

9 Citrátový cyklus (CC)

V kapitole 5 jsme se bavili o metabolismu sacharidů, v kapitole 6 o metabolismu aminokyselin a v kapitole 7 o metabolismu lipidů. Když jsme prováděli energetické bilance, vždy jsme vycházeli z toho, že z jednoho Ac-CoA vznikne 12 ATP v „nějakém“ Krebsově/citrátovém cyklu, nebo jsme se zmínili o tom, že tato látka je meziproduktem „jakéhosi“ citrátového cyklu. V této kapitole se na **citrátový cyklus**, který **představuje propojení metabolických drah všech živin, podíváme podrobněji**.

9.1 Katabolismus živin a citrátový cyklus

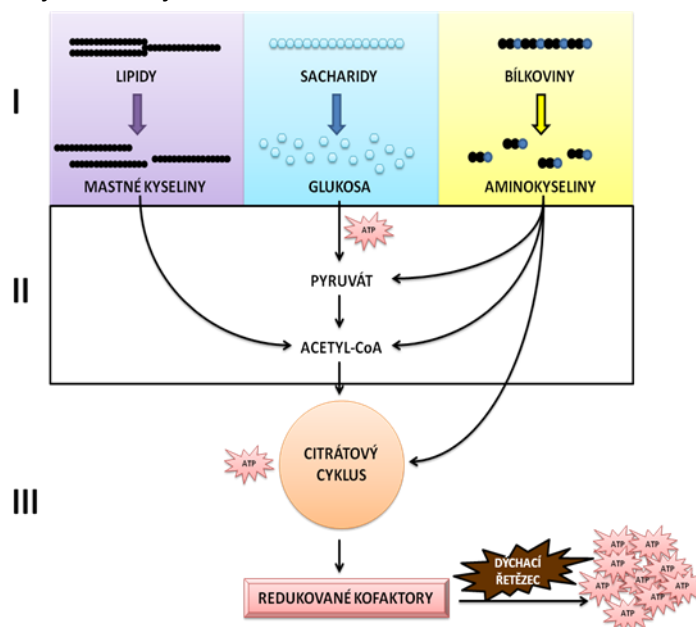
V katabolismu živin můžeme rozlišit tři různé fáze:

V první fázi dochází k **hydrolyze složitých molekul (biopolymerů) na základní stavební jednotky**. K procesům této fáze dochází v trávicím traktu a důležité je, že se v ní **nezískává žádná energie** a zároveň se **žádná energie nespotřebovává**.

V druhé fázi jsou vzniklé základní stavební jednotky (glukosa, AK, MK) přeměňovány na **amfibolické¹ meziprodukty**, kterými jsou **pyruvát a acetyl-CoA**. Při vzniku amfibolických produktů **vzniká jen malé množství energie** (v podobě ATP v glykolýze) avšak velké množství **redukovaných kofaktorů** (z β -oxidace MK). Zároveň dochází k malé spotřebě energie.

Ve třetí fázi dochází k **oxidaci acetyl-CoA** na oxid uhličitý v **citrátovém cyklu**, při tomto ději vznikají další **redukované kofaktory**. Ty jsou pak spolu s redukovanými kofaktory vzniklými ve druhé fázi **oxidovány v respiračním řetězci**. V respiračním řetězci tak **vzniká velké množství energie** v podobě ATP.

Výše popsane naznačuje následující schéma:



Poznámka

- ve schématu jsou zachovány barvy, které odpovídají daným kapitolám tohoto textu
- Doporučený poměr živin

Během dne by naše potrava měla obsahovat asi 55-60% škrobu, pod 30% tuků (konkrétněji 5% SAFA, 20% MUFA a 5% PUFA) a okolo 10-15% bílkovin.

¹ Amfibolické znamená, že je možné je použít jak v katabolismu, tak v anabolismu.

