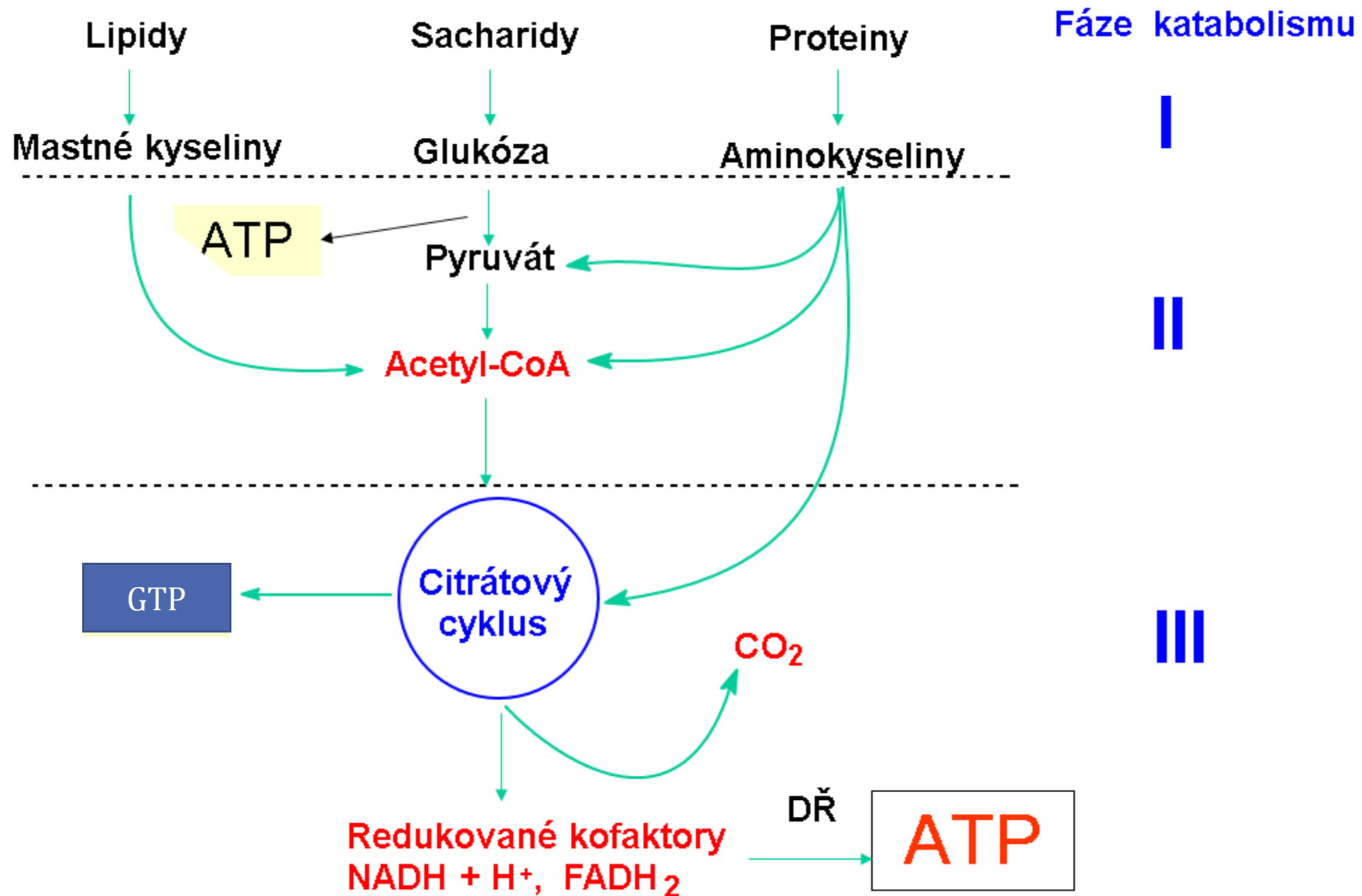


# Citrátový cyklus a dýchací řetězec

© Biochemický ústav LF MU 2018 (JG, HP, JD)



# Tři fáze metabolismu

## I. Fáze

- ✓ Probíhá v zažívacím traktu
- ✓ Hydrolytické štěpení velkých molekul na jejich základní jednotky
- ✓ Reakce katalyzují hydrolytické enzymy
- ✓ Výtěžek ATP je nulový

## II. Fáze

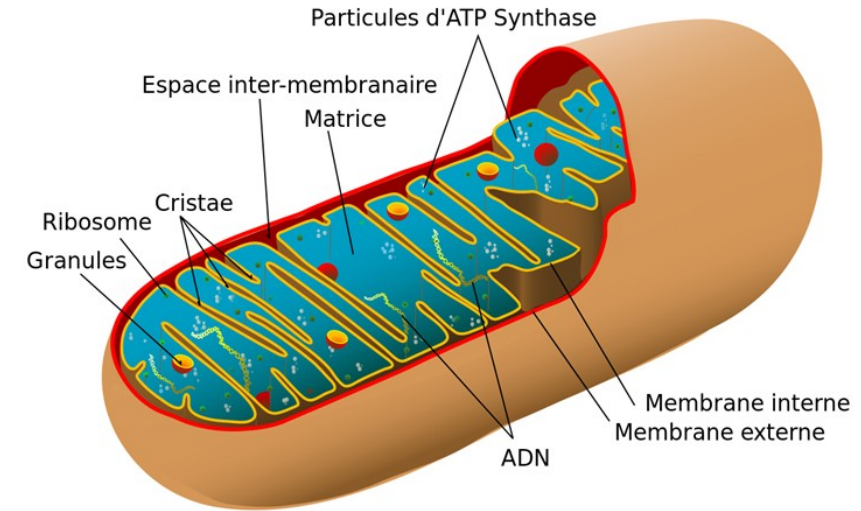
- ✓ Probíhá uvnitř buněk v různých tkáních v mtch/cytosolu
- ✓ Intracelulární enzymy – většinou dehydrogenázy
- ✓ Typickým produktem je AcCoA
- ✓ Produkce ATP je malá – substrátová fosforylace během glykolýzy
- ✓ Produkce redukovaných kofaktorů NADH a FADH<sub>2</sub>

## III. Fáze

- ✓ Největší zisk ATP
- ✓ Citrátový cyklus, DŘ a aerobní fosforylace
- ✓ Probíhá v mitochondriích

# Mitochondrie

- ✓ Vnější membrána:
  - ✓ dobře propustná pro většinu molekul
  - ✓ obsahuje bílkovinu porin, která tvoří propustné póry
- ✓ Vnitřní membrána:
  - ✓ velmi nepropustná
  - ✓ obsahuje řadu bílkovinných transportérů a enzymy a kofaktory dýchacího řetězce
  - ✓ ATP-áza syntetizující ATP
- ✓ Mezimembránový prostor
  - ✓ Protonový gradient (protonmotivní síla, která může být využita k tvorbě ATP)
- ✓ Matrix:
  - ✓ Gelovitý charakter
  - ✓ Citrátový cyklus
  - ✓  $\beta$ -oxidace
  - ✓ Replikace DNA
  - ✓ Proteosyntéza (13 proteinů dýchacího řetězce a oxidační fosforylace)
  - ✓ Játra – část močovinového cyklu, některé transaminace, oxidační dekarboxylace pyruvátu , ...
- ✓ Mitochondriální DNA – cirkulární, méně než 1 % buněčné DNA, celkem 37 genů, kóduje pouze 13 bílkovin



# Citrátový cyklus



## ✓ Krebsův cyklus

### ✓ Hans Adolf Krebs

- ✓ Ve 30. letech 20. století sledoval na holubičí svalové tkáni, jak a zda se živiny spalují na  $\text{CO}_2$
- ✓ Napadlo ho, že by se OA mohl regenerovat vazbou na nějaký produkt přeměny živin a kondenzovat na citrát
- ✓ 1937 publikoval teorii o této přeměně
- ✓ 1953 byla Krebsovi udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu

- ✓ Citrátovým cyklem a následným dýchacím řetězcem se produkuje asi 98 % v organismu využitelné energie.

