruvátdehydrogenasa (E<sub>1</sub>).



# Dihydrolipoyltranacetylase (E<sub>2</sub>)

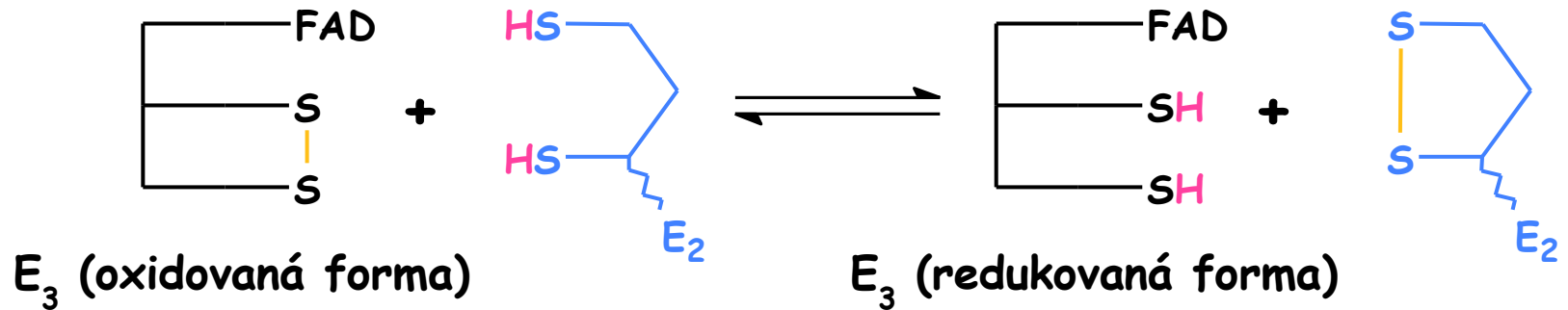


# Transesterifikace (E<sub>2</sub>).

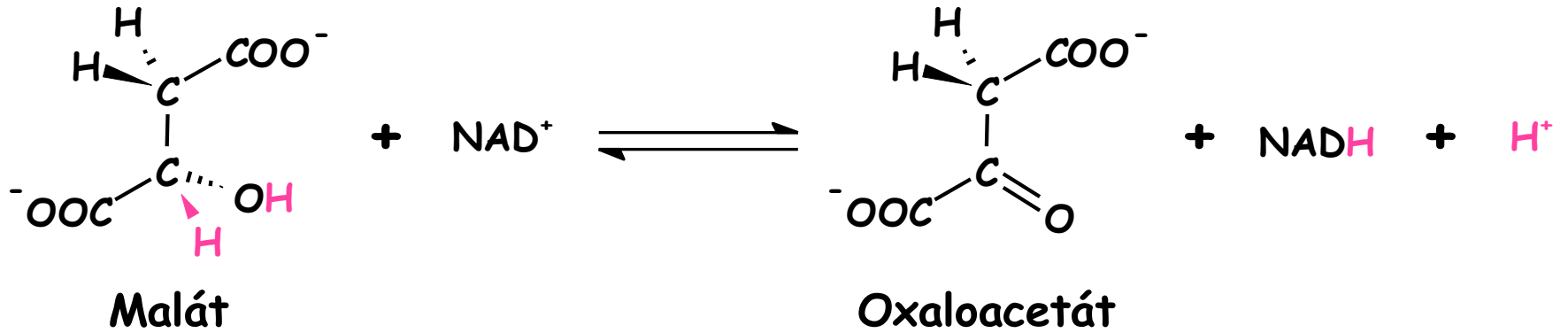


# Dihydrolipoyldehydrogenasa (E<sub>3</sub>).

Regenerace lipoamidu.



# CC - malátdehydrogenasa.



## Pyruvátdehydrogenasový komplex je regulován allostericky a reversibilní fosforylací.

Konečným produktem glykolýzy s uhlíkovým řetězcem je pyruvát. Před vstupem do CC musí být oxidačně převeden na acetyl CoA a  $\text{CO}_2$ . Děje se tak v játrech na pyruvátdehydrogenasovém komplexu. Proces převodu pyruvátu na acetyl CoA je ireversibilní což je příčinou, že acetyl CoA nemůže být převeden zpět na glukosu.

Pyruvátdehydrogenasový komplex je inhibován v transacetylasové části ( $\text{E}_2$ ) nadbytkem produktu - acetylem CoA. Další regulace je na části dihydrolipoyldehydrogenase ( $\text{E}_3$ ), který inhibuje NADH.

