

# C3181

# Biochemie I

## 09-Citrátový cyklus

FRVŠ **1647/2012**

# 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  $\beta$ -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
- 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

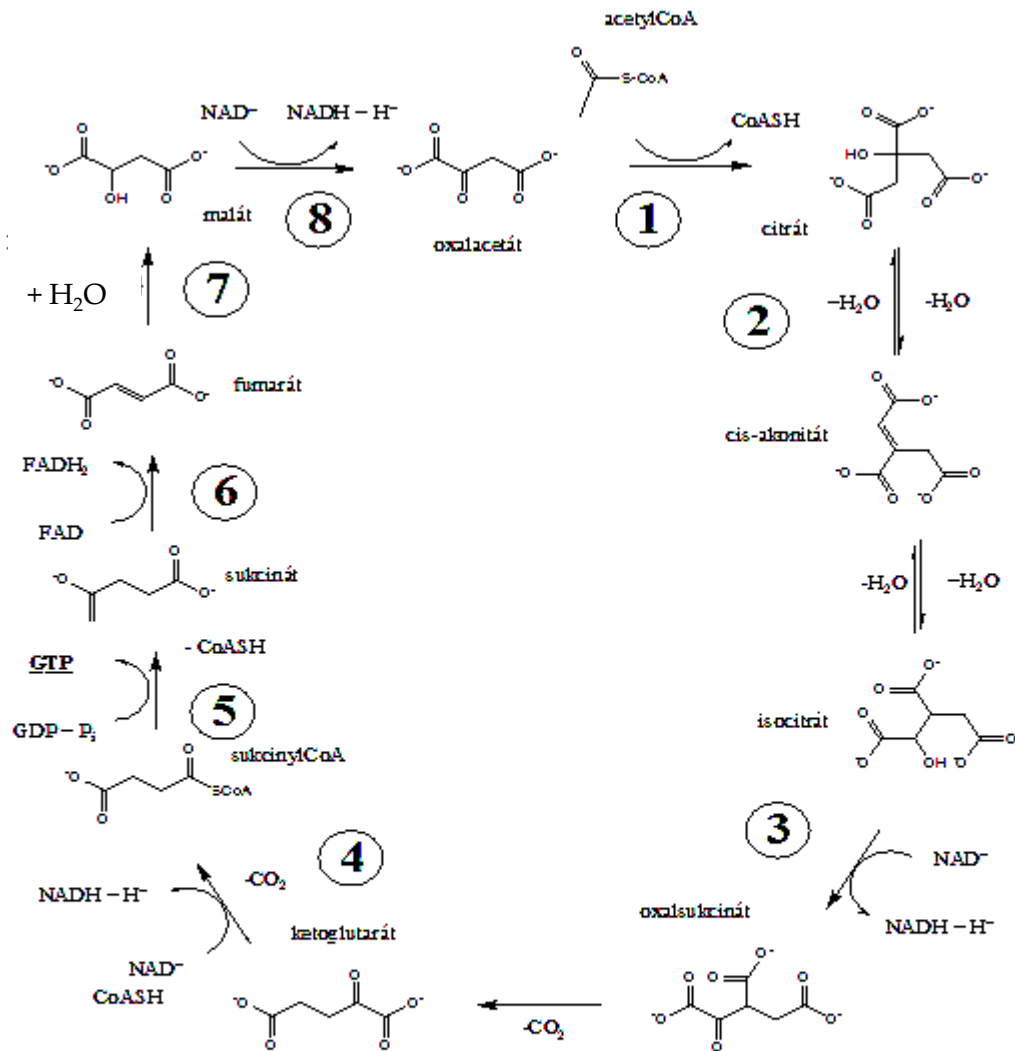
4  $\alpha$ -ketoglutarát DH

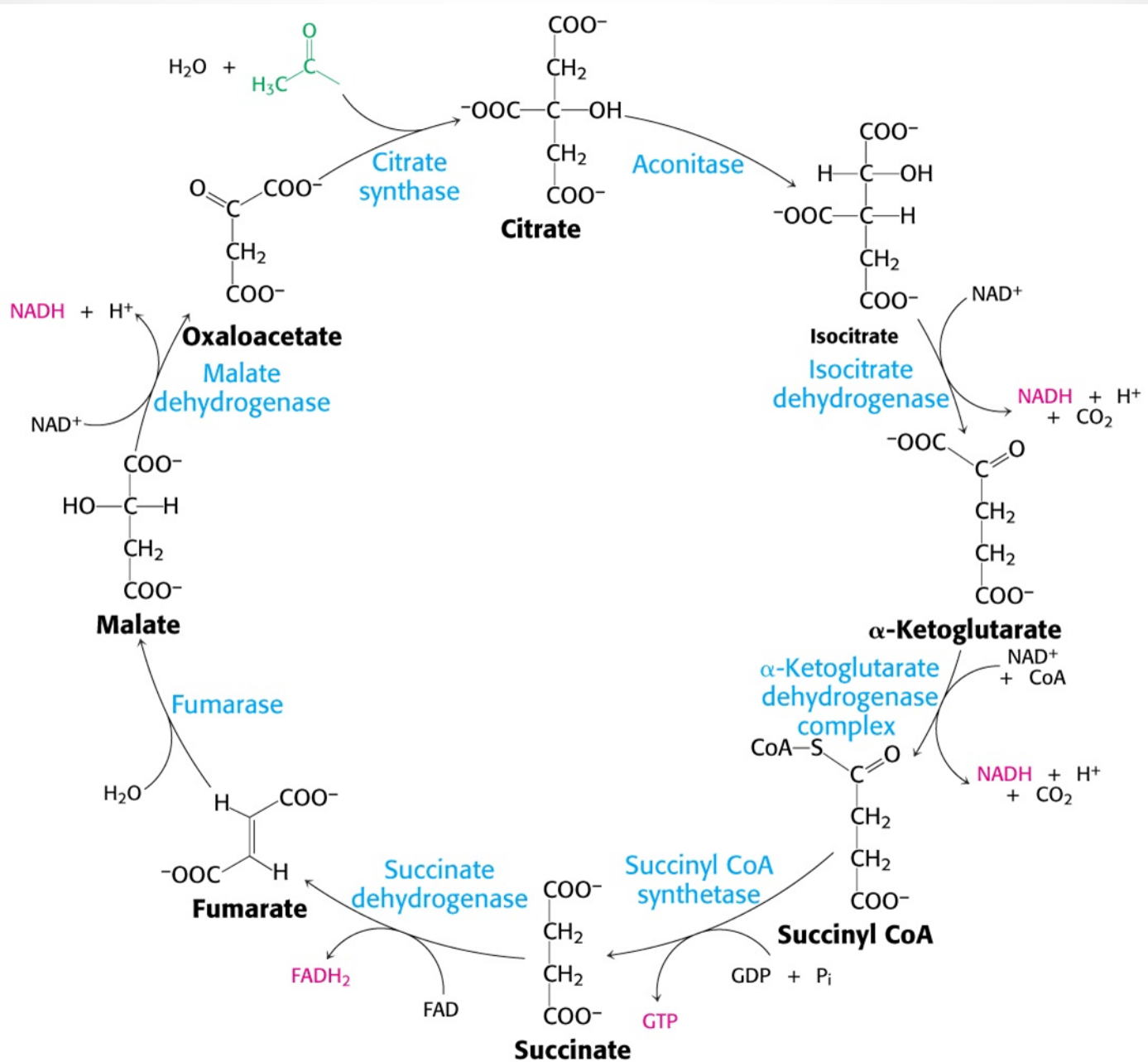
5 sukcinylCoA  
syntetasa

6 sukcinát DH