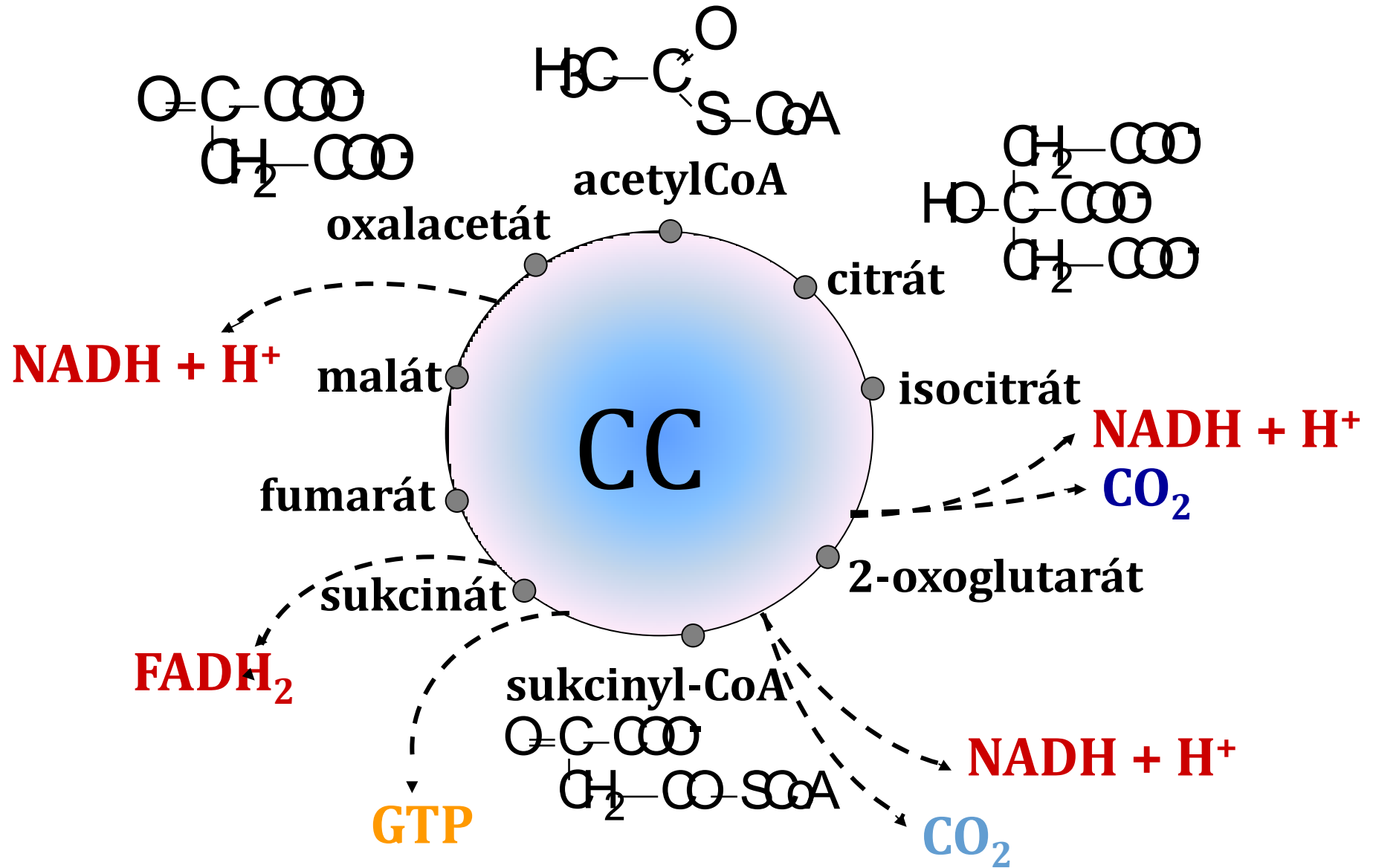
# Citrátový cyklus

- ✓ Série enzymově katalyzovaných reakcí
- ✓ Konečná dráha oxidace živin = katabolická dráha AcCoA
- ✓ Oba atomy C v AcCoA jsou zoxidovány na 2 CO<sub>2</sub>
- ✓ Přitom se uvolní 8 H<sup>+</sup> ve formě:
  - ✓ 3 NADH + H<sup>+</sup>
  - ✓ 1 FADH<sub>2</sub>
    - ✓ po reoxidaci NADH a FADH<sub>2</sub> v dýchacím řetězci ⇒ energie (ATP)
- ✓ Vznik 1 molekuly GTP
- ✓ Lokalizace:
  - ✓ Matrix mitochondrie

# Sumární rovnice citrátového cyklu



Produkt CC	Jeho další osud
CO <sub>2</sub>	Odstraněn vydýcháním
8 H <sup>+</sup>	Vazba na kofaktory NADH a FADH <sub>2</sub>
CoASH	Uvolnění a vstup do dalších reakcí
GTP	Přímý zisk energie

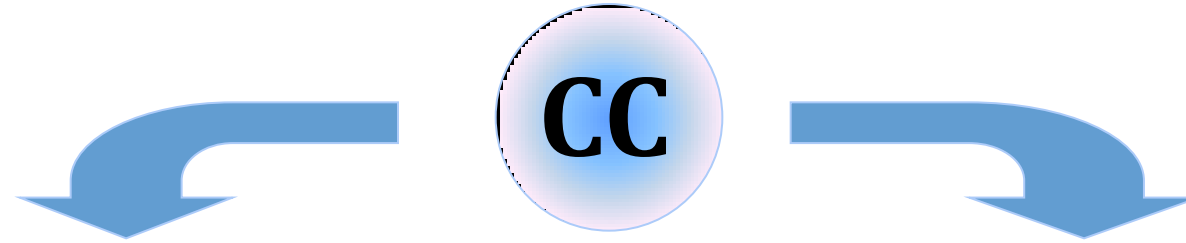




# Vznik AcCoA v matrix mitochondrie

- ✓ Oxidační dekarboxylace pyruvátu z glc a AK
- ✓  $\beta$ -oxidace MK
- ✓ Katabolismus některých AK (Thr, Trp, Lys, Leu, Ile)
- ✓ Extrahepatální utilizace KL
- ✓ Katabolismus ethanolu

# Význam citrátového cyklu



Katabolický charakter

celková oxidace uhlíkatých  
sloučenin

**C**  $\Rightarrow$   $\text{CO}_2$

**H**  $\Rightarrow$  redukované koenzymy

**energie**

Anabolický charakter

zdroj sloučenin (prekursorů) pro  
biosyntetické reakce

**meziprodukty CC**  $\Rightarrow$  syntetické reakce

# Energetická bilance CC

## Vznik v CC

## Ekvivalent ATP (DŘ)

1 × GTP

1

3 × NADH + H<sup>+</sup>

9

1 × FADH<sub>2</sub>

2

Celkem **12 ATP**

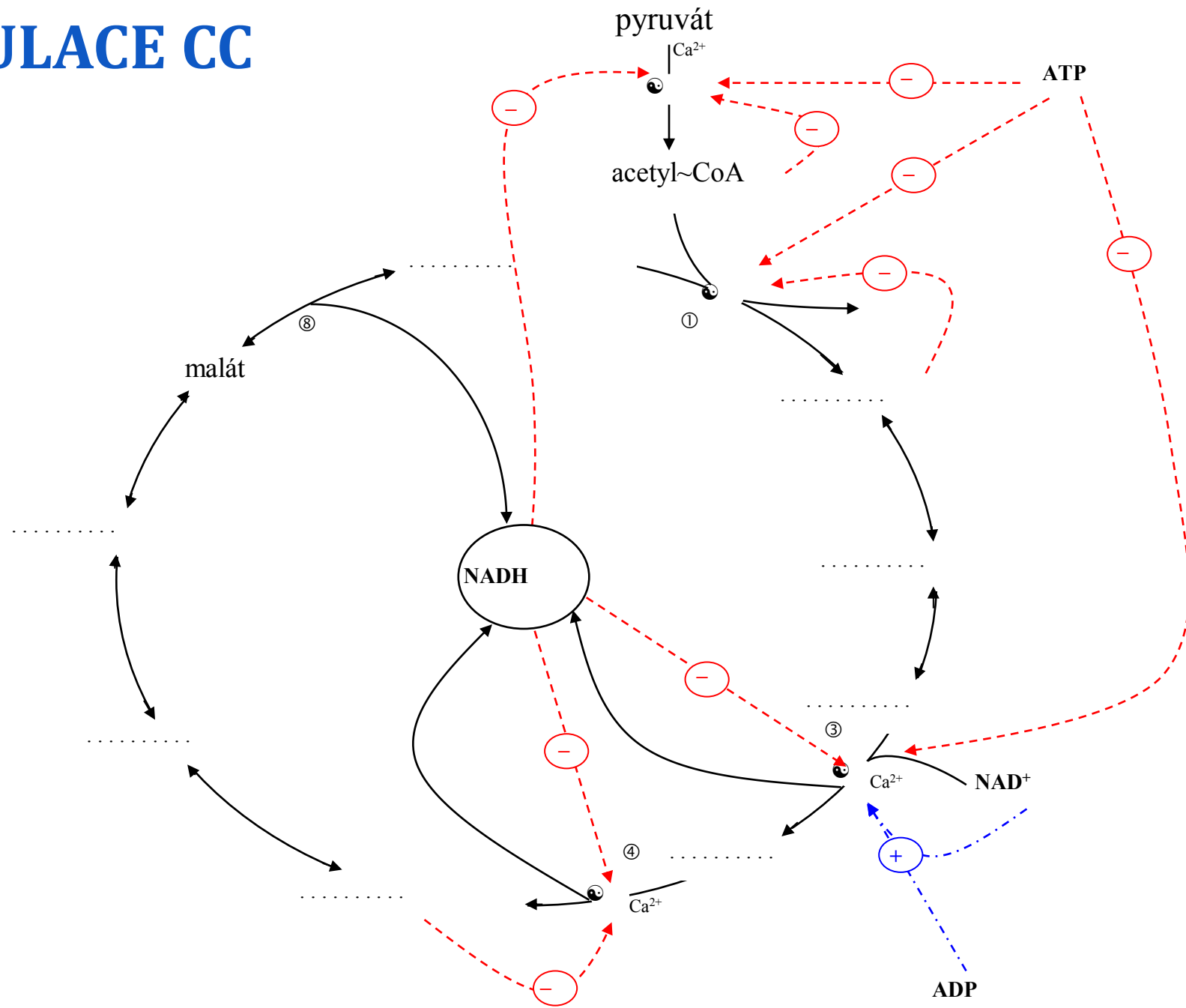
# Obecné vlivy na regulaci citrátového cyklu

- ✓ Energetický stav buňky rozhoduje o průběhu CC
  - ✓ CC probíhá jen za přítomnosti kyslíku
- ✓ Pokud má buňka dostatek energie, tak je CC zpomalen
  - ✓  $ATP/ADP > 1$   
⇒ ATP a NADH působí jako inhibitory CC
  - ✓  $NADH+H^+/NAD^+ > 1$
- ✓ Allosterická inhibice
- ✓ Inhibice produktem