Klíčovou reakcí regulace komplexu u eukaryot je kovalentní modifikace komplexu fosforylací.

Fosforylace pyruvátdehydrogenasové komponenty ( $\text{E}_1$ ) katalyzovaná specifickou kinasou zastaví aktivitu komplexu úplně. K obnovení aktivity dojde působením specifické fosfatasy.

# Regulace pyruvátdehydrogenasového komplexu.

Zjednodušeně:

Rostoucí poměry  $ATP/ADP$ ,  $NADH/NAD^+$  a acetyl CoA/CoA vyvolávají fosforylaci a tím deaktivaci komplexu.

Pyruvátdehydrogenasový komplex je vypínán za situace, kdy je dostatek energie a biosyntetických jednotek.

Na druhé straně: pyruvát a ADP jsou signály nízkého stavu energie aktivující dehydrogenasu inhibicí kinasy.

Insulin urychluje tvorbu acetyl CoA stimulací defosforylace komplexu. Následkem toho je glukosa převáděna na pyruvát.

Důležitost této kovalentní kontroly můžeme demonstrovat na lidech, kteří trpí deficitem fosfatasy.

Pyruvátdehydrogenasa je normálně fosforylována a tedy neaktivní, glukosa je převáděna na kyselinu mléčnou. Dochází k neregulované laktátové acidose - mnohé tkáně jsou nefunkční (pH mimo optimum).



# Regulace citrátového cyklu.

Citrátový cyklus je nastaven tak, aby optimálně produkoval potřebný ATP.

Primární kontrolními reakcemi CC jsou allosterické regulace enzymů:

Isocitrátdehydrogenasy.

2-Oxoglutarátdehydrogenasy.

Isocitrátdehydrogenasa je allostericky stimulována ADP což vede ke zvýšení afinity enzymu k substrátům. Kooperují isocitrát,  $\text{NAD}^+$  a  $\text{Mg}^{2+}$ .

NADH naopak inhibuje isocitrátdehydrogenasu vytěsněním  $\text{NAD}^+$ .  
Dalším inhibátorem je ATP.

POZOR: řada stupňů CC využívá  $\text{NAD}^+$  nebo FAD, kterých je dostatek jen, když je hladina energie na nízké úrovni.

## Regulace citrátového cyklu.

Druhým kontrolním místem CC je 2-oxoglutarátdehydrogenasa. Enzym je homologem pyruvátdehydrogenasy a proto i jeho regulace je analogická.

Enzym je inhibován sukcinyl CoA a NADH. Navíc je enzym inhibován vysokým energetickým nábojem - vysoká hladina ATP vede k inhibici enzymu.

U mnoha bakterií je místem inhibice také vstup acetyl CoA do cyklu.

Citrátsynthasa je allostericky inhibována ATP. Působením ATP dochází ke zvýšení hodnoty  $K_m$  pro acetyl CoA !!

Když hladina ATP vzroste je méně enzymu saturováno acetyl CoA a vytváří se méně citrátu.

# Citrátový cyklus jako zdroj biosyntetických prekurzorů.

Meziprodukty CC slouží jako prekurzory řady biosyntéz.

Oxaloacetát - aminotransferasová reakce - aspartát. Z Asp další aminokyseliny, pyrimidiny a puriny.

Oxaloacetát - glukoneogeneze - resyntéza glukosy.

Sukcinyl CoA - porfyriny, hem, chlorofyl.

2-Oxoglutarát - Glu, další aminokyseliny, puriny.

Citrát - mastné kyseliny, steroly.

Souhrnně je odnětí meziproduktů označeno jako reakce kataplerotické na rozdíl od reakcí anaplerotických.

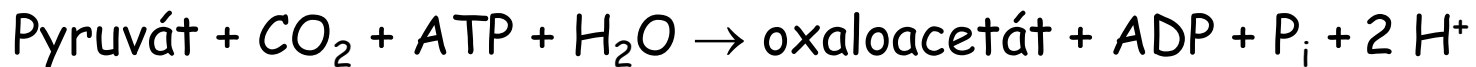
Anaplerotické reakce naopak doplňují meziprodukty metabolických drah. U CC např. karboxylace pyruvátu získáme oxaloacetát, který reakcí s citrátsynthasou poskytne citrát.

Meziprodukty CC, pokud jsou využity k biosyntézám, musí být rychle doplněny.

