

Citrátový cyklus



MITOCHONDRIA
THE CELL'S POWER HOUSE

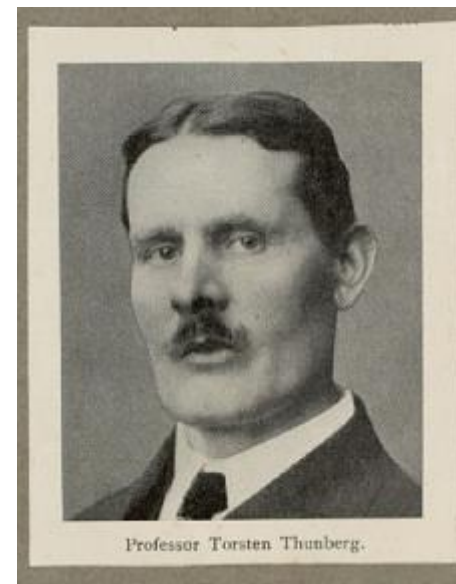
theAwkwardYeti.com

Citrátový cyklus

také znám jako cyklus trikarboxylových kyselin nebo **Krebsův cyklus**.

Jedním z prvních, který se zabýval oxidací organických sloučenin v živých organismech, byl **Torsten Thunberg**. Do roku 1920 popsal více než 60 organických sloučenin podléhajících oxidaci v živé tkáni, přičemž velkou pozornost u něj vzbudily **acetát, laktát, sukcinát, fumarát, malát, citrát a glutamát**. Pokusil se popsat oxidaci acetátu v cyklu, přičemž předpokládal kondenzaci dvou molekul acetátu za vzniku sukcinátu.

v roce 1937 objasnili Carl Martius a Franz Knoop úlohu ketoglutarátu (oxoglutarátu) jako produktu oxidační přeměny citrátu, byly vytvořeny všechny potřebné podmínky pro odhalení mechanismu, jak dochází k oxidaci některých složek přijímané potravy.



V roce 1937 byl cyklus kyseliny citrónové popsán **Hans Adlofem Krebsem a Johnsonem**. Následující objevy týkající se úlohy acetyl-CoA, procesů dehydrogenace a zejména pak výsledky pokusů prováděných s radioizotopy již správnost popsaného cyklu jen potvrdily. Na počest svého objevitele bývá cyklus citrónové kyseliny někdy označován i jako (velký) Krebsův cyklus nebo také jako cyklus trikarbonových kyselin.

Nobelova cena 1953



Citrátový cyklus

také znám jako cyklus trikarboxylových kyselin nebo **Krebsův cyklus**.

Bakterie nebo kvasinky (nebo specializované buňky) dokáží regenerovat NAD^+ bez přítomnosti volného kyslíku pomocí oxidace pyruvátu na laktát nebo etanol.

Citrátový cyklus je pokračováním glykolýzy u aerobních a fakultativně anaerobních organismů, kteří dokáží získávat energii pomocí respiračního řetězce.

Citrátový cyklus primárně **generuje redoxní potenciál (NADH , FADH_2)** oxidací dvojuhlíkatého acetátu (CH_3COO^-).

Ten je v respiračním řetězci využit pro výrobu ATP nebo GTP.

Probíhá uvnitř mitochondrií.

Mitochondrie je buněčná organela eukaryot. Je obalena dvojitou membránou (vnější a vnitřní). Vnitřní membrána je vlnitá a vytváří kristy. Díky vychlípení do vnitřního prostoru má vnitřní membrána velký aktivní povrch. Mezi membránami se nachází mezimembránový prostor vyplněný roztokem s podobným složením jako je v cytosolu buňky (ionty jsou volně vyměňovány mezi cytosolem a mezimembránovým prostorem).

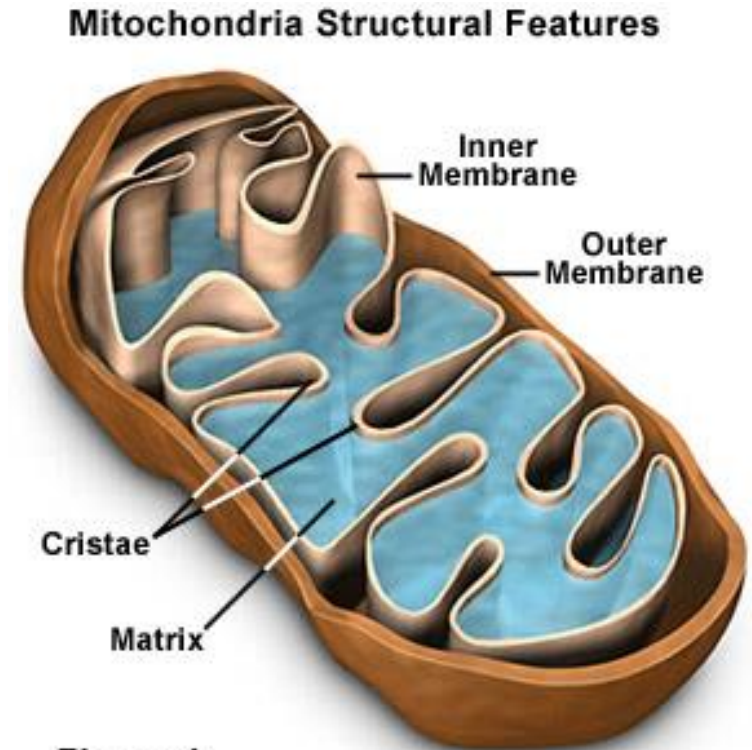
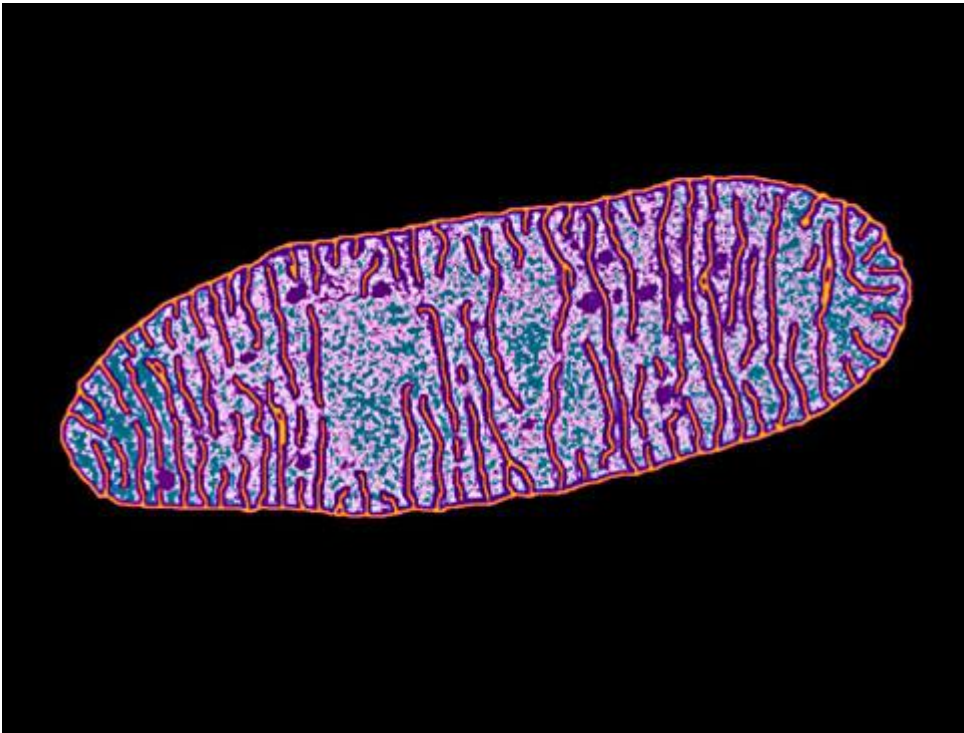
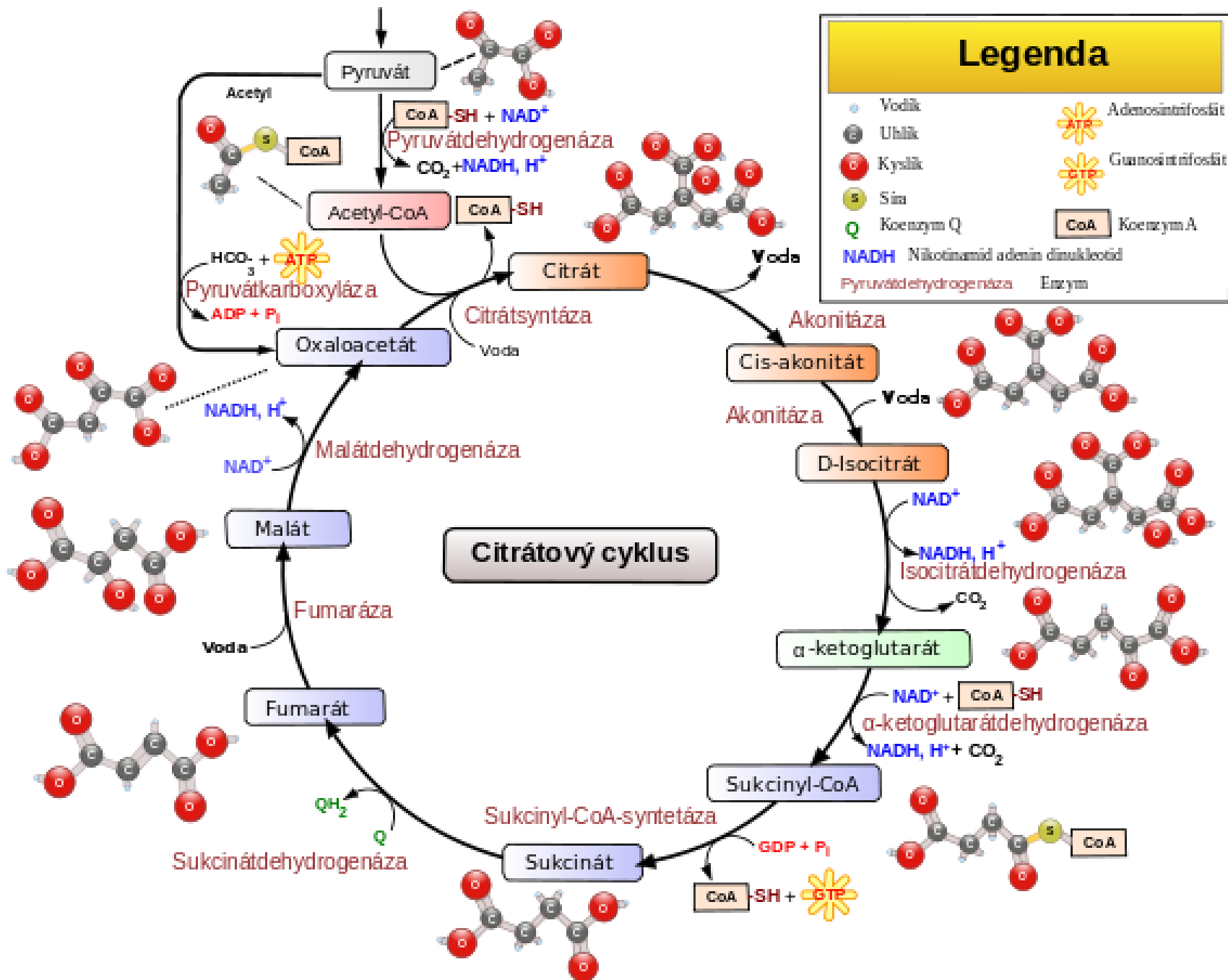
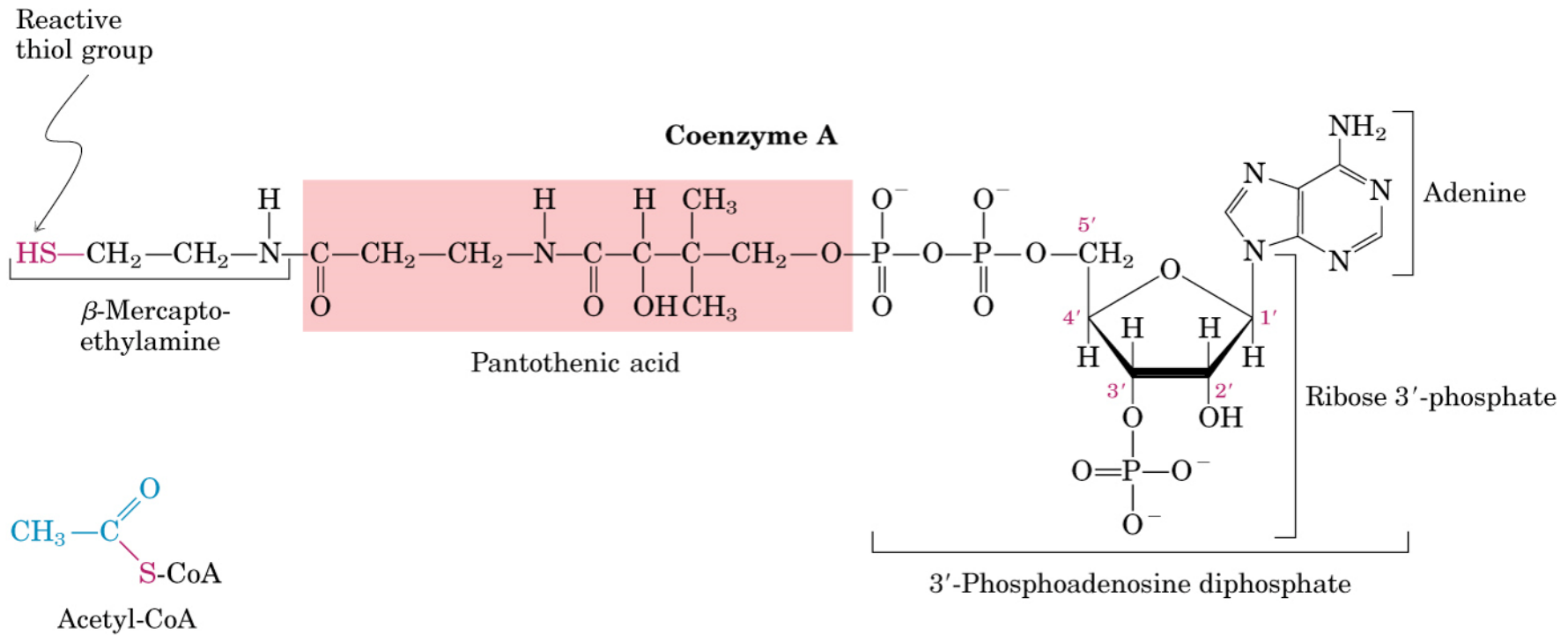


Figure 1



V Krebsově cyklu je oxidován **acetyl** (CH_3COO^-) - ten buňka může získat pomocí známé **glykolýzy**, ale také degradací **mastných kyselin** nebo **aminokyselin**. Nosičem acetylu je **Koenzym A (CoA)**. Molekula CoA se skládá z β -merkaptethylaminu, pantothenové kyselina (vitamin B_5) a 3'-fosfoadenosin difosfátu.



Acetylová skupina se váže ke CoA thioesterickou vazbou (která se snadněji hydrolyzuje než anhydridová "makroergická vazba" u ATP). Díky tomu je chemická reakce využívající acetyl-CoA nevratná.