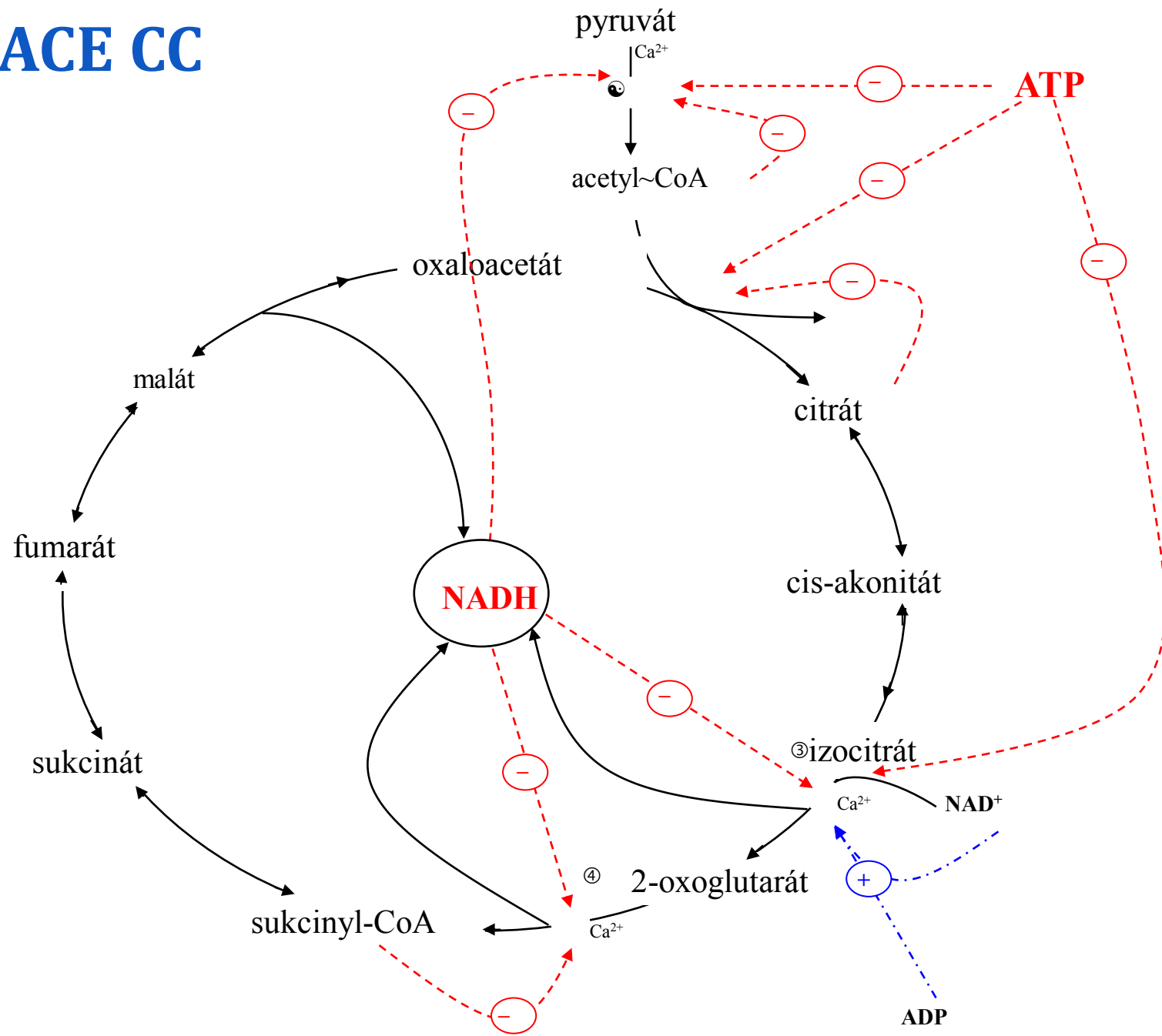
# Které reakce citrátového cyklu jsou:

- Nevratné
- Určují rychlost CC
- Allostericky inhibovány NADH
- Allostericky inhibovány ATP

# REGULACE CC



# REGULACE CC



❓ Čím je limitován průběh CC v buňce, která nemá dostatečný přísun kyslíku?

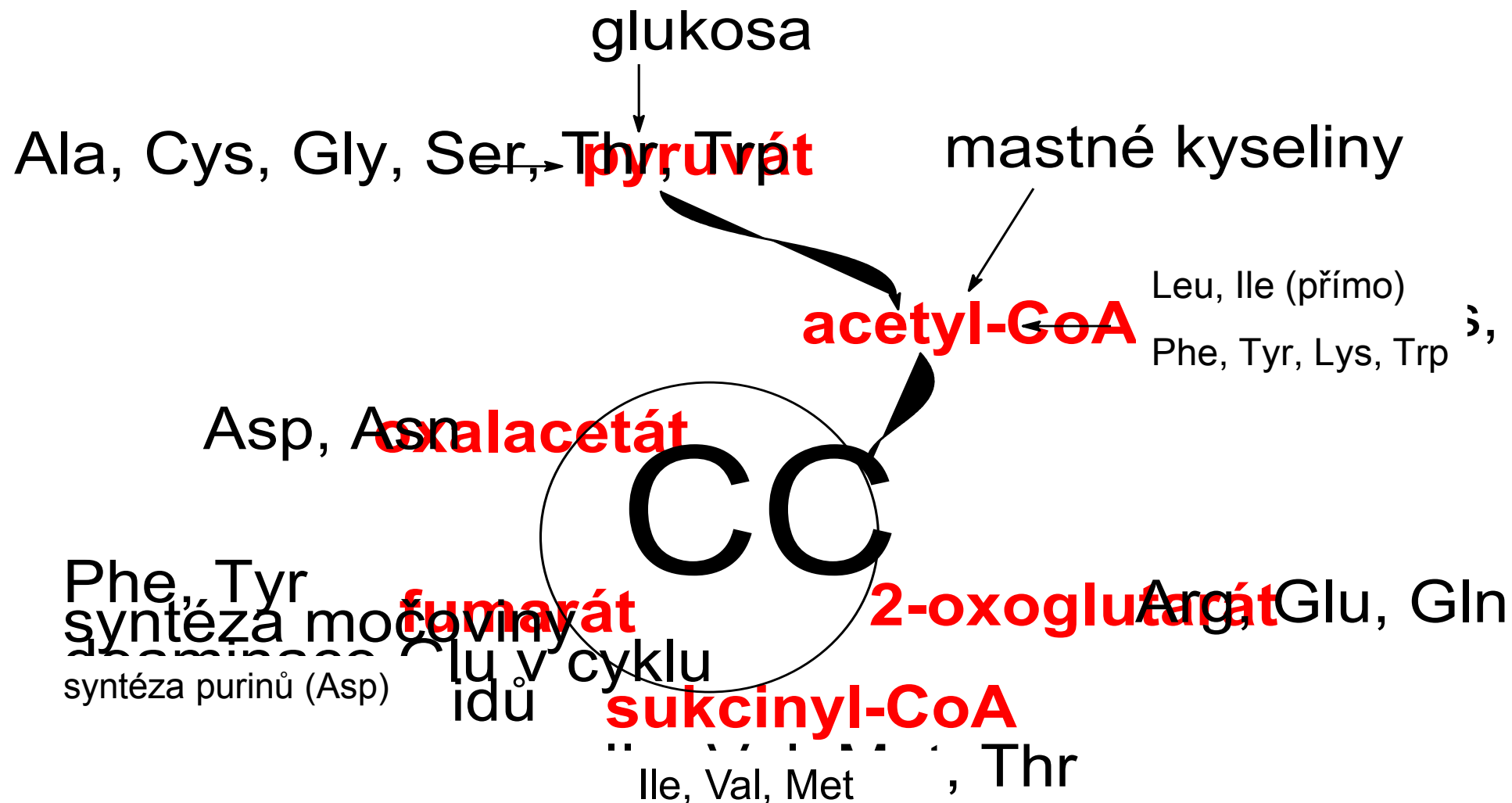
❓ Jakým způsobem je metabolizován AcCoA v hepatocytech pokud je ho nadbytek a současně:

❓ buňka má dostatek ATP?