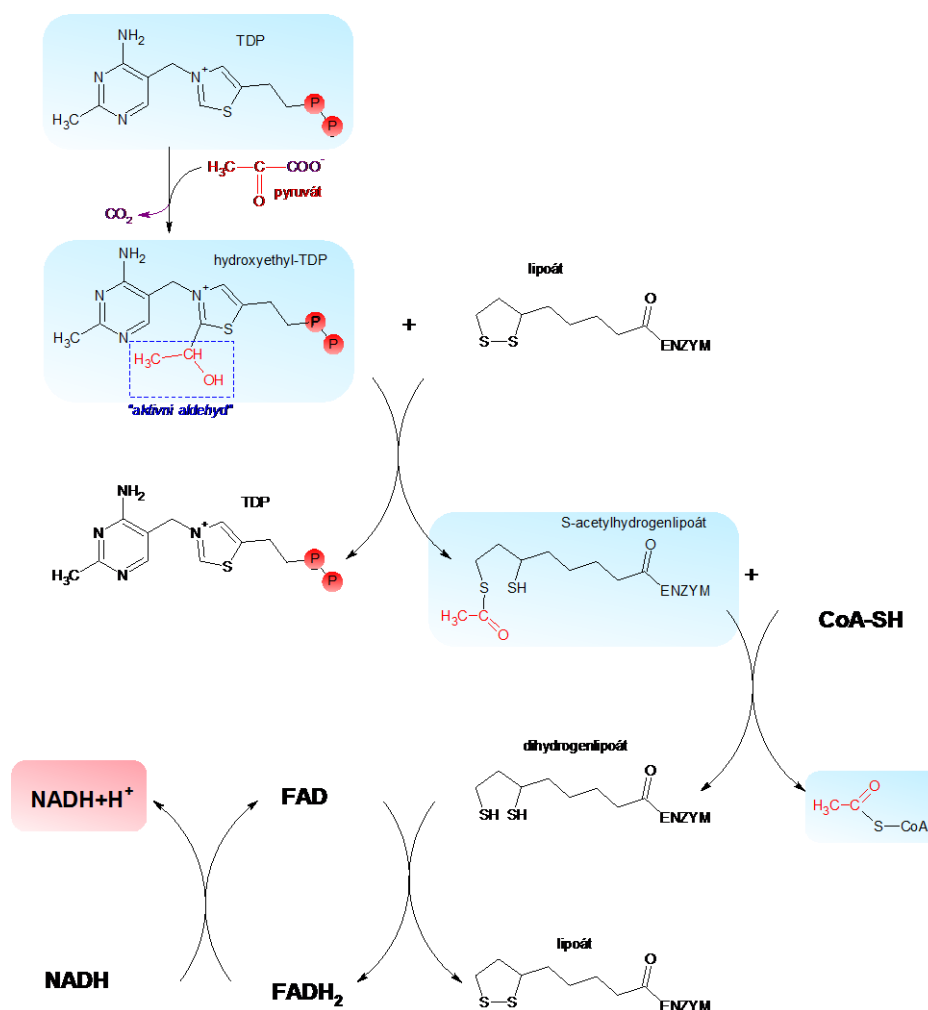
9.2 Vznik amfibolických meziproductů

Pyruvát vzniká v lidském těle **odbouráváním glukosy**, dále pak **transaminací alaninu** či v metabolismu některých dalších **AK**, lze jej získat např. i v metabolismu **glycerolu**.

V organismu² je pyruvát přeměňován buď na **laktát**, **acetyl-CoA** (co týče katabolických přeměn) nebo na **oxalacetát** (jedna z anaplerotických reakcí citrátového cyklu; viz *dále*), samozřejmě je možná i zpětná transaminace na **alanin**.

Acetyl-CoA vzniká **oxidativní dekarboxylací pyruvátu**, **β-oxidací MK** a **katabolismem některých AK**. Jeho vznik z pyruvátu byl sice již popsán v kapitole 5, ale opakování nikdy neuškodí.

Oxidativní dekarboxylace pyruvátu (**obecně oxidativní dekarboxylace 2-oxokyseliny**) se účastní **tři enzymy** (jejich komplex je nazýván **pyruvátdehydrogenasa**) a **pět kofaktorů** (TDP, lipoát, koenzym A, FAD, NAD⁺).



Poznámky:

(Schéma je zcela identické se schématem z kapitoly 5).

Pyruvát se v prvním kroku napojuje na TDP. Při napojení došlo k jeho dekarboxylaci, při které vzniká hydroxyethylová skupina, která se z historických důvodů nazývá **aktivním aldehydem** (i když s aldehydovou skupinou jako takovou nic společného nemá!). „Aktivní aldehyd“ je následně přenesen na lipoát a z něj pak na koenzym A, čímž vznikne **acetyl-CoA**. Lipoát je následně potřeba zregenerovat pro další reakce, o což se postará FAD, vznikne z něj FADH₂ a získané vodíky jsou následně ještě předány NAD⁺.

² Mimo organismus je možné z laktátu vytvořit kyselinu octovou, acetaldehyd, alkohol...

9.3 Citrátový cyklus

Citrátový cyklus představuje **terminální metabolickou dráhu** základních živin. Ty do něj nejčastěji vstupují ve formě **acetyl-CoA** a o tomto případě nyní budeme hovořit.

Výjimkou jsou některé metabolity pocházející z katabolismu aminokyselin, které se do CC napojují v jiném místě.

V citrátovém cyklu vznikají **tři produkty**:

a) **CO₂**

Oxid uhličitý je tzv. „**energetický žebřák**“, v jeho molekule **má uhlík oxidační číslo IV** (což je nejvyšší možné oxidační číslo uhlíku), a proto jej nelze nadále oxidovat a získávat z něj energii.

Nejvíce CO₂ v těle vzniká právě v CC a jeho další osudy mohou být různé – nejvíce je ho vydycháno ven z organismu plícemi. Kromě této možnosti může hrát jistou roli v hydrogenkarbonátovém pufracním systému, nebo se může účastnit karboxylačních reakcí.

b) **redukováné kofaktory**

V průběhu CC dochází celkem ke **třem dehydrogenacím**, přičemž vzniká jedno FADH₂ a dvě NADH+H⁺.

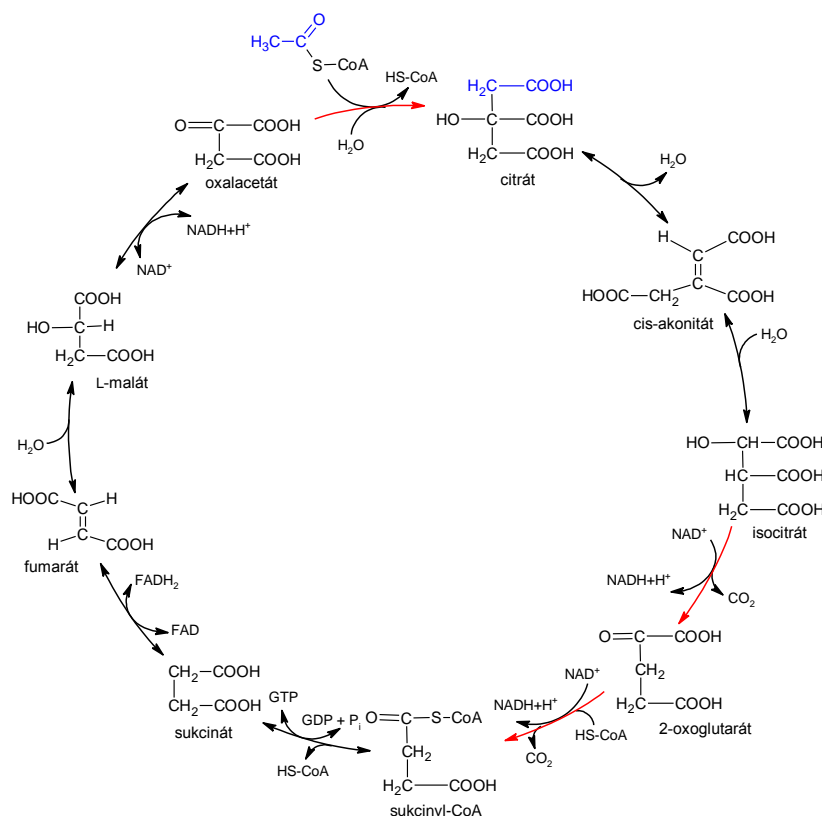
Redukované kofaktory obecně mají za úkol **uchovat ve své molekule co nejvíce energie**, která se získala oxidací živin. Tato energie je z jejich molekul následně využita v dýchacím řetězci k tvorbě protonového gradientu a skrze něj k tvorbě **ATP**. (viz kapitola 10)