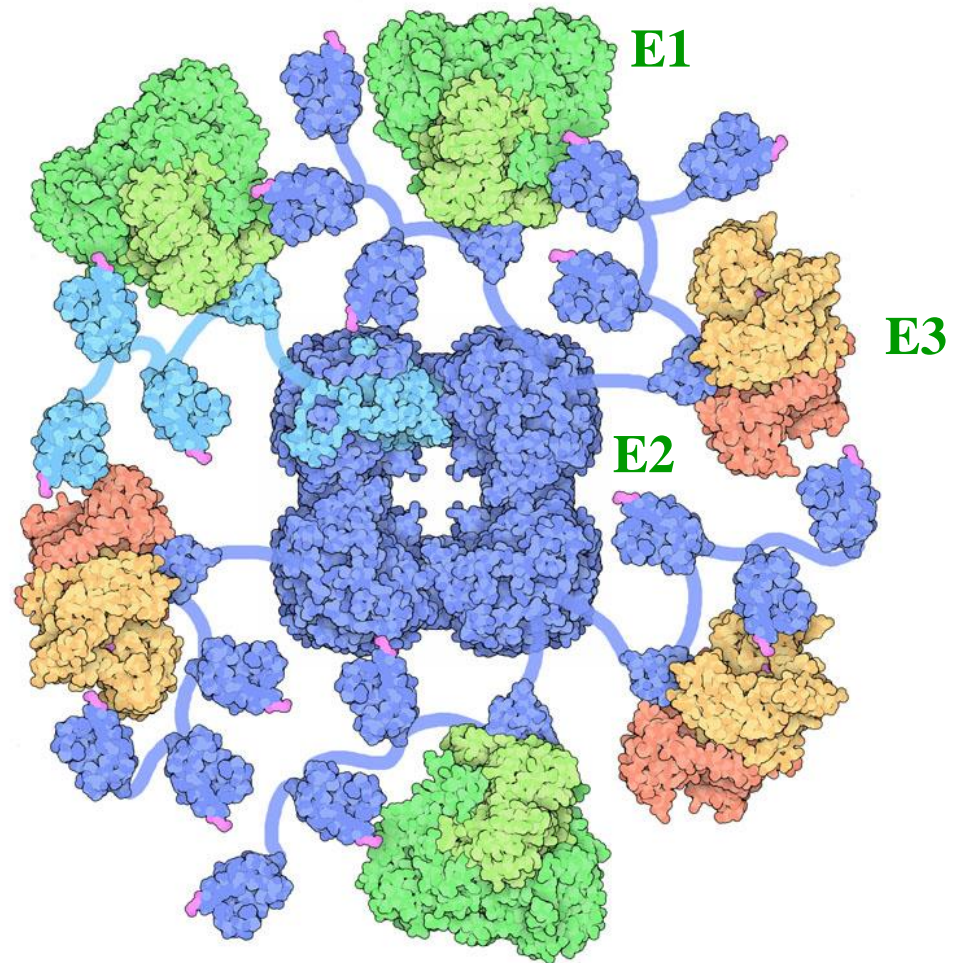
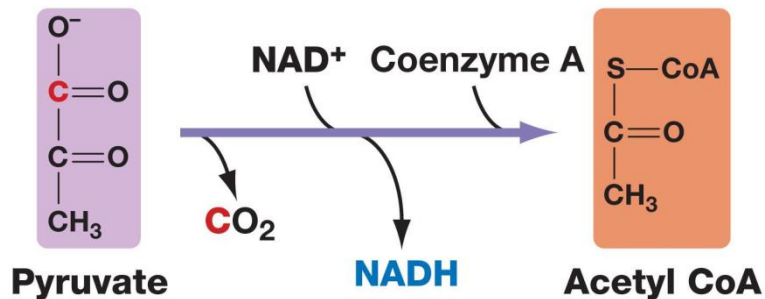
Acetylová skupina je generována z **pyruvátu** (glykolýza, rozklad AMK) nebo rozkladem mastných kyselin. V glykolýze vznikající pyruvát je transportován z cytosolu do mitochondrií a dekarboxylován na CH_3COO^- ve velkém **Pyruvát dehydrogenázového komplexu** skládajícího se ze 3 enzymů.

Komplex se skládá z:

Pyruvát dehydrogenázy (E1)

Dihydrolipoyl transacetylázy (E2)

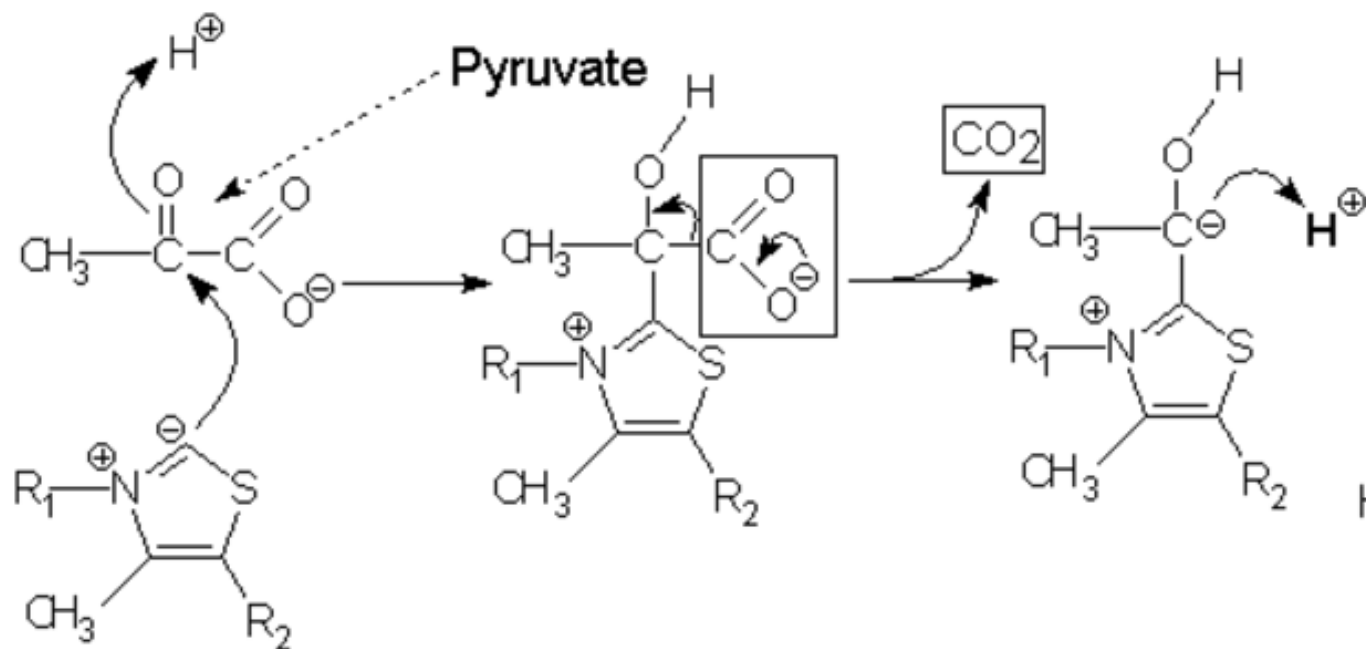
Dihydrolipoyl dehydrogenázy (E3)



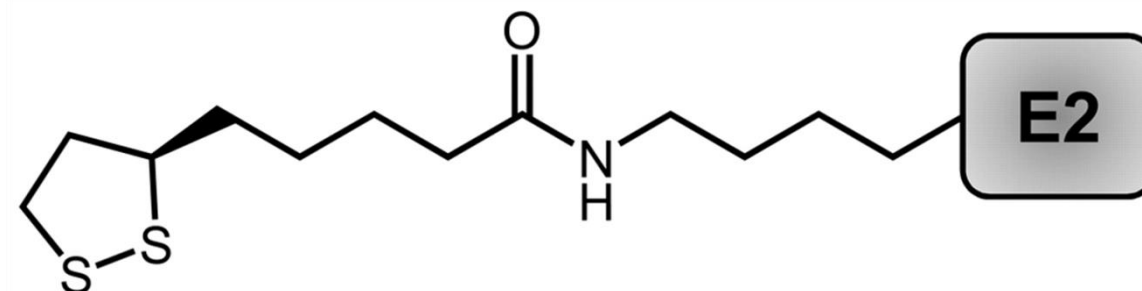
V průběhu konverze pyruvátu na acetyl-CoA se generuje jedna molekula NADH/H^+ a uvolní se CO_2 .

První z enzymů **Pyruvát dehydrogenáza (E1)**, katalyzuje dekarboxylaci pyruvátu. Kofaktorem reakce je **thiaminpyrofosfát**, který vytváří novou vazbu s C=O (karbonylovou) skupinou pyruvátu.

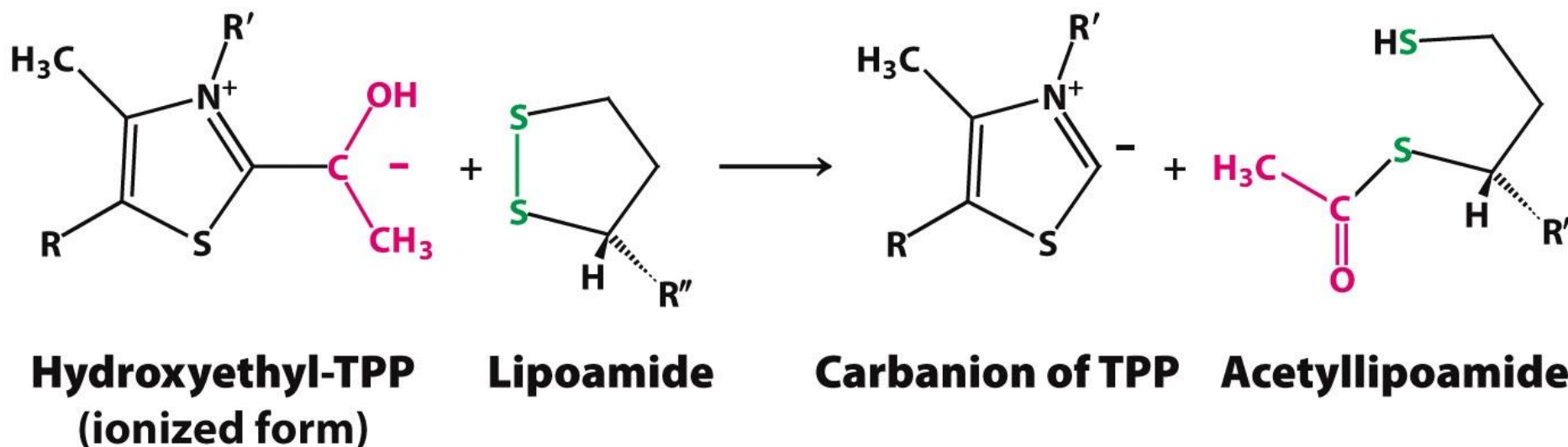
Stabilizace této vazby vede k narušení vazeb mezi ke kofaktoru vázaným uhlíkem a karboxylovou skupinou. Vazba se přeručí a do prostoru se uvolní molekula CO₂.



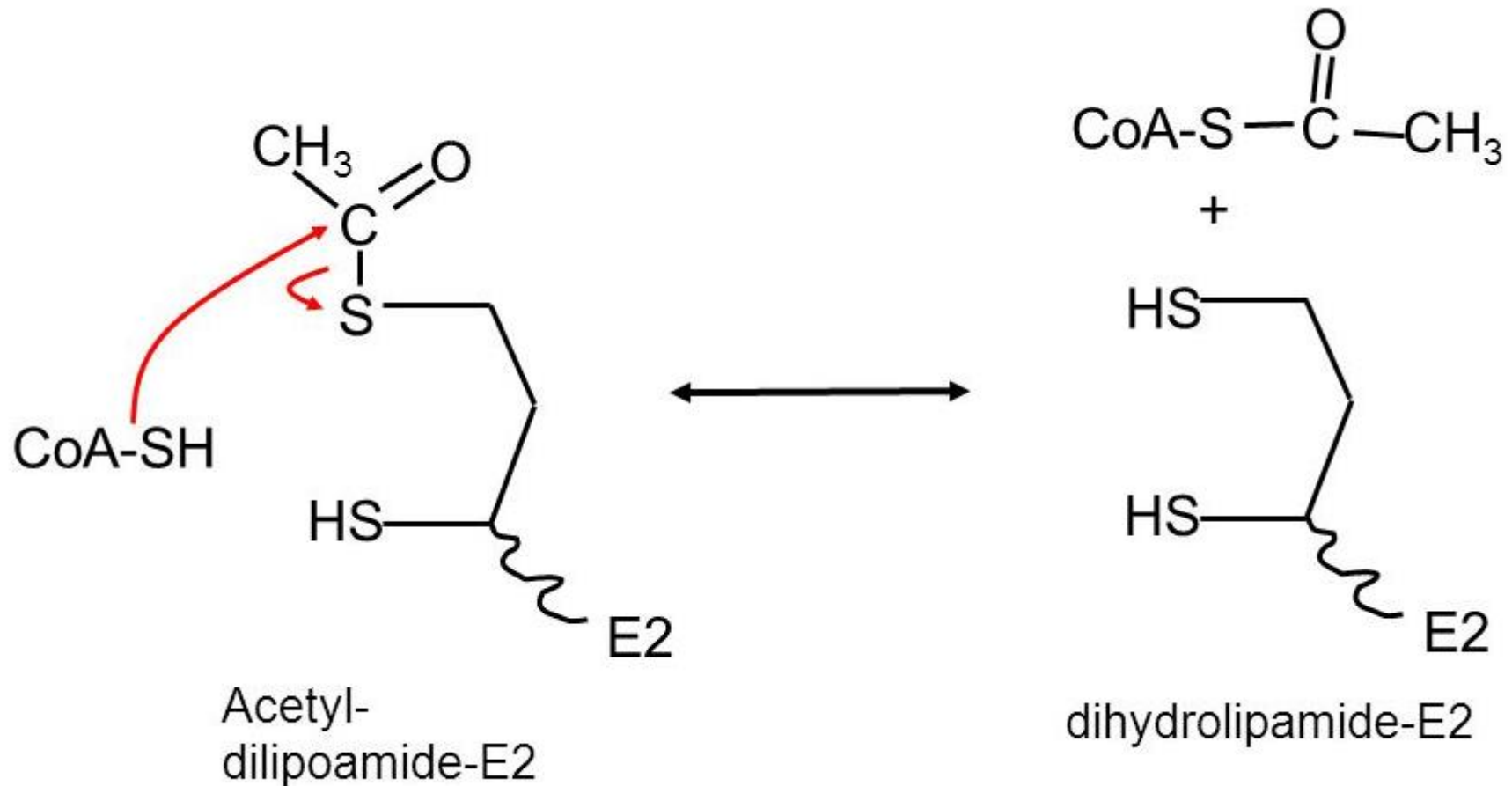
Vzniklý **acetyl** je transportován na **lipoamid**, který je součástí E2 (**Dihydrolipoyl transacetylázy**). Tento kofaktor obsahuje thiazolový kruh (se vzájemnou vazbou mezi atomy Síry – podobně jako u disulfidických můstků). Thiazolový kruh je spojen C řetzcem kovalentně k proteinu (vazbou přes lysin).



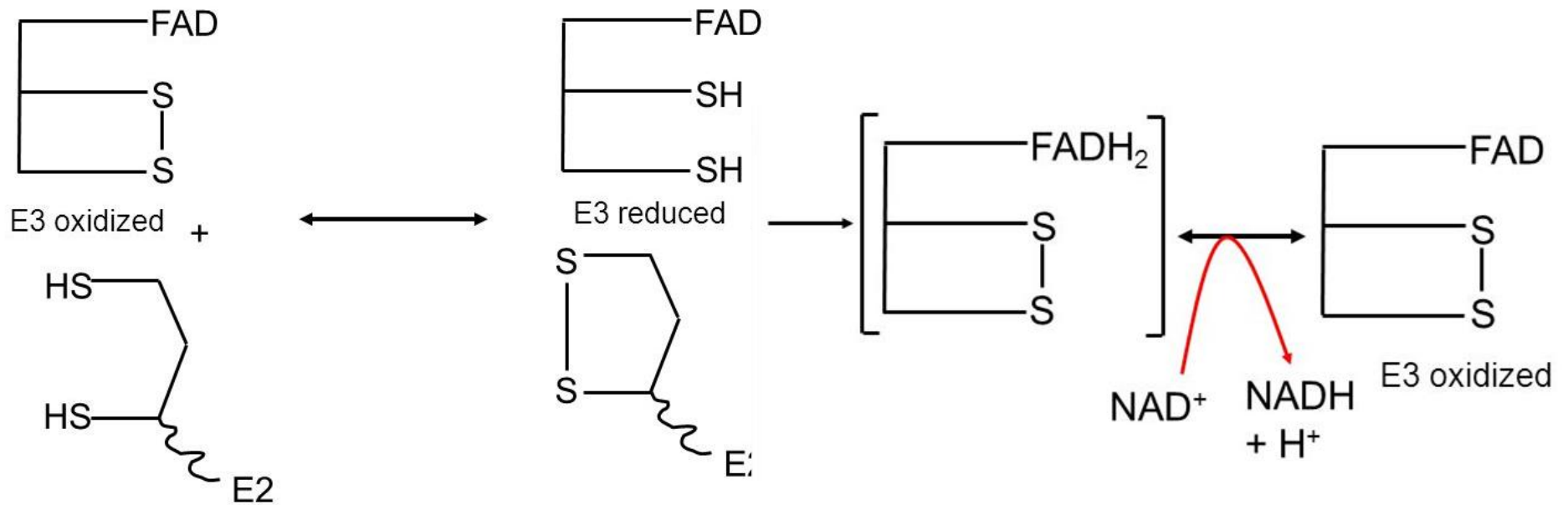
Během přenosu acetylové skupiny dochází k redukci thiazolového kruhu. Na jeden atom síry je thioesterovou vazbou navázán acetyl, druhý atom je redukován protonem.