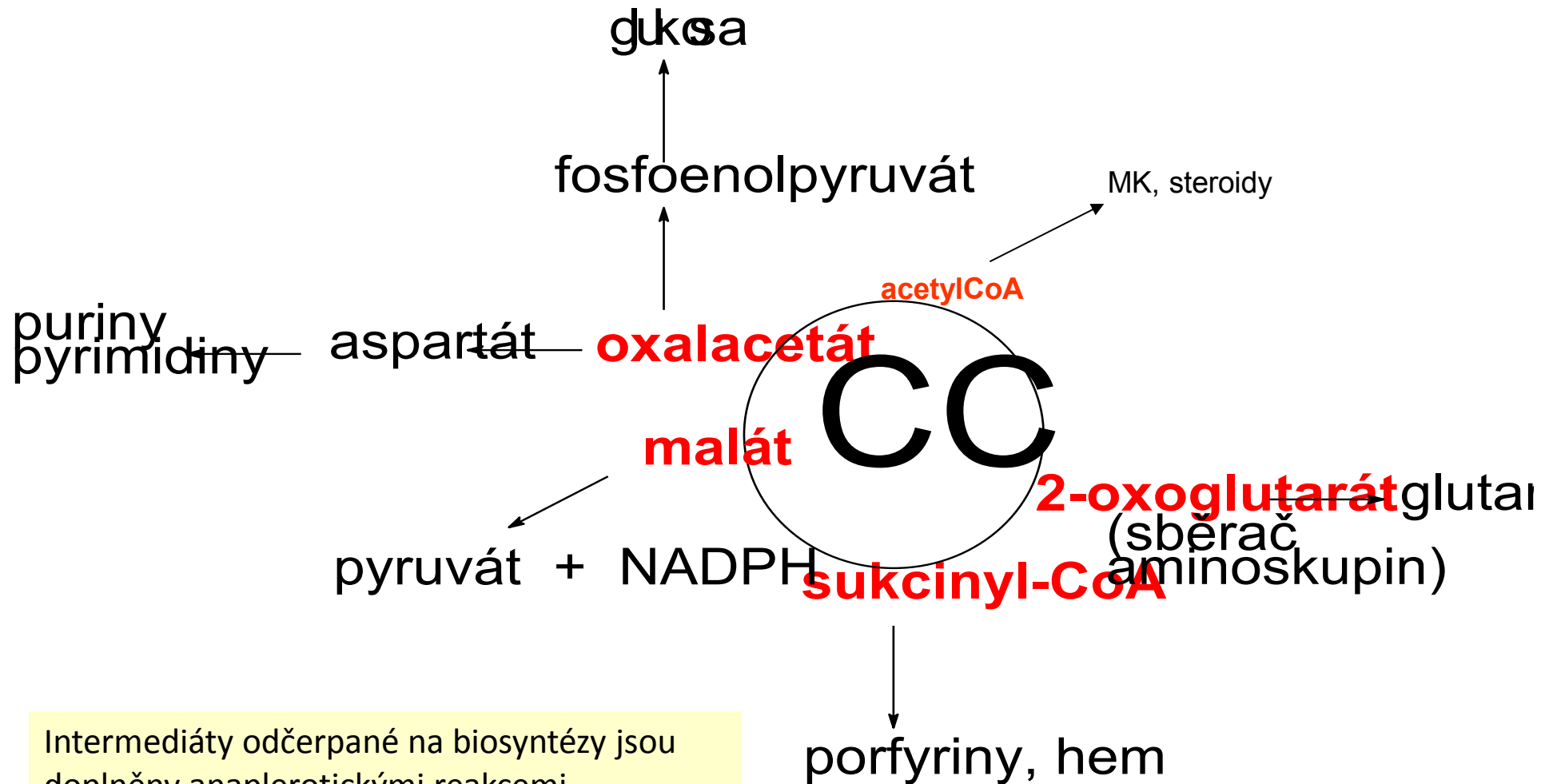
❓ buňka má nedostatek OA?



# Katabolické děje - vstupy do CC



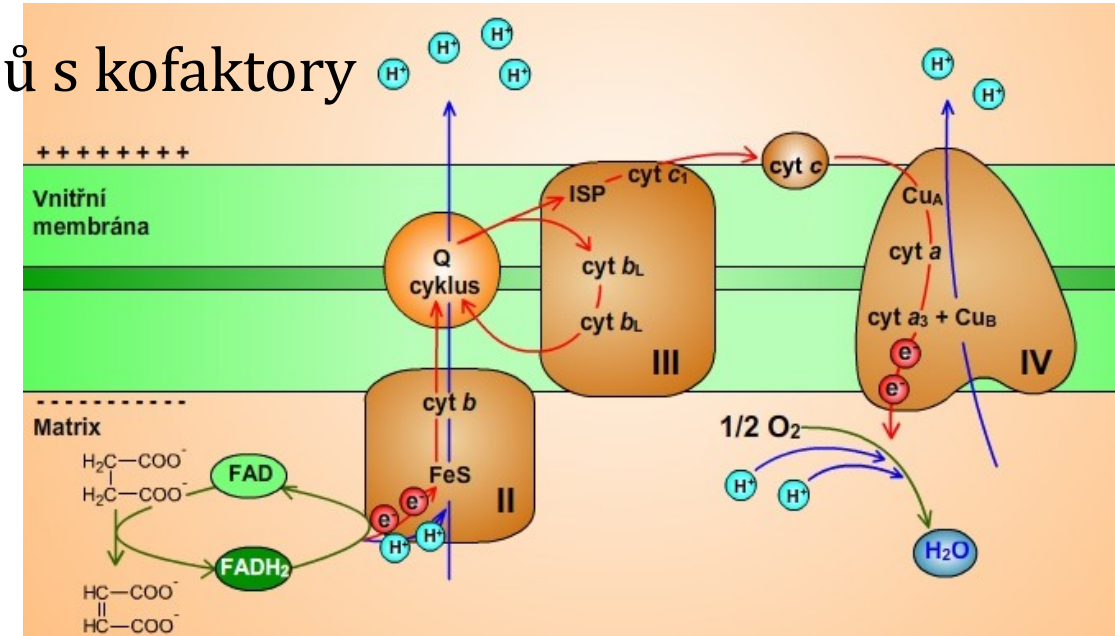
# Anabolické děje - výstupy z CC



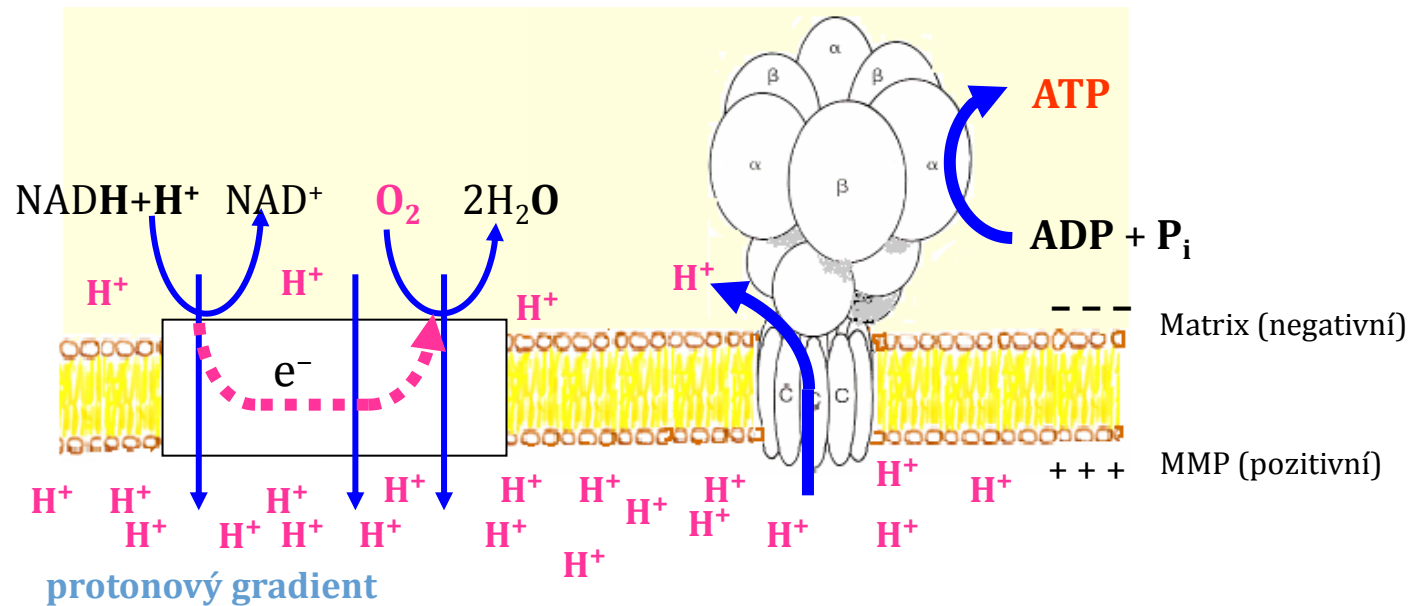
Intermediáty odčerpány na biosyntézy jsou doplněny anaplerotickými reakcemi

# Dýchací řetězec

- ✓ Vnitřní mitochondriální membrána
- ✓ Systém (kaskáda, řetěz) oxidoredukčních enzymů s kofaktory
  - ✓ enzymové komplexy I–IV
  - ✓ dva pohyblivé přenašeče (koenzym Q, cyt c)
- ✓ Kofaktory: cytochromy
  - ✓ ubichinon (koenzym Q)
  - ✓ FMN, FAD
  - ✓ bílkoviny s nehemovým železem a sírou
- ✓ Konečná fáze přeměny vodíku z živin
- ✓ Spřažení dýchacího řetězce s aerobní fosforylací (tvorba ATP)



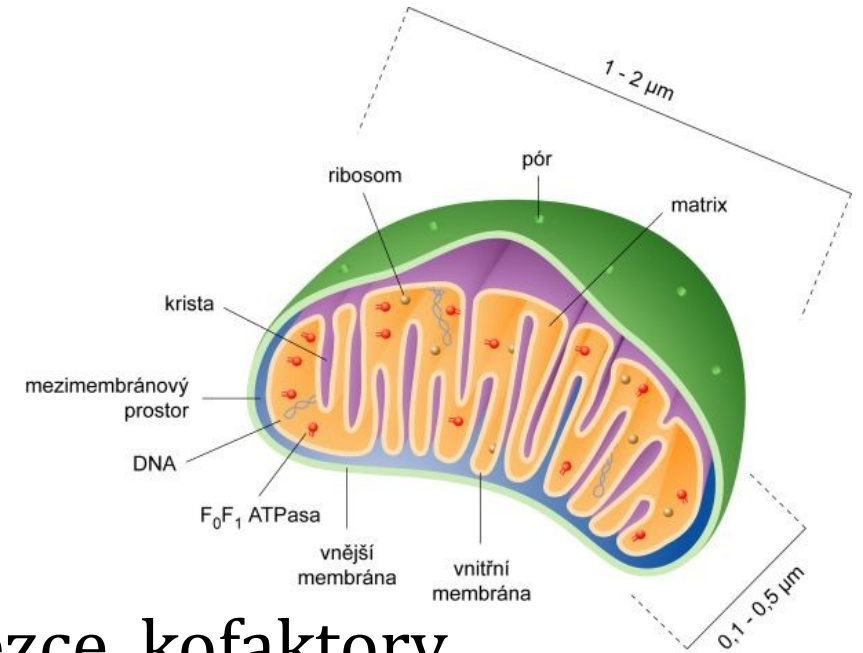
DŘ je soustava redoxních dějů ve vnitřní mitochondriální membráně, která začíná oxidací NADH a končí redukcí  $O_2$  na vodu.