c) **GTP**

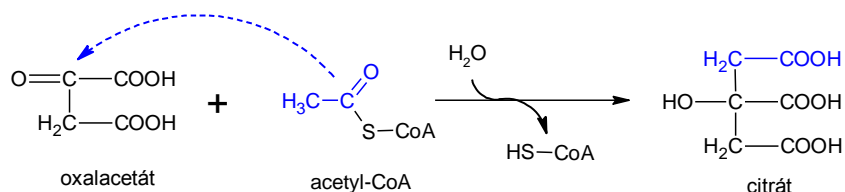
V jedné z reakcí CC vzniká **GTP** substrátovou fosforylací. Vzniklé GTP však rychle reaguje s **ADP** na vzniku **ATP** a **GDP**.

Nyní se zaměříme na jednotlivé reakce citrátového cyklu. Schéma níže je znázorňuje všechny tak, jak po sobě následují.

Je vhodné zmínit, že tři reakce CC jsou nevratné (ve schématu znázorněny červeně).



Reakce 1:



Typ reakce: **kondenzace**

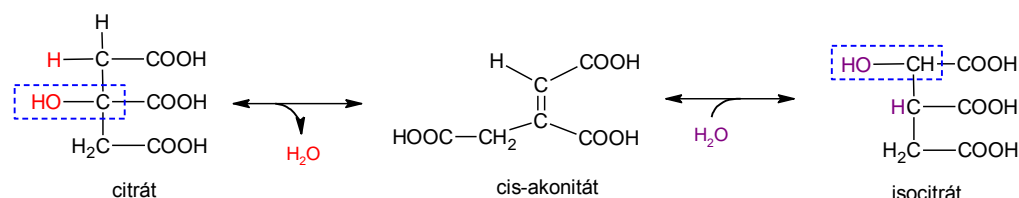
Enzym: **citrátsynthasa**

Kofaktor: **koenzym A**

V první reakci CC vzniká kondenzací oxalacetátu a acetyl-CoA **citrát**, při reakci se uvolňuje značné množství tepla (reaguje energeticky bohatá sloučenina (acetyl-CoA) s energeticky chudou sloučeninou (oxalacetát) za vzniku energeticky chudé sloučeniny (citrát)).

Reakce je **nevratná**. Kdybychom chtěli z citrátu vytvořit acetyl-CoA a oxalacetát (což chceme v případě syntézy mastných kyselin, jelikož acetyl-CoA se v podobě citrátu přenáší do **cytosolu**), musíme reakci dodat **energii v podobě ATP**.

Reakce 2 a 3:



Typ reakce: **izomerace** (rozdělená do dvou kroků: **eliminace vody** a **adice vody**)

Enzym: **akonitasa**

Kofaktor: **Fe-S**

V druhá a třetí reakci CC dochází k postupné přeměně citrátu na isocitrát přes meziprodukt cis-akonitát. V první části této izomerační reakci je eliminována voda z citrátu za vzniku dvojné vazby, v druhé části následuje adice vody (samozřejmě na jiné místo, než ze kterého pocházela voda eliminovaná) za vzniku isocitrátu.

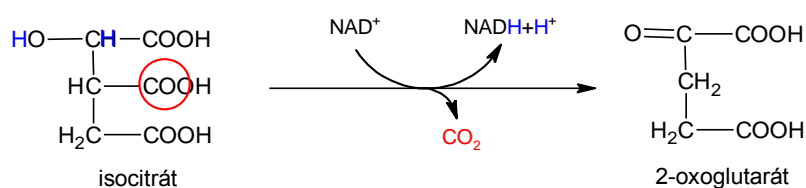
Hlavním smyslem reakce je přeměnit **terciární hydroxylovou skupinu** na **sekundární hydroxylovou skupinu** (ve schématu modře zarámováno). V další reakci totiž dojde k dehydrogenaci a aby k ní mohlo dojít, je potřeba, aby na uhlíku, ze kterého vychází –OH skupina byl vodík (který bude v dehydrogenaci odtržen) – tento vodík citrátu chybí, avšak isocitrát jej má.

Reakci katalyzuje enzym akonitasa. Tu je možné inhibovat pomocí **fluoracetátu** (letální dávka této látky pro člověka je pouhých 50 mg!) a zastavit tak citrátový cyklus.

Jakým způsobem fluoracetát akonitasu inhibuje? Velikost atomu fluoru je zhruba stejná, jako velikost atomu vodíku. Fluoracetát se tak v první chvíli chová jako normální acetát a reaguje s oxalacetátem za vzniku fluorcitrátu (enzym citrátsynthasa nepozná, že použila fluoracetát místo acetátu). Fluorcitrát by nyní „chtěl“ pokračovat v citrátovém cyklu, ale akonitasa je velmi důsledný enzym, naváže jej na sebe, zjistí, že místo atomu vodíku obsahuje fluorcitrát atom fluoru a nedovolí reakci, aby nadále probíhala. Tím se inhibuje a reakce se zastaví, což vede k zastavení CC, což zabrání buňce aby získávala energii, což vede ke smrti...