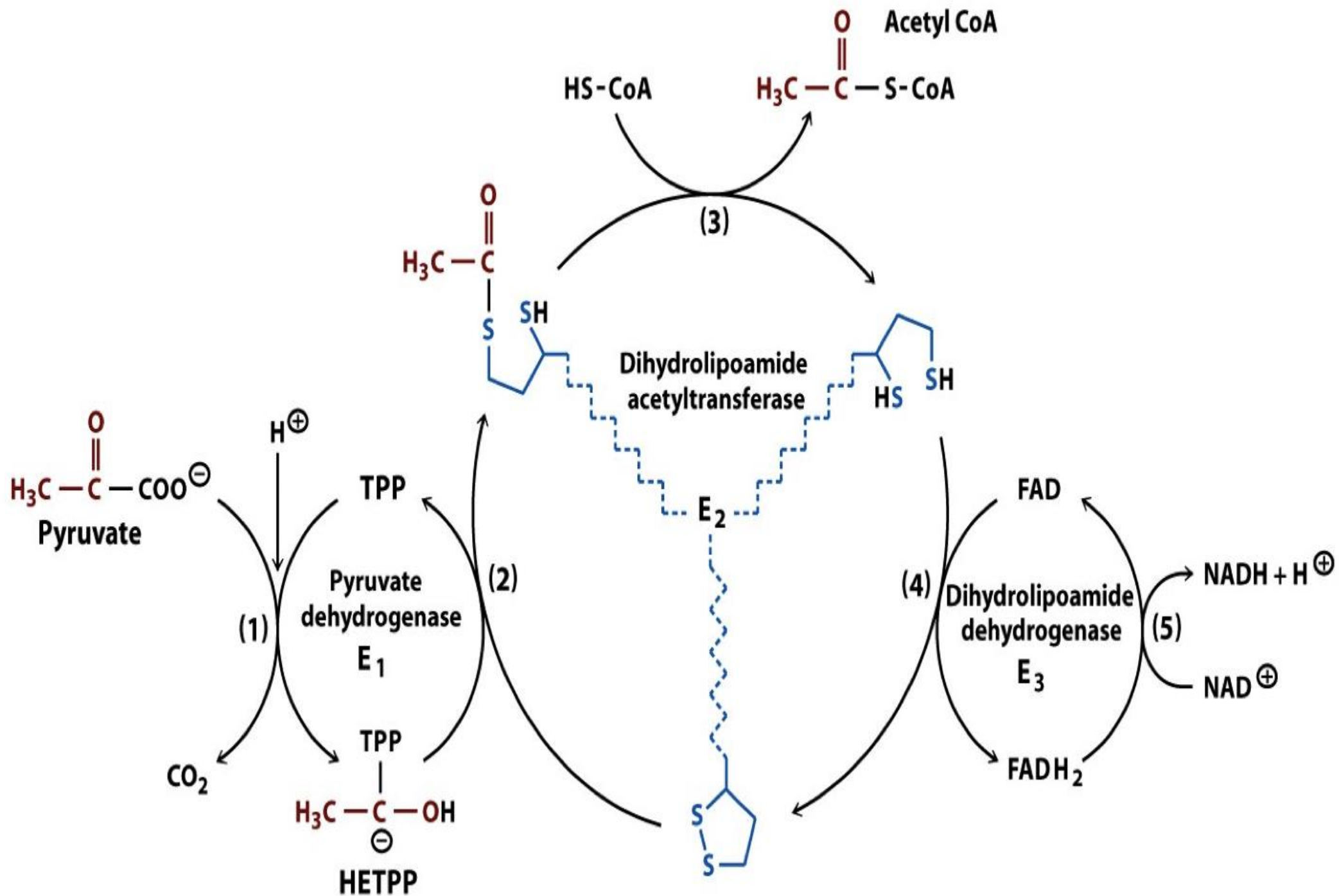


Lipoát thioster přesune část své molekuly do aktivního místa druhého enzymu **Dihydrolipoyl transacetylázy (E2)**. Zde dochází k transféru acetylové skupiny na HS-CoA. Produkt reakce, Acetyl-CoA je z reakce uvolněn a následně může **vstoupit do citrátového cyklu**.



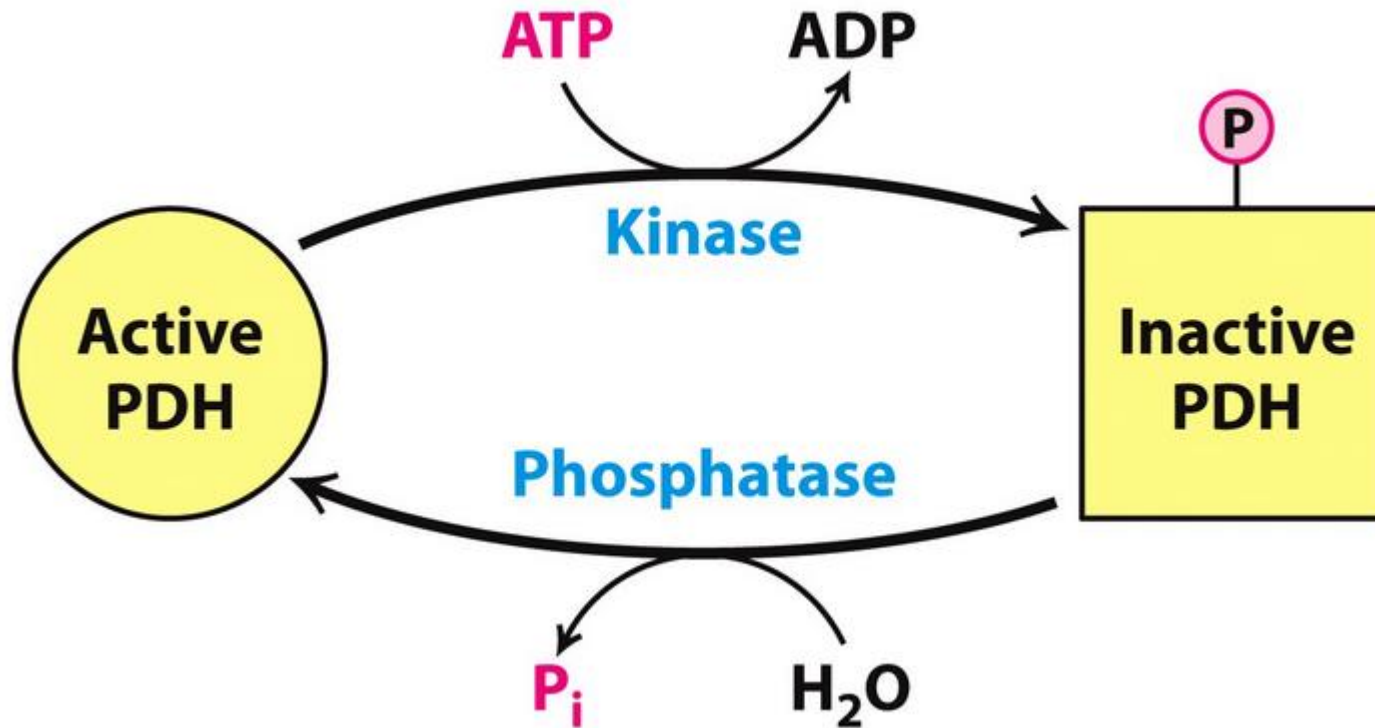
Poslední enzym **Dihydrolipoyl dehydrogenázy (E3)** regeneruje dihydrolipoát, aby mohl být opětovně využit. Enzym obsahuje kromě FAD kofaktoru také disulfidický můstek, oba se účastní redoxní reakce. Redukované sulfidy a FAD jsou následně oxidovány přistupujícím NAD^+ na NADH .





Pyruvát dehydrogenázový komplex

Pyruvát dehydrogenázový komplex, hlavně její E1 podjednotky, je klíčová molekula řídící energetický metabolismus buněk. Aktivita enzymu E1 je regulována fosforylací – **pokud je fosforylován**, záporný náboj fosfátu změní strukturu enzymu a enzym je **inaktivní**. Odstraněním fosfátů je enzym opětovně aktivován.

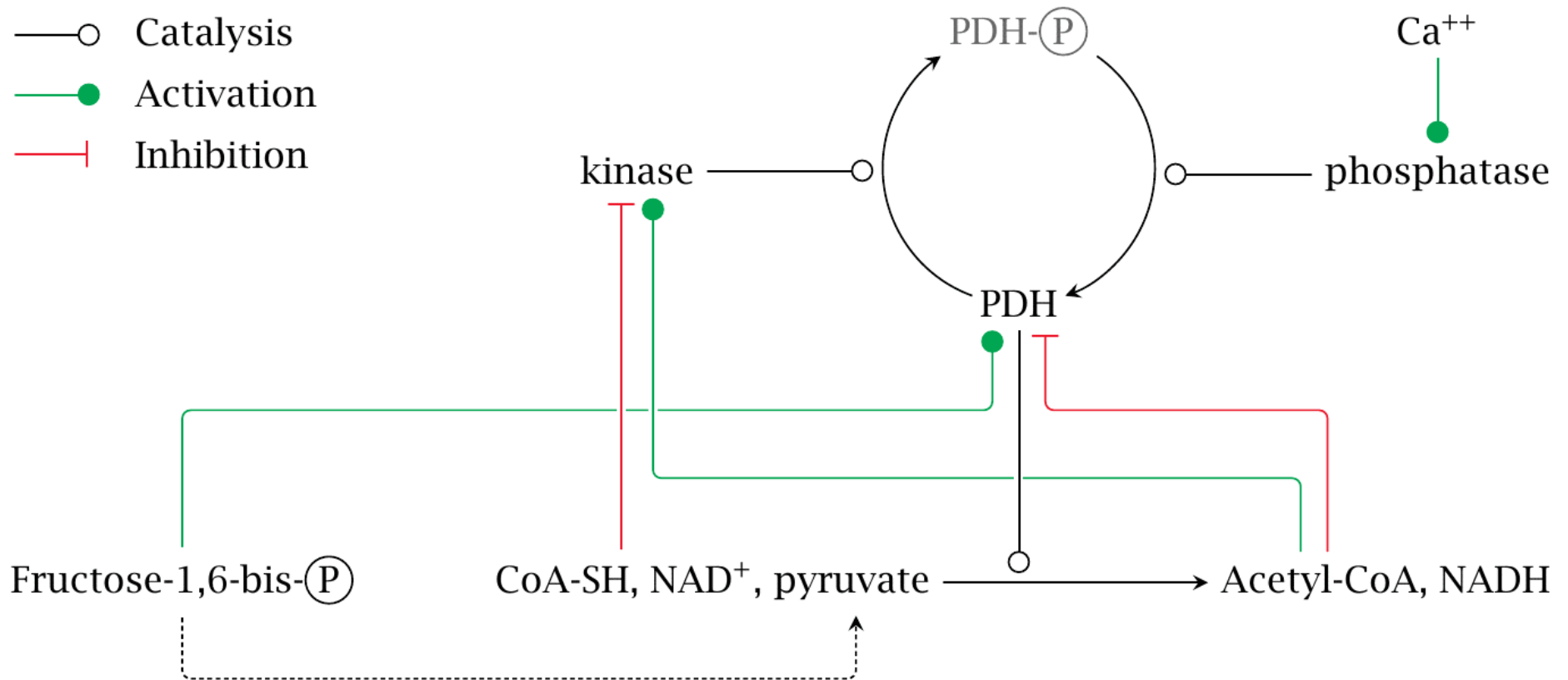


Enzym je fosforylován – **Pyruvát dehydrogenáza kináza** (PDK)

a defosforylován - **Pyruvát dehydrogenáza fosfatáza** (PDP).

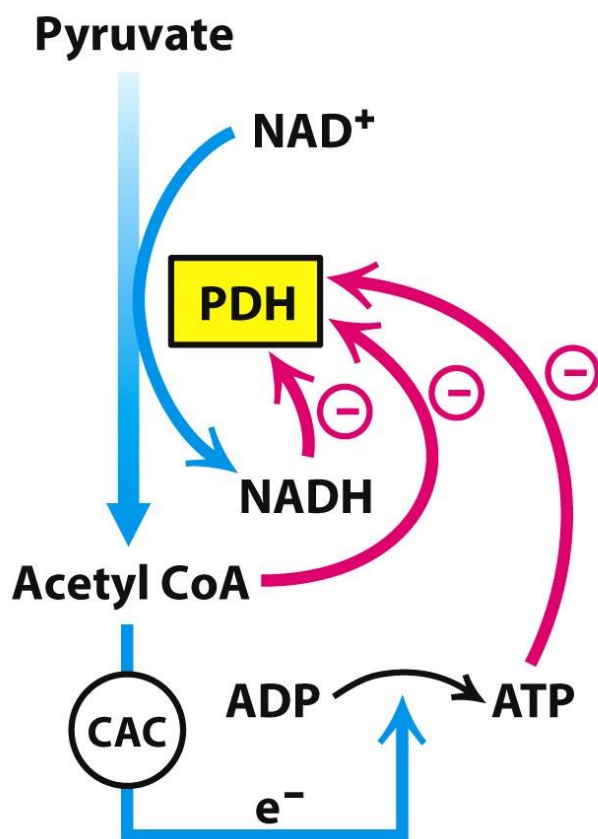
V těle existují 4 různé izoenzymy (proteiny s odlišnou strukturou, ale stejnou katalytickou aktivitou) – PDK1, PDK2, PDK3, PDK4. Nachází se v různých tkáních v různém množství. Liší se rozdílnou citlivostí k inhibitorům.

PDK mohou být inhibovány molekulami, které značí **dostatek** energie v buňce. Jsou inhibovány pokud je vysoký poměr ATP/ADP, NADH/NAD⁺ nebo acetyl-CoA/HS-CoA..

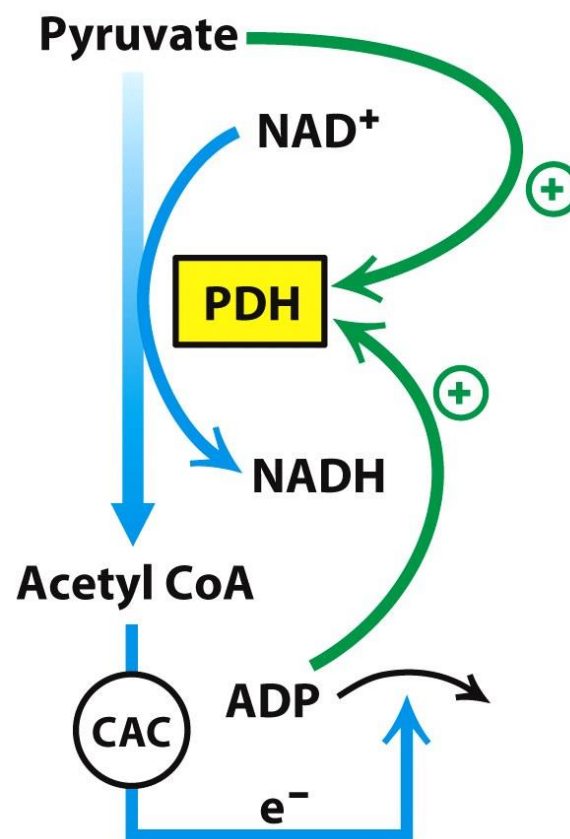


Co je důsledkem inhibice **E1**. Při nízké hladině glukózy v krvi dochází v játrech k štěpení glykogenu. Pokud je ale glukóza v krvi snížena dlouhodobě, jaterní buňky glykogen vyčerpají a musí **nastartovat glukoneogenezi**. Glukóza je syntetizována z pyruvátu – je tedy nežádoucí, aby se všechnen pyruvát spotřebovával v citrátovém cyklu. Aktivní **PDK** inaktivuje **E1** v **Pyruvát dehydrogenázovém komplexu**, což vede k akumulaci pyruvátu a nastartování **glukoneogenze**.

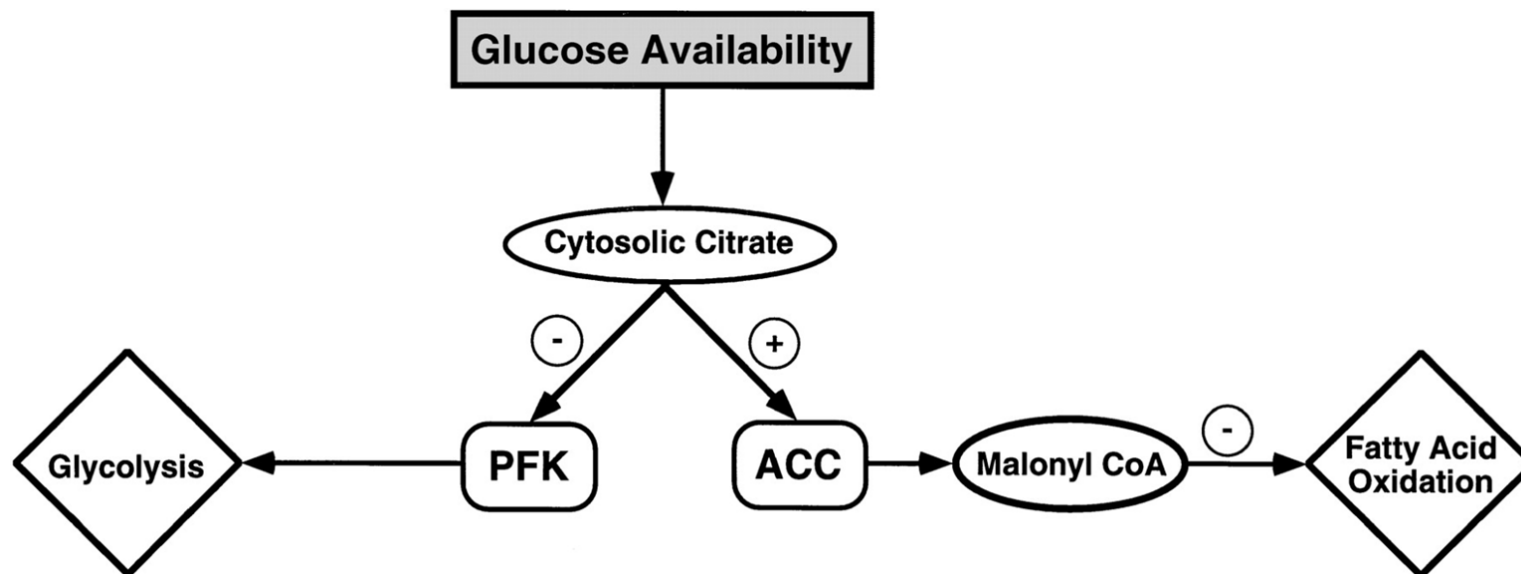
(A) HIGH ENERGY CHARGE



(B) LOW ENERGY CHARGE



Ve svalech je situace jiná. Blokací **E1** dochází k **hromadění pyruvátu** a sval začne regenerovat NAD^+ oxidací pyruvátu na laktát. Ten je Coriho cyklem vrácen zpět do jater, kde slouží pro syntézu dalšího pyruvátu pro glukoneogenezi.