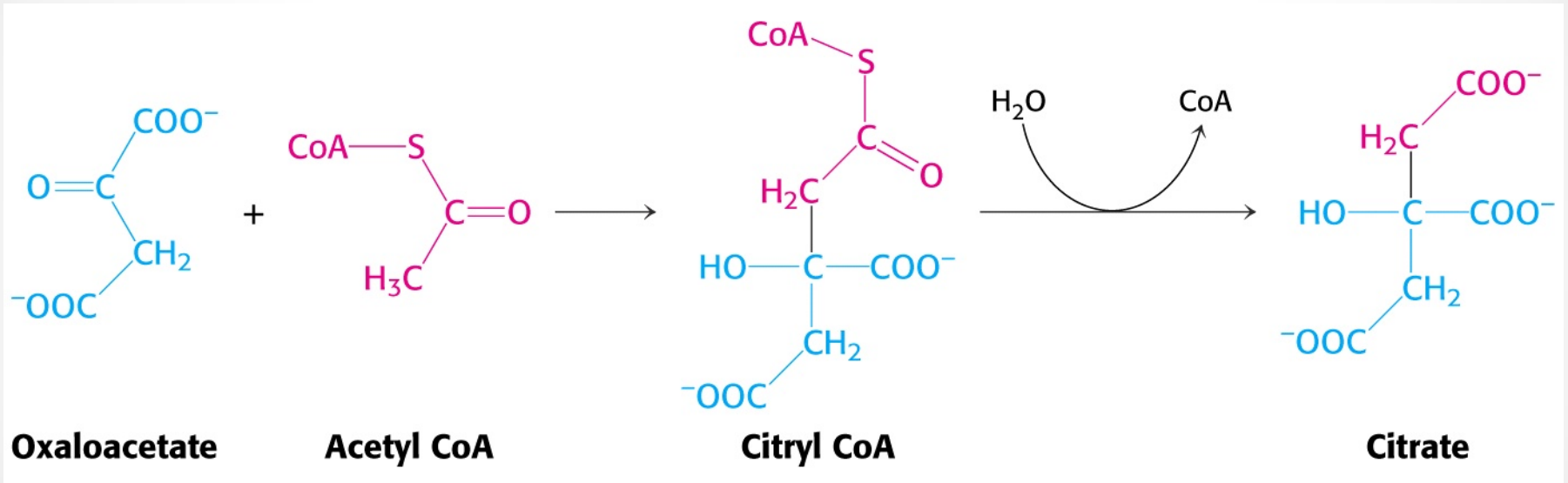
7 fumarasa

8 malát DH



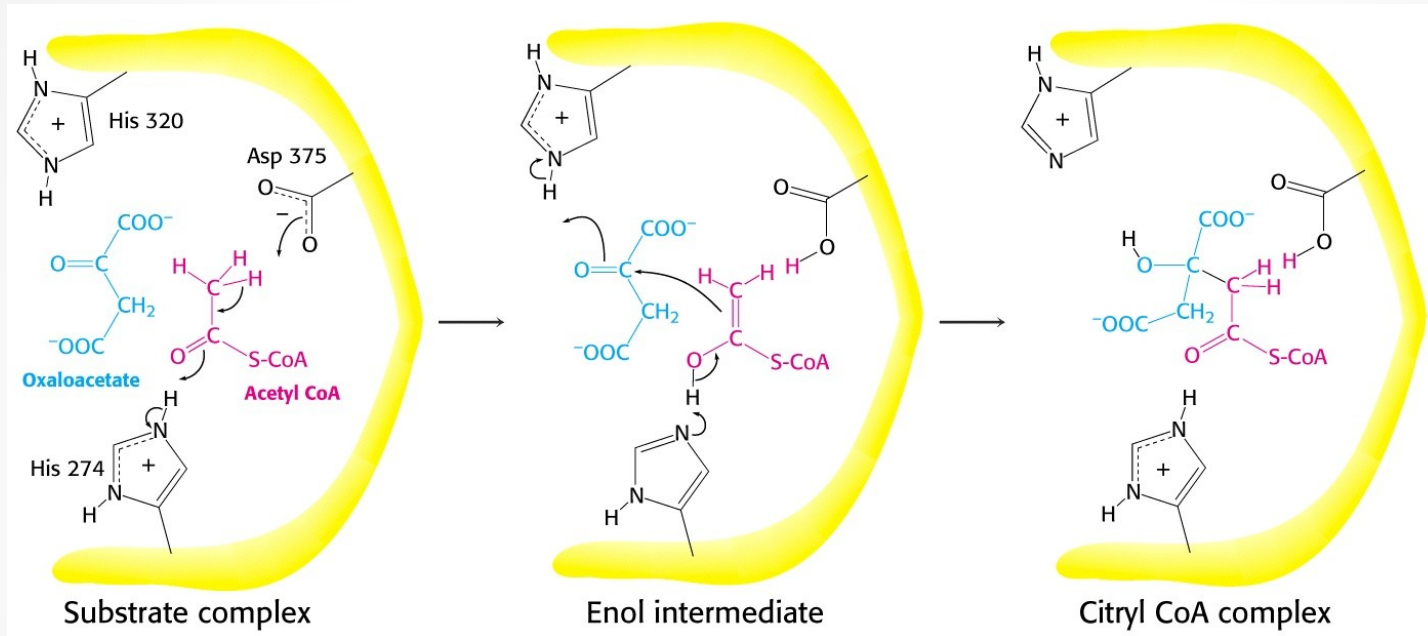


# Citrát syntasa



- Bez účasti ATP
  - Aldolová kondensace

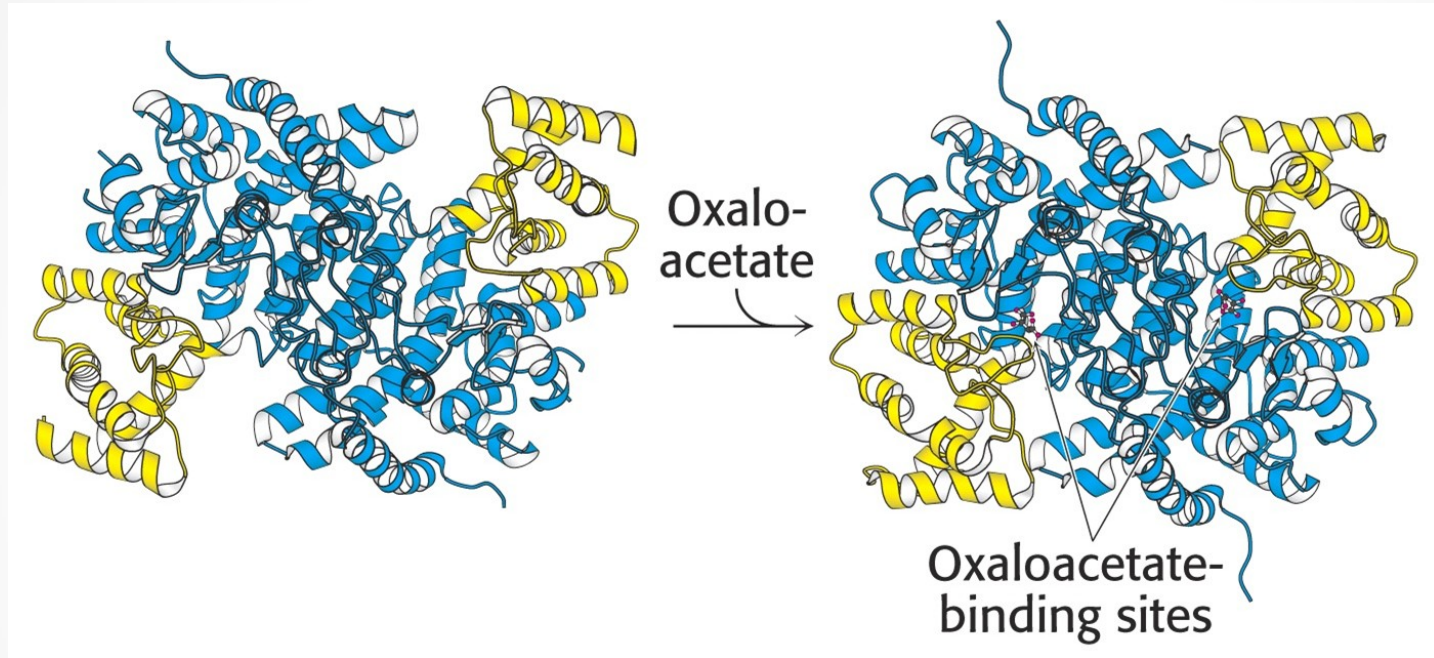
# Citrát syntasa



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

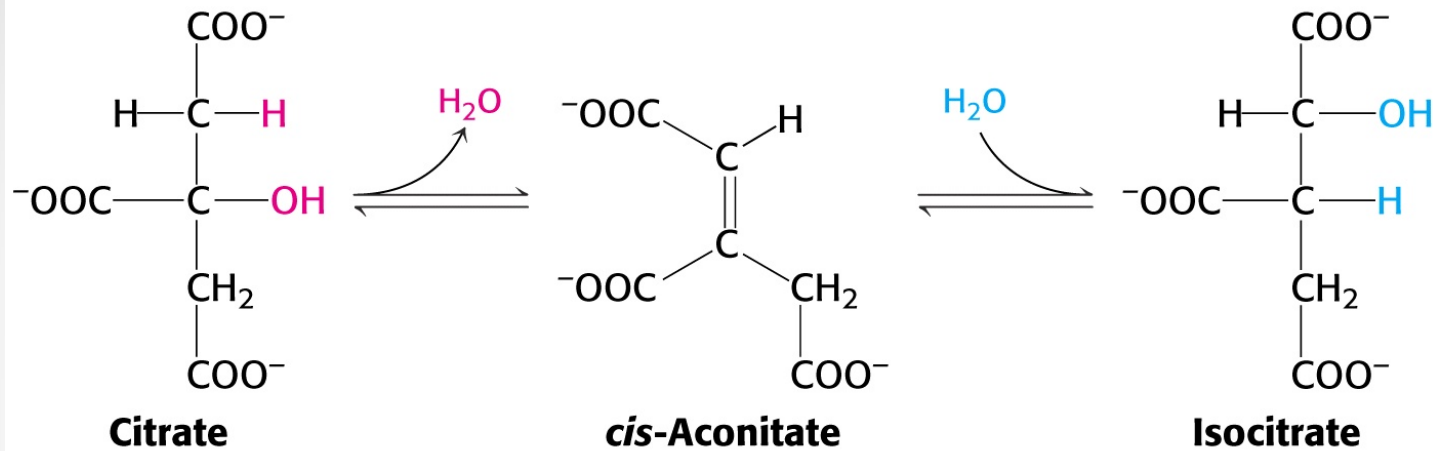
# Dílčí kroky TCA

**TABLE 17.2 Citric acid cycle**

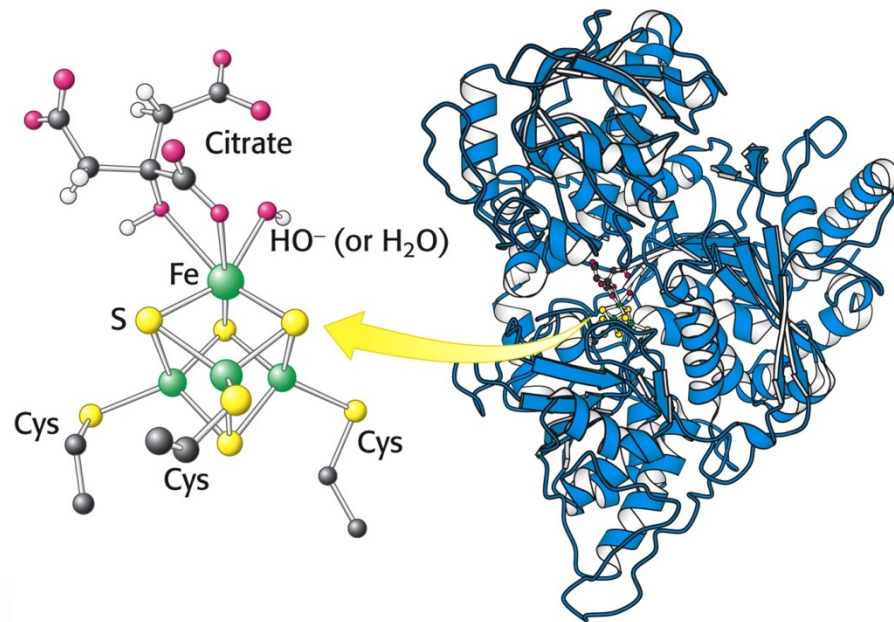
Step	Reaction	Enzyme	Prosthetic group	Type*	$\Delta G^{\circ}$	
					kcal mol <sup>-1</sup>	kJ mol <sup>-1</sup>
1	Acetyl CoA + oxaloacetate + H <sub>2</sub> O $\longrightarrow$ citrate + CoA + H <sup>+</sup>	Citrate synthase		a	-7.5	-31.4
2a	Citrate $\rightleftharpoons$ <i>cis</i> -aconitate + H <sub>2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