Velké množství fluoracetátu se nachází v rostlince *Dichopetalum cynosum*.

Reakce 4:



Typ reakce: **dehydrogenace a dekarboxylace**

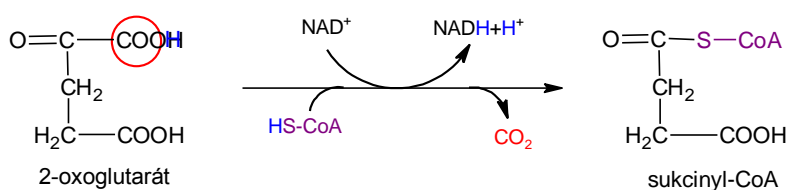
Enzym: **isocitrátdehydrogenasa**

Kofaktory: **NAD⁺**

Čtvrtá reakce probíhá jako dvě velmi rychle po sobě následující reakce – dehydrogenace a dekarboxylace.

Význam této reakce tkví v tom, že **získáváme první redukovaný kofaktor NADH+H⁺**, jeden z uhlíků původního Ac-CoA byl tedy plně zoxidován na CO₂.

Reakce 5:



Typ reakce: **oxidativní dekarboxylace³**

Enzym: **2-oxoglutarátdehydrogenasa** (jedná se o komplex tří enzymů)

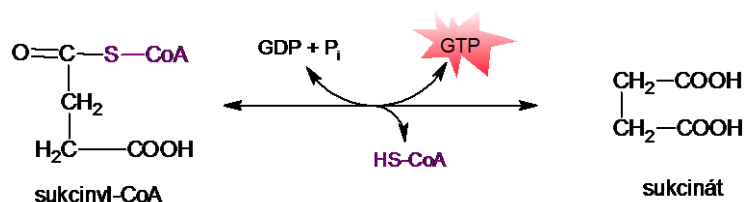
Kofaktory: **NAD⁺, FAD; lipoát, TDP, koenzym A** (typické kofaktory oxidační dekarboxylace)

2-oxoglutarát je 2-oxokyselina a její **dekarboxylace probíhá stejně jako jakákoliv jiná oxidační dekarboxylace 2-oxokyselin** (viz poznámka pod čarou).

Stejně jako jakákoliv jiná dekarboxylace je nevratná (pro opačnou reakci by bylo potřeba dodat energii) a jelikož se jedná i o **dehydrogenaci**, vzniká při ní **další redukovaný kofaktor NADH+H⁺** (druhý uhlík acetyl-CoA byl plně zoxidován na CO₂).

Navíc je vhodné zmínit, že vzniklý produkt reakce – **sukcinyl-CoA** – je **thioester**, což znamená, že se jedná o **makroergní sloučeninu** a lze tedy očekávat, že energii v něm vázanou bude chtít buňka nějak získat (což se jí podaří v další reakci).

Reakce 6:



³ Existuje rozdíl mezi „dehydrogenací a dekarboxylací“ v reakci 4 a „oxidativní dekarboxylací“ v reakci 5. V případě reakce 4 se jedná o „**prostou dekarboxylaci**“ – dehydrogenací isocitrátu vzniká velmi nestabilní meziprodukt, který samovolně dekarboxyluje; reakce se účastní pouze jeden enzym a jeden kofaktor. V případě reakce 5 je jedná o „**oxidativní dekarboxylaci 2-oxokyselin**“. Má stejný průběh jako dekarboxylace pyruvátu (rovněž 2-oxokyselina) a stejný průběh jako dekarboxylace 2-oxokyselin, které vznikají v metabolismu AK s rozvětveným řetězcem (Val, Leu, Ile) – účastní se jí pět kofaktorů a jedná se o **komplex tří enzymů**.

Typ reakce: **substrátová fosforylace**

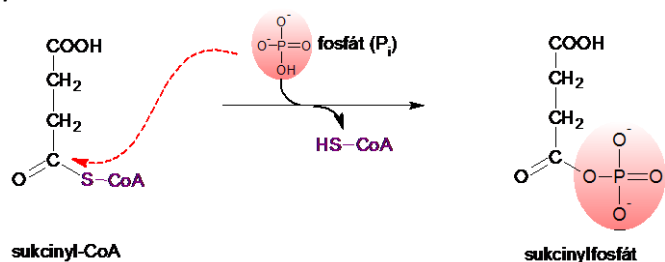
Enzym: **sukcinyl-CoA-synthetasa** (v aktivním místě enzymu se nachází **histidin**)

Kofaktor: **koenzym A**

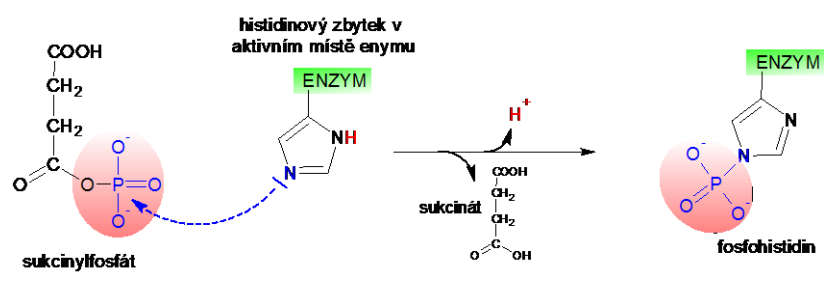
V šesté reakci vzniká ze sukcinyl-CoA **sukcinát**, přičemž chemická energie sukcinyl-CoA je zachycena v podobě GTP.

Vznik GTP je **třístupňová reakce** – energie ze sukcinyl-CoA je nejprve předána do struktury sukcinylfosfátu, následně do substituovaného fosfoamidu (fosfohistidinu) a až z něj na GDP.