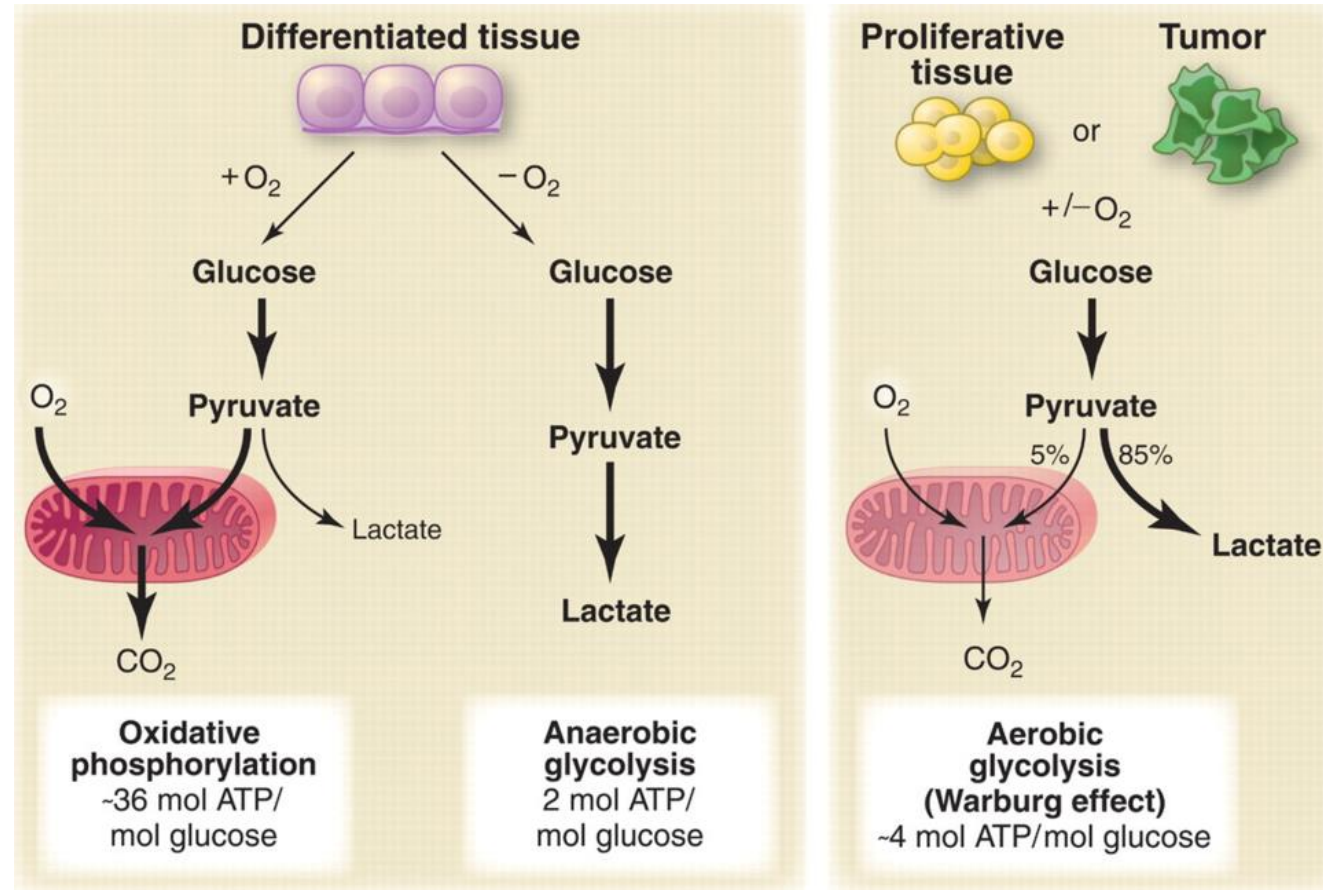


Navíc **PDK/PDP** slouží jako regulátory metabolismu cukrů a tuků. **PDK** snižuje produkci **acetyl-CoA**. Ten je prekurzorem pro **malonyl-CoA** (**inhibitor oxidace mastných kyselin** – proces ve kterém je acetyl-CoA do citrátového cyklu generován rozpadem mastných kyselin). Díky tomu sval místo glukózy začne spotřebovávat tuky.

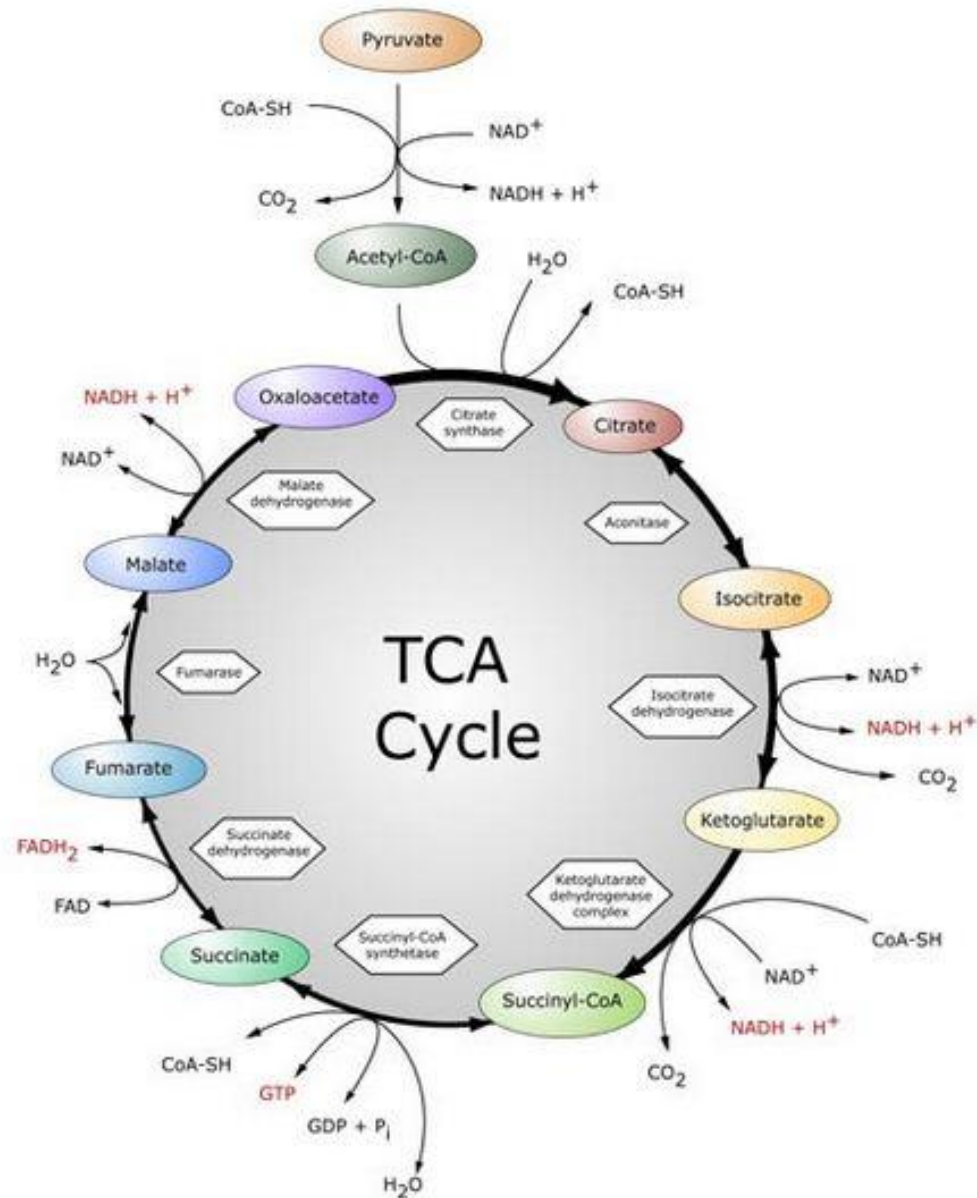
V nádorových buňkách je **aktivita E1 také inhibována**. Nádorové buňky se často nachází v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku a často mívají defektní mitochondrie. Mitochondrie se totiž účastní apoptotických procesů a mohou být pro nádorové buňky fatální.

Buňky mají velmi aktivní glykolýzu (až 200x více než zdravé buňky), ale **pyruvát** je zutilizován na **laktát**. Této dráze dávají přednost, i když je hladina kyslíku normální.

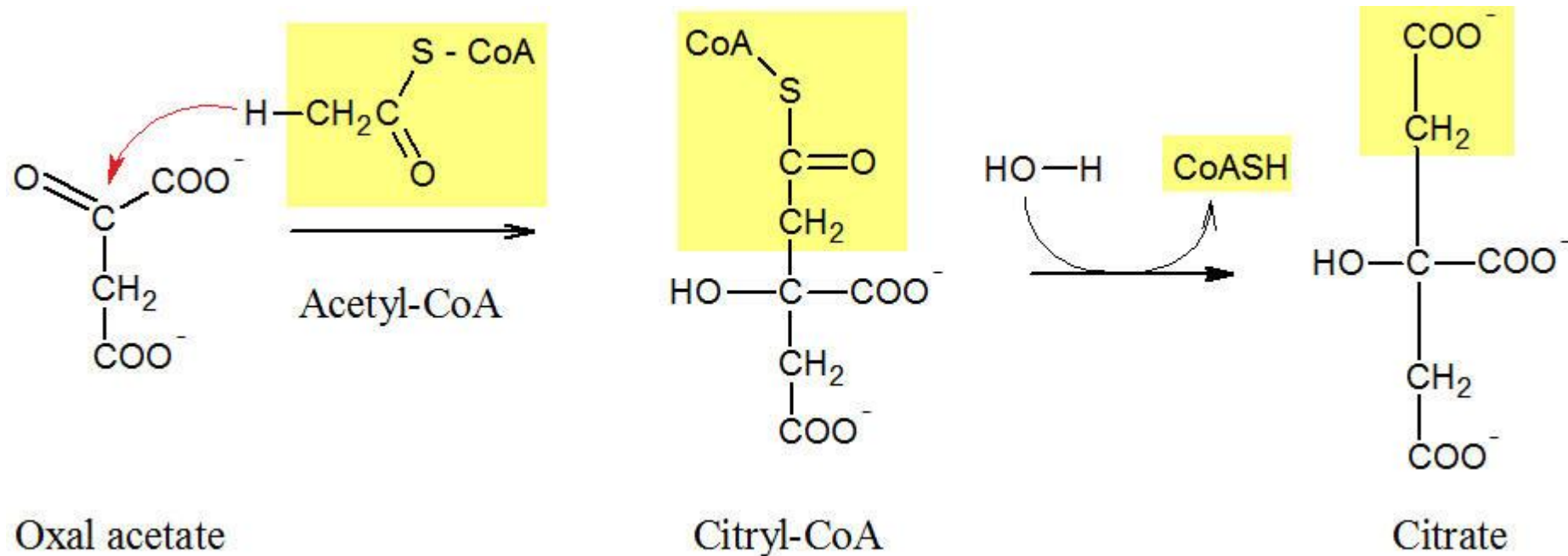
Tzv. **Warburgův efekt** tak vysvětluje značné nároky nádorových buněk na glukózu (anaerobní glykolýza produkuje méně energie).

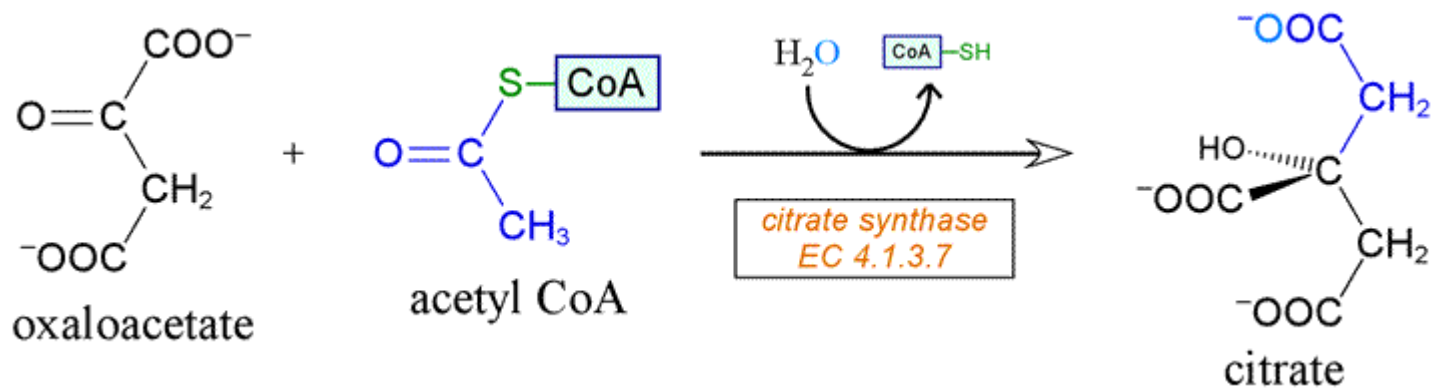


Acetyl-CoA je vstupní molekulou citrátového cyklu.

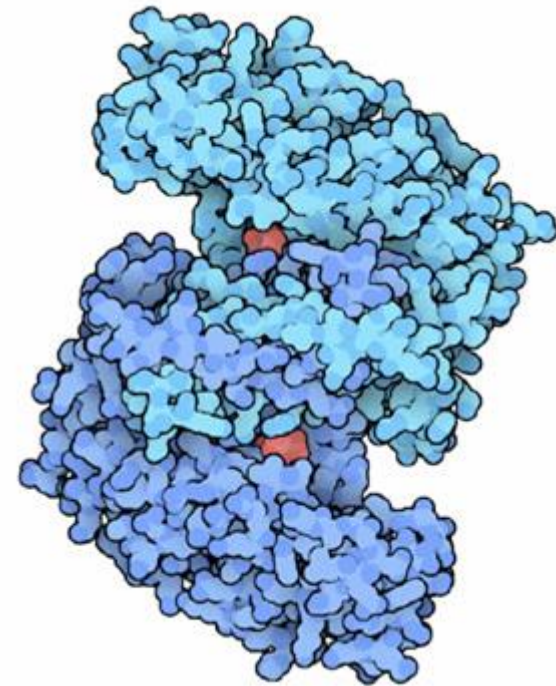


Prvním krokem cyklu je přenos acetylové skupiny (2C) z **Acetyl-CoA** na **oxalacetát** (4C). Produktem enzymatické reakce katalyzované **citrát syntázou** je **citrát** (6C). Reakce probíhá ve dvou krocích. V prvním dochází k tvorbě vazby mezi Acetyl-CoA a oxalacetátem. Meziprodukt je v **katalytickém místě enzymu stabilizován volnými histidiny**. Následně přistoupí molekula vody a dojde k hydrolýze thioesterové vazby a vzniku citrátu.