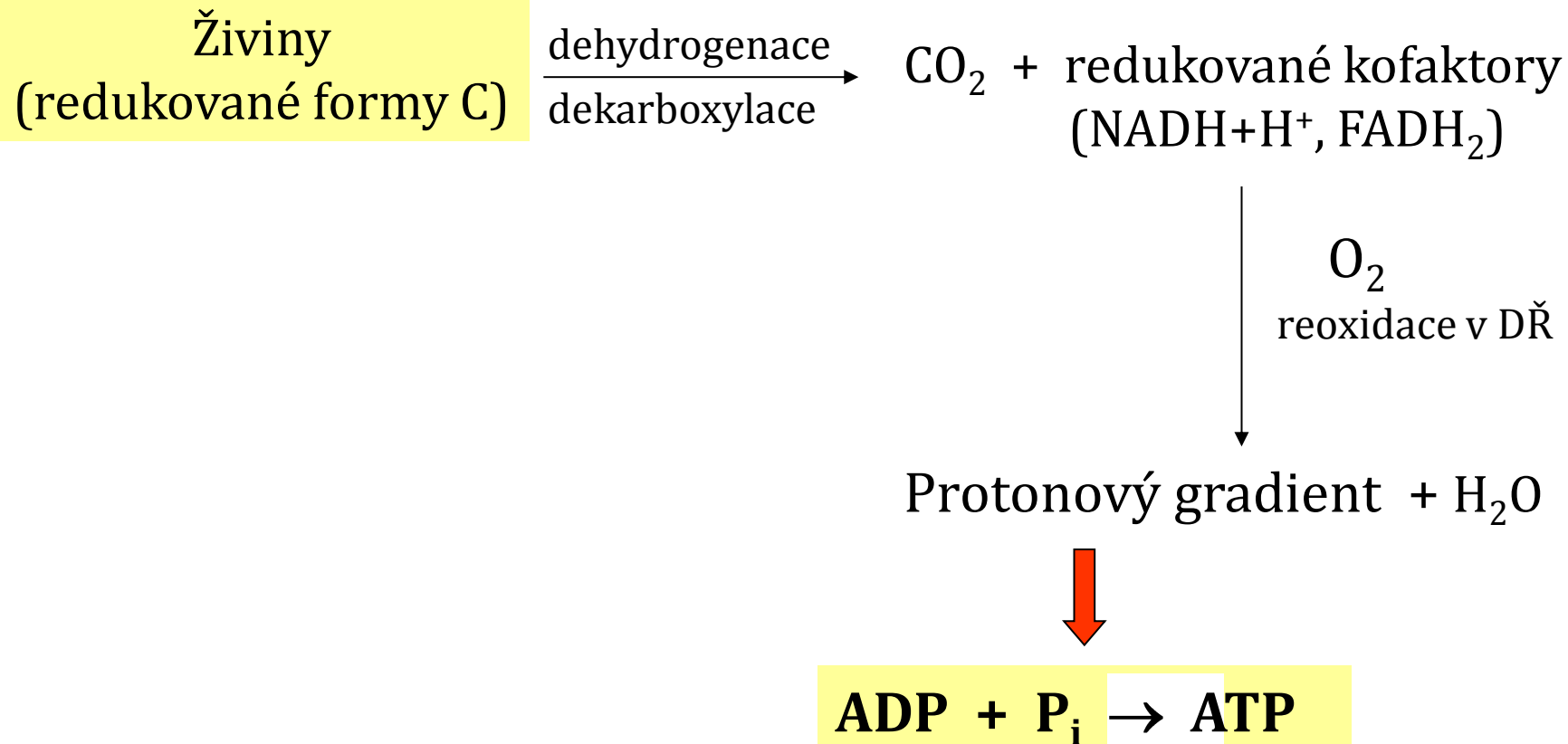
- ✓ Transfer elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně je spojen s transferem protonů přes membránu do mezimembránového prostoru.
- ✓ Protonový gradient je využit na syntézu ATP.

# Vnitřní mitochondriální membrána (VMM)

- ✓ Kristy
- ✓ Semipermeabilní
- ✓ Není propustná pro ionty
- ✓ Není propustná pro protony !
- ✓ Obsahuje enzymové komplexy dýchacího řetězce, kofaktory
- ✓ Obsahuje transportní proteiny

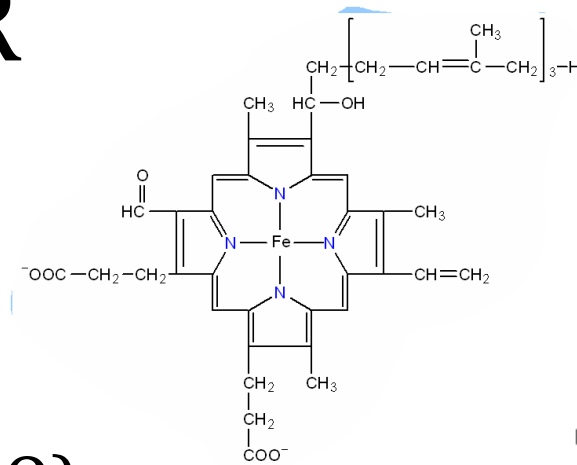


# Aerobní fosforylace je důsledek reoxidace redukovaných kofaktorů v DŘ

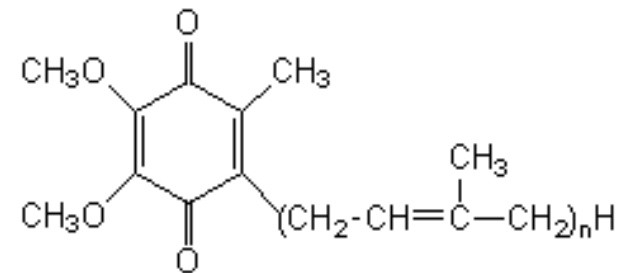


# Kofaktory DŘ

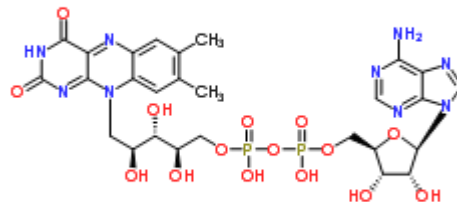
✓ Cytochromy



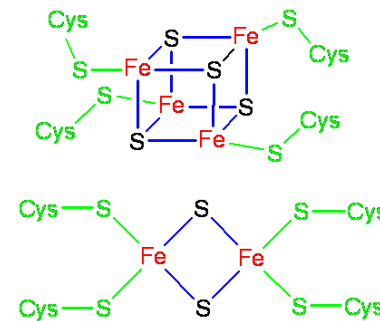
✓ Ubichinon (koenzym Q)



✓ FMN, FAD

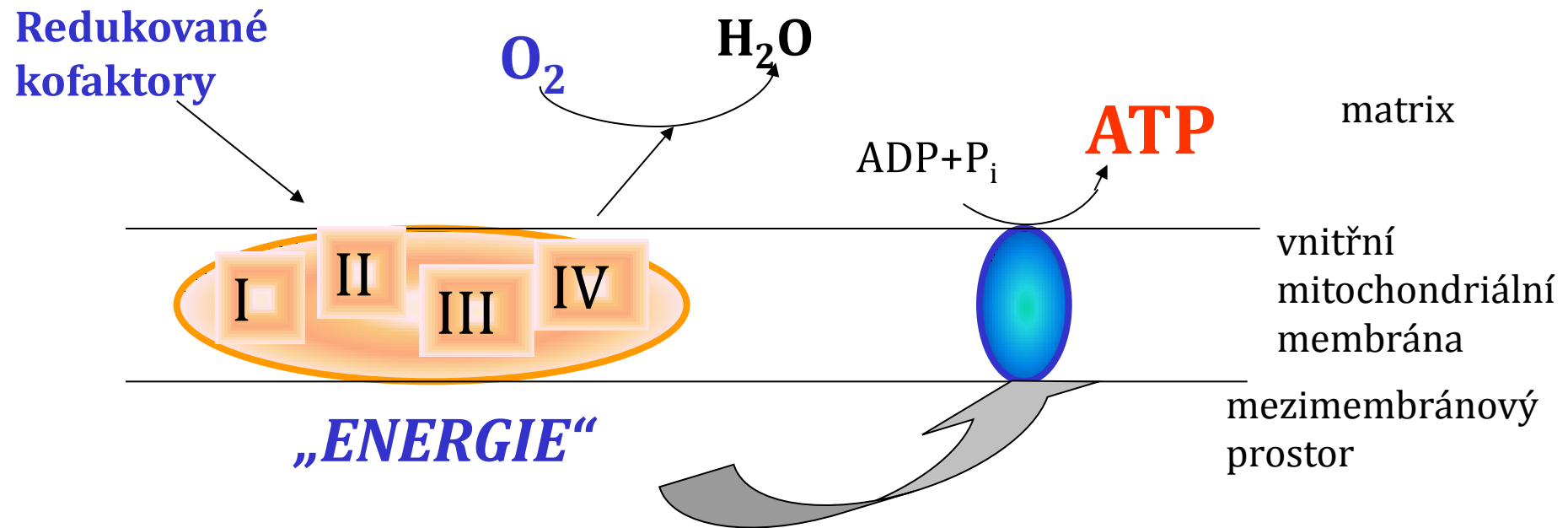


✓ Bílkoviny s nehemovým železem a sírou



# Schématický průběh DŘ

- ✓ NADH, FADH<sub>2</sub> (redukováné kofaktory) ⇔ oxidace enzymy DŘ (komplexy I-IV)
  - ✓ vstup do DŘ
  - ✓ postupný transport .....
  - ✓ reakce s kyslíkem za vzniku vody
- ✓ Uvolněná energie se uchovává se ve formě ATP