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

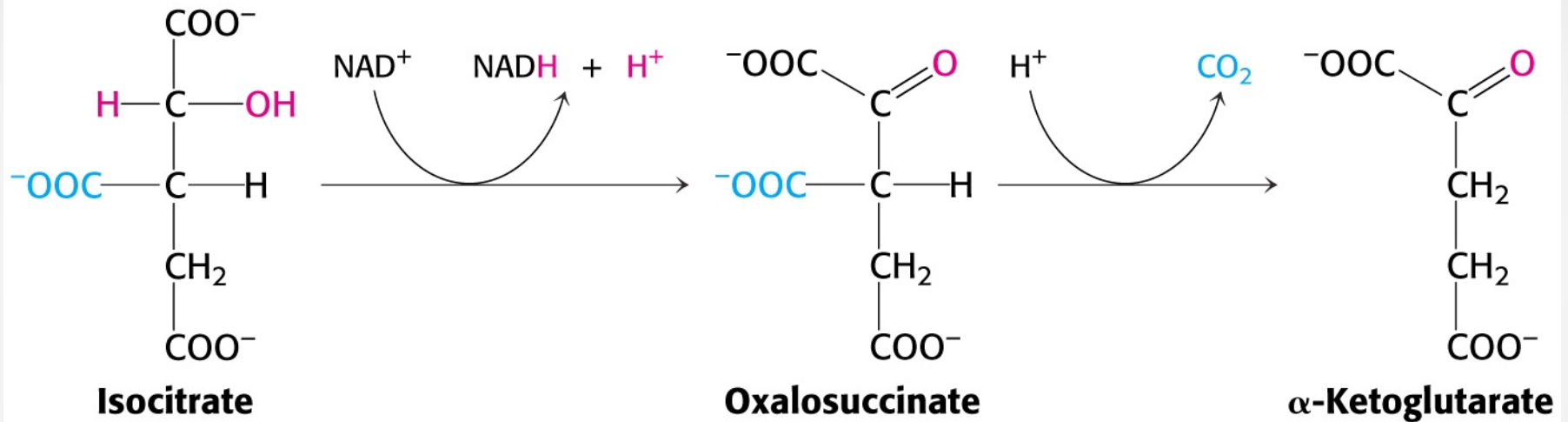
# Akonitasa



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

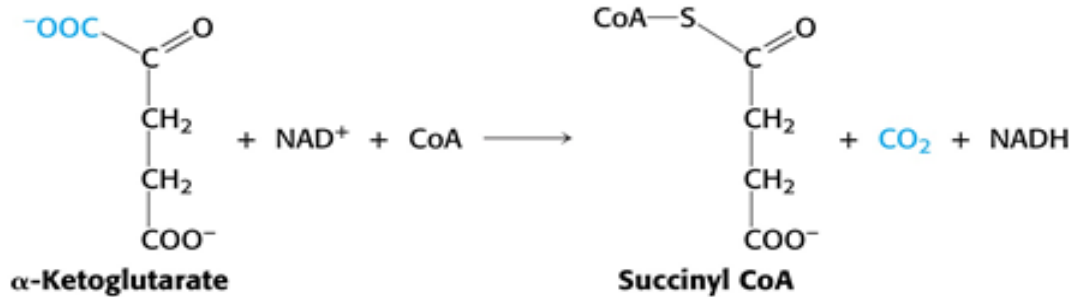


# Isocitrát dehydrogenasa



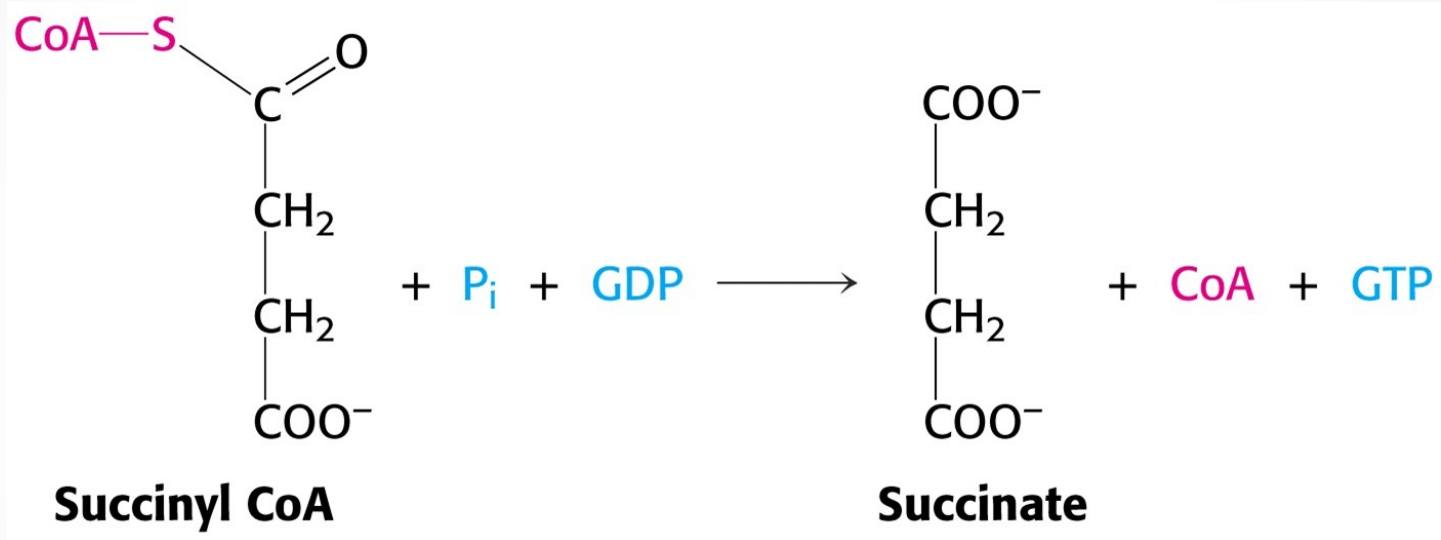
- Dvoustupňová přeměna
  - dehydrogenace
  - dekarboxylace  $\beta$ -karboxylu