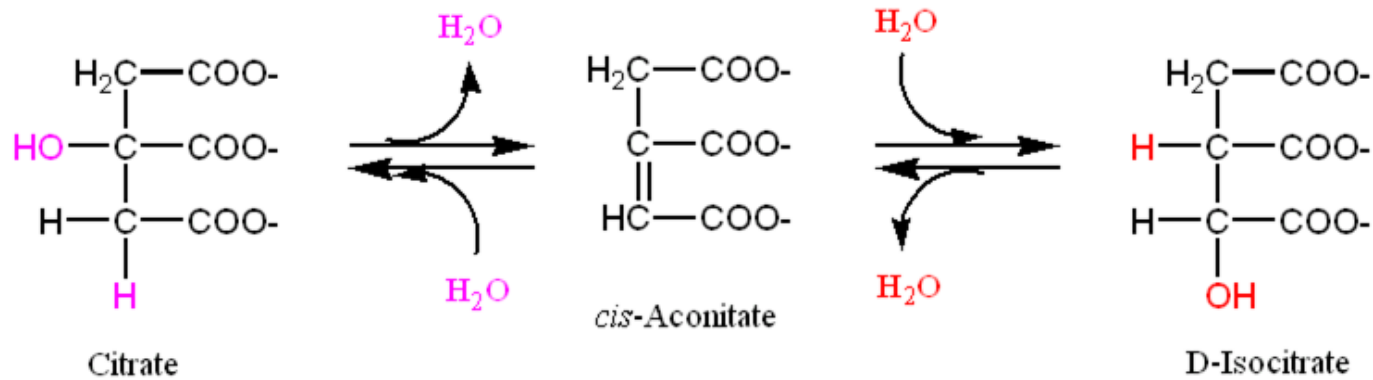




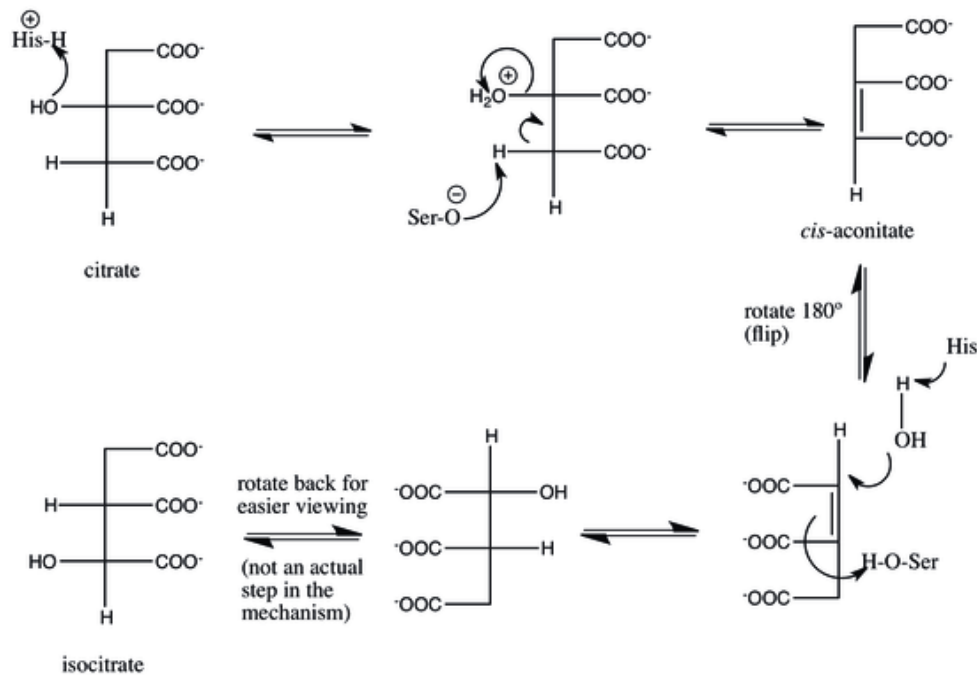
Citrát syntáza je podobně jako **PDK** inhibována vysokou hladinou ATP, acetyl – CoA a NADH. Dalším inhibítorem je sukcinyl-CoA. Tato molekula vzniká v následných fázích citrátového cyklu a má velmi podobnou strukturu jako Acetyl-CoA. Enzym jej nedokáže zpracovat - sukcinyl-CoA je kompetitivním inhibítorem.



Citrát je pak převeden na svůj izomer – **izocitrát**. Izocitrát je snadněji oxidovatelný než citrát. Enzym katalyzující reakci se nazývá **Akonitáza**.



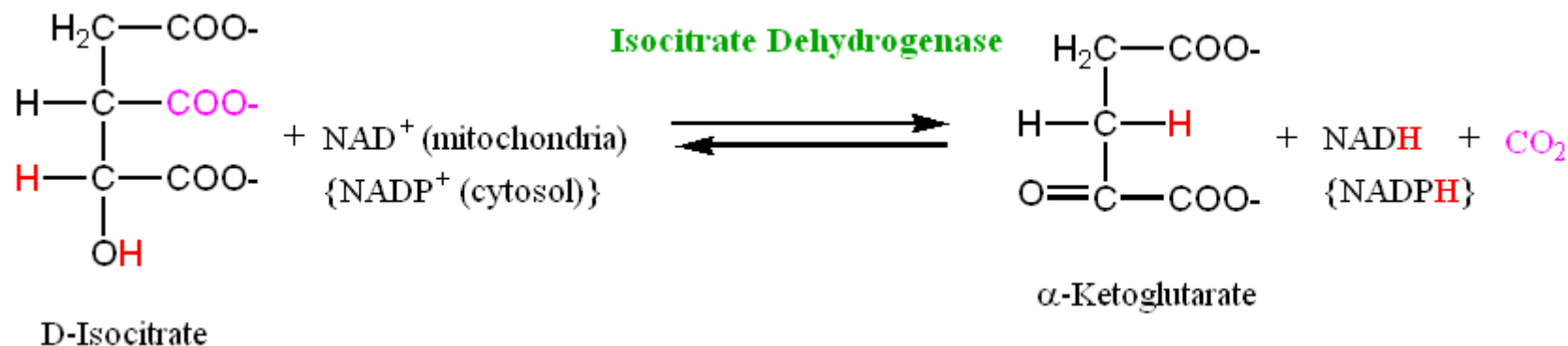
Reakce katalyzuje výměnu OH- skupiny z C2 na C3 uhlík. V prvním kroku reakce dochází k dehydrataci citrátu na akonitát (obsahující dvojnou vazbu). Poté se molekula v enzymu otočí o 180° a dvojná vazba je napadena molekulou vody. Po hydrolýze vzniká izocitrát.



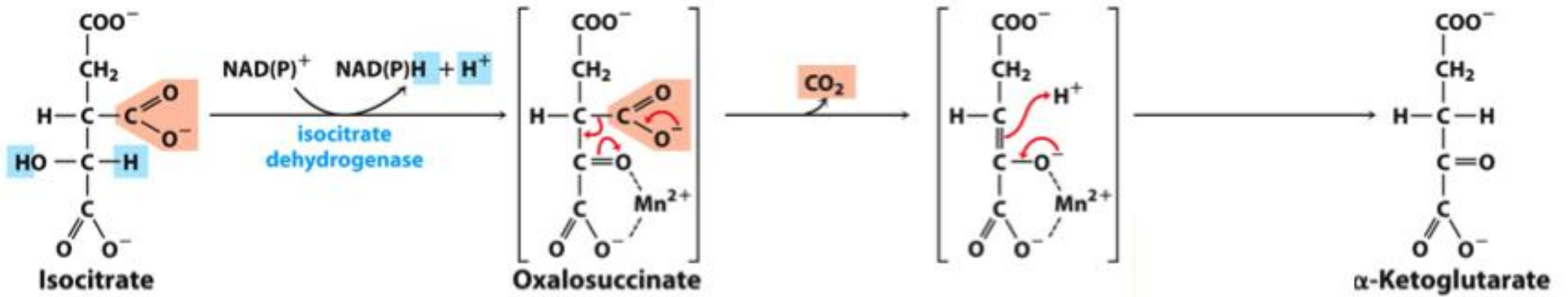
V dalších fázích cyklu dochází k dekarboxylacím (odstraněním dvou CO₂ z molekuly) a návrat 6C kyseliny na 4C. CO₂ ale není **odstraněn** z právě vstupujícího acetylu, ale z molekuly vstupujícího **oxalacetátu**. Tak se acetylová skupina po proběhnutí jednoho cyklu stává součástí molekuly oxalacetátu.

Přechod z C6 na C5

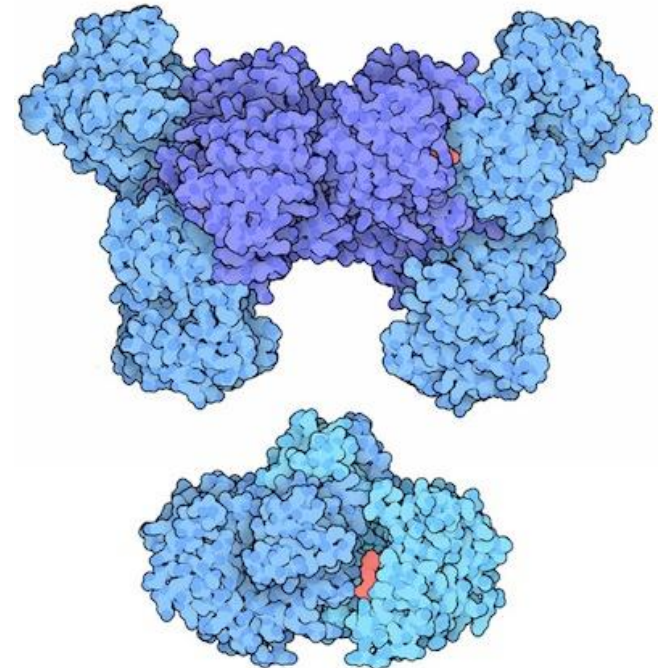
Další krok cyklu katalyzuje **izocitrát dehydrogenáza** (IDH). Enzym má tři podjednotky, které jsou allostericky regulované. Pro svoji aktivitu potřebuje přítomnost Mg²⁺/Mn²⁺ v aktivním místě. Jako kofaktor přenosu protonů využívají jak NAD⁺ (enzymy citrátového cyklu) tak i NADP⁺ (monomerní izoenzymy pracující v cytosolu).



Izocitrát je v této části oxidován na oxalsukcínát v přítomnosti NAD^+ (a jeho redukce na NADH/H^+). Následuje dekarboxylace na α -ketoglutarát.



IDH reakce je jednou z ireverzibilních reakcí citrátového cyklu. Je aktivována svými substráty (izocitrát, NAD^+ , Mn^{2+}), inhibována produkty a ATP.



Přechod z C5 na C4

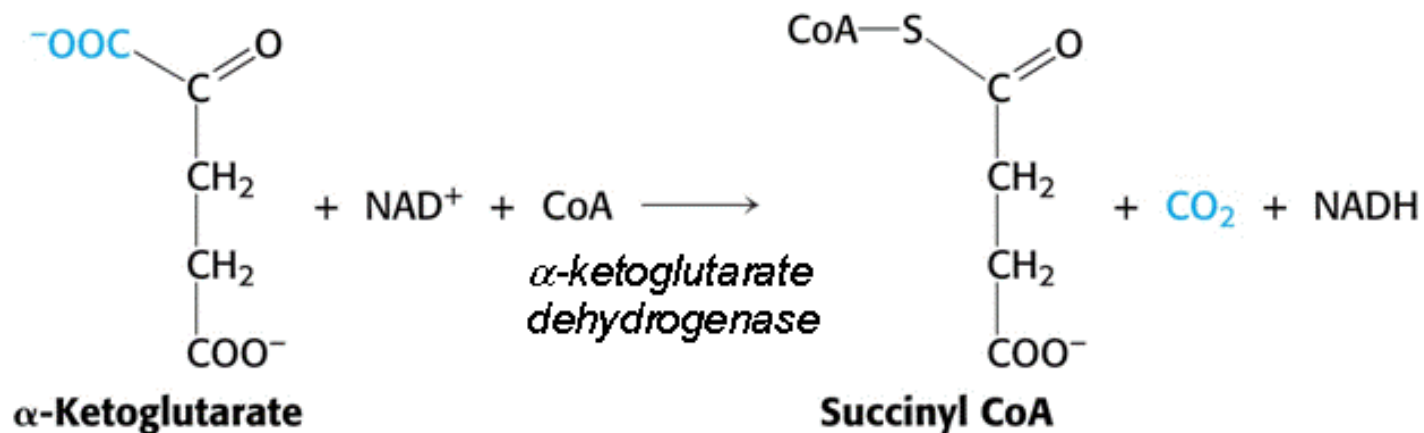
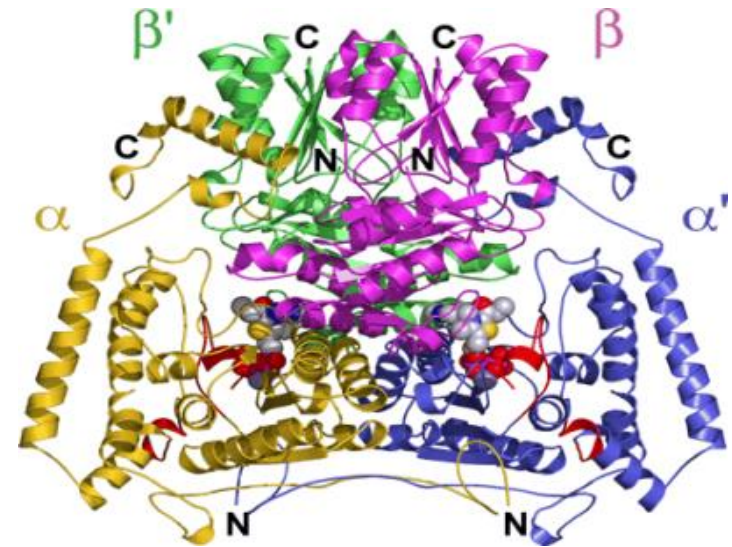
Další reakce je katalyzována komplexem podobným Pyruvát dehydrogenázovému komplexu

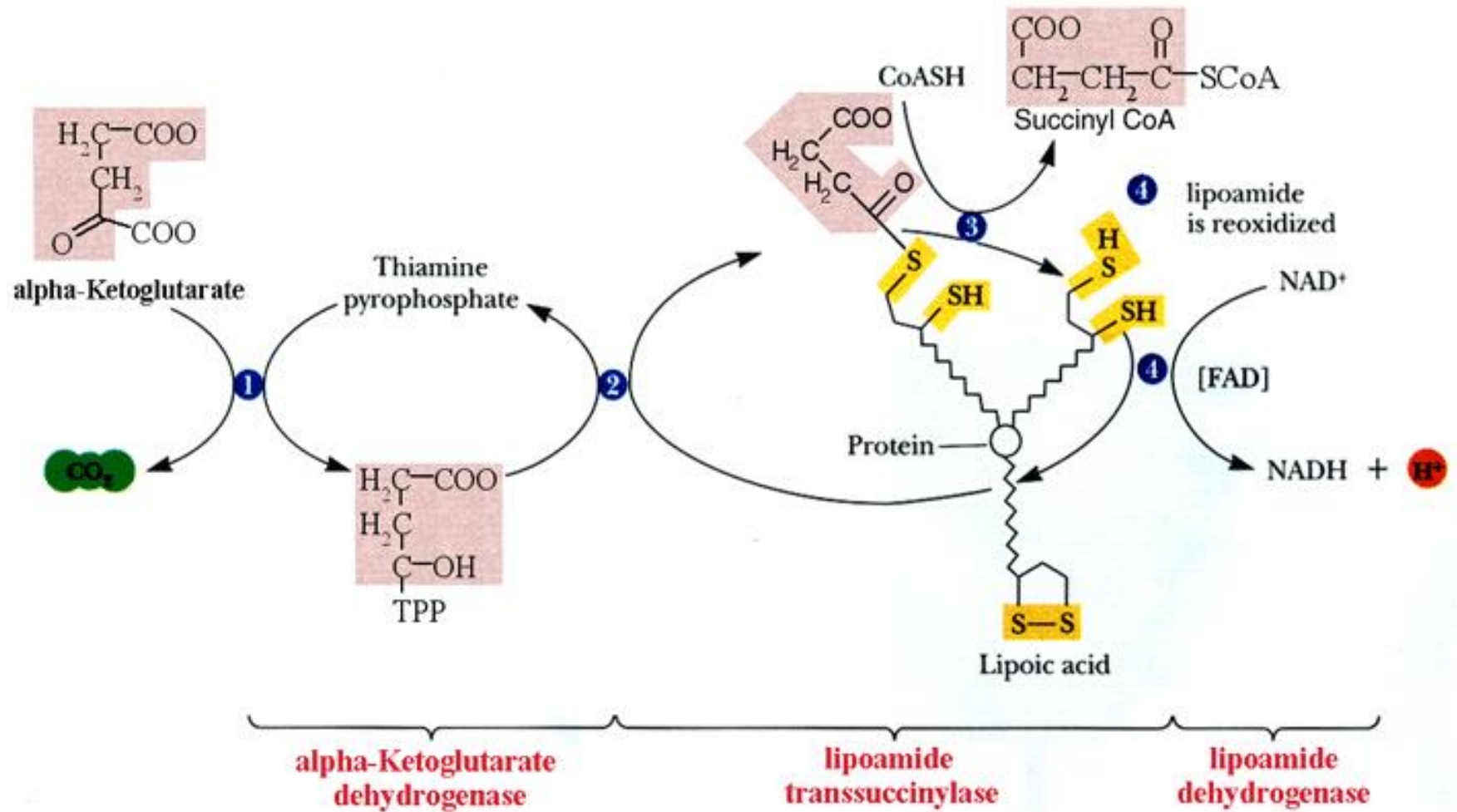
— **α -ketoglutarátdehydrogenázovým komplexem.** Komplex obsahuje 3 podjednotky:

α -ketoglutarát dehydrogenáza

Dihydrolipoyl transacetylázy

Dihydrolipoyl dehydrogenázy

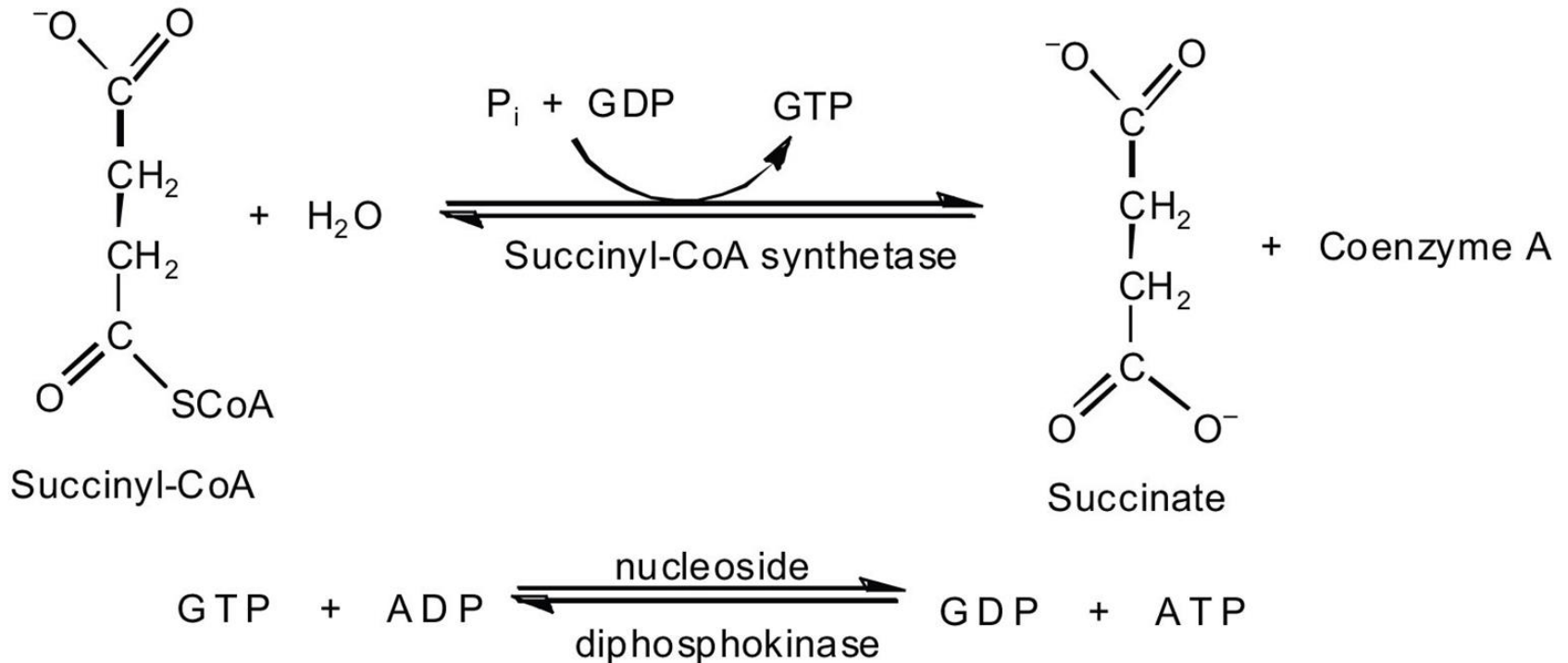




Mechanismus reakce je podobný pyruvát DH komplexu. Rozdílem je, že v první reakci dochází k vazbě α -ketoglutarátu na thiaminpyrofosfát místo pyruvátu. Z molekuly se uvolní CO_2 a sukcinyl se přenesse na HS-CoA.

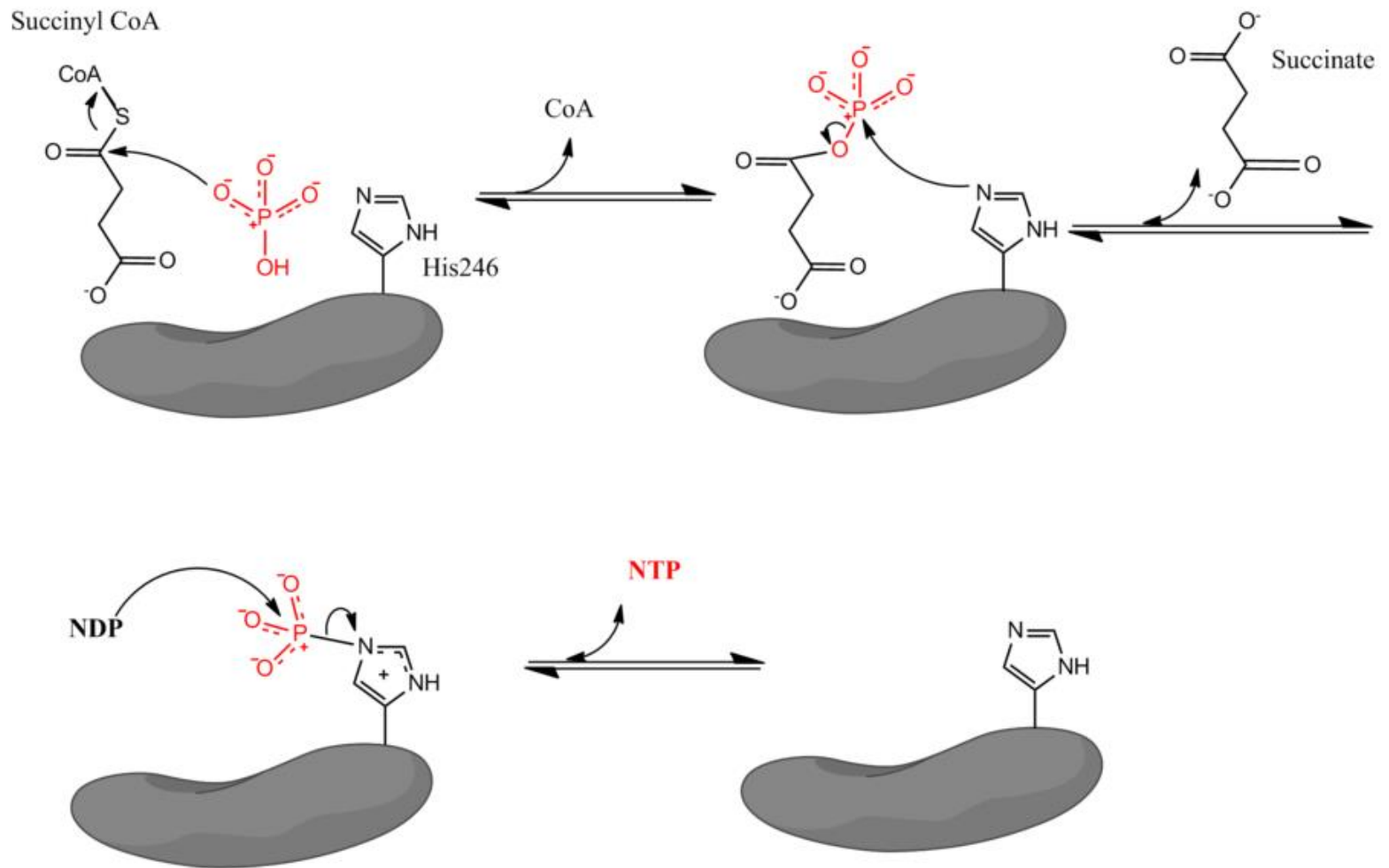
Sukcinyl-CoA.

Následnou reakcí je uvolnění **sukcinátu** z **sukcynyl-CoA**. Reverzibilní reakce katalyzovaná **sukcynyl-CoA syntetázou** umožňuje vznik další makroergické vazby mezi GDP (ADP) a Pi. Jako jediná reakce citrátového cyklu přímo produkuje GTP (ATP).

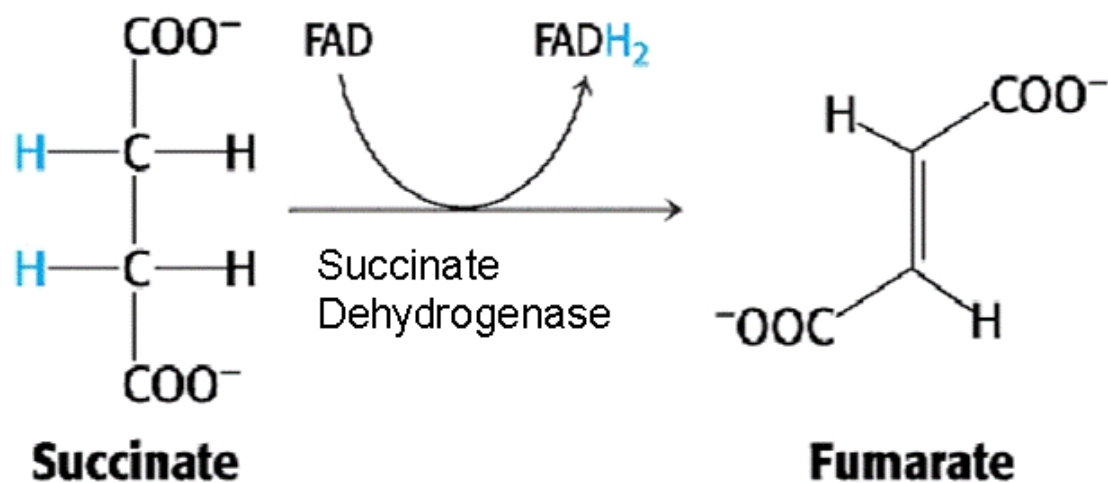


Sukcynyl-CoA syntetáza má dvě izoformy s rozdílnou specificitou vůči GDP nebo ADP. Utilizace dané makroergické molekuly je spojena s tím, v jaké buňce je enzym produkován. Tkáně zapojené v anabolickém mechanismu (játra, ledviny) generují GTP, v katabolickém (svaly, mozek, srdce) zase ATP.

Mechanismus katalýzy se skládá ze tří kroků. V první fázi dojde ke štěpení thioesterové vazby přístupujícím fosfátem. Fosfát se naváže na sukcinyl a vzniká sukcinylfosfát. Následně je **fosfátová skupina odstraněna histidinem** v katalytickém centru enzymu. Uvolní se sukcinát. Následně **GDP** přebírá fosfát z histinu.



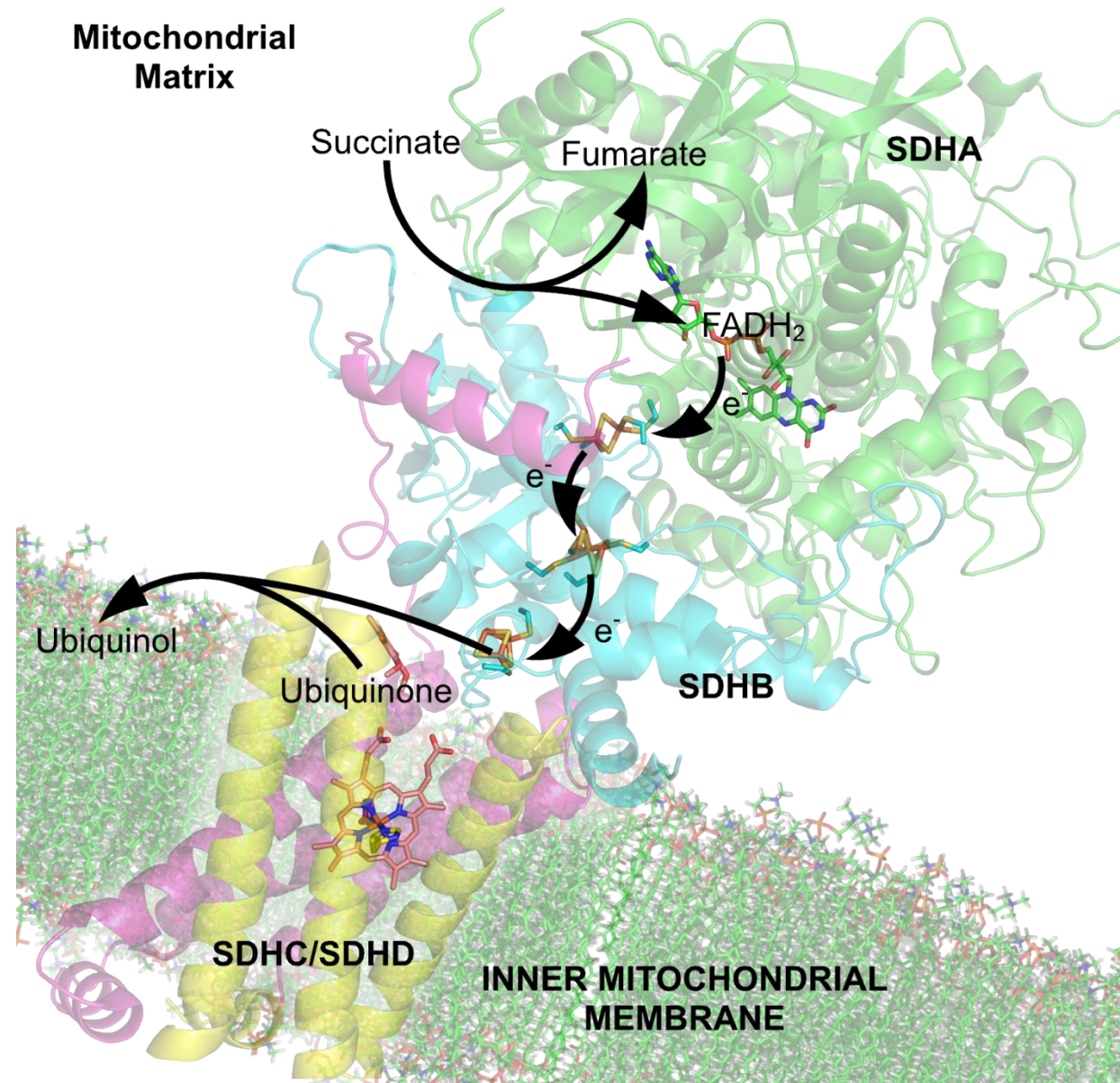
V dalším kroku je **sukcinát** oxidován na **fumarát** za přítomnosti FAD kofaktoru v **sukcinyl dehydrogenáze**. Kofaktorem reakce je FAD, který je redukován na FADH₂.



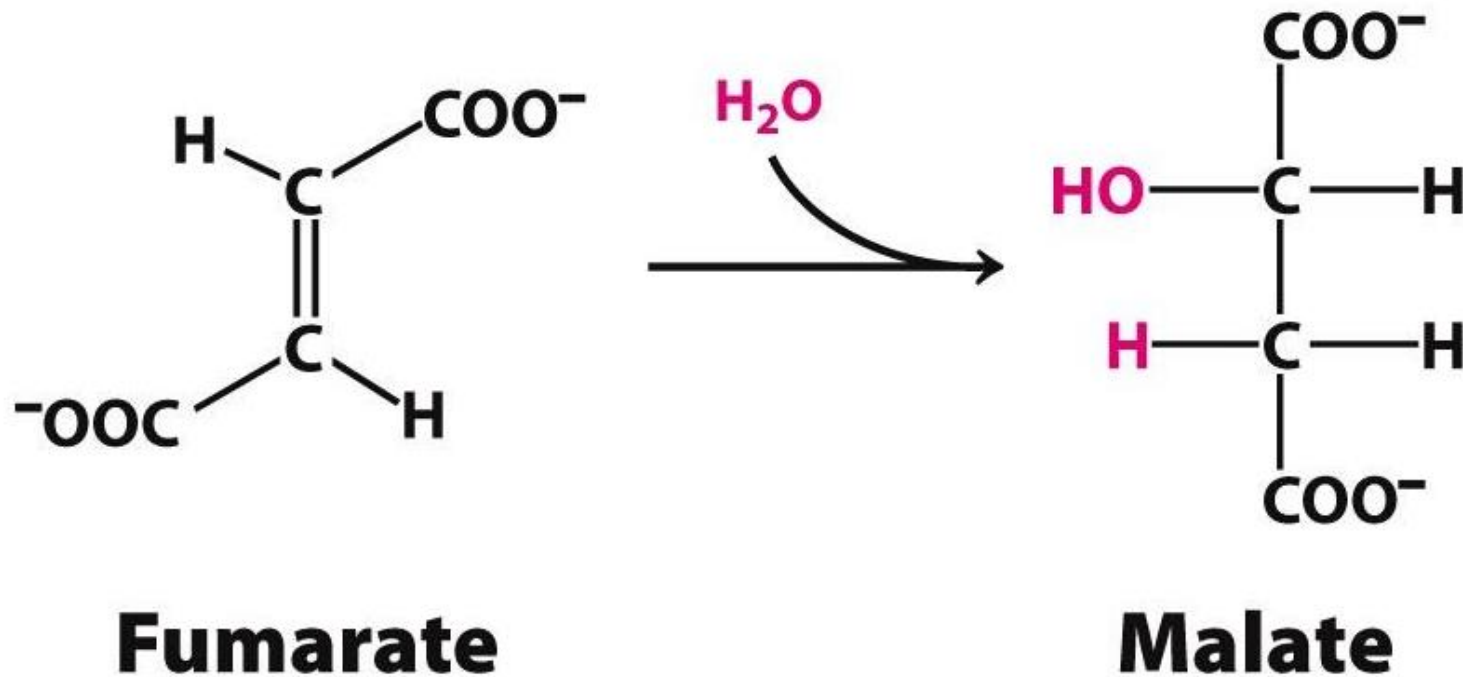
Enzym je kompetitivně inhibován molekulami z pozdějších fází cyklu - **malátem a oxalacetátem**.

