

Základy biochemie

Evžen Wybitul
Lucie Drahoňovská

Verze v0.9.0
Poslední update 23.1.2020 (dokončení nukleotidů).
Sláva bioinformatikům!

Obsah

1	Úvod	2
2	Biomolekuly	4
2.1	Voda	6
2.1.1	Acidobazické vlastnosti vody a kyselin	10
2.2	Aminokyseliny	12
2.2.1	Acidobazické vlastnosti AK	15
2.2.2	Posttranslační modifikace AK	16
2.3	Kovalentní struktura proteinů	17
2.3.1	Síly udržující stabilitu proteinů	20
2.3.2	Protein folding	21
2.3.3	Struktura a funkce globinů	23
3	Enzymy a enzymová kinetika	31
3.1	Stavba enzymů	32
3.2	Názvosloví enzymů	34
3.3	Regulace enzymatické aktivity	35
3.4	Jak enzymy pracují	37
3.5	Enzymová kinetika	39
3.6	Enzymová inhibice	41
3.6.1	Kompetitivní inhibice	43
3.6.2	Akkompetitivní inhibice	43
3.6.3	Smíšená inhibice	44
3.6.4	Ireverzibilní inhibice	44
3.7	Vliv pH na enzymy a bisubstrátové reakce	44
3.8	Makroergní molekuly	46
3.8.1	ATP	48
3.9	Metabolismus a enzymologie	51
3.9.1	Princip katalýzy	51
3.9.2	Chymotrypsin	55
4	Sacharidy a glykolýza	60
4.1	Významné aldózy a ketózy	61

4.2 Cyklické formy	64
4.3 Deriváty monosacharidů	65
4.4 Disacharidy	66
4.5 Polysacharidy	67
4.5.1 Glykosaminoglykany	69
4.6 Glykolýza	73
4.6.1 Reakce glykolýzy	76
4.6.2 Zpracování pyruvátu za anaerobních podmínek	86
4.6.3 Regulace glykolýzy	87
4.7 Cyklus kyseliny citronové	88
4.7.1 Komplex pyruvát dehydrogenázy (PDC)	93
4.7.2 Reakce KC	99
4.7.3 Regulace KC	109
4.8 Intermediáty KC	110
4.9 Glyoxalátový cyklus	112
4.10 Oxidativní fosforylace	115
4.10.1 Mitochondrie	116
4.10.2 Oxidace (elektron-transportní řetězec)	119
4.10.3 Fosforylace	129
4.10.4 Regulace OF	140
5 Lipidy, mastné kyseliny a jejich metabolismus	140
5.1 Mastné kyseliny	141
5.2 Oxidace MK	143
5.2.1 Rozložení tuků na MK	145
5.2.2 Aktivace MK	146
5.2.3 Transport MK do mch	148
5.2.4 Beta-oxidace	149
5.2.5 Ketolátky	155
6 Další metabolické dráhy cukrů	156
6.1 Metabolismus glycogenu	156
6.1.1 Odbourávání glycogenu	157
6.1.2 Syntéza glycogenu	161
6.1.3 Regulace glycogenfosforylázy	164
6.1.4 Coriho cyklus	169
6.2 Glukoneogeneze	169
6.2.1 Obcházení pyruvát-kinázové reakce	173
6.2.2 Obcházení zbývajících dvou kinázových reakcí	175

6.2.3	Kompartmentalizace gng	176
6.2.4	Regulace	177
6.3	Pentózofosfátová dráha	178
6.3.1	Průběh oxidativní části	181
6.3.2	Průběh neoxidativní části	182
7	Metabolismus tuků	182
7.1	Příprava malonylu-CoA	184
7.1.1	Regulace ack	185
7.2	Syntéza MK	186
7.2.1	Přenos důležitých reaktantů na místo reakce	189
7.2.2	Elongace a desaturace MK	190
7.2.3	Syntéza triacylglycerolů	191
7.3	Regulace metabolismu tuků	193
7.4	Cholesterol	197
7.4.1	Syntéza cholesterolu	198
7.4.2	Transport cholesterolu do buňky a jeho regulace	203
7.5	Ikosanoidy	204
7.5.1	Tvorba a účinky ikosanoidů	205
7.5.2	Cykлизující dráha	206
7.6	Glycerolipidy a sfingolipidy	210
7.6.1	Fosfolipidy	210
7.6.2	Sfingolipidy	212
8	Metabolismus aminokyselin	213
8.1	Transaminace	214
8.1.1	Obecný průběh reakce	215
8.1.2	Příklady transaminačních reakcí	218
8.2	Oxidativní deaminace glutamátu	220
8.3	Cyklus močoviny	221
8.3.1	Průběh	222
8.4	Metabolismus C-kostry AK	223
8.4.1	Skupina [A, C, G, S, T]	228
8.4.2	Skupina SAM	233
8.4.3	Skupina NIH	235
8.5	AK jako prekurzory syntézy	236
8.6	Syntéza AK	239

9 Metabolismus nukleotidů	240
9.1 Syntéza nukleotidů	243
9.1.1 Syntéza purinů	243
9.1.2 Syntéza pyrimidinů	247
9.1.3 Syntéza deoxyribonukleotidů	253
9.2 Degradace nukleotidů	254

ČÁST 1 —

ÚVOD

Biochemie pomáhá vysvětlovat rozmanitost přírody — všechno tvorstvo staví na několika základních principech, 20 AK, třech druzích biopolymerů... A složitost v přírodě vzniká hierarchicky kombinací těchto faktorů. Zároveň mnoho jevů, které jsou na makroúrovni těžko vysvětlitelné, má svůj základ právě v biochemii (nebo související molekulární biologii).