# $\alpha$ – ketoglutarátdehydrogenasa



- Multienzymový komplex – analog pyruvát DH
  - Lipoamid DH stejná

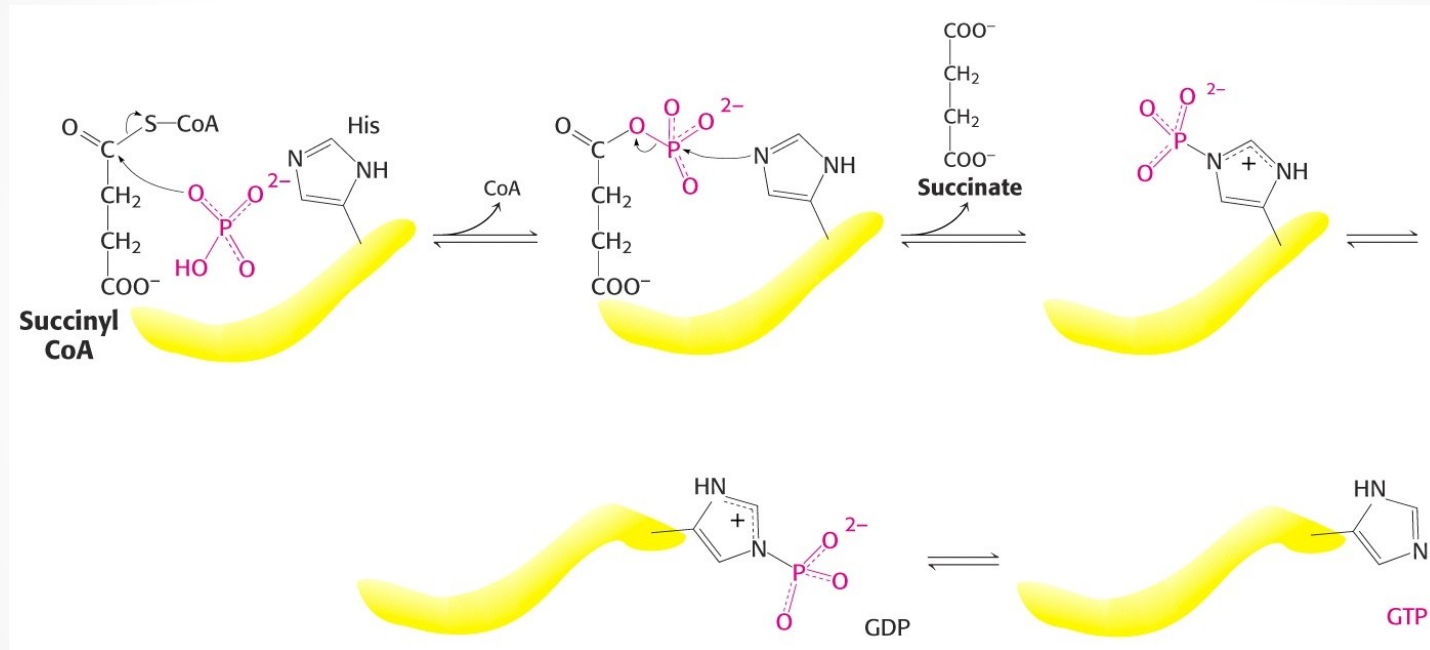
# SukcinylCoA syntetasa



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

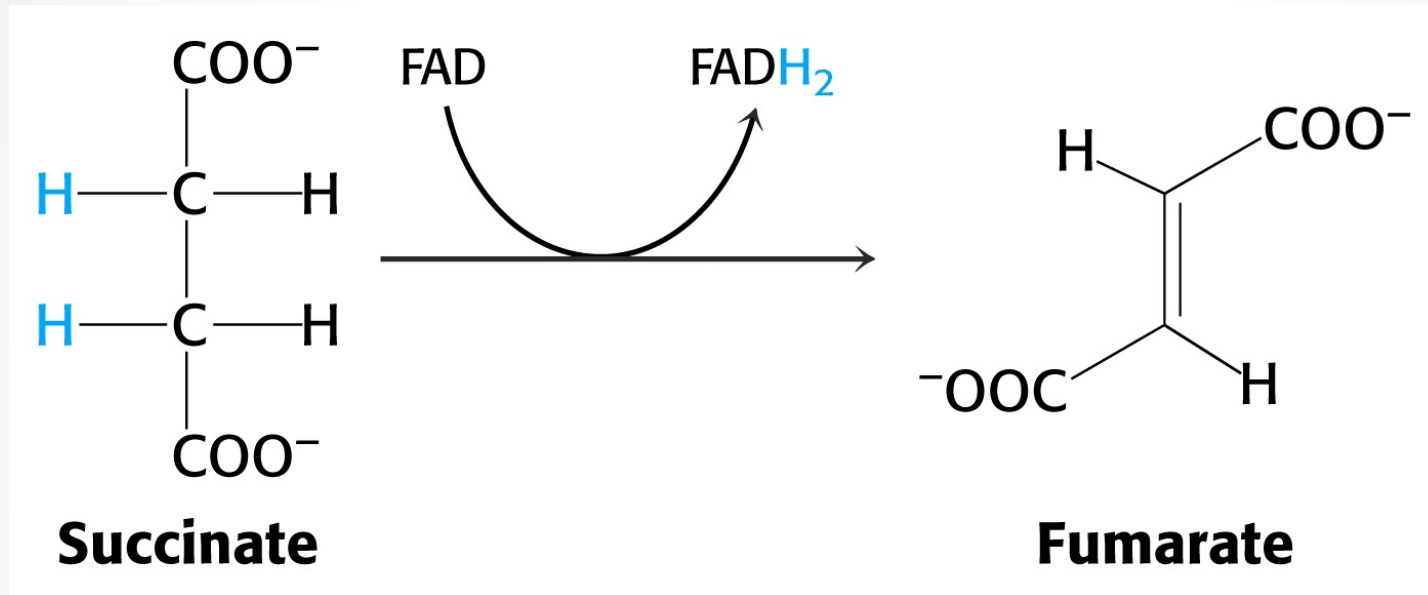


# SukcinylCoA syntetasa



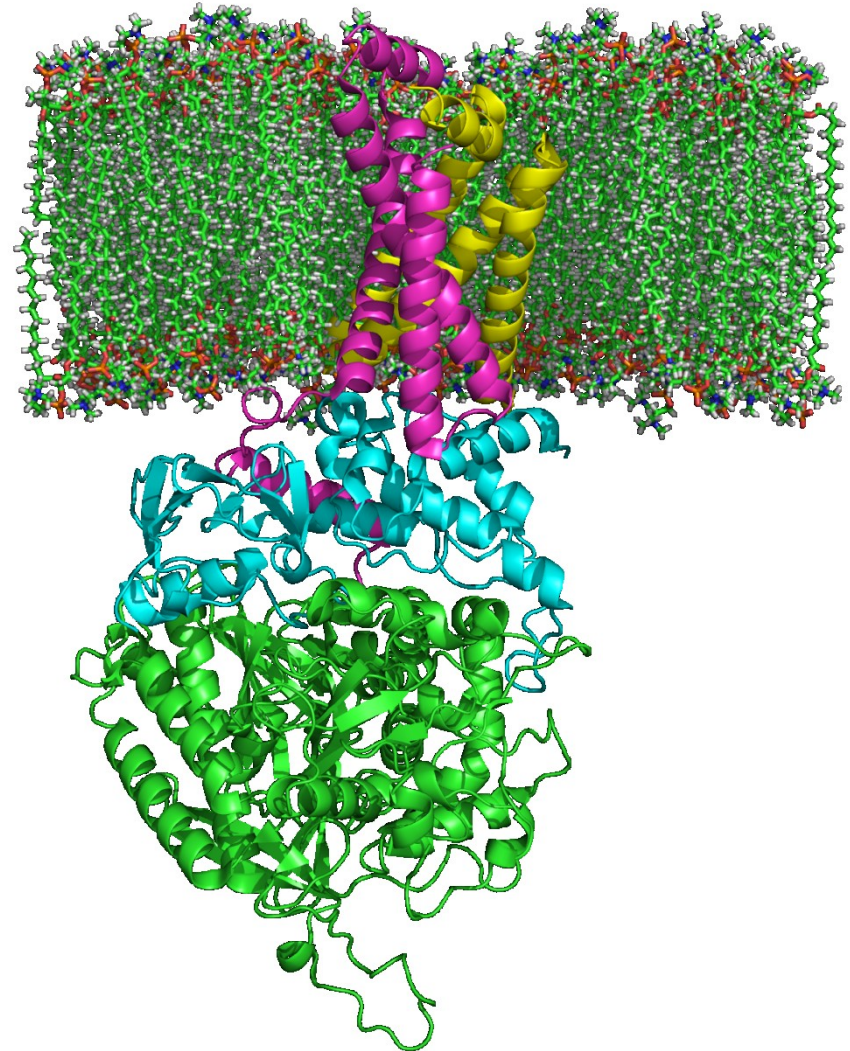
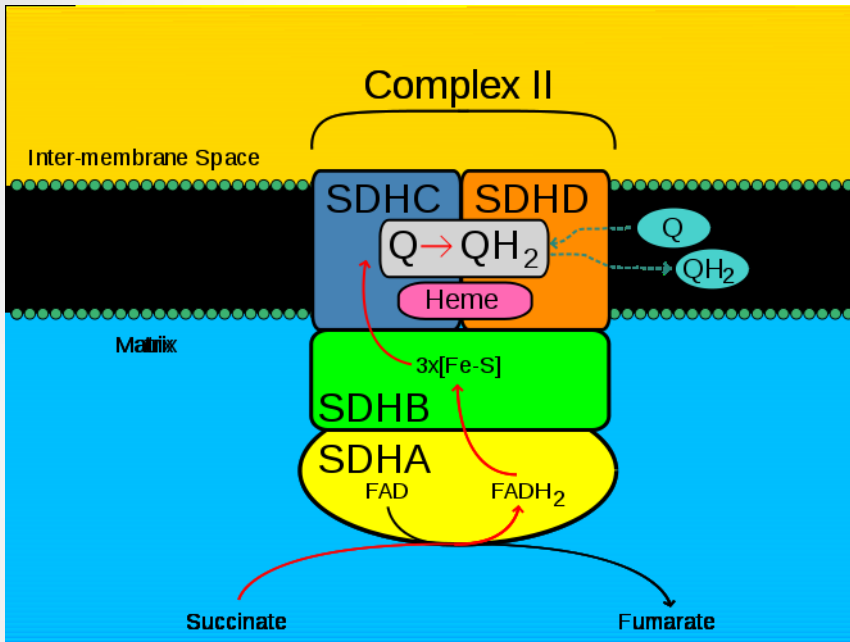
- Účast fosfohistidinu
  - Obecnější mechanismus přenosu ~P

# Sukcinát dehydrogenasa



- Membránově vázaný enzym
  - Ostatní enzymy TCA rozpuštěny v matrix
  - Reoxidace prostetické skupiny FADH<sub>2</sub>