# Zdroje redukovaných kofaktorů

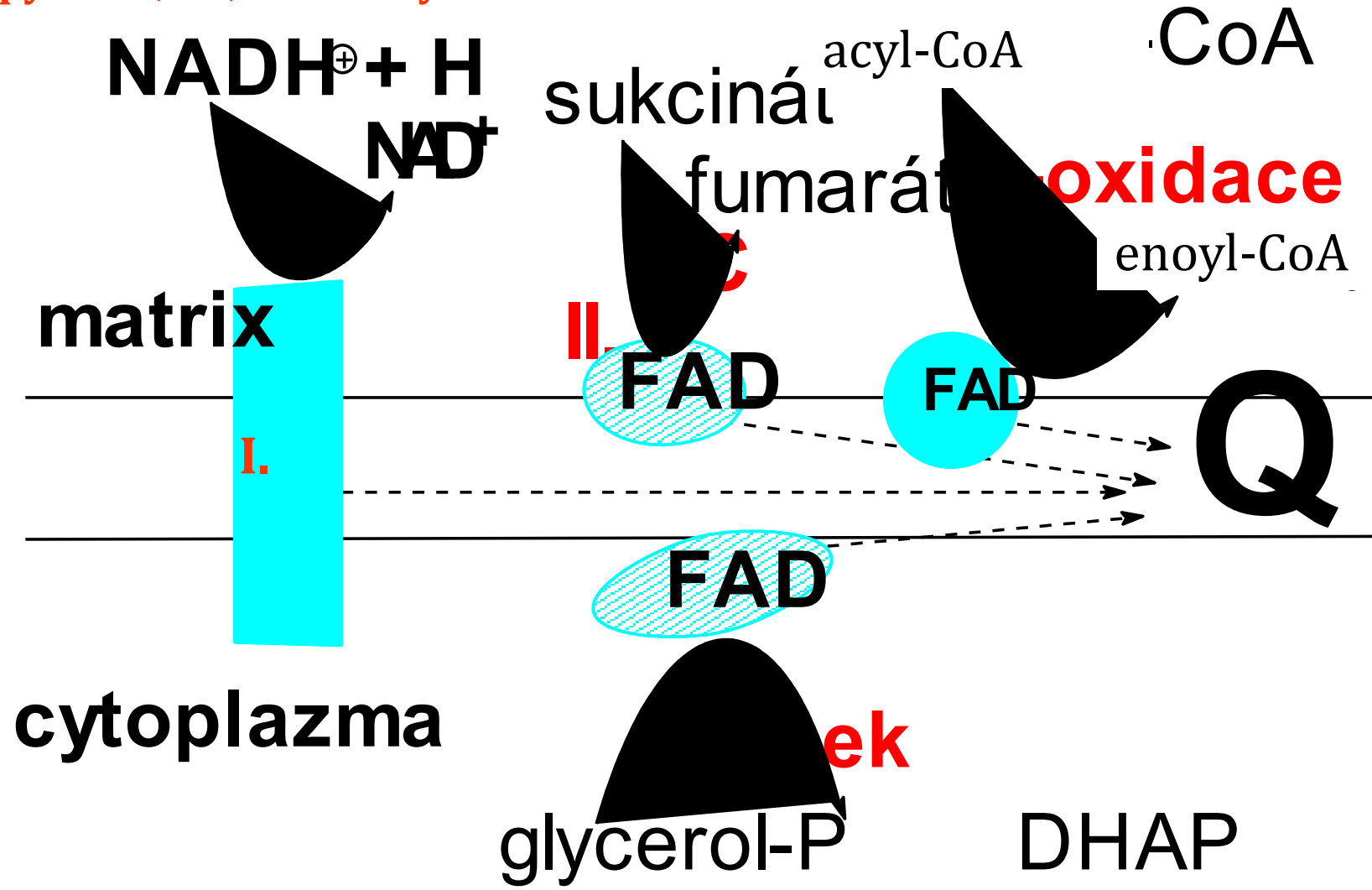
<b>NADH (matrix)</b>	citrátový cyklus (isocitrát, 2-oxoglutarát, malát), β-oxidace MK (β-hydroxyacyl-CoA), oxidační dekarboxylace pyruvátu, dehydrogenace ketolátky (β-hydroxybutyrát), dehydrogenační deaminace glutamátu
<b>NADH (cytosol)</b>	glykolýza (dehydrogenace glyceraldehyd-3-P), glukoneogeneze (dehydrogenace laktátu na pyruvát) dehydrogenace ethanolu (na acetaldehyd)
<b>FADH<sub>2</sub> (matrix)</b>	β-oxidace mastných kyselin (dehydrogenace alkanoyl-CoA) citrátový cyklus (dehydrogenace sukcinátu)

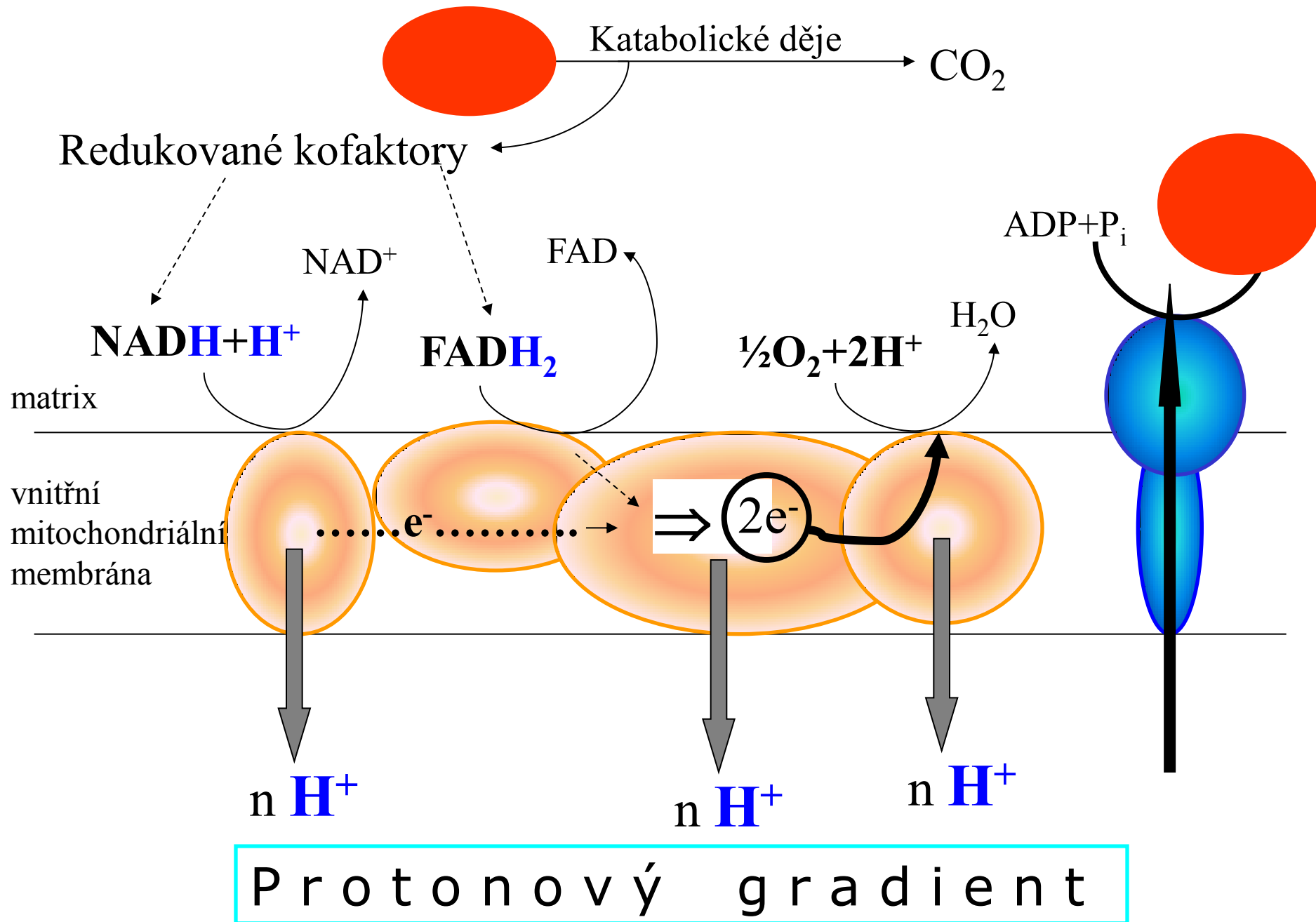
## Transport NADH z cytosolu do matrix

- ✓ NADH vznikající v cytoplazmě musí být transportován do matrix
- ✓ vnitřní mitochondriální membrána není volně propustná
- ✓ dva přenašečové mechanismy (člunky)
- ✓ aspartát/malátový (univerzální)
- ✓ glycerolfosfátový (mozek, sval)

