

C5720 Biochemie

22_Citrátový cyklus

Obsah

- Citrátový cyklus, reakce, význam, energetická bilance.
- Anabolický význam, anaplerotické reakce, glyoxylátový cyklus.
- Praktické aplikace, technologické využití.

Citrátový cyklus

- **Synonyma: cyklus trikarboxylových kyselin - TCA, Krebsův cyklus**
- Katabolický pochod (nejen, ale převážně)
- Spojnice metabolismu sacharidů, lipidů a aminokyselin
- Odbourává aktivní acetát vzniklý
 - oxidační dekarboxylací pyruvátu (pocházejícího z glykolýzy)
 - nebo β -oxidací mastných kyselin – viz příslušná kapitola
- Vstupy a výstupy dalších metabolitů
- Lokalizován v mitochondriální matrix
 - Úzká vazba na respirační řetězec
 - Aerobní podmínky – reoxidace redukováných kofaktorů

Cyklický průběh

- Reakce acetylCoA s oxalacetátem – citrát
- Přeměny dehydrogenacemi a dekarboxylacemi
 - Degradace acetátu
 - Formálně $\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} = 2 \text{CO}_2 + 8 \text{H}$
 - Produkce redukovaných kofaktorů – vodík
 - Uhlík a kyslík jako CO_2
- Výstup startovní molekuly oxalacetátu
- Formulován H. Krebsem (Oxford 1937), NC 1953
 - Dílčí zjištění již dříve – A. Szent-Györgyi, F. Knoop, C. Martius