# Sukcinát dehydrogenasa

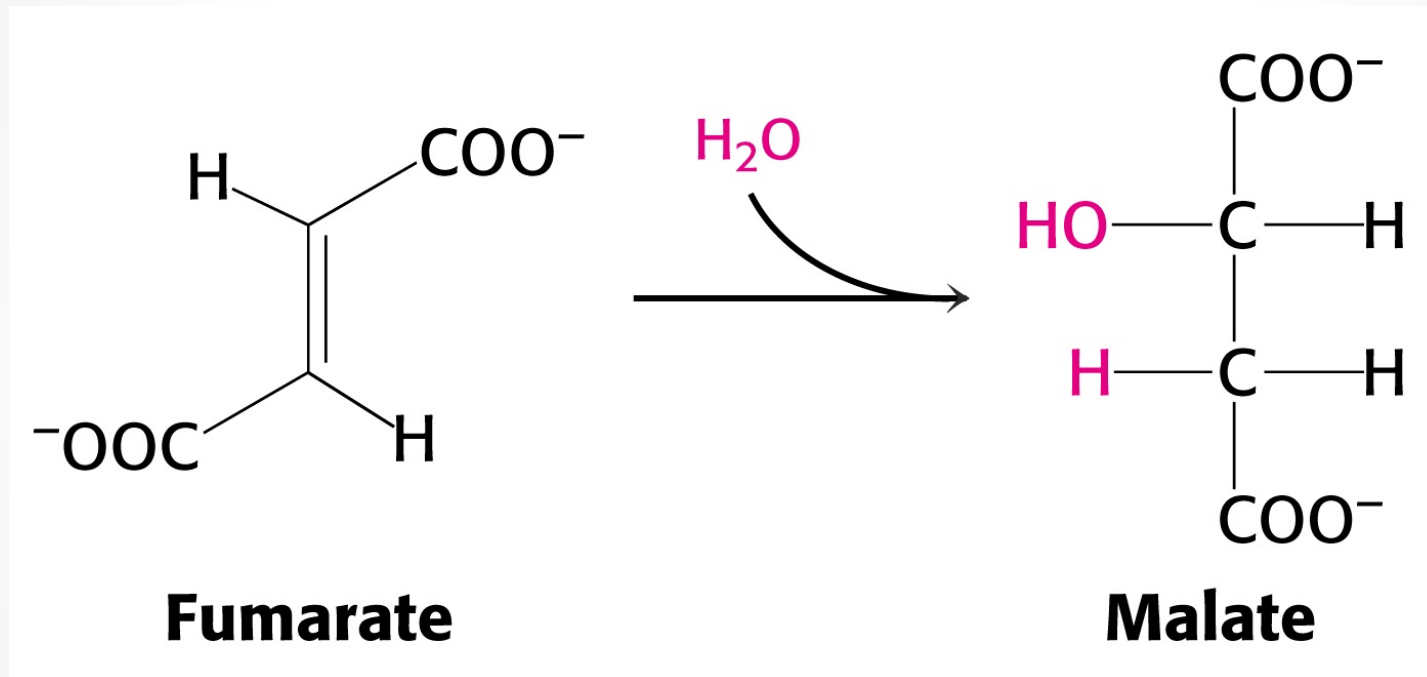


Komplex 4 podjednoto

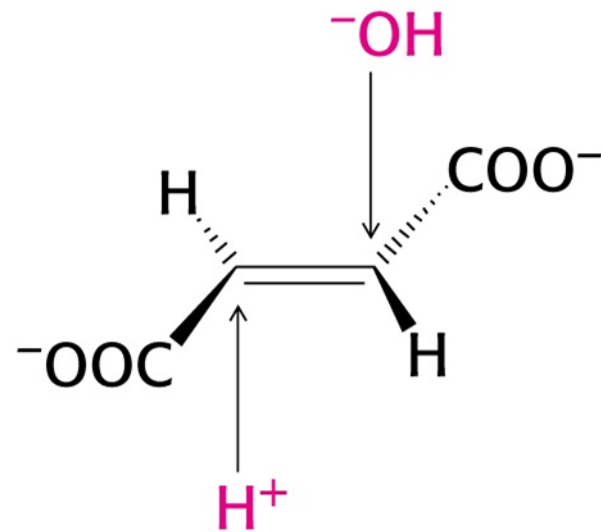
- 2 katalytické
- 2 membránové



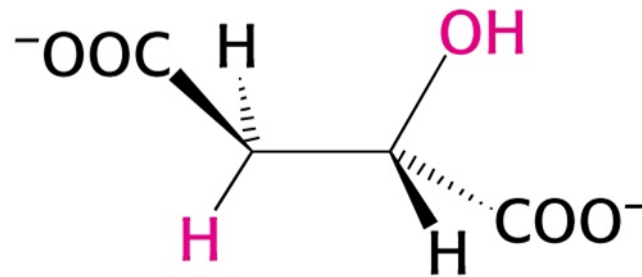
# Fumarasa



- Adice vody, lyasa
- Stereospecificita – L-malát



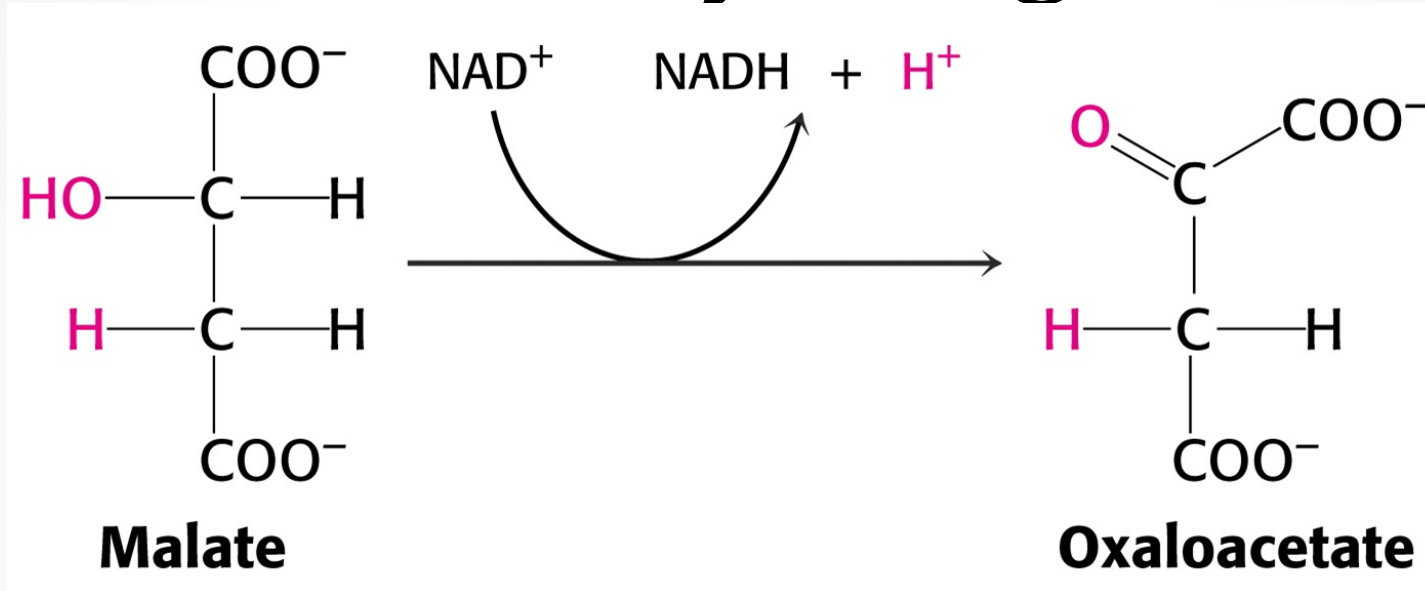
**Fumarate**



**L-Malate**

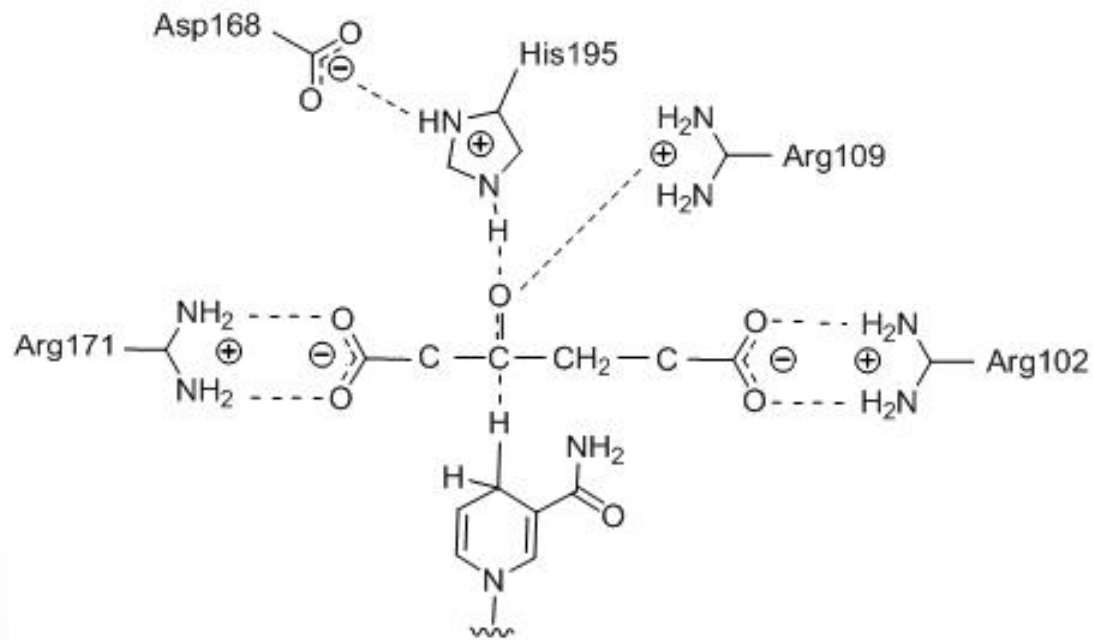
Stereospecificita adice vody  
– L-malát