# Sběrná místa pro redukční ekvivalenty

pyruvát, CC, ketolátky





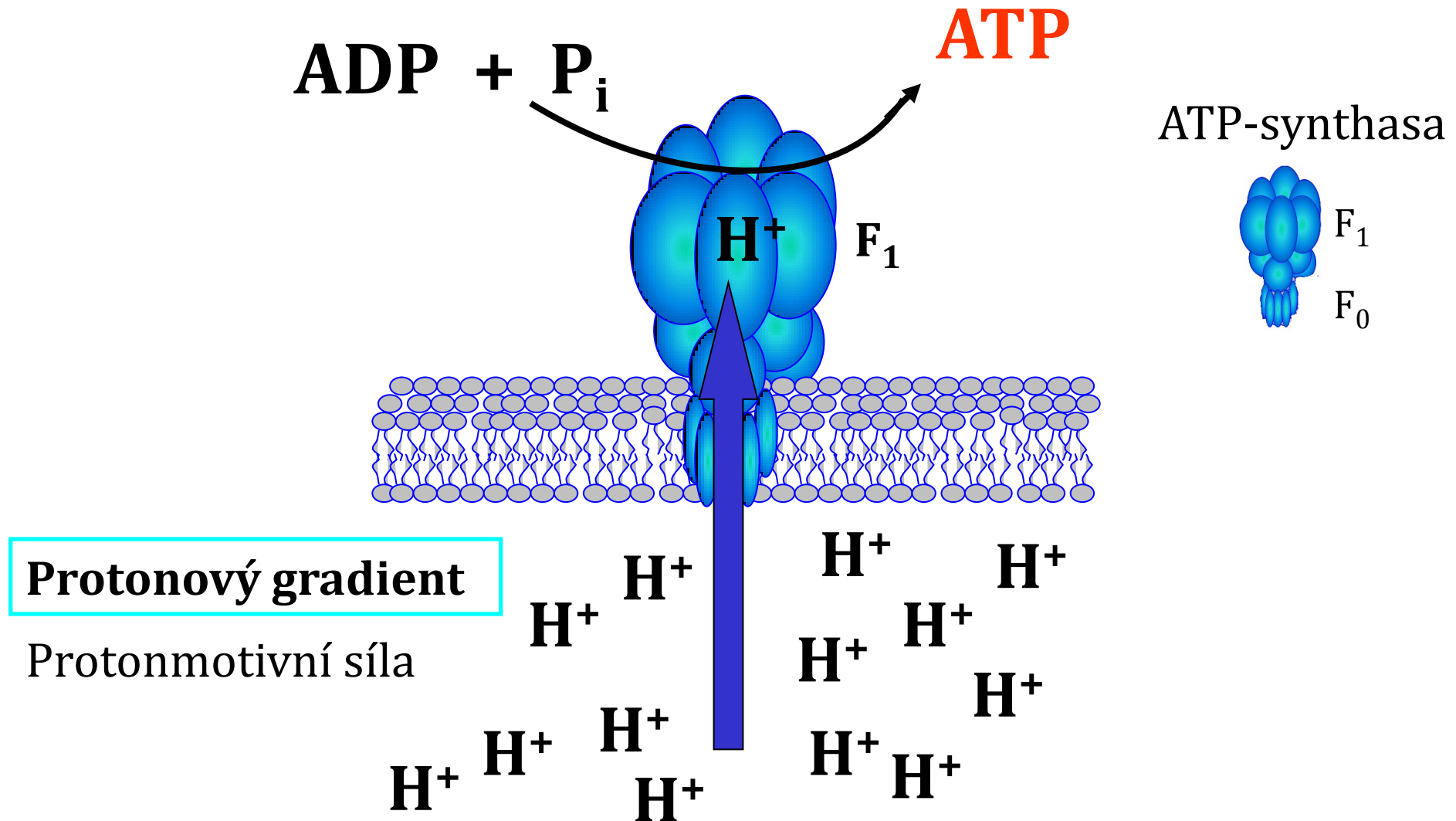
# V DŘ se třikrát převádějí protony do mezimembránového prostoru

- ✓ mezi vnitřní a vnější stranou VMM se vytvoří **protonový gradient**
- ✓ jeho vybití je spojeno s uvolněním energie (protonmotivní síla), která má dvě složky:
  - ✓ elektrická složka = rozdíl membránových potenciálů
  - ✓ koncentrační složka = rozdíl pH

## **Využití protonmotivní síly**

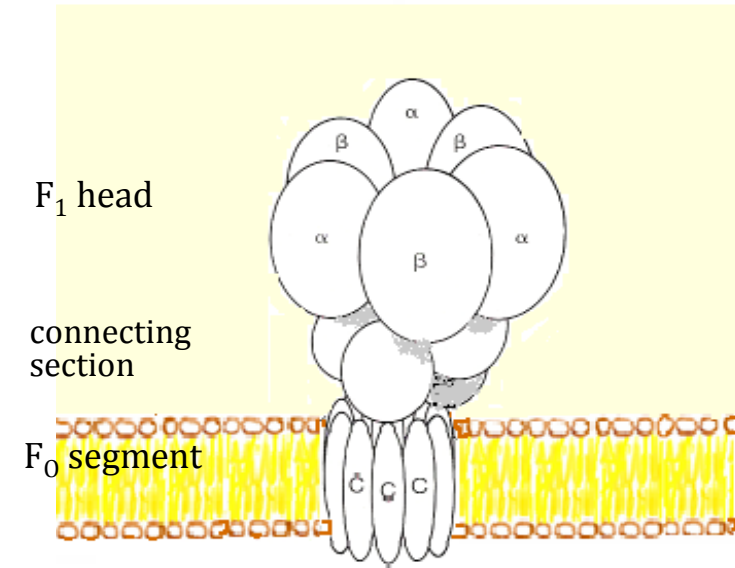
- ✓ Syntéza ATP aerobní fosforylací
- ✓ Teplo (zejména hnědá tuková tkáň, thermogenin vytváří protonový kanál ve VMM)
- ✓ Aktivní transport metabolitů přes VMM

# Syntéza ATP aerobní fosforylací

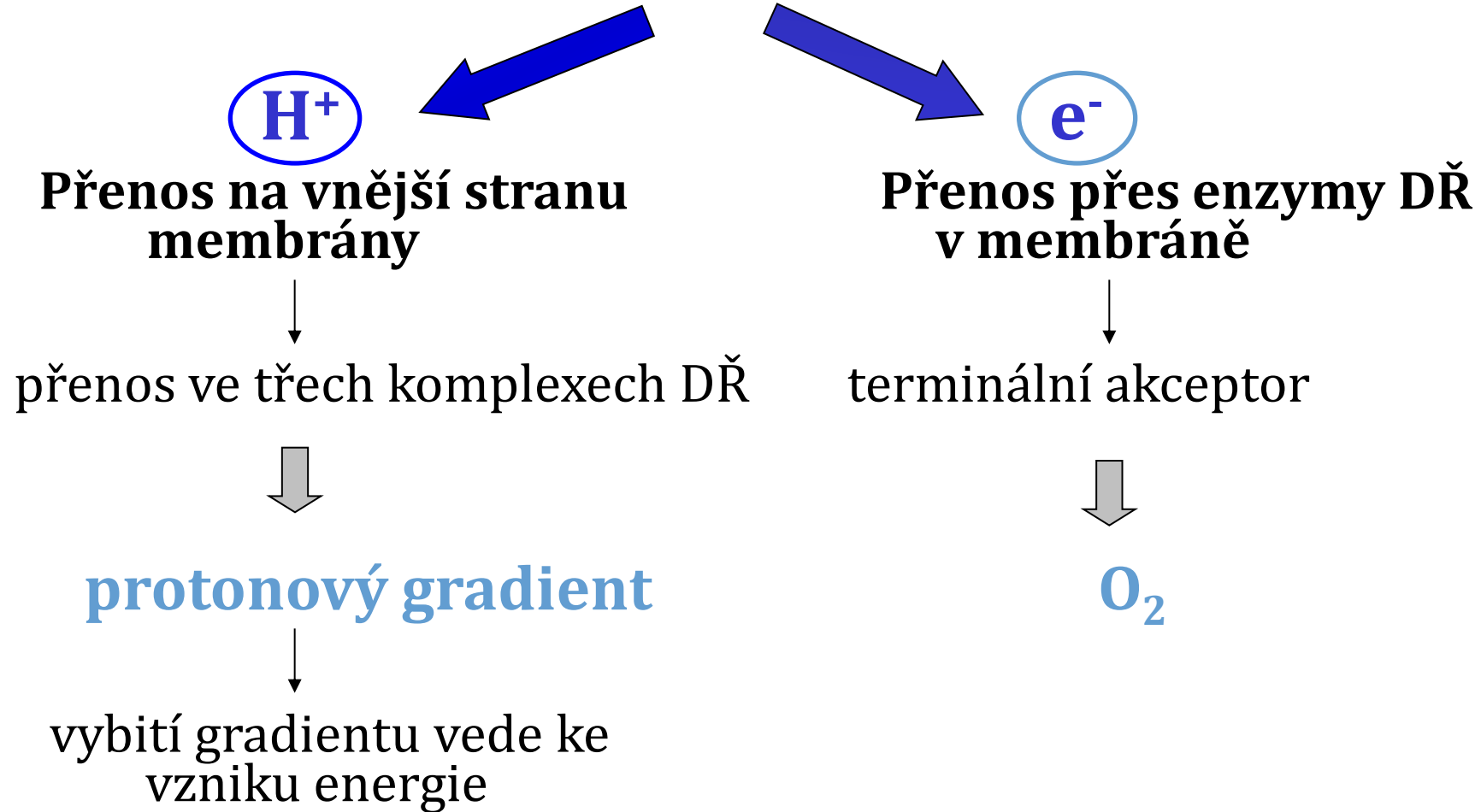


## ATP-synthasa má tři části

- ✓ všechny složené z podjednotek
- ✓  $F_0$  prochází membránou, kanál pro  $H^+$ , prstenec z několika podjednotek C, které při průchodu  $H^+$  **rotují**
- ✓ spojující  $\gamma$  podjednotka také rotuje
- ✓  $F_1$  (v matrix) má tři  $\alpha$  a tři  $\beta$  podjednotky, na ní probíhá syntéza ATP, nerotuje