Průběh TCA

Enzymy

1 citrátsyntasa

2 akonitasa

3 isocitrát DH

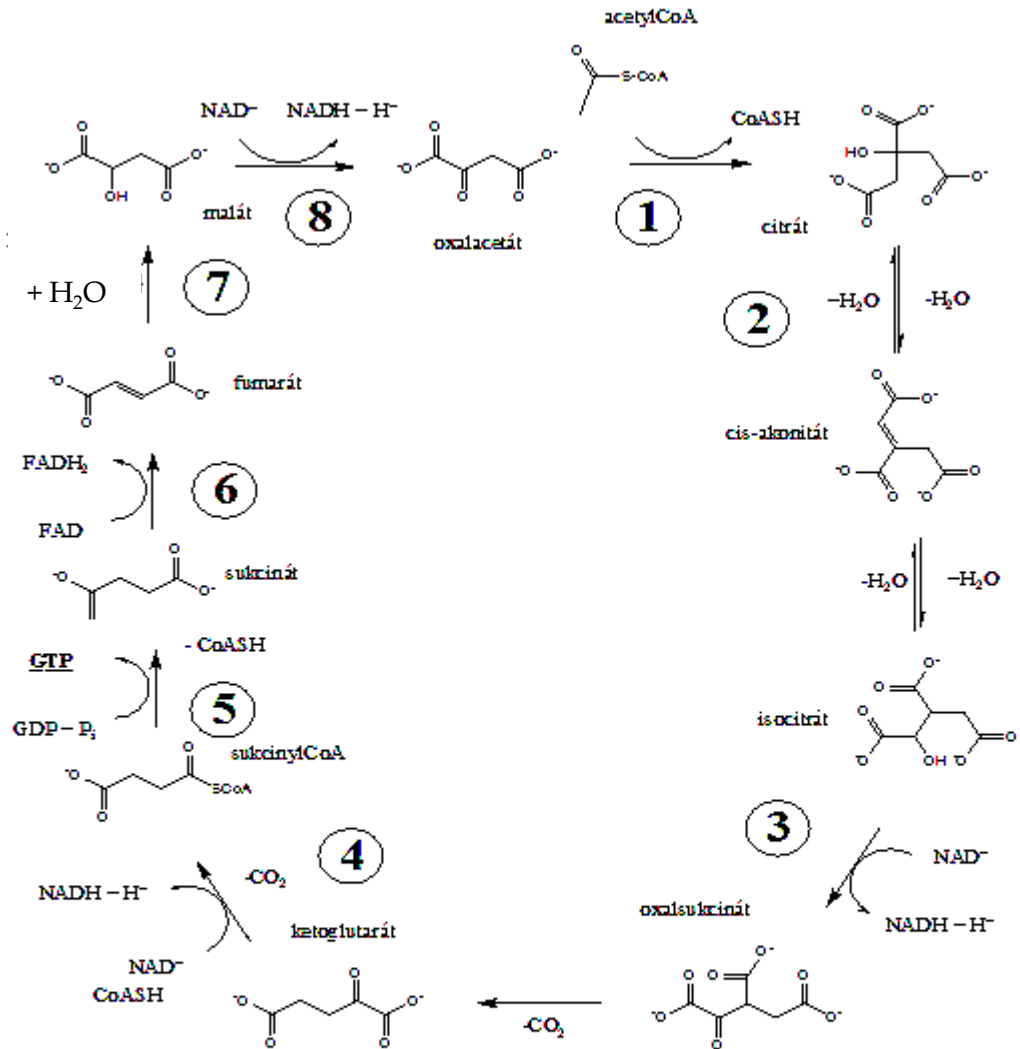
4 α -ketoglutarát DH

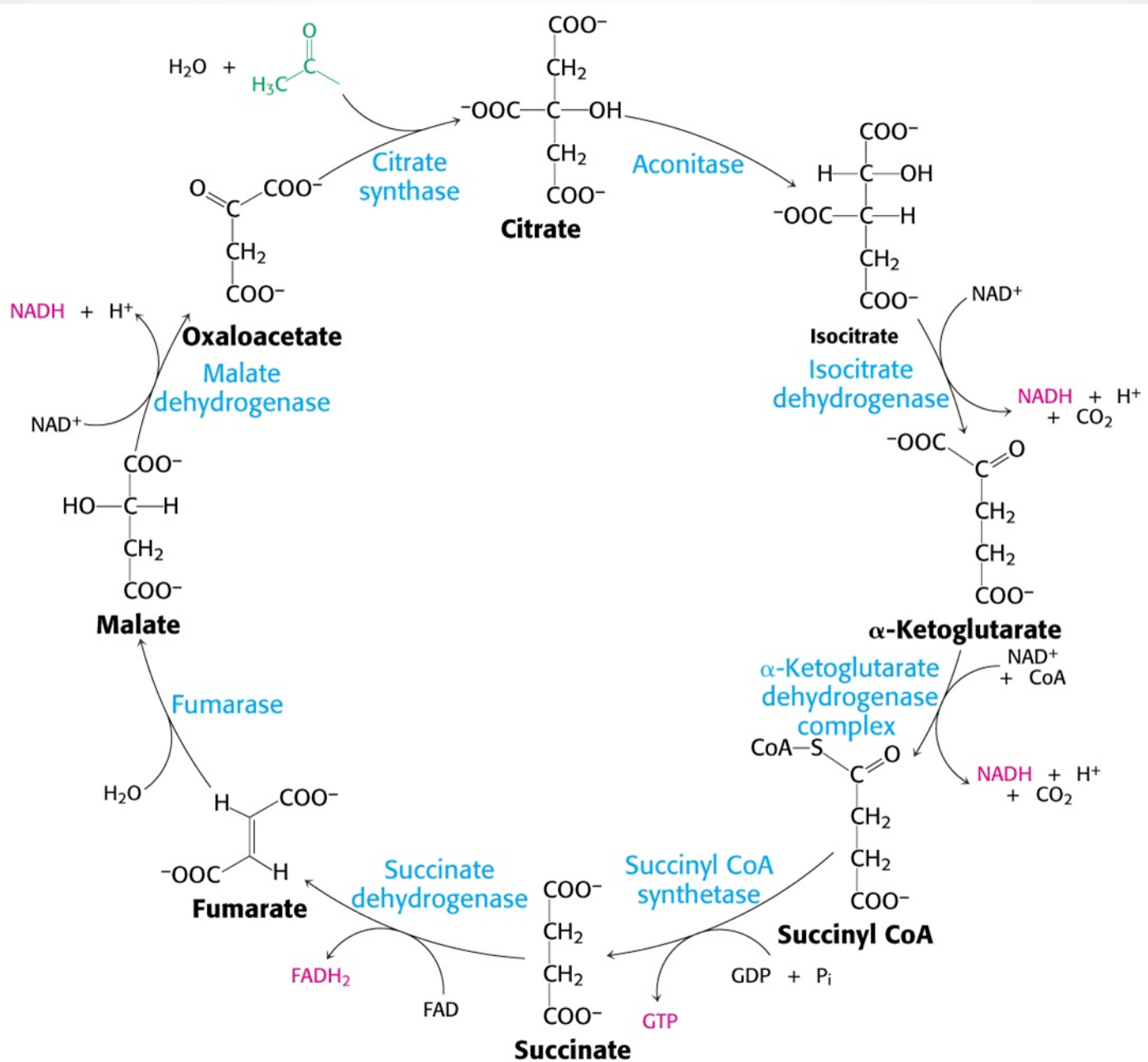
5 sukcinylCoA
syntetasa

6 sukcinát DH

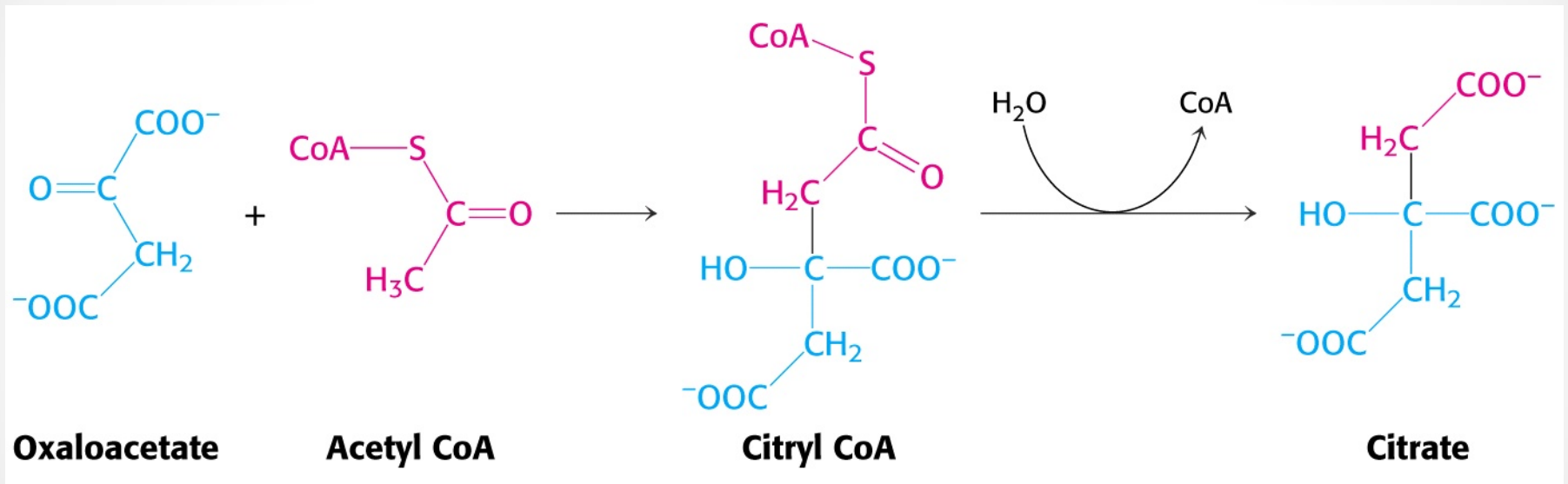
7 fumarasa

8 malát DH



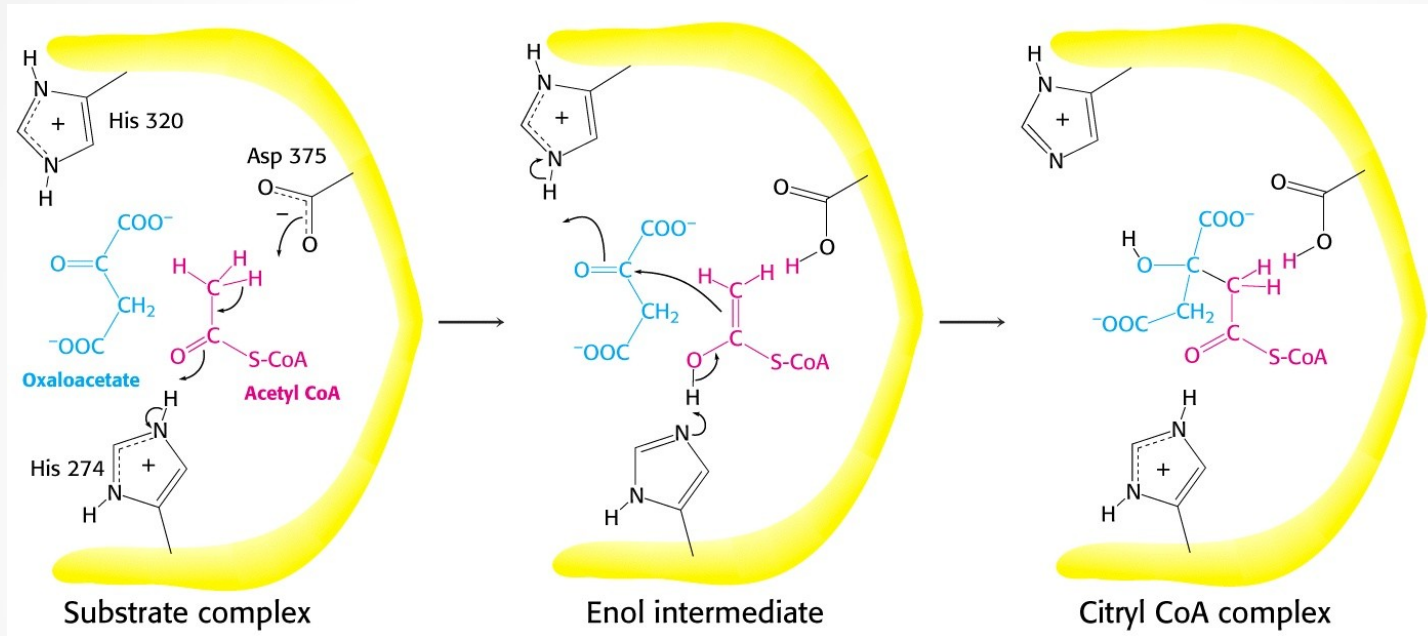


Citrát syntasa



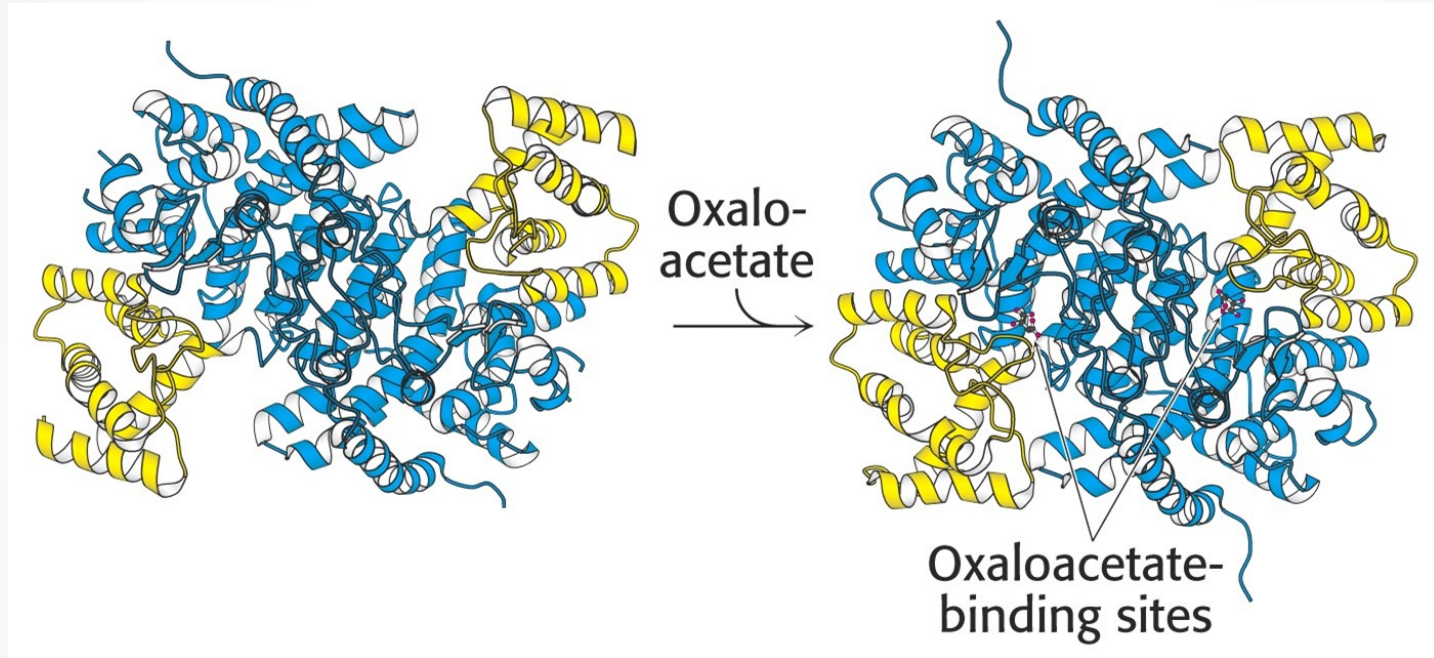
- Bez účasti ATP
 - Aldolová kondensace

Citrát syntasa



- Uspořádaný mechanismus
 - nejprve vazba oxalacetátu
 - pak acetylCoA
 - hydrolytické místo se zformuje nakonec
 - nehydrolyzuje se acetylCoA, ale citrylCoA

Citrát syntasa



- Homodimer (savci)
 - podjednotky po 49 kDa
 - změna konformace

Rovnováhy

- Citrate synthase
- $K_{\text{obs}} = \frac{[\text{Citrate}][\text{CoA}]}{[\text{Oxaloacetate}][\text{Acetyl-CoA}][\text{H}_2\text{O}]} = 2.24 \pm 0.11 \times 10^6$
- Citrate lyase
- $K_{\text{obs}} = \frac{[\text{Citrate}]}{[\text{Oxaloacetate}][\text{Acetate}]} = 2.22 \pm 0.16 \text{ m}^{-1} \quad - 28,4 \text{ kJ/mol}$
- Ovlivněno $[\text{Mg}^{2+}]$