# 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

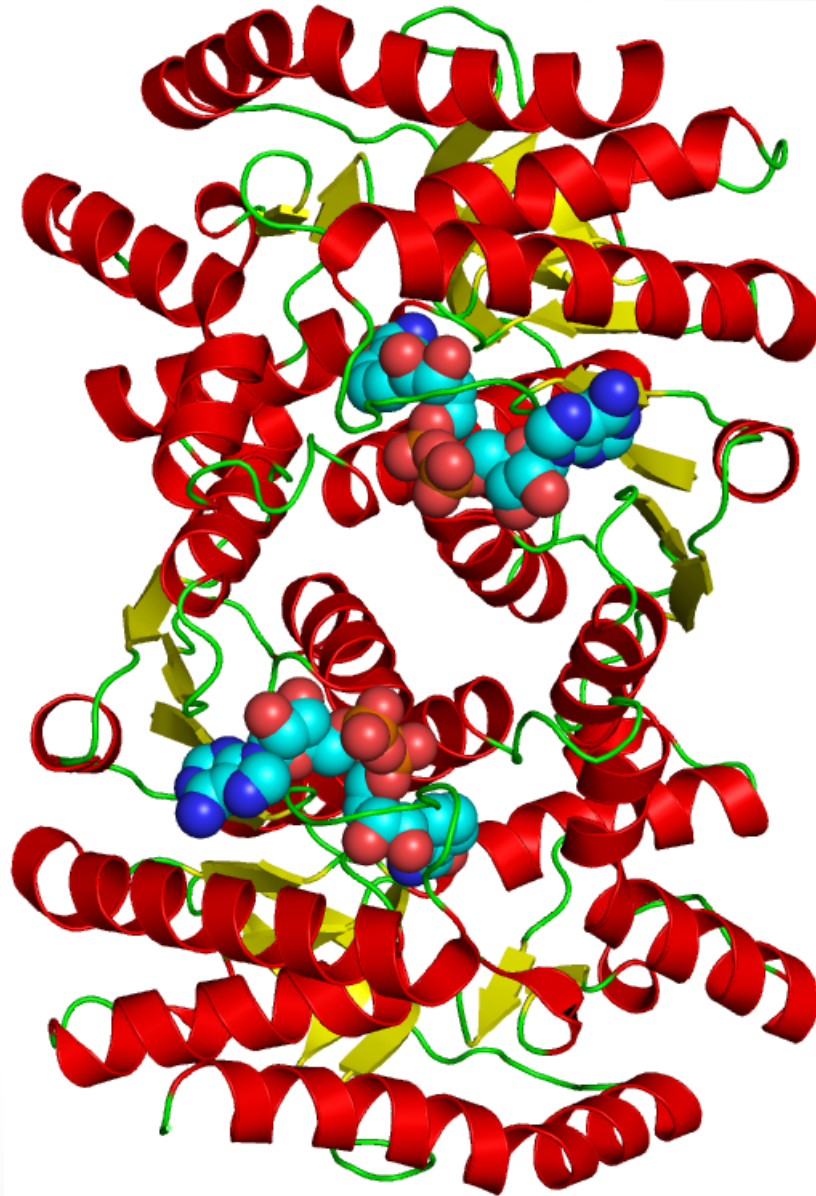


- Aktivní místo MDH



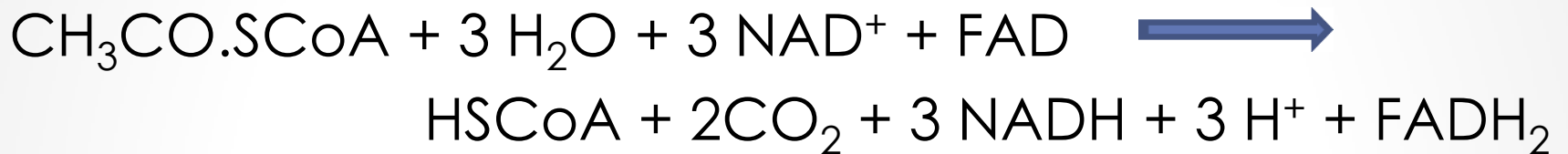
# Malát DH

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



# Bilance TCA

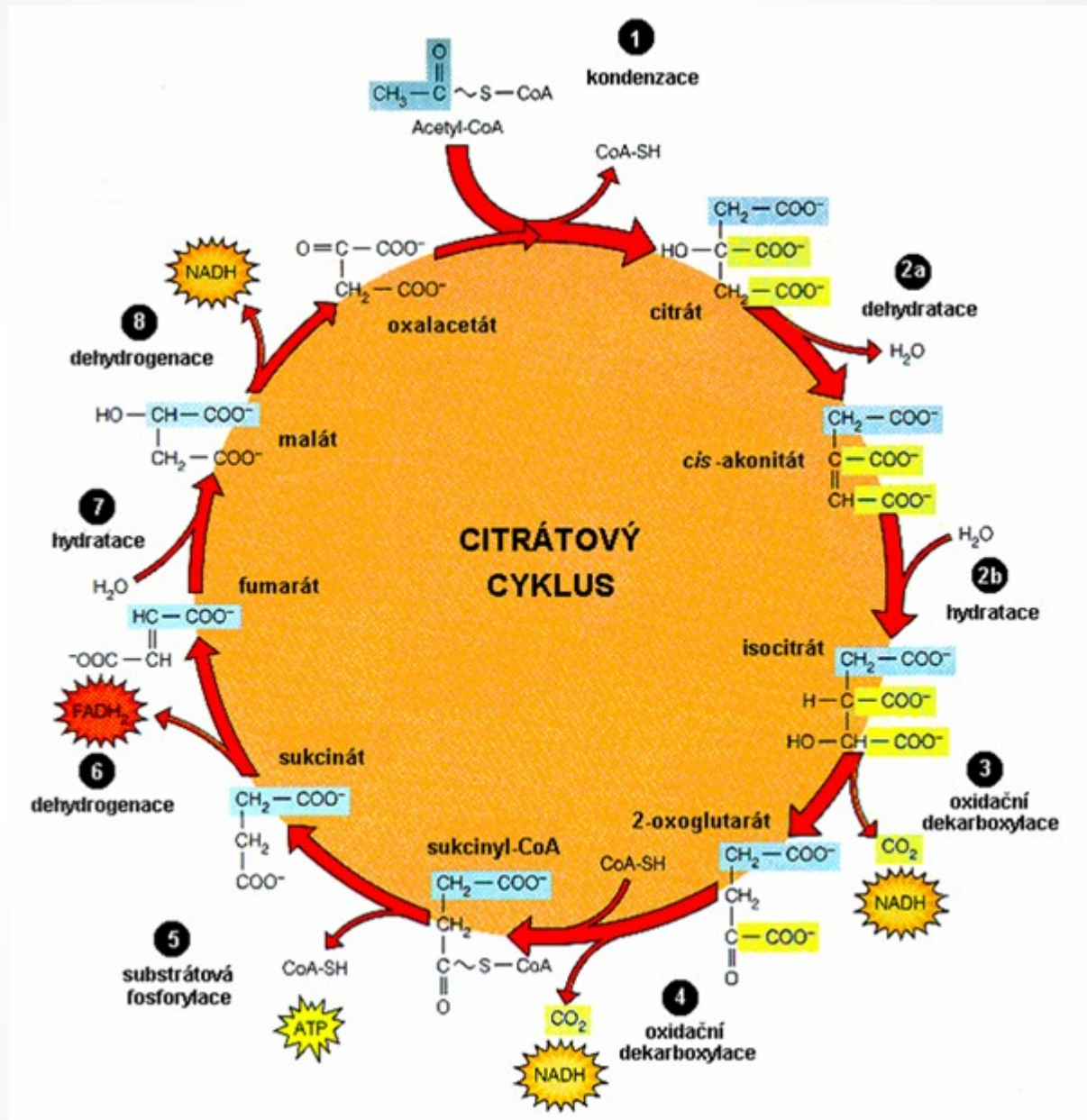
Látková



Energetická

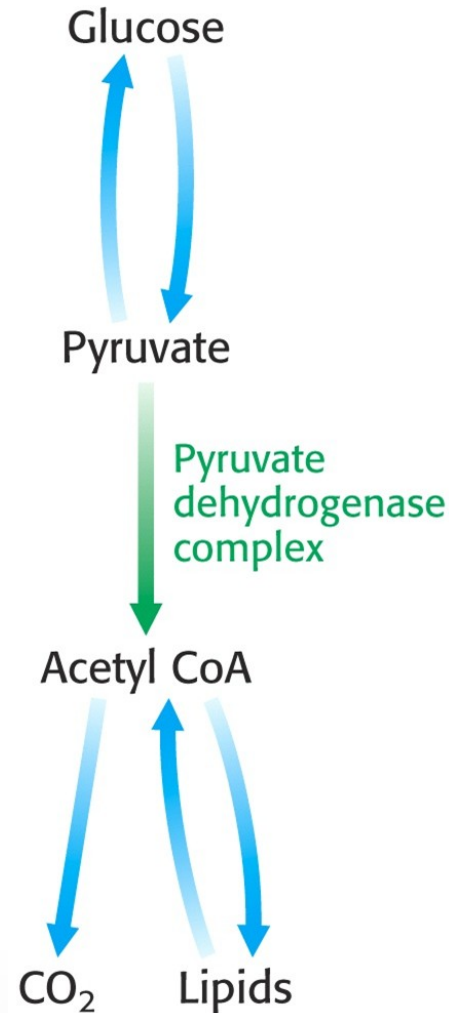
- 1 GTP (2 GTP/glukosu)
- Další energie se získá oxidací NADH a FADH<sub>2</sub>