Sukcinyl dehydrogenáza jako jediný z enzymu se nachází na **vnitřní membráně mitochondrie**. To proto, že tento enzymatický komplex se účastní jak citrátového cyklu tak i respiračního řetězce.

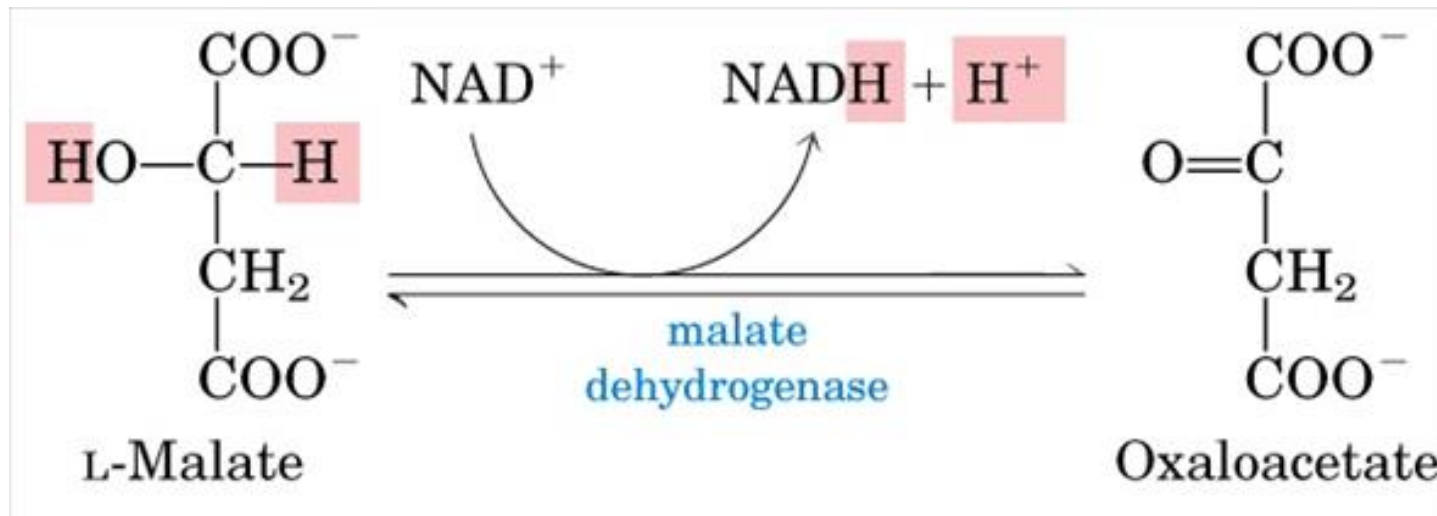
Umístění umožňuje transport elektronů uvolněných oxidací sukcinátu putovat přes další kofaktory do mezimembránového prostoru – zde jsou využity pro redukci **ubichinonu** (koenzym Q10) na ubichinol.



Fumarát je v další fázi cyklu hydratován na **L-malát**. Reakce je katalyzována **Fumarázou**. Enzym má 2 isoformy: cytosolickou a mitochondriální (cytosolická katalyzuje reakce spojené s metabolismem aminokyselin). Mitochondriální forma obsahuje navíc krátký peptidický úsek, který slouží jako signál pro jeho transport do mitochondrií.

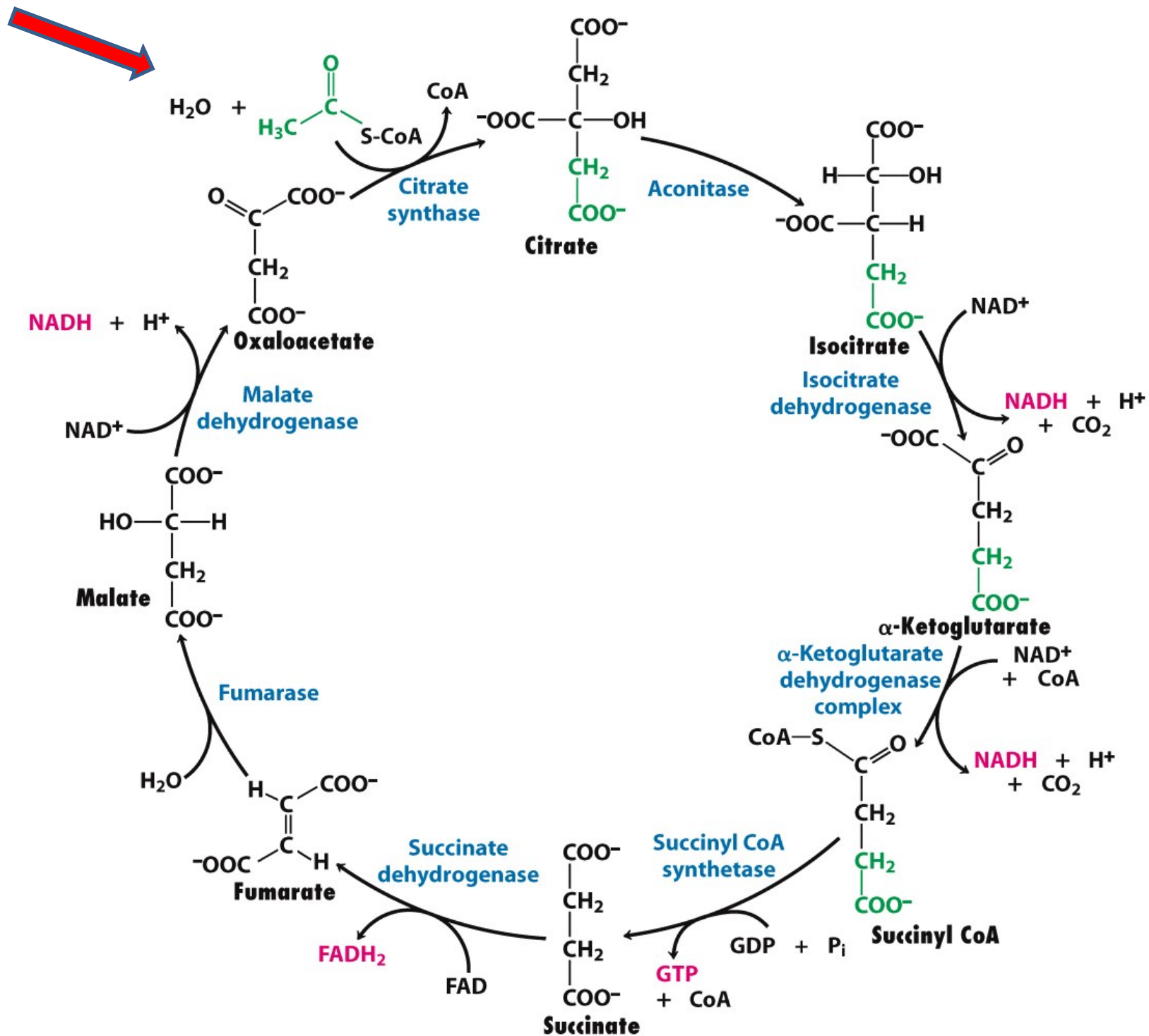


Poslední část cyklu je regenerace vstupní molekuly – oxalacetátu. **Malát** je oxidován na **oxalacetát** pomocí **Malát dehydrogenázy**. Během reakce dochází k redukci NAD⁺ na NADH/H⁺. Podobně jako předchozí enzym, má dvě isoformy – cytosolickou a mitochondriální. Cytosolická se účastní glukoneogeneze.

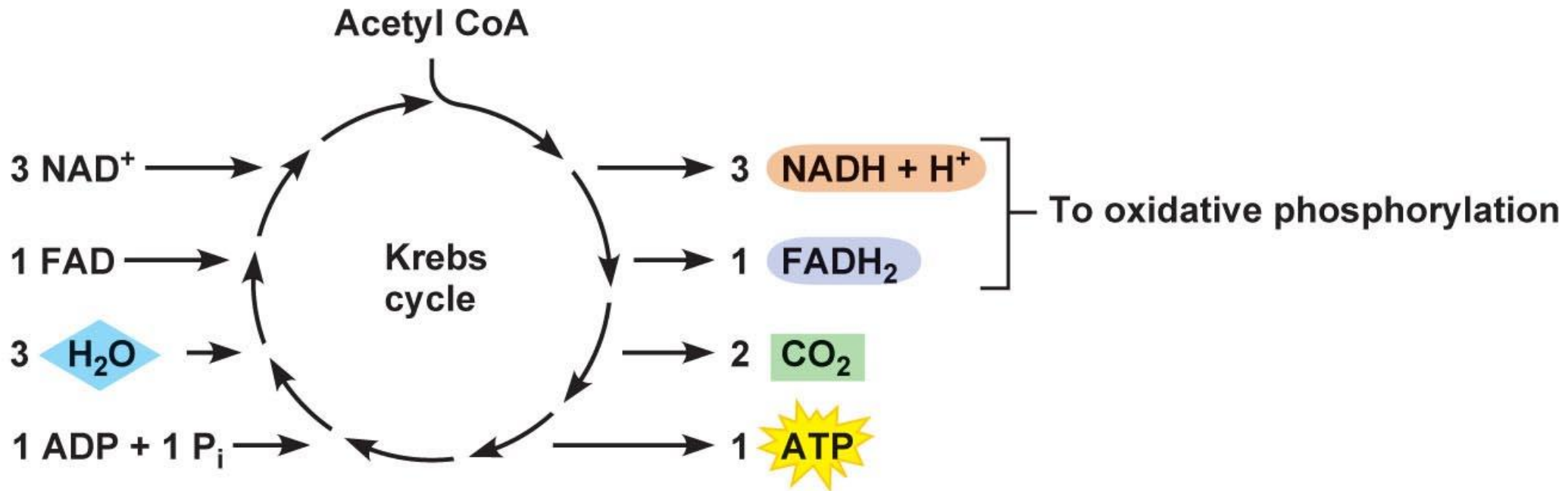


Enzym je inhibován vysokou koncentrací oxalacetátu. Zajímavá je jeho inhibice citrátem do allosterického místa enzymu – při nízké hladině NAD⁺ a malátu je inhibiční, při vysoké naopak aktivační.

Oxalacetát opětovně vstupuje jako substrát do dalšího cyklu.



V jedné otáčce citrátového cyklu je vyprodukována 1 molekula GDP (ATP), 3 NADH/H⁺, 1 FADH₂ a 2 CO₂. Z jedné molekuly glukózy je produkce dvojnásobná, protože z jedné glukózy vnikají dva acetyl-CoA.



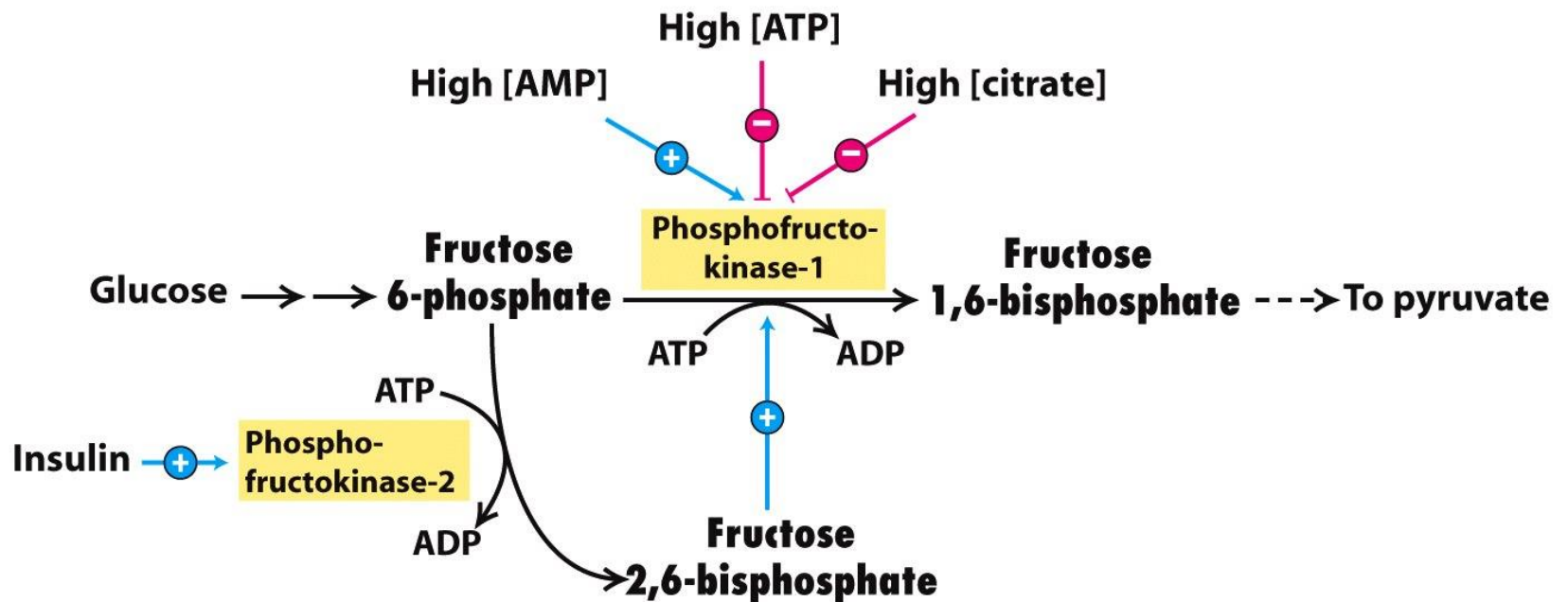
(a)



Dráha je primárně regulována vzájemnou koncentrací substrátů a produktů enzymatických reakcí v buňce. Pokud by nebyla regulována, docházelo by k plýtvání energie díky nadprodukci **NADH** a **ATP**. Snížené množství ADP způsobuje akumulaci NADH. Jak klesá hladina NAD^+ , dochází k inhibici aktivit všech dehydrogenáz (a citrát syntázy).

Dalším regulátorem je hladina Ca^{2+} , který aktivuje PDP(**pyruvate dehydrogenase phosphatase** a následně pyruvát dehydrogenázu), tak i další dehydrogenázy.

Citrát vznikající v cyklu slouží jako zpětný regulační krok. Dostává se do cytosolu, kde **inhibuje enzym glykolýzy** – fosfofruktokinázu a brání přílišné akumulaci pyruvátu.

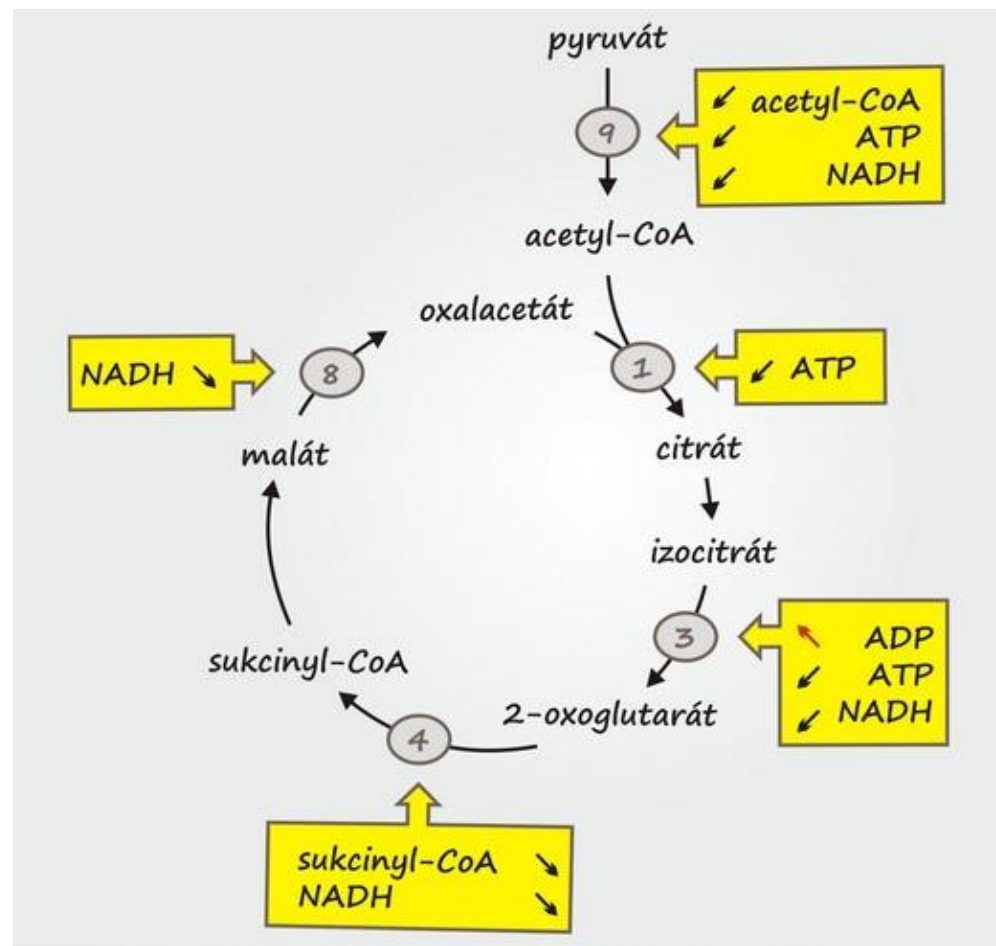


Rychlost citrátového cyklu je ovlivňována především potřebou ATP (energie) v buňce, nabídkou výchozích substrátů (oxalacetátu a acetyl-CoA) a také aktivitou klíčových enzymů.