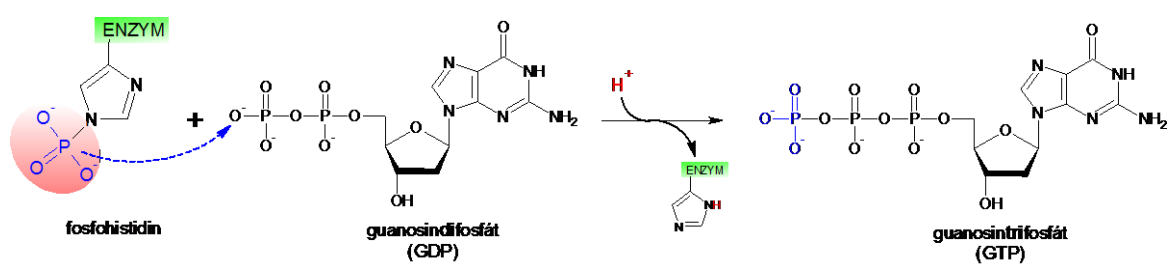
V anglické literatuře je tento způsob „předávání si energie“ mezi různými sloučeninami nazýván „**passing a hot potato**“.



a) **Fosfát** (se **čtyřmi** kyslíky!) se napojí na sukcinyl-CoA za vzniku sukcinylfosfátu. Sukcinylfosfát je **smíšený anhydrid kyseliny fosforečné a jantarové**, jedná se o **makroergní sloučeninu**.

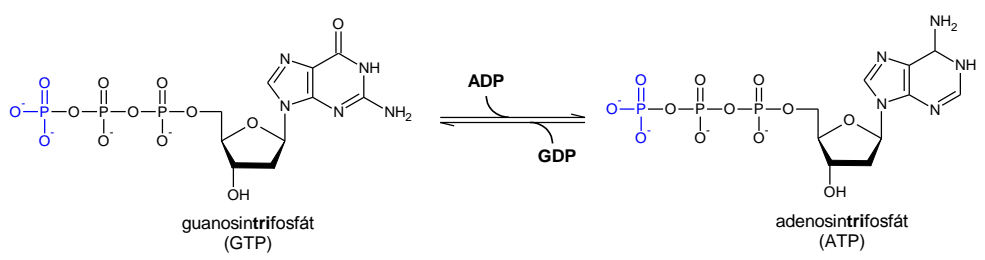


b) Enzym účastnící se reakce (sukcinyl-CoA-synthetasa) má v aktivním místě histidinový zbytek. Na tento histidinový zbytek je **přenesen fosforyl** (má **pouze tři kyslíky**) za vzniku **fosfohistidinu** (a sukcinátu). Fosfohistidin je **substituovaný fosfoamid** (**makroergní sloučenina**)

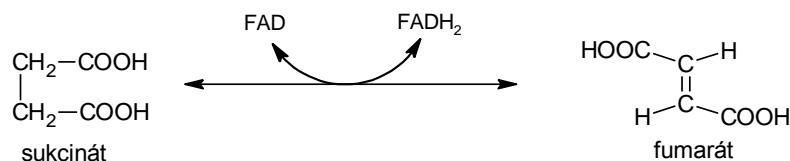


c) Fosforyl je z aktivního místa enzymu následně přenesen na GDP za vzniku **GTP**. (Povšimněme si, že při přenosu fosforylu na aktivní místo i z něj docházelo v molekule histidinu k přeskupování dvojných vazeb, což nejprve vedlo k uvolnění protonu, který se nyní, po uvolnění fosforylu, vrátil na své místo).

Vzniklé GTP je opět jen dočasným přenašečem energie. Velmi rychle dochází k tomu, že se potká s ADP a pomocí enzymu **nukleosiddifosfátkinasy** na něj předá svůj fosforyl, čímž vzniká **ATP**.



Reakce 7:



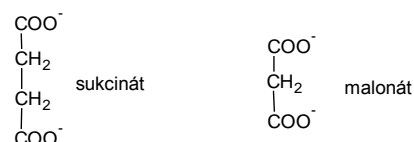
Typ reakce: **dehydrogenace** (na vazbě –C–C–)

Enzym: **sukcinátdehydrogenasa**

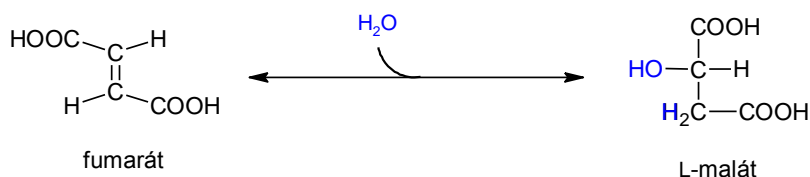
Kofaktor: **FAD**

V sedmé reakci dochází ke **třetí dehydrogenaci**, které se tentokrát účastní kofaktor FAD. Jedná se o **jedinou reakci CC**, která neprobíhá v matrix mitochondrie, ale **na vnitřní mitochondriální membráně** (enzym je jedním ze vstupů do DŘ! Viz dále)

Enzym sukcinátdehydrogenasa **může být inhibován malonátem**, který má velmi podobnou strukturu jako sukcinát (kompetitivní inhibice).



Reakce 8:



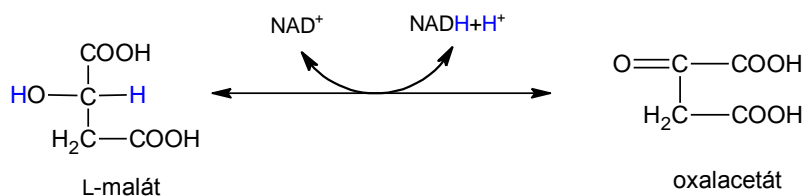
Typ reakce: **hydratace**⁴

Enzym: **fumarasa**

Kofaktor: žádný

Adice vody na fumarát je **stereospecifická** – voda se aduje tak, že vždy vzniká **L-malát** (v živém organismus D-malát nevznikne!). Stereospecifitu zajišťuje fumarasa („obalí“ substrát tak, aby nebylo možné přidat –OH skupinu na místo vodíku a naopak)⁵.