Rovnováhy

- 1. *Citrate synthase*, $\Delta G^{0'} = -34.2$ kJ/mol,
- 2. *Aconitase* $\Delta G^{0'} = + 6.4$ kJ/mol
- 3. *Isocitrate dehydrogenase* $\Delta G^{0'} = - 20.9$ kJ/mol
- 4. *-Ketoglutarate dehydrogenase* $\Delta G^{0'} = -33.5$ kJ/mol
-
- 5. *Succinyl-CoA synthetase* $\Delta G^{0'} = -4.0$ kJ/mol
- 6. *Succinate dehydrogenase* $\Delta G^{0'} = -1.4$ kJ/mol
- 7. *Fumarase* $\Delta G^{0'} = -3.8$ kJ/mol
- 8. *Malate dehydrogenase* $\Delta G^{0'} = +29.7$ kJ/mol

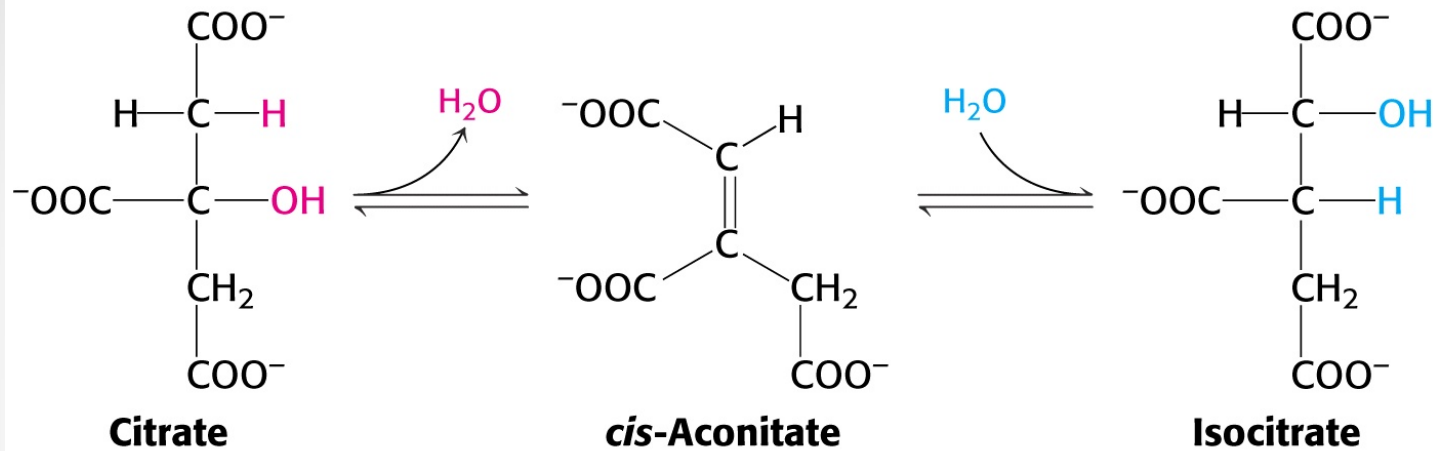
Dílčí kroky TCA

TABLE 17.2 Citric acid cycle

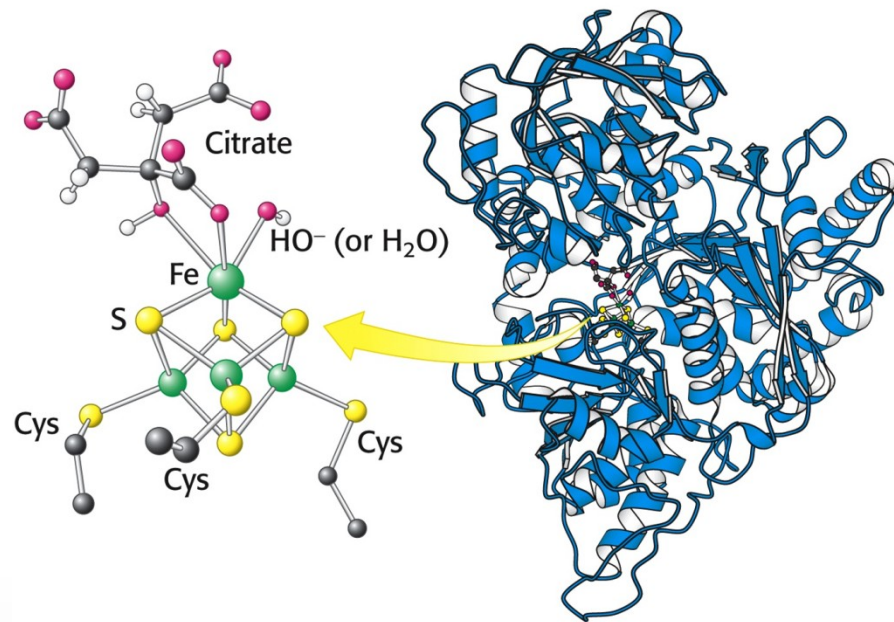
Step	Reaction	Enzyme	Prosthetic group	Type*	ΔG°	
					kcal mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹
1	Acetyl CoA + oxaloacetate + H ₂ O \longrightarrow citrate + CoA + H ⁺	Citrate synthase		a	-7.5	-31.4
2a	Citrate \rightleftharpoons <i>cis</i> -aconitate + H ₂ O	Aconitase	Fe-S	b	+2.0	+8.4
2b	<i>cis</i> -Aconitate + H ₂ O \rightleftharpoons isocitrate	Aconitase	Fe-S	c	-0.5	-2.1
3	Isocitrate + NAD ⁺ \rightleftharpoons α -ketoglutarate + CO ₂ + NADH	Isocitrate dehydrogenase		d + e	-2.0	-8.4
4	α -Ketoglutarate + NAD ⁺ + CoA \rightleftharpoons succinyl CoA + CO ₂ + NADH	α -Ketoglutarate dehydrogenase complex	Lipoic acid, FAD, TPP	d + e	-7.2	-30.1
5	Succinyl CoA + P _i + GDP \rightleftharpoons succinate + GTP + CoA	Succinyl CoA synthetase		f	-0.8	-3.3
6	Succinate + FAD (enzyme-bound) \rightleftharpoons fumarate + FADH ₂ (enzyme-bound)	Succinate dehydrogenase	FAD, Fe-S	e	~0	0
7	Fumarate + H ₂ O \rightleftharpoons L-malate	Fumarase		c	-0.9	-3.8
8	L-Malate + NAD ⁺ \rightleftharpoons oxaloacetate + NADH + H ⁺	Malate dehydrogenase		e	+7.1	+29.7

*Reaction type: (a) condensation; (b) dehydration; (c) hydration; (d) decarboxylation; (e) oxidation; (f) substrate-level phosphorylation.

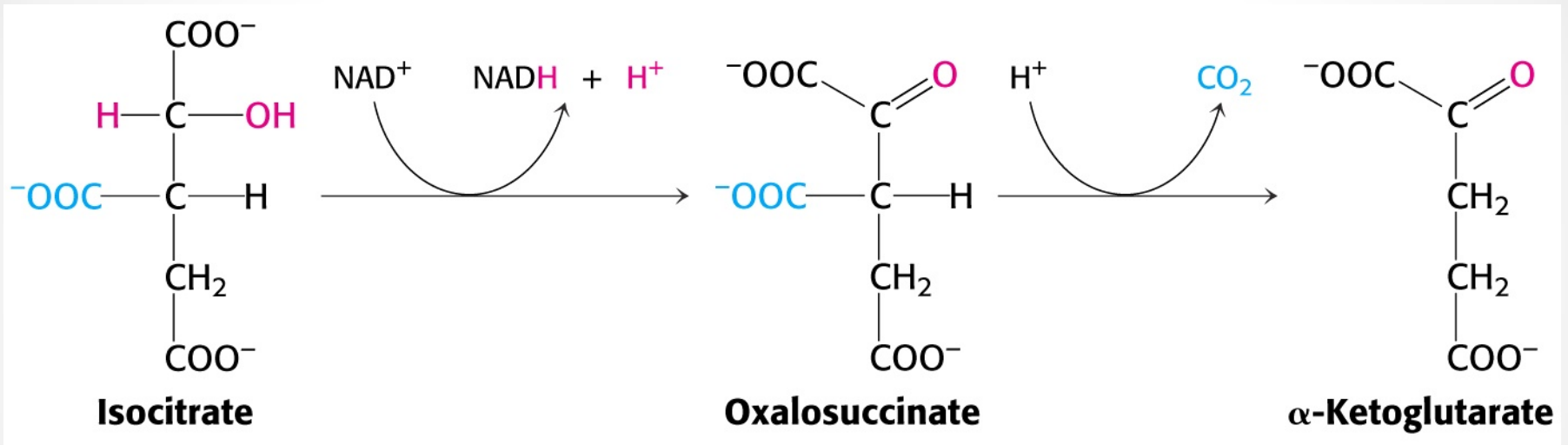
Akonitasa



- Ustavení rovnováhy
- Fe-S protein (klastr Fe_4S_4)
 - vnitřní oxidoredukce (no net)
 - Rovnovážný stav 9:1:2 (dle cMg^{2+})