# Vodík přenesený do dýchacího řetězce



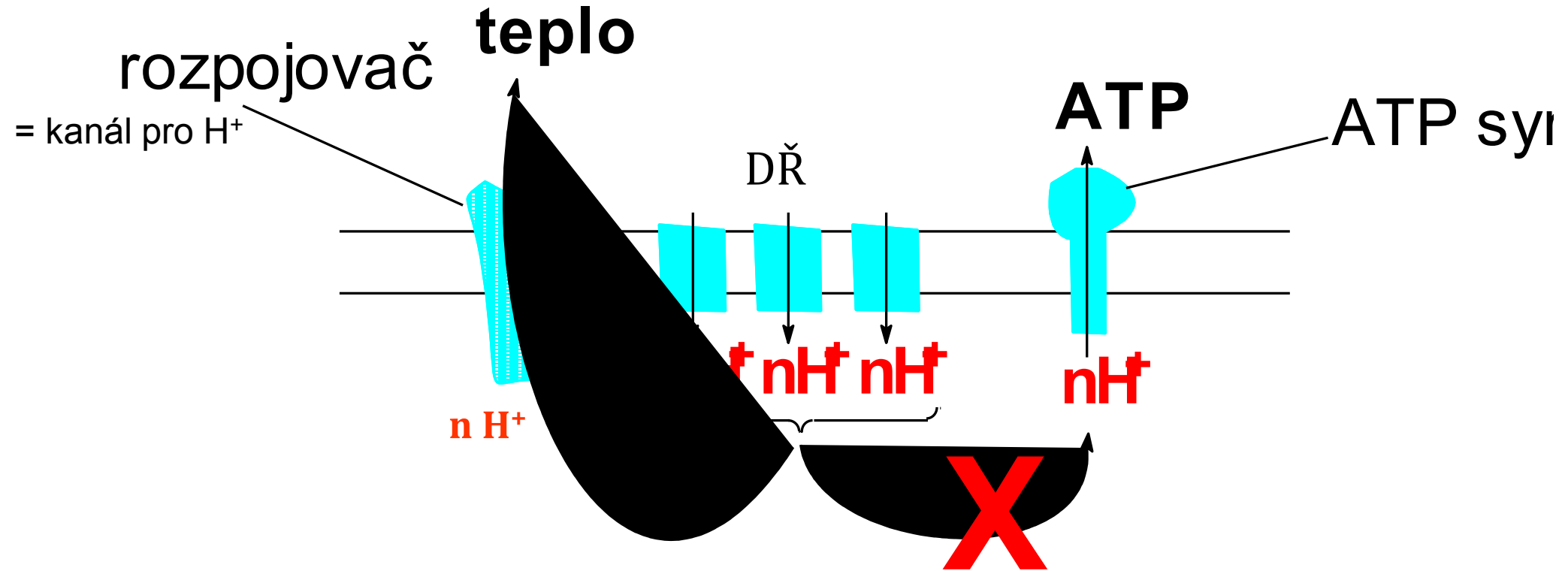
**ENERGIE** využita  
k syntéze **ATP** („konzerva“ energie)



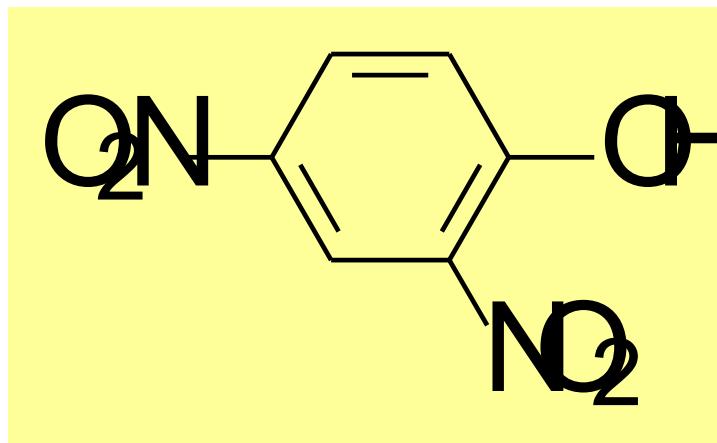
# Rozpojovače

- ✓ DŘ a fosforylace jsou za normálních podmínek těsně spojeny jako důsledek nepropustnosti VMM pro  $H^+$
- ✓ **Jediná cesta pro  $H^+$  zpět do matrix je přes  $F_0$  část ATP-syntasy**
- ✓ Některé látky mohou vybit protonový gradient bez zisku chemické energie (ATP) - rozpojí DŘ od aerobní fosforylace
- ✓ Uvolní se pouze teplo
- ✓ DŘ probíhá bez přerušení
- ✓ Aerobní fosforylace neprobíhá = netvoří se ATP

# Rozpojovače



# 2,4-Dinitrofenol



- ✓ Právý rozpojovač
- ✓ Otrava: zvýšená tělesná teplota, horečka, pocení, zrychlený dech
- ✓ Smrtečná dávka kolem 1 g
- ✓ 1920–1930 se užíval v dávce 2,5 mg/kg jako „zázračný“ prostředek na hubnutí
- ✓ Podobně působí pikrová kyselina

# Thermogenin (uncoupling protein 1, UCP1) je fyziologický rozpojovač

- ✓ Speciální bílkovina s kanálem pro  $H^+$
- ✓ Vyskytuje se v hnědé tukové tkáni (buňky mají více mitochondrií)
- ✓ Probíhá DŘ, tvoří se  $H^+$  gradient, thermogenin vybíjí gradient na teplo, netvoří se ATP
- ✓ Novorozenci, hibernující zvířata (zimní spáči)

# Inhibitory DŘ

## Dýchacího řetězce

- ✓ rotenon, barbital (I)
- ✓ malonát (II)
- ✓ antimycin A (III)
- ✓ dimerkaprol (III)
- ✓ CO, **CN<sup>-</sup>**, SH<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup> (IV)

## ATP-syntasy

- ✓ oligomycin

# Stechiometrie vzniku ATP

přenos 2 e<sup>-</sup> z NADH ..... 3 ATP

přenos 2 e<sup>-</sup> z flavoproteinů ..... 2 ATP

novější výzkumy uvádějí nižší hodnoty:

transfer 2 e<sup>-</sup> z NADH na ½ O<sub>2</sub> ... 2.5 ATP

transfer 2 e<sup>-</sup> z FADH<sub>2</sub> na ½ O<sub>2</sub> .... 1.5 ATP

## Rychlost DŘ + aerobní fosforylace závisí na dostupnosti

O<sub>2</sub>, substrátů (hlavně NADH, ADP), kapacitě DŘ

### Limitující faktory:

- a) v klidu – dostupnost ADP + kapacita DŘ
- b) při fyzickém výkonu – přísun O<sub>2</sub> do matrix

# Energetická bilance citrátového cyklu

*Přímý zisk v CC*

*Zisk energie v DŘ*

---

GTP .....**1 ATP**

3 NADH ...reoxidace v dýchacím řetězci.....**3 x 3 ATP**

FADH<sub>2</sub> .....reoxidace v dýchacím řetězci .....**2 ATP**

Celkem **12 ATP** na 1 acetylCoA

# Dva způsoby vzniku ATP

## Substrátová fosforylace

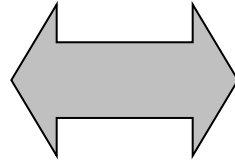
- ✓ ATP vzniká při konverzi makroergních meziproduktů při metabolismu živin
- ✓ **sukcinyl-CoA (CC)**
- ✓ **1,3-bisfosfoglycerát** (glykolýza)
- ✓ **fosfoenolpyruvát** (glykolýza)

## Aerobní fosforylace

- ✓ navazuje na DŘ
- ✓ na syntézu ATP se využije protonmotivní síla



***In vitro***  
„ANORGANICKÉ  
SPALOVÁNÍ“



***In vivo***  
„BIOCHEMICKÉ  
SPALOVÁNÍ“

**Biochemické oxidace  
„Buněčné dýchání“**

Oxidace sacharidu  $\Rightarrow$   $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

- ✓ **Energie** uvolněna jako teplo
- ✓ Žádná energie **není uložena**

Oxidace sacharidu  $\Rightarrow$   $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Oxidace v postupných krocích

- ✓ **Energie je uložena** v makroergních sloučeninách
- ✓ Energie je dostupná pro pozdější využití