Reakce 9:



Typ reakce: **dehydrogenace**

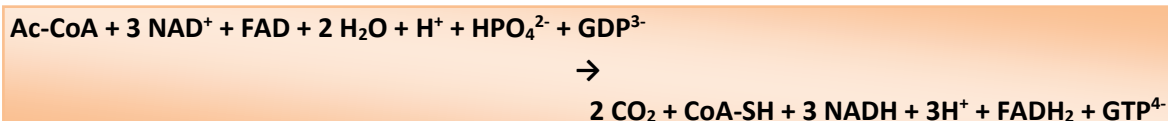
Enzym: **malátdehydrogenasa**

Kofaktor: **NAD⁺**

⁴ V reakci 7 dochází k dehydrogenaci, v reakci 8 k hydrataci. Stejně jako jsme se o tom zmínili (podrobněji) při β-oxidaci mastných kyselin, je nutné si uvědomit, že hydratace (dehydratace) **není oxidačně redukční reakce** (oxidační číslo molekuly jako celku se nemění), zatímco hydrogenace (dehydrogenace) **jsou oxidačně redukčními reakcemi**.

⁵ Kdybychom prováděli adici vody na fumarát in vitro, vznikla by směs L-malátu a D-malátu (racemát).

Osmá reakce uzavírá citrátový cyklus. Jedná se o dehydrogenaci, při které vzniká NADH+H⁺. Nyní již víme, jak přesně citrátový cyklus probíhá, pokusme se tedy o něho **látkovou bilanci**:



Dva uhlíky z acetyl-CoA jsou zcela oxidovány na 2 molekuly CO₂ – při této oxidaci se uvolní 8 atomů vodíku, které jsou navázány na molekuly redukovaných kofaktorů.

Energetická bilance na jeden acetyl-CoA:

Tabulka 1 - Energetická bilance CC

Reakce	GTP / Redukované kofaktory	Ekvivalent ATP
isocitrát → 2-oxoglutarát	1 NADH+H ⁺	3 ATP
2-oxoglutarát → sukcinyl-CoA	1 NADH+H ⁺	3 ATP
sukcinyl-CoA → sukcinát	1 GTP	1 ATP
sukcinát → fumarát	1 FADH ₂	2 ATP
L-malát → oxalacetát	1 NADH+H ⁺	3 ATP
CELKEM		12 ATP

9.4 Regulace citrátového cyklu

Citrátový cyklus je velmi důležitý metabolický děj, jehož regulace nemůže být ponechána náhodě. Existuje řada mechanismů, které jeho průběh zpomalují či zrychlují.

Obecně má na regulaci velký vliv **metabolický stav buňky** – potřebuje-li buňka energii (poměry ATP/ADP či NADH+H⁺/NAD⁺ jsou nízké) **citrátový cyklus probíhá**, má-li buňka dost energie (poměry jsou vysoké), citrátový cyklus je inhibován. Kromě metabolického stavu buňky se uplatňují různé **alosterické inhibitory** a **inhibice produktem** (viz níže).

Velice významným faktorem je dostatek kyslíku v buňce!!! Nemá-li buňka dost kyslíku, je citrátový cyklus zastaven!⁶

V citrátovém cyklu se nacházejí **tři enzymy**, jejichž funkce je důsledně regulována. Všechny tři z nich **katalyzují nevratné reakce citrátového cyklu** a na regulaci jejich funkce se podílí vždy ATP nebo NADH+H⁺ (a vždy ještě nějaká další látka).

Podobně je regulován i enzym **pyruvátdehydrogenasa**, která zajišťuje vznik acetyl-CoA (a protože Ac-CoA je velmi důležitým substrátem citrátového cyklu, zahrneme do regulace i reakci jeho vzniku).

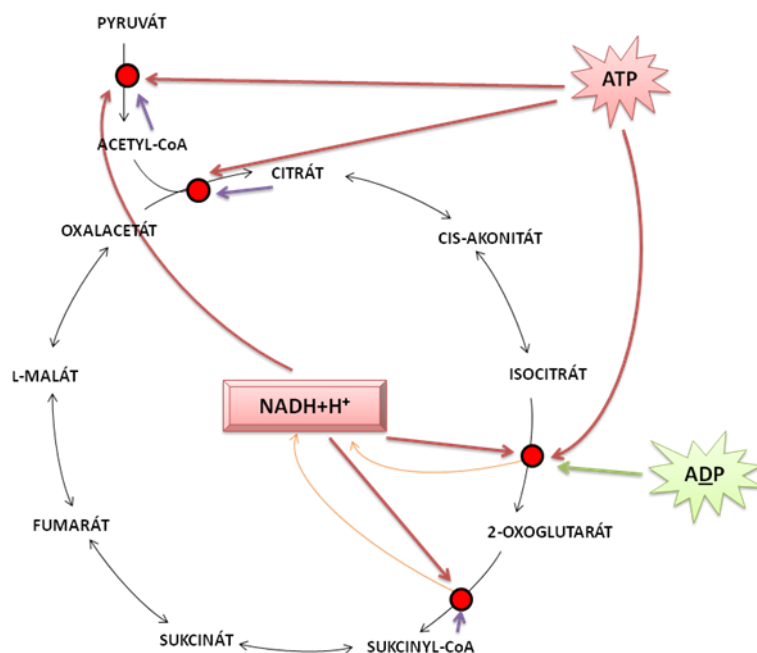
Tabulka 2 - Klíčové enzymy CC a jejich regulace

Enzym	Vliv ATP	Vliv NADH+H ⁺	Vliv dalších látek
Pyruvátdehydrogenasa	–	–	acetyl-CoA (inhibice produktem)
Citrátsynthasa	–	–	citrát (inhibice produktem)
Isocitrátdehydrogenasa	–	–	ADP (alosterická aktivace)
2-oxoglutarátdehydrogenasa	–	–	sukcinyl-CoA (inhibice produktem)

Poznámka: ATP a NADH+H⁺ fungují jako alosterické inhibitory.