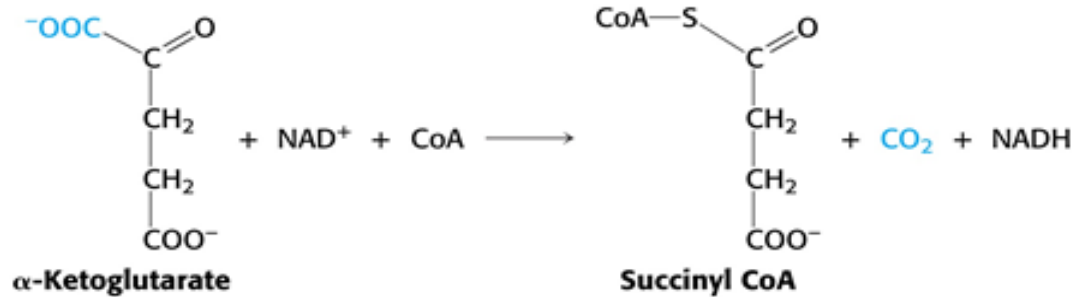


Isocitrát dehydrogenasa



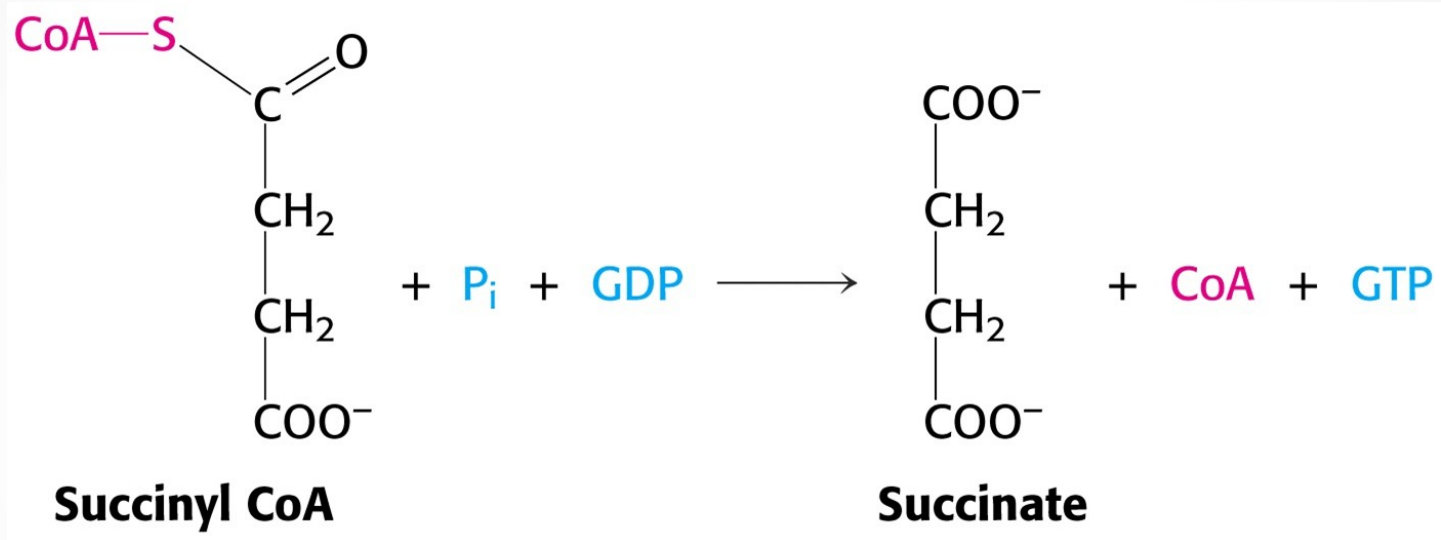
- Dvoustupňová přeměna
 - dehydrogenace
 - dekarboxylace β -karboxylu

α – ketoglutarátdehydrogenasa



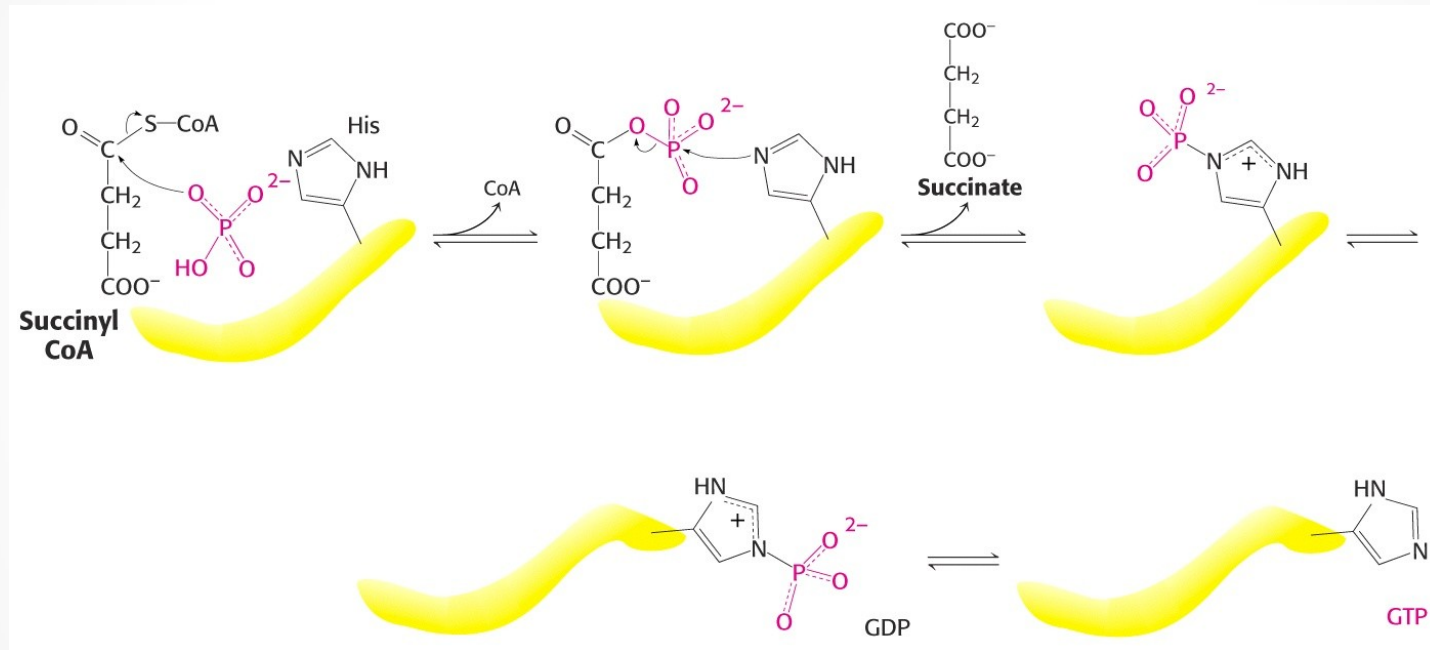
- Multienzymový komplex – analog pyruvát DH
 - Lipoamid DH stejná

SukcinylCoA syntetasa



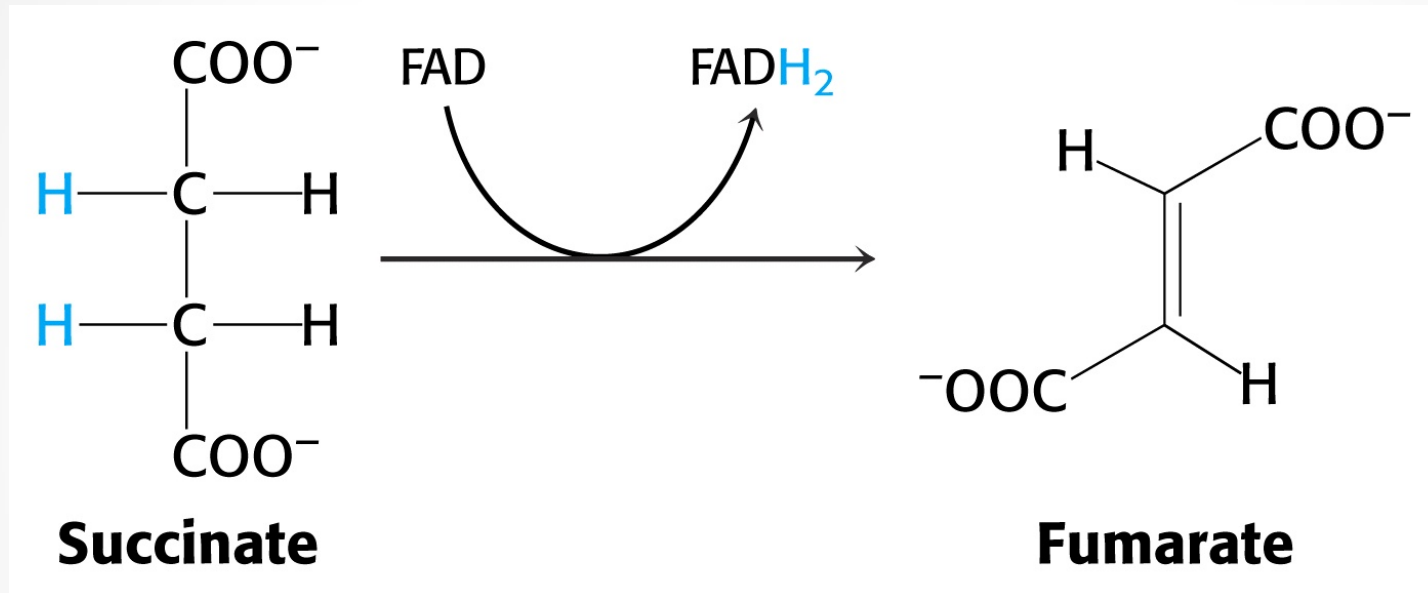
- Opačný směr
- GTP – ekvivalent ATP
 - Speciální funkce GTP