Jak je oxaloacetát doplňován ?

Savci postrádají enzym pro přímou přeměnu acetyl CoA na oxaloacetát nebo kterýkoliv další meziprodukt CC (viz glyoxylátový cyklus u mikroorganismů a rostlin).

Oxaloacetát je doplňován karboxylací pyruvátu - pyruvátkarboxylasou (koenzym biotin).



Pyruvátkarboxylasa je významným enzymem glukoneogeneze.

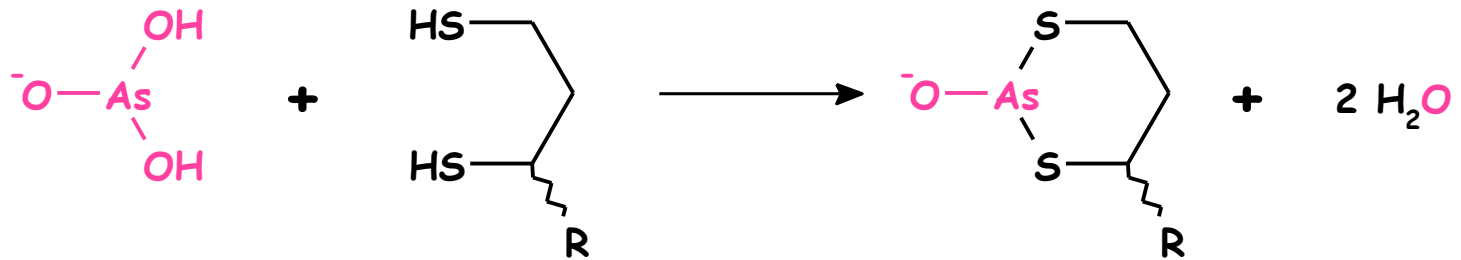
Enzym je aktivován acetyl CoA - signál potřeby oxaloacetátu !

Pokud je hladina energie vysoká je oxaloacetát přeměňován na glukosu.

Při nízké hladině energie doplňuje oxaloacetát meziprodukt CC.

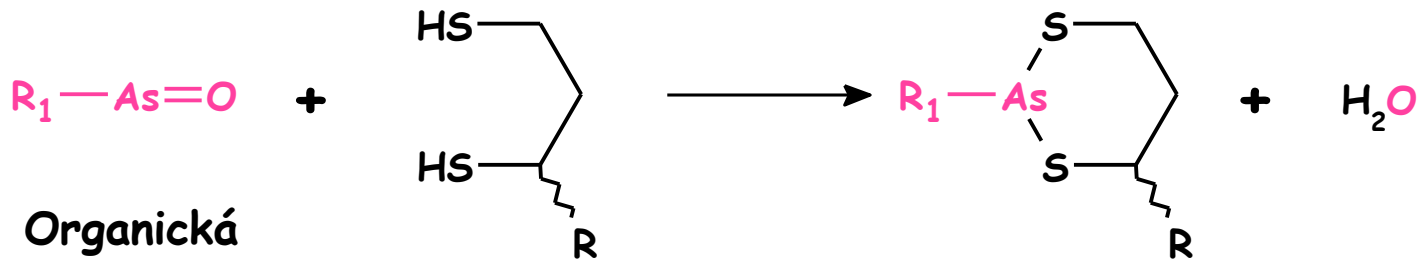
Anaplerotická reakce - může se doplňovat kterýkoliv meziprodukt !!

# Toxicita arsenitanů a organických sloučenin As (inhibice pyruvátdehydrogenasového komplexu - „Marryša“).



Arsenitan

Dihydrolipoamid



Organická  
sloučenina arsenu

## Sir Hans Adolf KREBS (1900-1981)



- 1900 Narozen v Německu.
- 1918 Nastoupil na studium mediciny.
- 1923 Absolvoval studium mediciny.
- 1925 Získal Ph.D. na univerzitě v Hamburku.
- 1932 Objev močovinového cyklu.
- 1933 Emigrace do Velké Británie.
- 1937 Objev citrátového cyklu neboli Krebsova cyklu.
- 1945 Ustanoven profesorem na univerzitě v Sheffieldu.
- 1953 Udělena Nobelova cena v oboru „Fyziologie a lékařství“.
- 1954 Profesor na univerzitě v Oxfordu.
- 1958 Povýšen do šlechtického stavu (Sir).
- 1981 Zemřel v Oxfordu, VB.