⁶ Velký vliv kyslíku je podmíněn tím, že v dýchacím řetězci je ho potřeba k oxidaci redukovaných kofaktorů. Není-li jej dostatek, NADH+H⁺ se hromadí a inhibuje některé z enzymů CC.

Pro „Větší přehlednost“ využijeme i schéma regulace citrátového cyklu:



Ke schématu:

Schéma je uvedeno pro úplnost a vychází ze schématu ze skript Biochemie I – semináře.

Popis:

- červenými tečkami jsou označeny reakce, o jejichž regulaci se zajímáme
- červené šipky naznačují **alosterickou inhibici**, která je zajištěna ATP a NADH+H⁺ (oranžové šipky naznačují, které reakce NADH+H⁺ produkují)
- fialové šipky naznačují **inhibici produktem**
- zelená šipka naznačuje **alosterickou aktivaci** pomocí ADP

9.5 Anaplerotické reakce CC

Sémantika slova: *ana* (řec.) = opět, znovu; *pleros* (řec.) = plný, naplněný

Anaplerotické neboli **doplňující** reakce citrátového cyklu jsou takové reakce, ve kterých vznikají různé **meziprodukty CC** (tyto meziprodukty se mohou do CC zapojit a zajistit jeho funkčnost).

Nejvýznamnější jsou následující reakce:

- **oxalacetát** je doplňován **karboxylací pyruvátu⁷** (pyruvát + CO₂ → oxalacetát; reakce se účastní jako kofaktor **biotin**; enzym se nazývá **pyruvátkarboxylasa**) a **transaminací aspartátu** (aspartát → oxalacetát)
- **fumarát** vzniká v **katabolismu fenylalaninu** a **tyrosinu**, rovněž vzniká v **ornitinovém cyklu** a při syntéze **purinových bází** (lze říci, že aspartátu)
- **sukcinyl-CoA** vzniká v katabolismu rozvětvených AK (Val, Ile, Met)
- **2-oxoglutarát** vzniká **transaminací glutamátu**

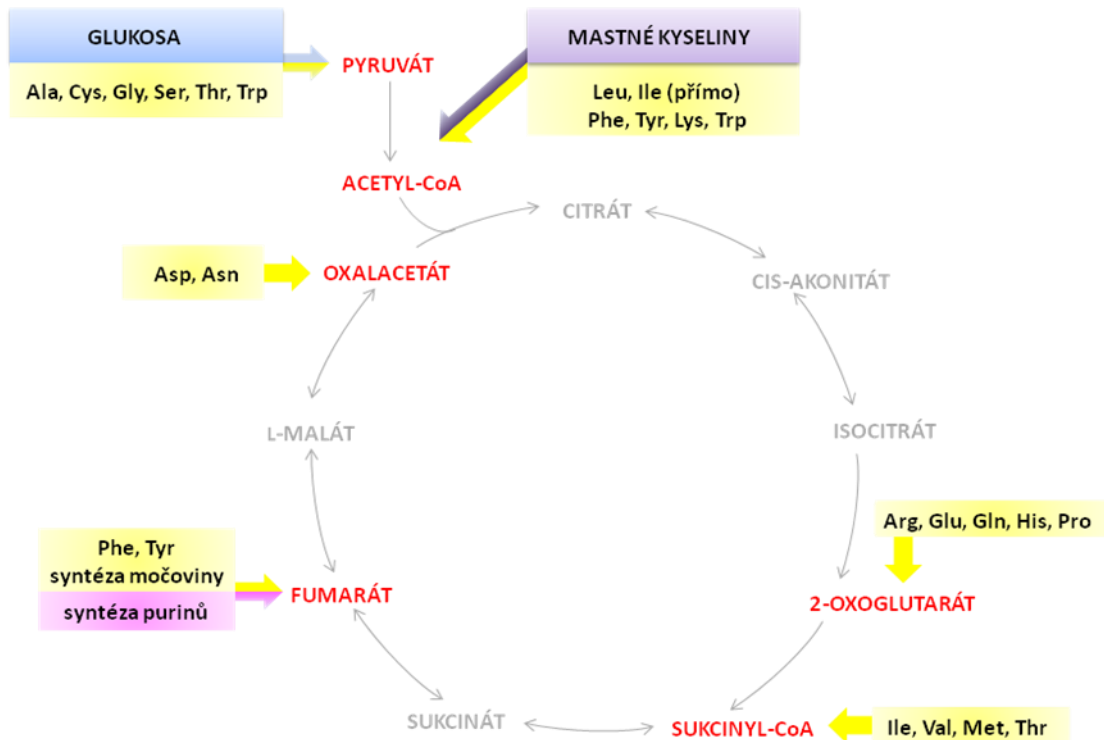
Kromě výše uvedených reakcí existují i další reakce, ve kterých vznikají meziprodukty CC (tzv. **vstupy do CC; katabolické reakce**). Stejně tak ale existují reakce, které **potřebují meziprodukty CC** pro svůj průběh a **meziprodukty z CC odčerpávají** (tzv. **výstupy z CC; anabolické reakce**).

⁷ Existuje i **redukční** karboxylace pyruvátu, při níž vzniká **L-malát**. Tato reakce však nemá tak velký význam – vzájemná přeměna těchto dvou látek má význam v opačném směru (tedy od malátu k pyruvátu) – jedná se o reakci katalyzovanou **jablečným (malic) enzymem** a vzniká při ní **NADPH+H⁺**.