SukcinylCoA syntetasa



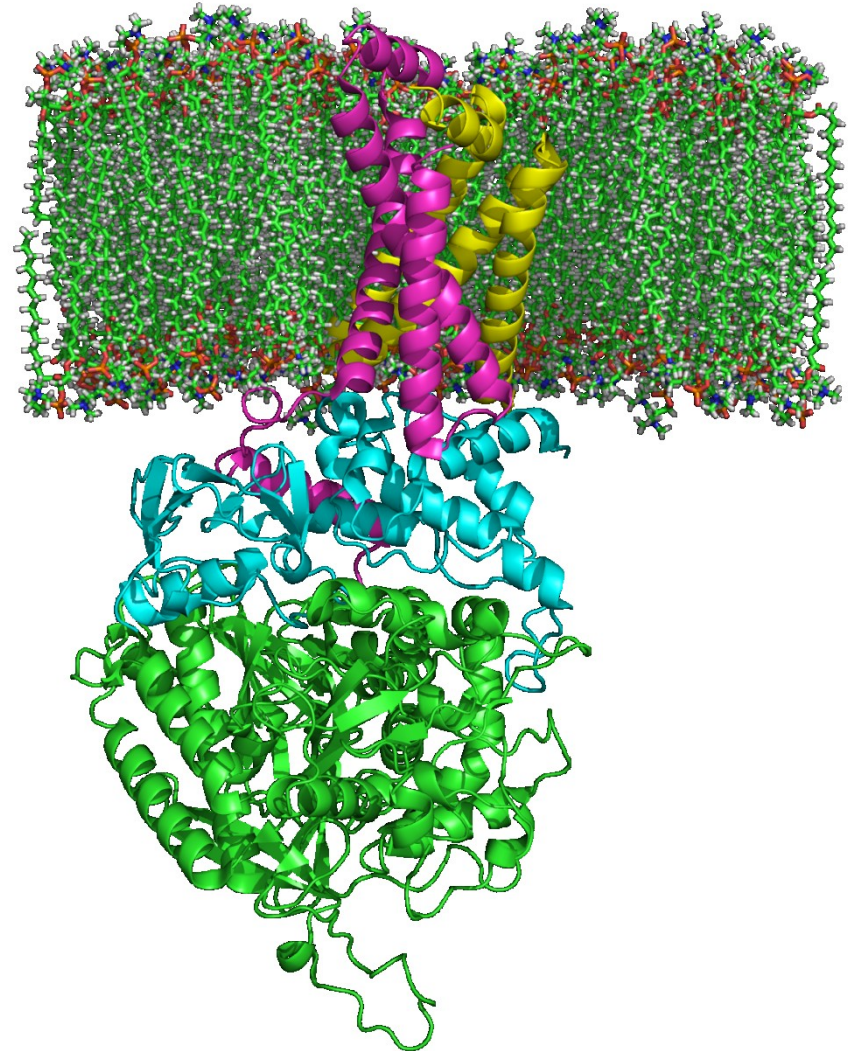
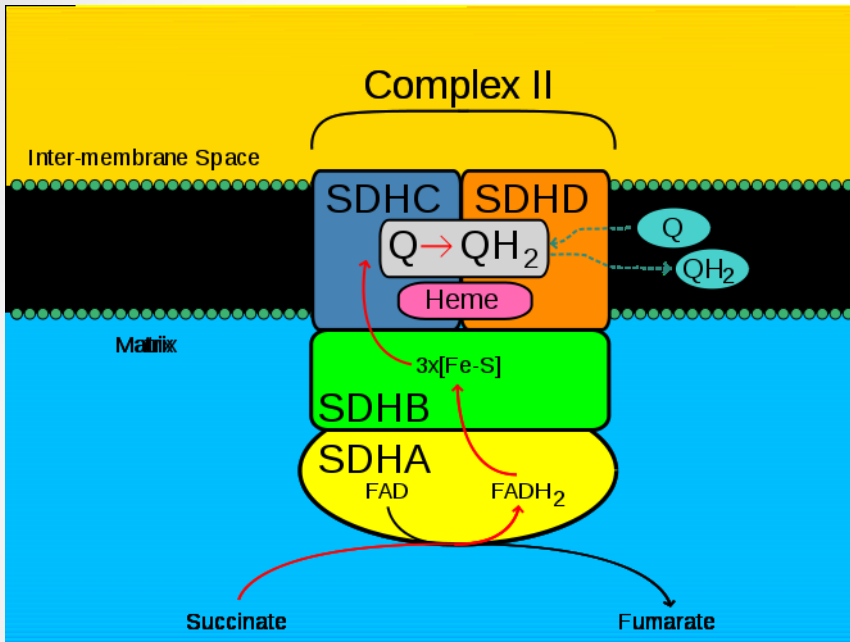
- Účast fosfohistidinu
 - Obecnější mechanismus přenosu $\sim\text{P}$

Sukcinát dehydrogenasa



- Membránově vázaný enzym
 - Ostatní enzymy TCA rozpuštěny v matrix
 - Reoxidace prostetické skupiny FADH₂