Proces striktně respirační – provázán s dýchacím řetězcem



# Metabolické vztahy

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

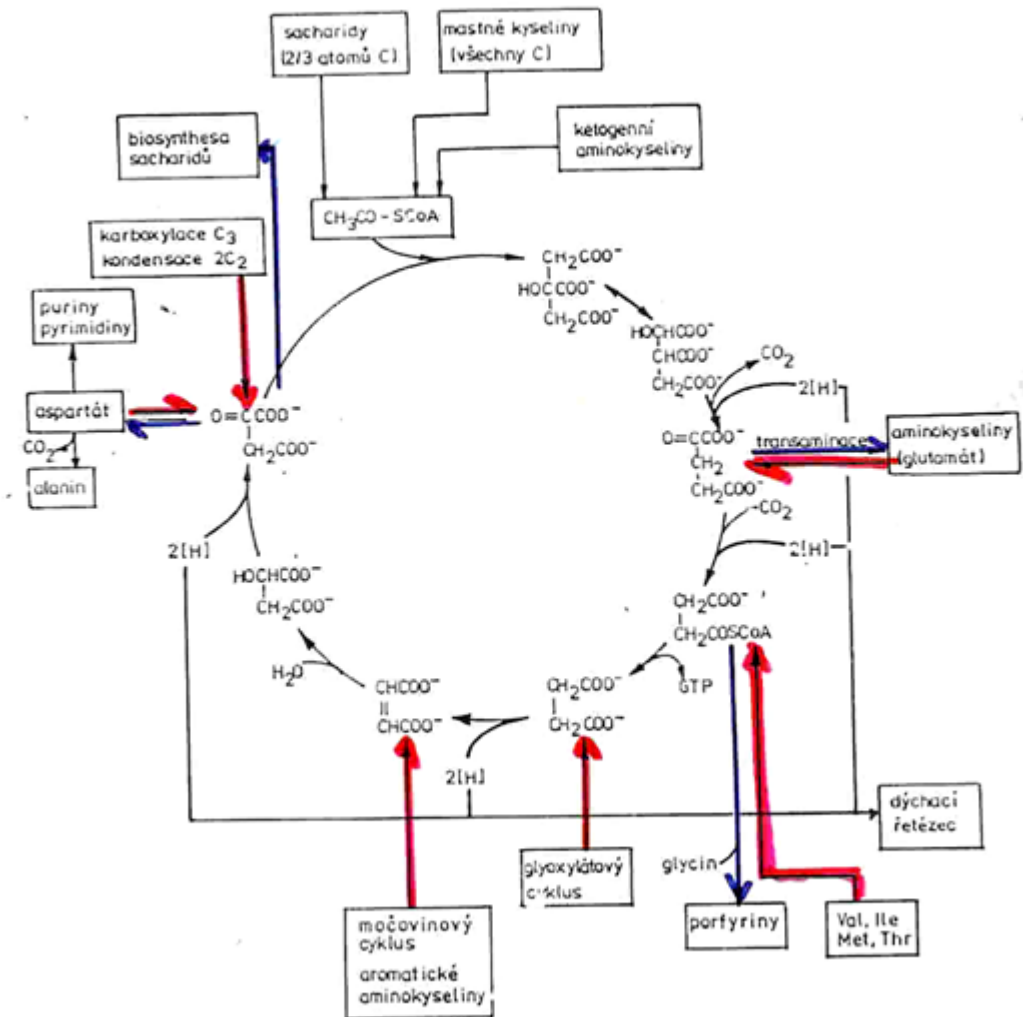


# Anabolický význam TCA

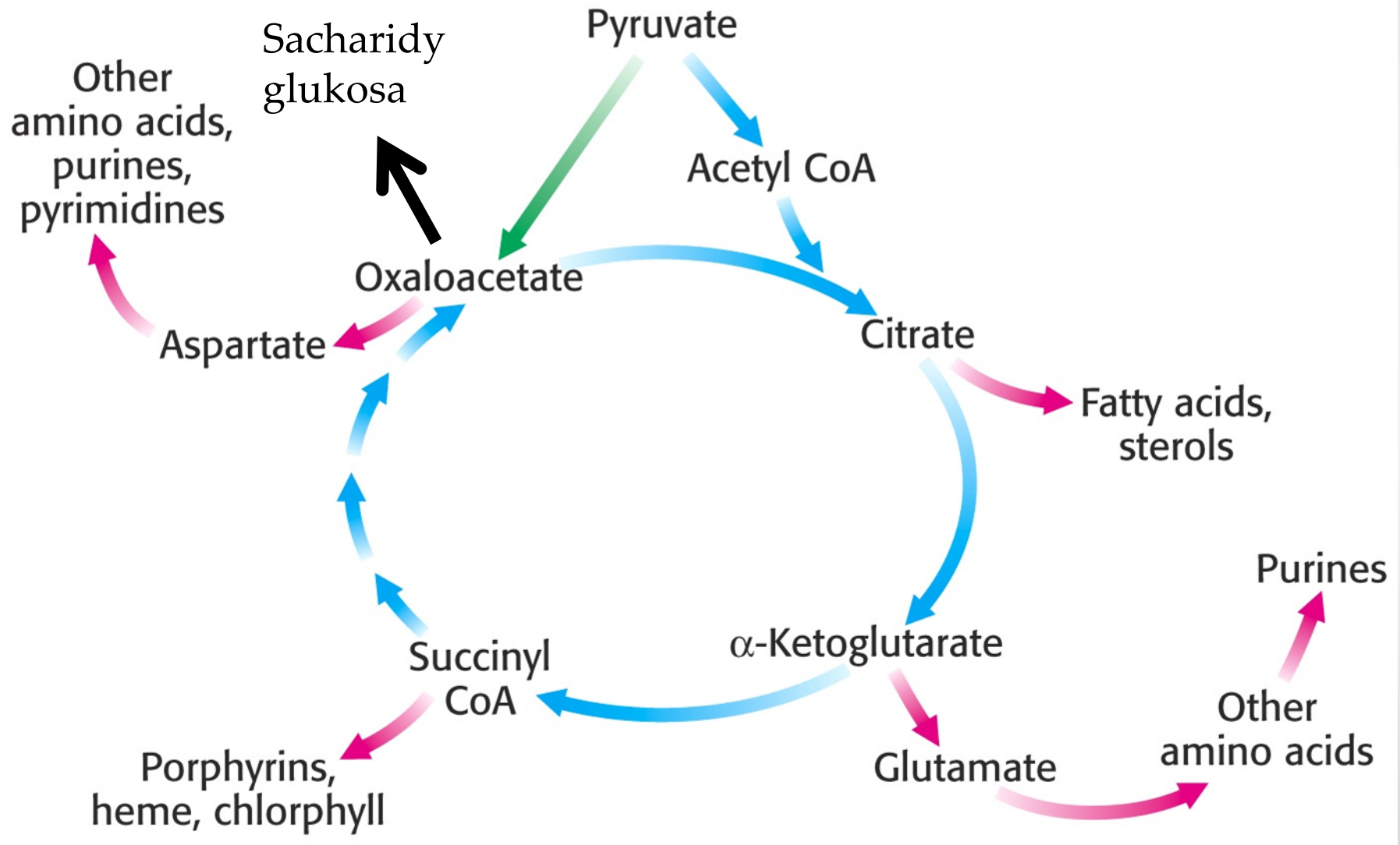
- Vývojově starší
  - Funkce za anaerobních podmínek
  - Adaptace pro aerobní organismy
- U mikroorganismů
  - Neúplný TCA za anaerobiosy
  - Smysl vysloveně katabolický

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

## Amfibolická povaha cyklu



# Biosyntetické vztahy TCA

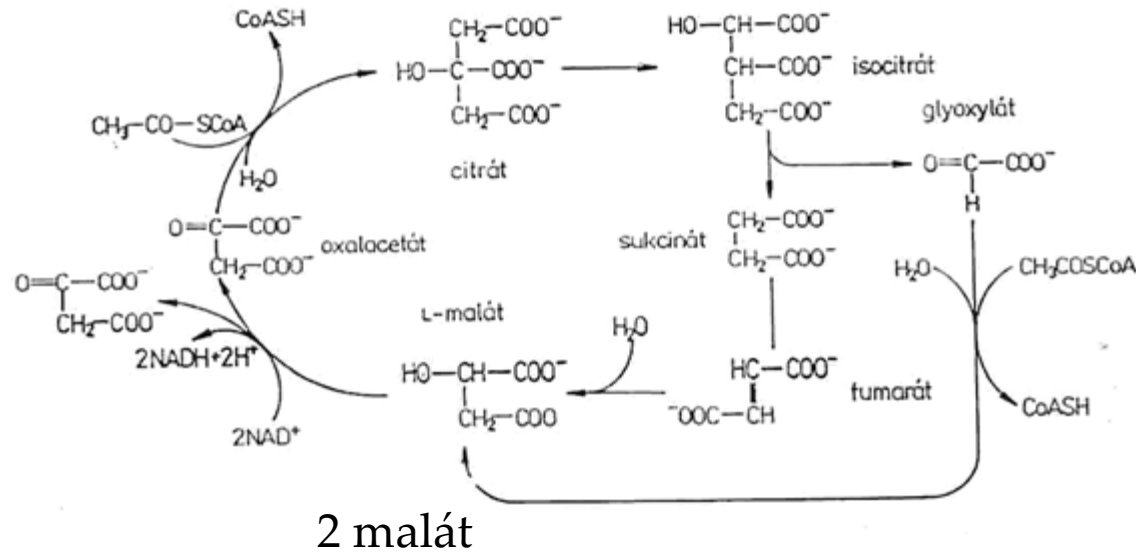


# Anaplerotické dráhy

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