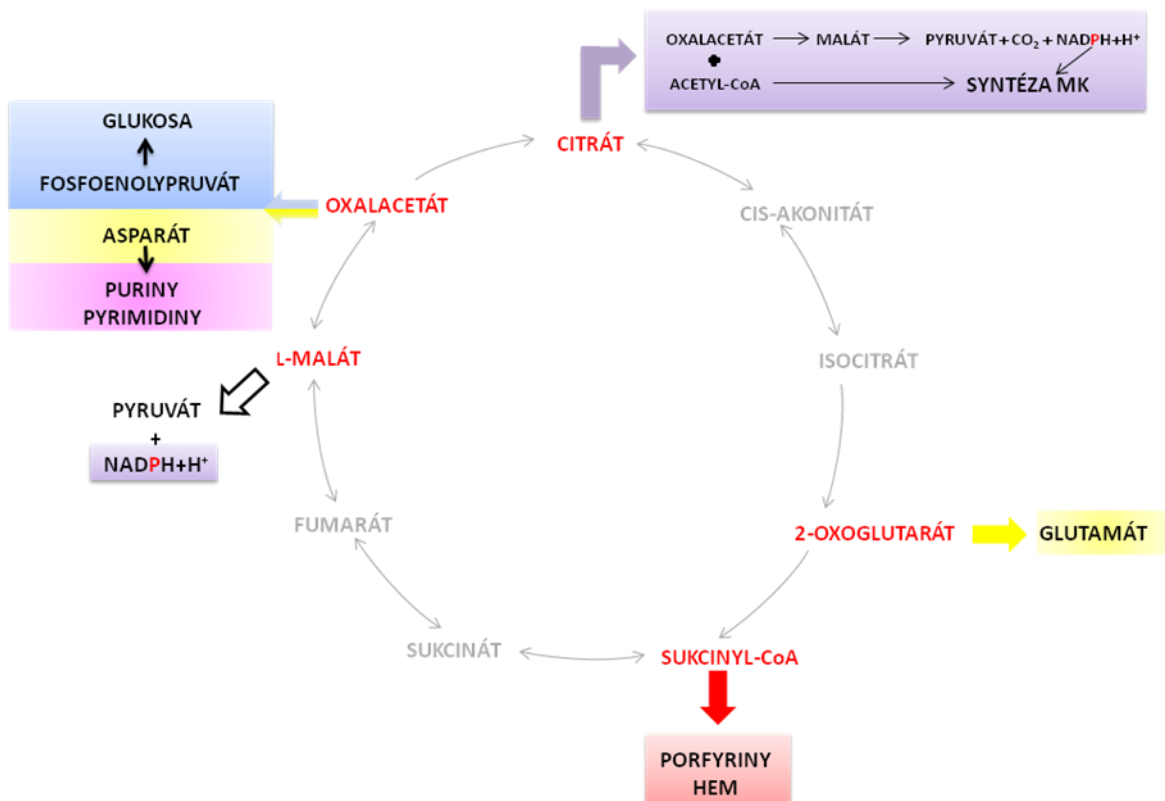
Proto říkáme, že má citrátový cyklus **ambifolický charakter** (je zároveň terminální *katabolickou* drahou pro oxidaci acetyl-CoA a zároveň i poskytovatelem některých meziproductů glukoneogeneze, transaminace a dalších *anabolických* reakcí).

Následující 2 schémata se týkají právě vstupů a výstupů z CC.

VSTUPY DO CC



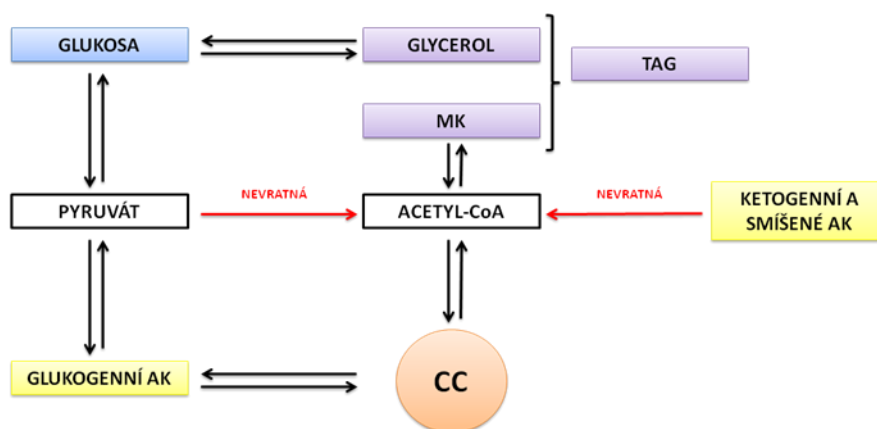
VÝSTUPY Z CC



9.6 Vzájemné přeměny živin

Jelikož se v citrátovém cyklu setkávají metabolické dráhy všech živin, je asi na místě zmínit se i o tom, **jaké živiny umí naše tělo upravit na jiné.**

Schéma:



Co ze schématu vyplývá?

- **jsme** schopni vytvořit ze sacharidů tuky
- **jsme** schopni vytvořit z glukogenních AK sacharidy
- **jsme** schopni ze sacharidů (pyruvát, CC) tvořit uhlíkaté skelety neesenciálních AK
- **jsme** schopni vytvářet z AK tuky (při nadbytku proteinů)
- **nejsme** schopni vytvořit z mastných kyselin sacharidy
- **nejsme** schopni vytvořit z mastných kyselin aminokyseliny⁸

⁸ Schéma může být poněkud matoucí – delší oklika (vždy **přes citrátový cyklus**) může vést z mastných kyselin jak k AK, tak k sacharidům... *ale zdání klame!* Je potřeba si uvědomit, že z tuků získáme acetyl-CoA, jehož uhlíky jsou z citrátového cyklu odstraněny ve formě CO₂ – nemohou se proto podílet na vzniku uhlíkatého skeletu ani aminokyselin ani sacharidů!