Sukcinát dehydrogenasa

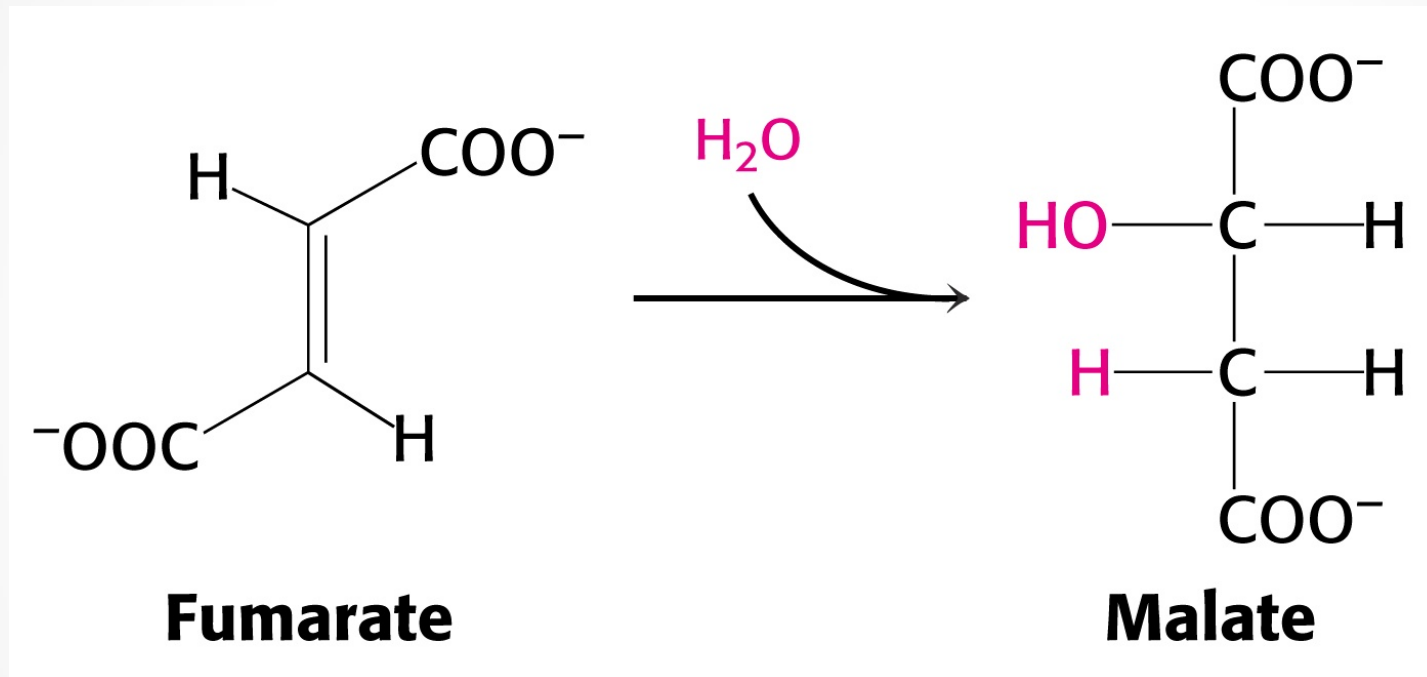


Komplex 4 podjednoto

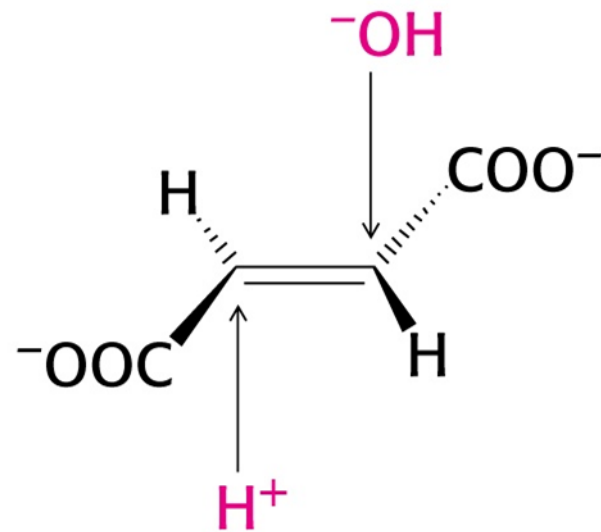
- 2 katalytické
- 2 membránové



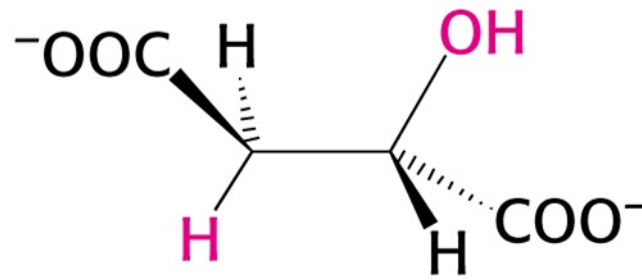
Fumarasa



- Adice vody, lyasa
- Stereospecificita – L-malát



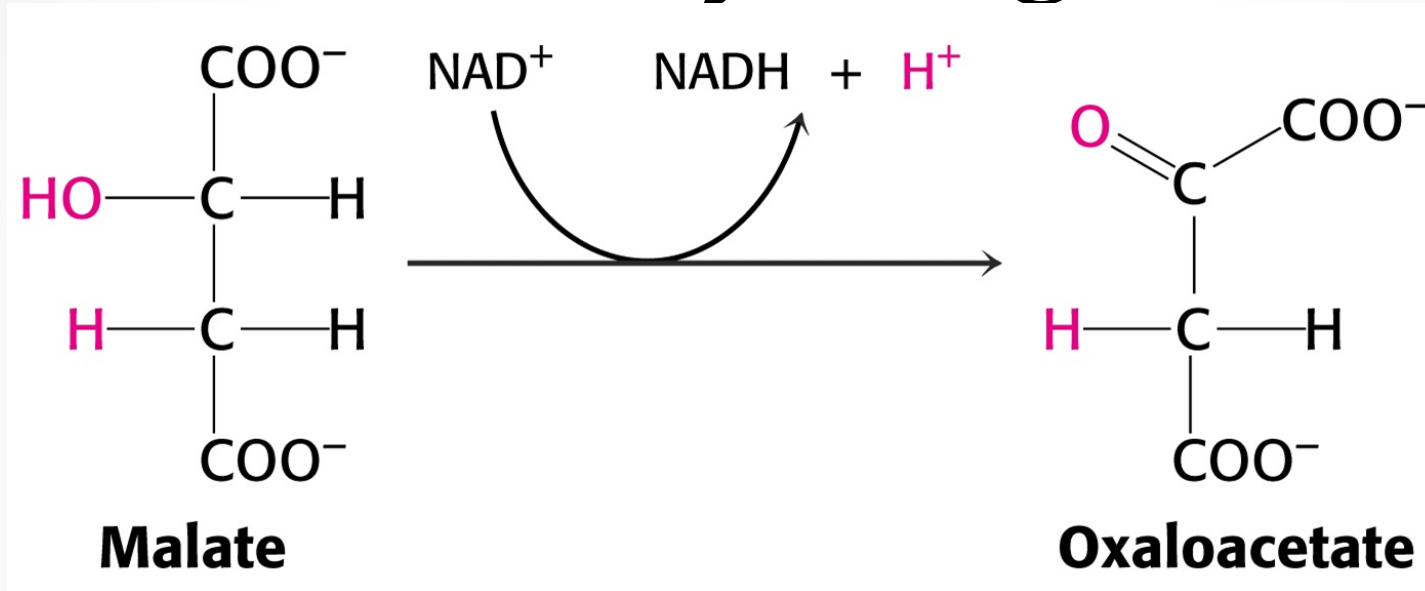
Fumarate



L-Malate

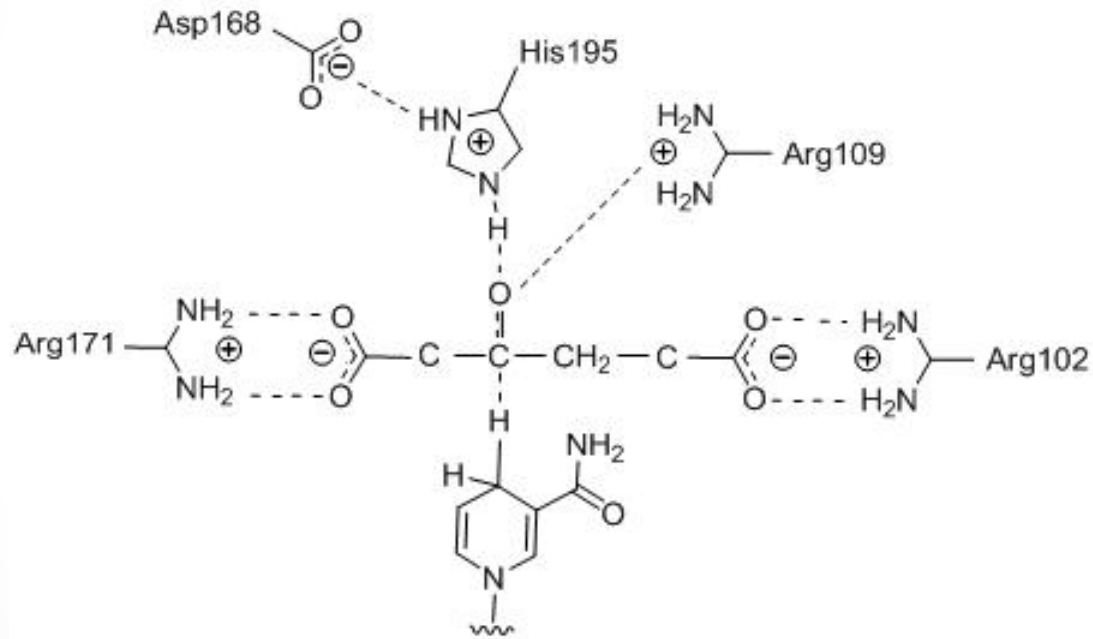
Stereospecificita adice vody
– L-malát

Malát dehydrogenasa



- $K_{\text{obs}} = \frac{[\text{Oxaloacetate}][\text{NADH}]}{[\text{Malate}][\text{NAD}^+]} = 2.86 \pm 0.12 \times 10^{-5}$
- $\Delta G^{0'} = +29.7 \text{ kJ/mol}$