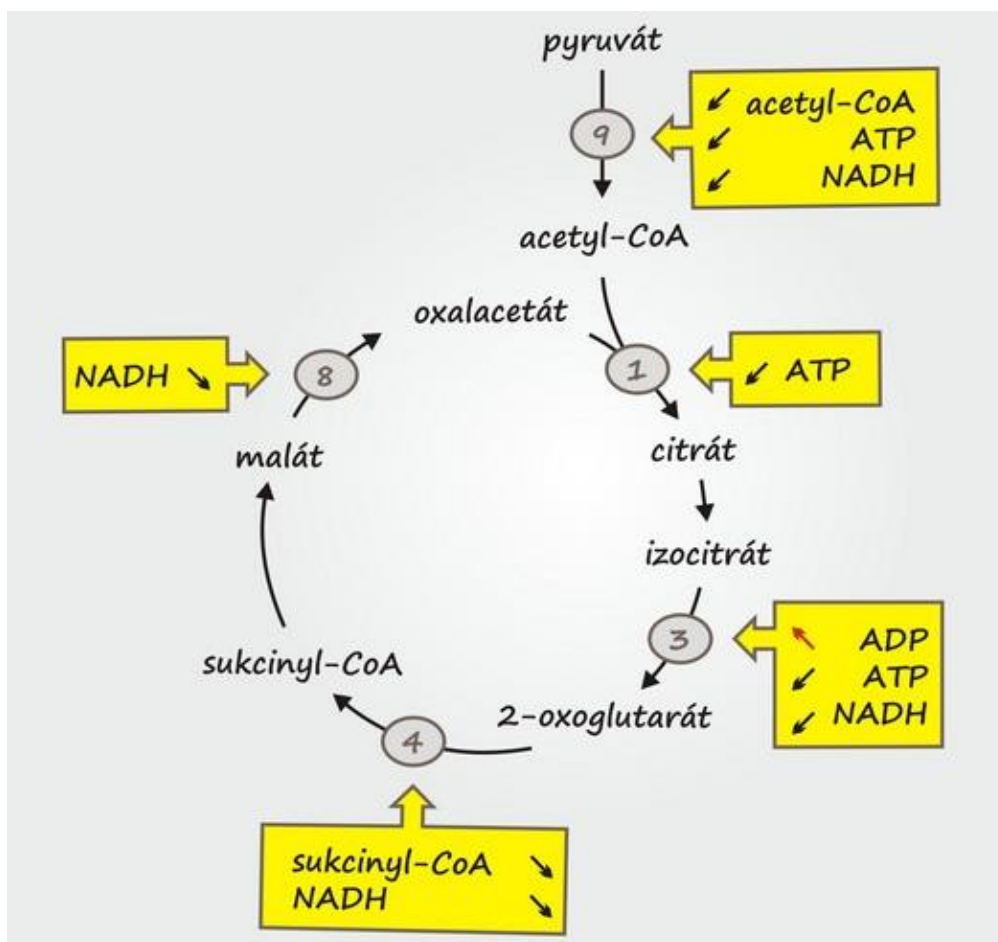
Pokud se aktivuje proces glykolýzy nebo oxidace mastných kyselin, dochází i k aktivaci citrátového cyklu. Velkou roli hraje i obsah NADH.

Současně je nutno mít na zřeteli úzkou provázanost s regulací aktivity pyruvátdehydrogenázy (9).

Prvním regulačním místem je kondenzace oxalacetátu s acetyl-CoA. ATP vystupuje v roli allosterického inhibitoru enzymu citrátsyntázy (1) a jeho účinek spočívá ve zvýšení hodnoty K_M pro acetyl-CoA. Se zvyšující se koncentrací ATP se snižuje afinita enzymu k acetyl-CoA, což v důsledku vede ke snížení produkce citrátu.



„Nejpomalejším“ enzymem cyklu je izocitrátdehydrogenáza (3), jejíž aktivita klesá se zvyšujícím se poměrem ATP/ADP. Vysoká koncentrace ATP způsobí inhibici tohoto enzymu, následně se začne zvyšovat koncentrace citrátu, který se pak přenáší přes mitochondriální membránu do cytosolu buňky. **Zde začne inhibičně působit na aktivitu fosfofruktokinázy.** Dochází ke snížení rychlosti glykolýzy a v konečném důsledku ke snížení produkce pyruvátu (a tím i oxalacetátu případně acetyl-CoA). Tento reakční krok je druhým regulačním místem cyklu.



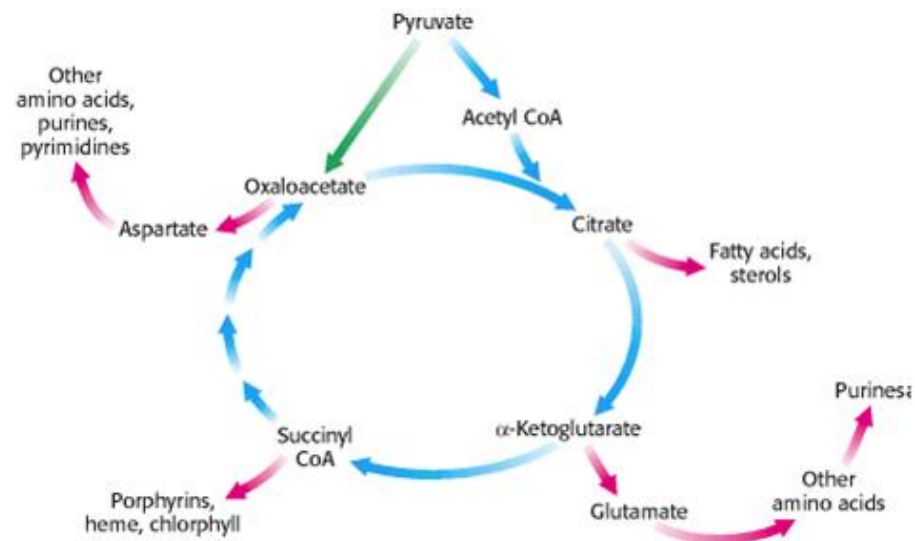
Molekuly vznikající v citrátovém cyklu jsou součástí dalších metabolických drah.

Acetyl-CoA se nemůže transportovat ven z mitochondrií. V cytosolu je získáván z mitochondriálního citrátu, pro který má mitochondrie transportní protein. V cytosolu je citrát rozložen na oxalacetát a acetyl-CoA (opačná reakce k citrátovém cyklu). Poté slouží k syntéze masných kyselin a cholesterolu.

α -ketoglutarát – prekurzor pro syntézu některých aminokyselin, které jsou navíc potřeba pro syntézu nukleotidů.

Oxalacetát – prekurzor pro aspartát a glukózu v glukoneogenezi.

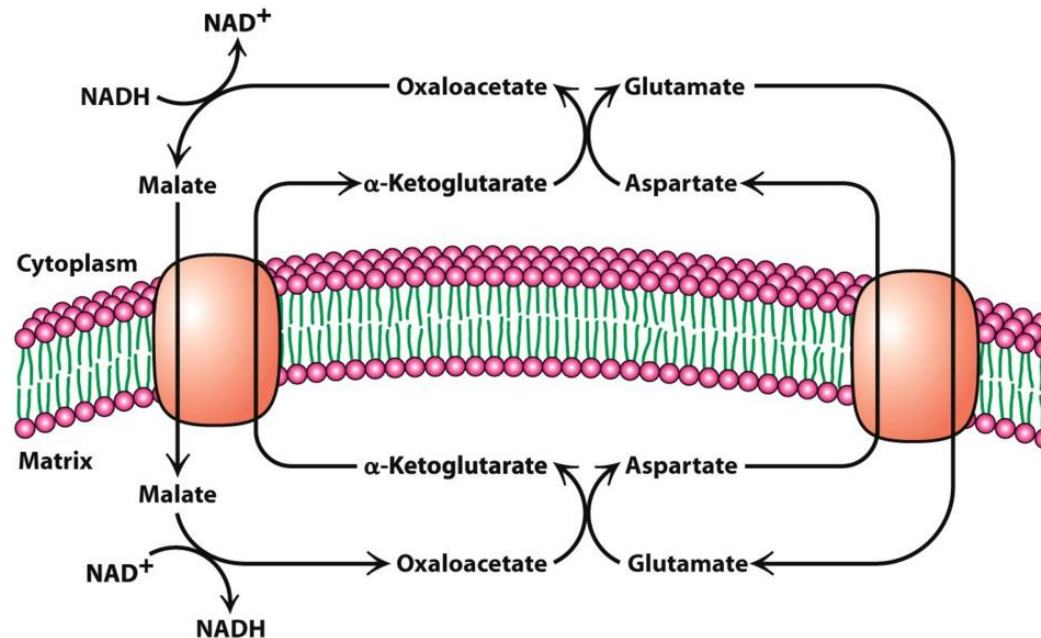
sukcinyl-CoA – syntéza porfirínového kruhu (hem)



Citrátový cyklus slouží k aerobní regeneraci **NAD⁺** potřebné pro enzymy glykolýzy. Oxidativní regenerace NAD⁺ má výhodu v tom, že je redoxní potenciál nepřímo transportován do mitochondrií, kde je využit pro tvorbu ATP v respiračním řetězci. Tohoto přenosu se účastní **malát-aspartátový člunek**.

Metabolická dráha se skládá ze **4 proteinů** -

Enzymů **Malát dehydrogenázy** a **Aspartát aminotransferázy** (obě mají cytosolické a mitochondriální isoformy) a dvou transportních proteinů – antiportérů (**Malát- α -ketoglutarátový antiportér** a **Glutamát-Aspartát antiportér**).



Transportér čili přenašeč je běžný výraz pro membránový protein, umožňující specifický transport solutu (rozpuštěná látka) iontového i neiontového charakteru, kdy se buď neuplatňuje zdroj energie (zprostředkovaná difuze), nebo je zdrojem elektrochemický potenciál nějakého kationtu (sekundární aktivní transport), nebo nějaká exergonická chemická nebo fotochemická reakce (primární aktivní transport).

Na rozdíl od kanálů je přenašeč orientován svým vazebným místem střídavě na jednu a na druhou stranu membrány.

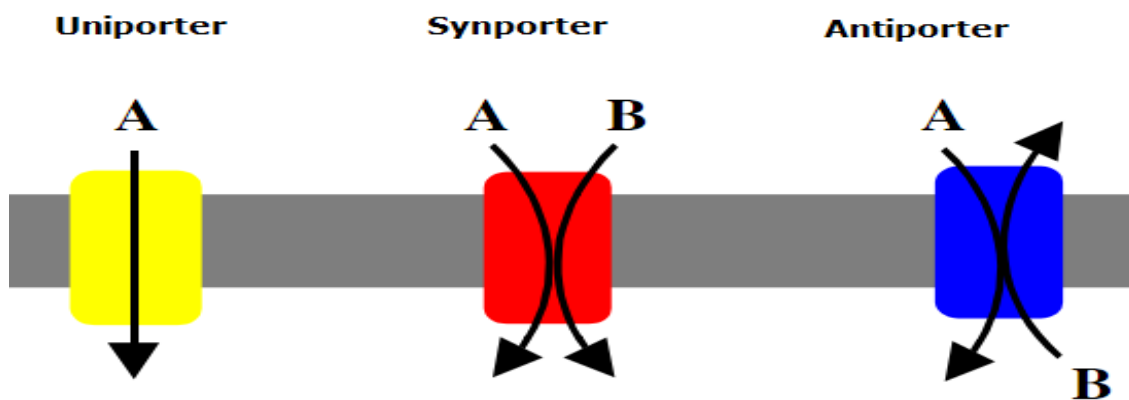
Exportér je přenašeč, který funguje ve směru z buňky do vnějšího prostředí.

Importér je přenašeč, který funguje ve směru z vnějšího prostředí do buňky.

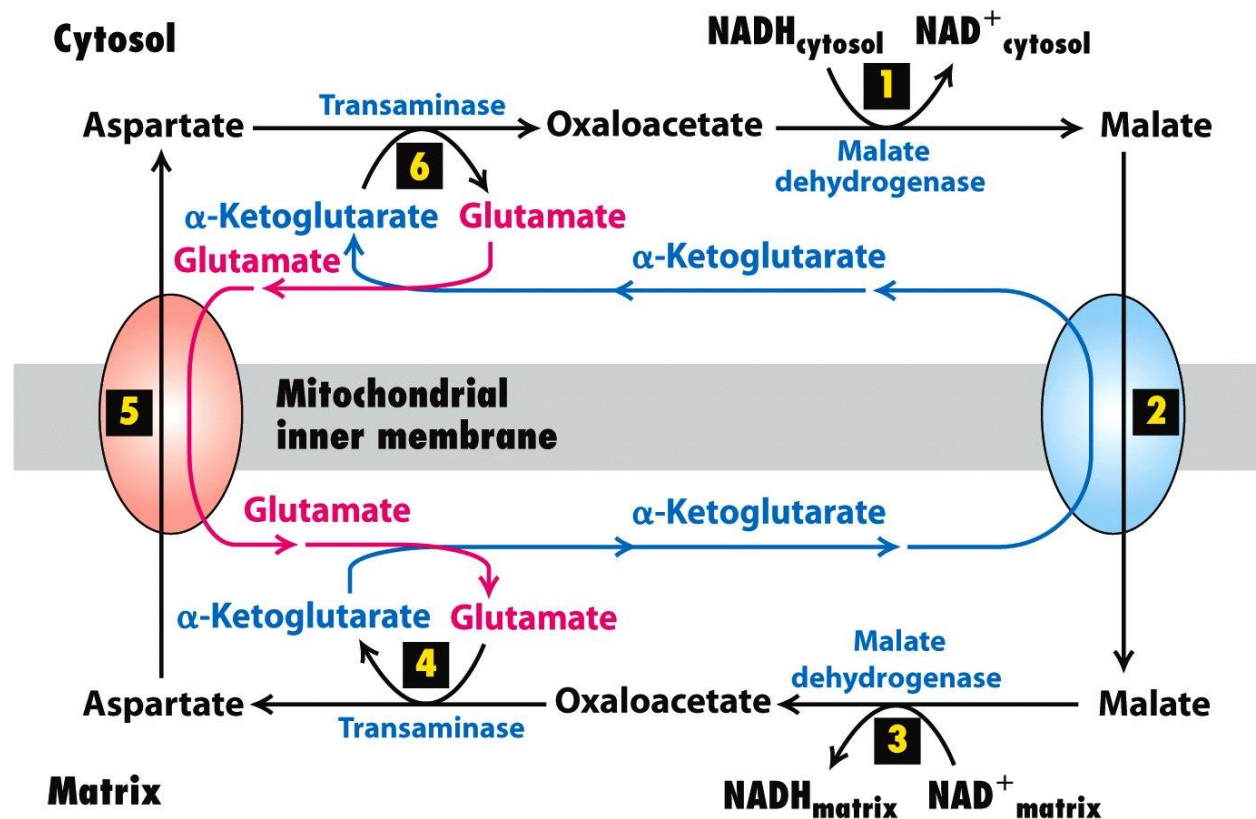
Uniporter je přenašeč transportující jedinou molekulu nebo ion.

Antiporter je přenašeč, transportující dva (výjimečně tři) ionty v opačném směru přes membránu.

Symporter je přenašeč transportující dva soluty týmž směrem, přičemž alespoň jeden z nich je elektricky nabitý.



V cytosolu v přítomnosti NADH oxidován **oxalacetát** na **malát**. Z reakce se uvolní NAD⁺, který je opětovně využit v jiných reakcích. **Malát** vstupuje do **Malát- α -ketoglutarátového antiportéru**. Molekuly **malátu** vstupuje z mezimembránového prostoru mitochondrie do matrix, naopak z matrix je vypuštěna molekula **α -ketoglutarátu**. V matrix je malát oxidován na **oxalacetát** za redukce NAD⁺ na NADH/H⁺.



Oxalacetát nemůže být transportován přes mitochondriální membrány. Proto se na **oxalacetát** může být následně vázána aminoskupina pomocí **aspartát aminotransferázy** a vzniká **α -ketoglutarát**. Aminoskupina je transportována z aminokyseliny **glutamátu**.

Druhý antiportér, **Glutamát-Aspartát antiportér**, přenesse **aspartát** ven z matrix a přinese molekulu **glutamátu**. Následně je aspartát deaminován na **oxalacetát**. Aminoskupina je přenesena na **α -ketoglutarát** a dochází k regeneraci poslední molekuly člůnku, **glutamátu**.