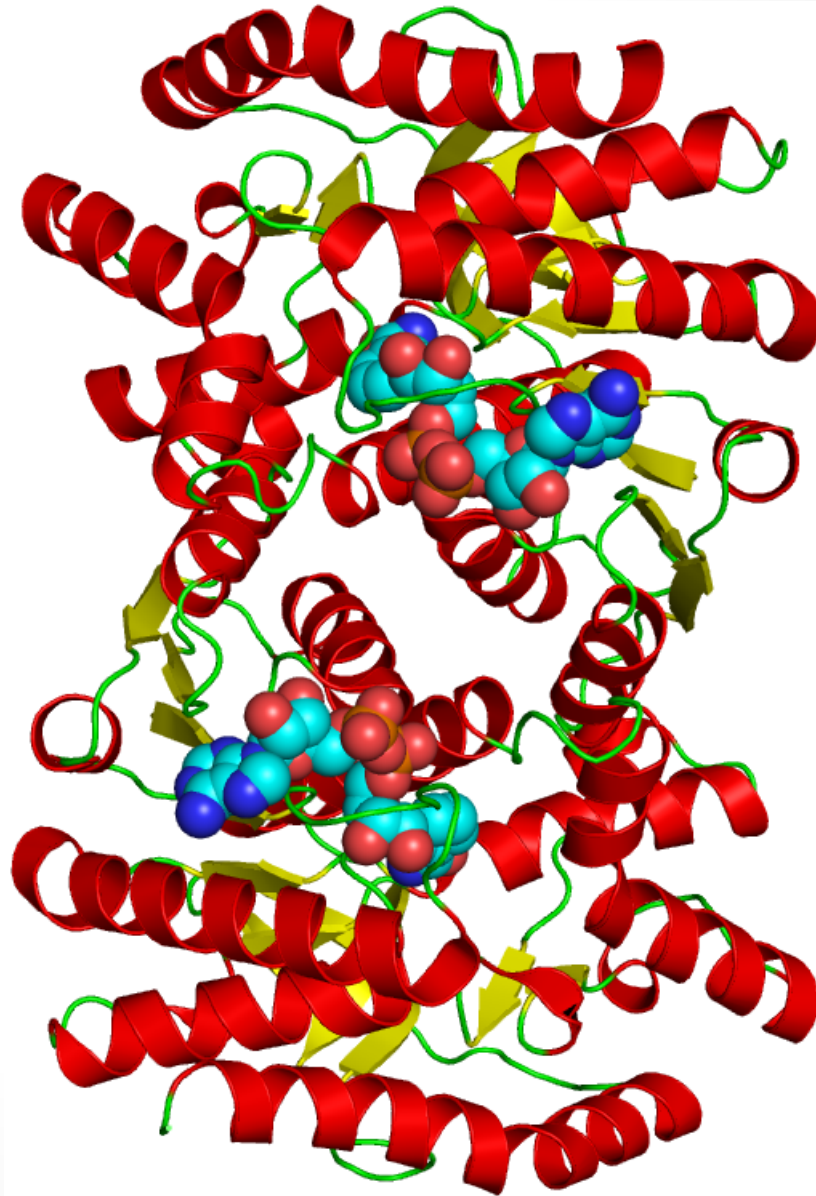
Malát dehydrogenasa



- Aktivní místo MDH

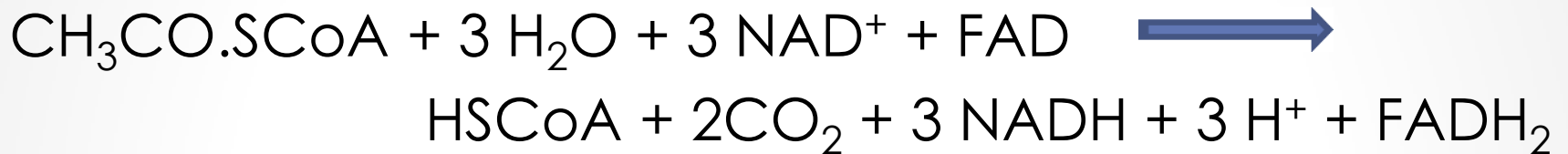
Malát DH

- Homodimer
 - Glykoprotein
 - Vázané oligosacharidy
- Mitochondriální
- vs. cytoplasmatická
 - Fylogeneticky odlišné
 - Prokaryontní předek



Bilance TCA

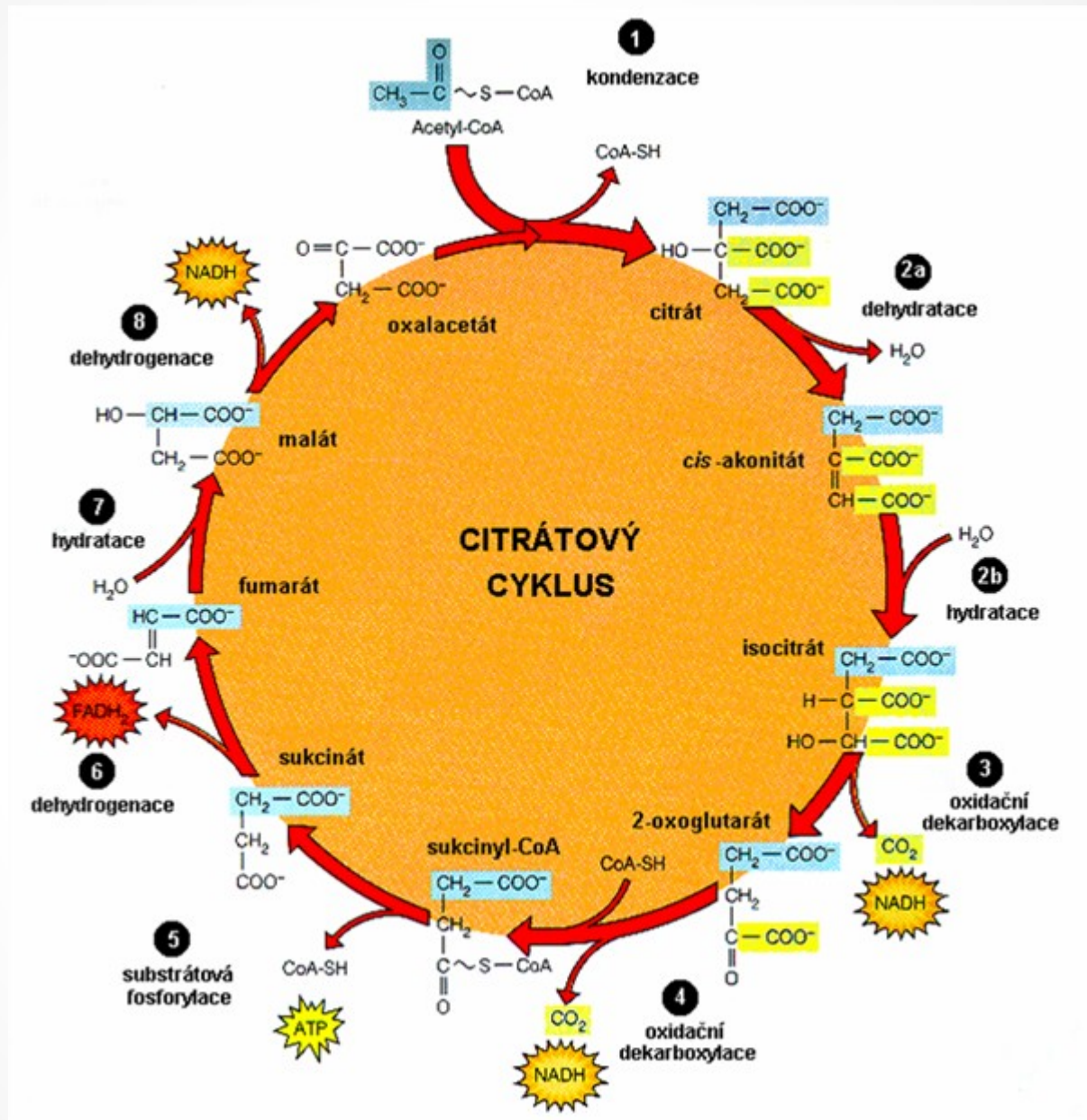
Látková



Energetická

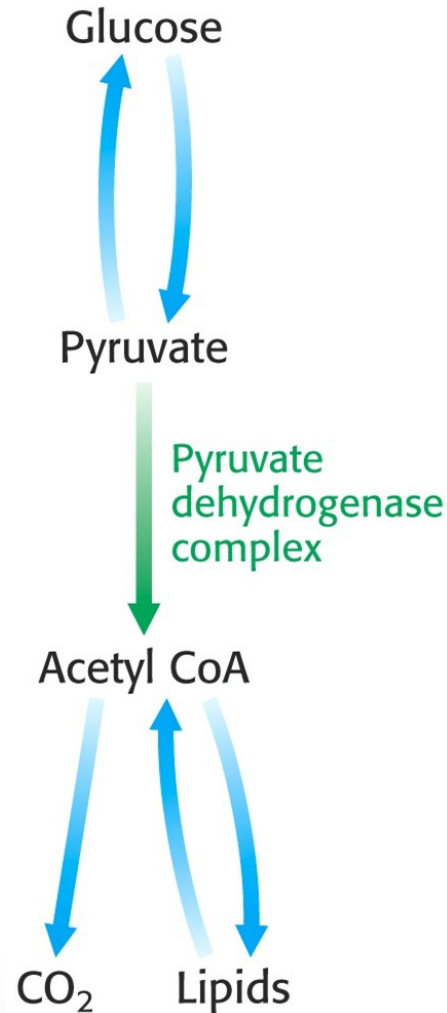
- 1 GTP (2 GTP/glukosu)
- Další energie se získá oxidací NADH a FADH₂

Proces striktně respirační – provázán s dýchacím řetězcem



Metabolické vztahy

- Zjednodušené schema
- Dekarboxylace pyruvátu
 - ireverzibilní proces (živočichové)

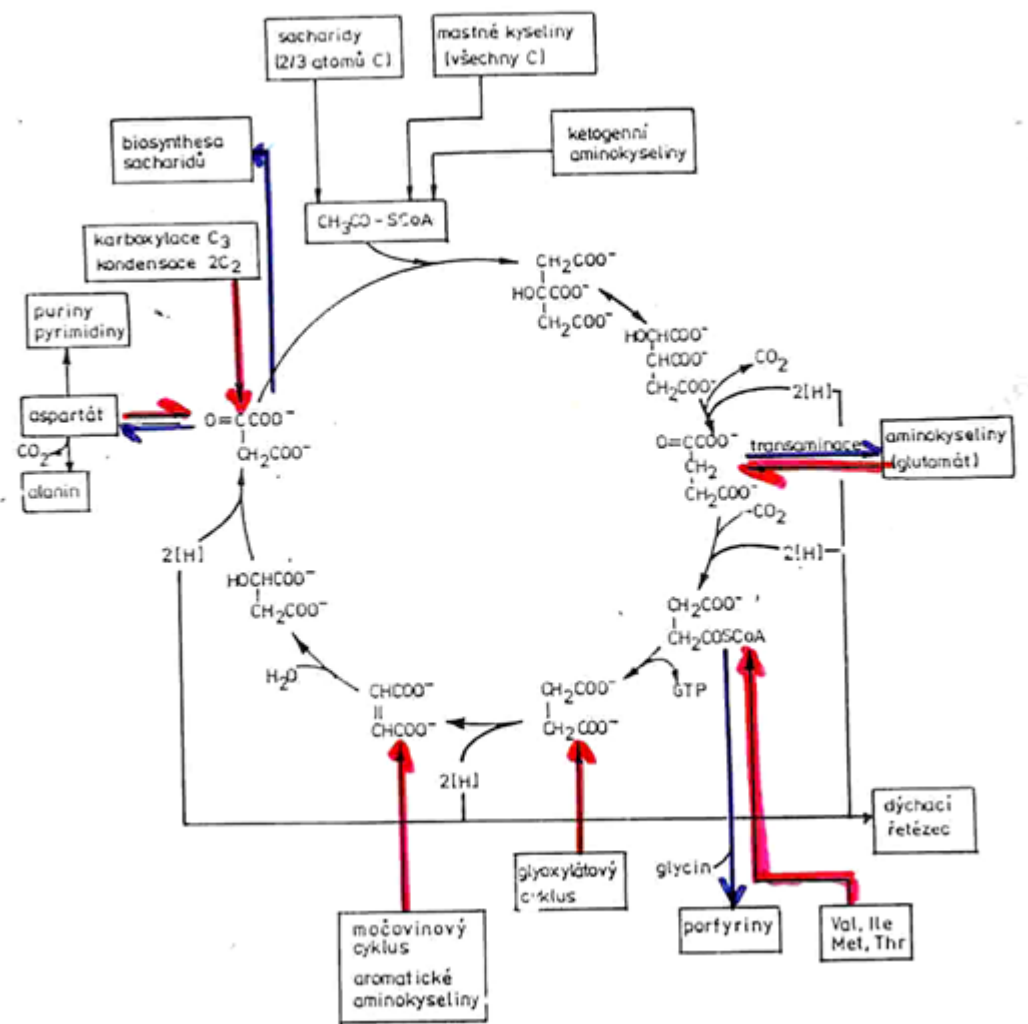


Anabolický význam TCA

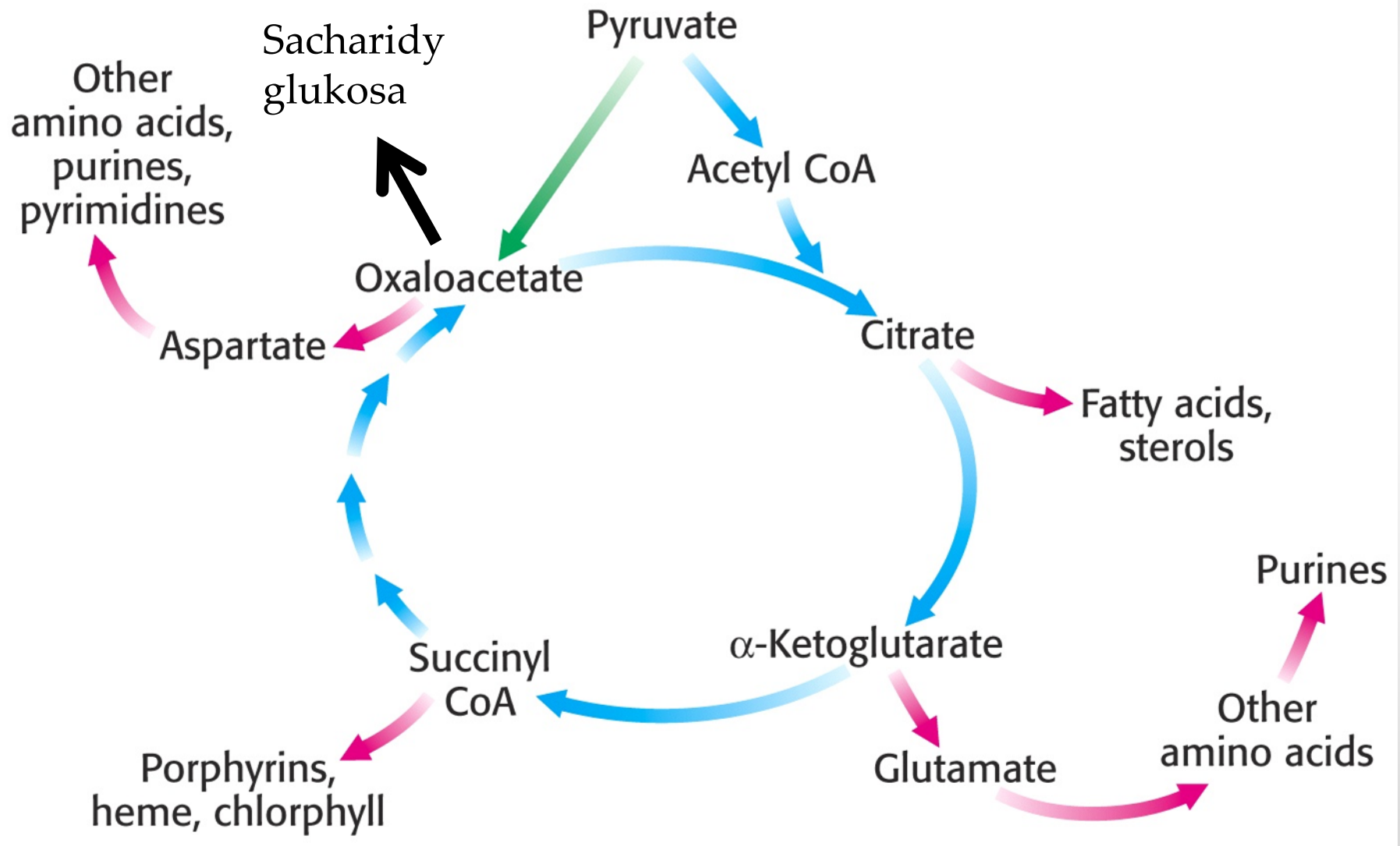
- Vývojově starší
 - Funkce za anaerobních podmínek
 - Adaptace pro aerobní organismy
- U mikroorganismů
 - Neúplný TCA za anaerobiosy
 - Smysl vysloveně katabolický

Vzájemné vztahy mezi TCA a metabolismem sacharidů, lipidů a aminokyselin. Zvláštní význam má biosyntetická dráha syntézy porfyrinů (modře)

Amfibolická povaha cyklu



Biosyntetické vztahy TCA

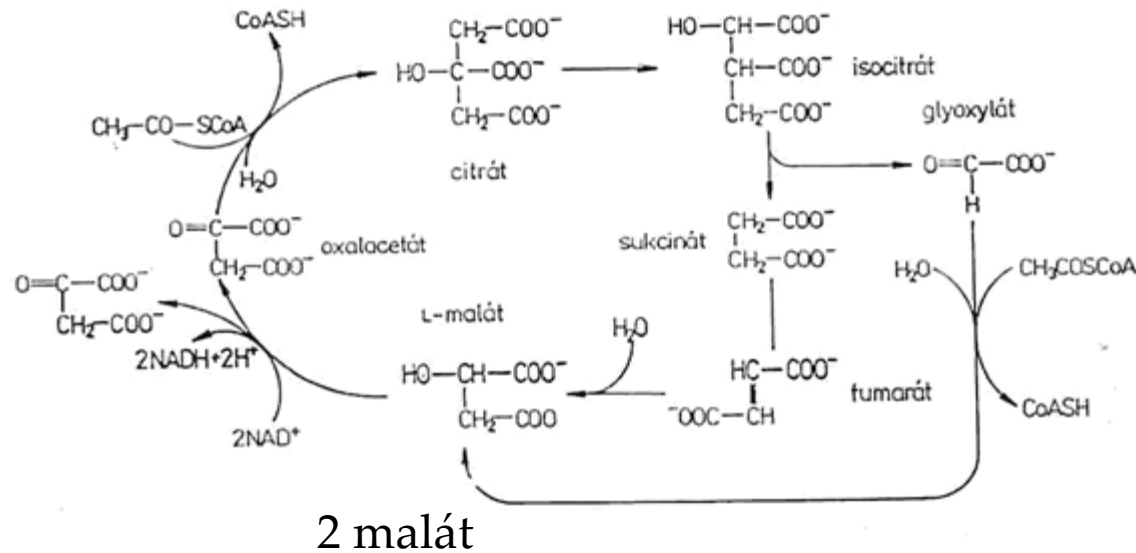


Anaplerotické dráhy

- Doplnění metabolitů
 - Odčerpaných z TCA k nezbytným biosyntetickým účelům
 - Převáděných na zásobní formy (glukosa)
- U živočichů
 - karboxylace pyruvátu (vzniklého hlavně glykolýzou)
 - produkty katabolismu aminokyselin
 - Závisí na přísunu sacharidů
- Mikroorganismy a rostliny
 - Jsou schopny doplňovat metabolity TCA i z jednodušších látek (dvouuhlíkaté metabolity – z MK apod.)
 - Anaplerotické dráhy nezávislé na přísunu sacharidů
 - 2 enzymy tzv. glyoxylátového cyklu – isocitrátlyasa a malátsyntasa
 - Živočichové nemají – nepotvrzené zprávy

Glyoxylátová dráha (zkratka)

Glyoxylátový cyklus:



- Překlenutí dekarboxylačních kroků
- $2 \text{CH}_3\text{CO.SCoA} \rightarrow \text{HOOC.CO.CH}_2\text{COOH} + 2 \text{HSCoA}$