HISTORIE OBORU

- L. Pasteur (19. stol.)
 - položil základy biochemie
 - fermentaci způsobují mikroorganismy
 - každý život pochází ze zárodku (zába nevznikne z bahna)
- E. Buchner (přelom 19. a 20. stol.)
 - fermentaci je schopen navodit buněčný extrakt
 - popření vitalismu: to, čeho je živý organismus schopen, *je možné* analyzovat, není to dáno žádnou ”životní silou” (*vis vitalis*)
 - fermentace je chemický proces, je nutné se ptát, co je to na chemické úrovni => počátek studia glykolytické dráhy
 - dostal Nobelovu cenu
- A. Harder, Hans von Euler-Chelpin
 - dialýza

[DIALÝZA]

POSTUP

- (1) do kádinky přidáme pufr
- (2) do kádinky přidáme střívko (semipermeabilní membrána)
- (3) přes póry projdou jen molekuly s určitou velikostí, cut-off point je několik tisíc Da
 - malé molekuly (fruktóza) přes střívko projdou

- stejná koncentrace uvnitř i vně střívka

Zjistilo se, že velké molekuly, které přes membránu neprošly (tedy proteiny, pozn. profesora) jsou termolabilní. Došlo poprvé k separaci, frakcionaci, rozdělení kvasinek.

- dále pak výzkumy malých molekul (byly dobře dostupné), objevy vitamínů, základních metabolických drah
- J. Sumner (1926)
 - krystalizace proteinu ureázy z bobů: velký milník, čistý materiál, navíc uměl katalyzovat štěpení močoviny => proteiny jako nositelé enzymové aktivity
- popisy glykolýzy, cyklu kyseliny citrónové, určení struktury DNA, krátce na to určení krystalové struktury myoglobinu (protein z vorvaně)
- poznání transformace energie (oxidativní fosforylace), fungování buňky a regulace jejího metabolismu
 - objevy všech velkých metabolických drah, počátek hledání jejich regulace
- později (90. léta – součastnost) spíše už **systémové studium**
 - jak se soubory molekul v buňce chovají, studium celého souboru proteinů v buňkách (např. jak se liší soubory proteinů kvasinek žijících v různých podmírkách)
 - studium proteomu, metabolomu, etc., pomocí molekulárně biochemických a hmotnostně spektrometrických přístupů, které umožňují vše pozorovat najednou
 - velký posun v popisu diverzity – víme o všem, co se organismu týká => můžeme skoro definitivně rozhodnout, čemu jsou organismy příbuzné, ptáme na celé soubory genů a proteinů

[CO JE POTŘEBA K POCHOPENÍ PŘEDNÁŠKY]

- stavba atomu (elektronová konfigurace základních biogenních prvků, jak dochází k hybridizaci, co jsou orbitaly, prostorová struktura v hybridizacích)
- stavba jednoduchých molekul, zejména těch založených na uhlíku
 - znát jeho elektronovou konfiguraci a záležitosti hybridizace
 - pouze uhlík z celé tabulky je schopen tvořit tak akorát stabilní řetězení C–C–C–C–...
 - * N–N–N–N–... nestabilní
 - * O–Si–O–Si–... až příliš stabilní
- periodické vlastnosti prvků: jak se v tabulce mění elektronegativita, velikost iontu, elektronová afinita, ionizační energie, velikost elektronového obalu
- co je to kovalentní vazba, vodíkové můstky a další interakce
- základní poznatky o chemických rovnováhách
- základy termodynamiky: první a druhý zákon, zachování energie, entropie

- kyseliny, zásady, pufry
-

ČÁST 2 —

BIOMOLEKULY

[ŠTĚPENÍ C-H VAZEB]

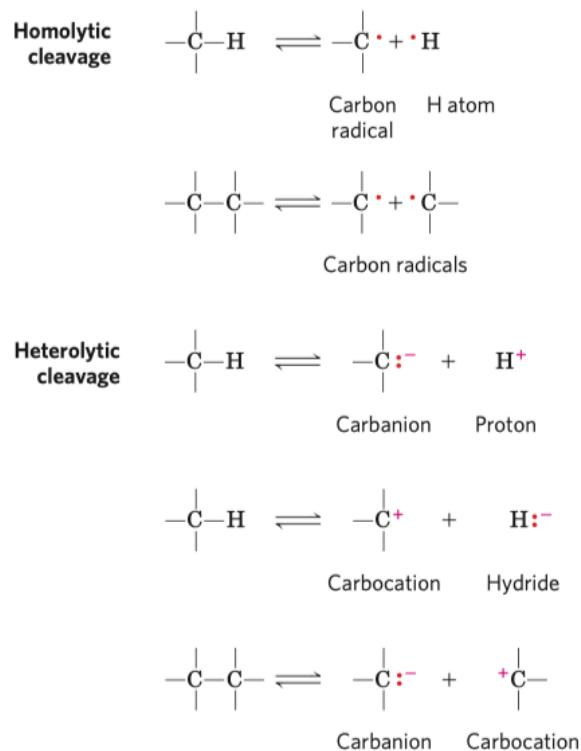
- **homolytické štěpení**

- vede ke vzniku radikálů, každý z účastníků vazby získává jeden elektron z vazebného páru

- **heterolytické štěpení**

- vede ke vzniku iontů
- heterolytickým štěpením mohou vznikat významné nukleofilní skupiny (hydroxy, amino, imidazolová, atd.) i elektrofilní skupiny (protony, ionty kovů, atd.)

V biologických systémech nejčastěji vzniká záporně nabité C (s oběma elektrony z páru) a proton H⁺. Pokud je k dispozici koenzym NAD⁺ nebo NADP⁺, může vzniknout kladně nabité C⁺ a H⁻.



Obrázek 2.1: Homolytické a heterolytické štěpení

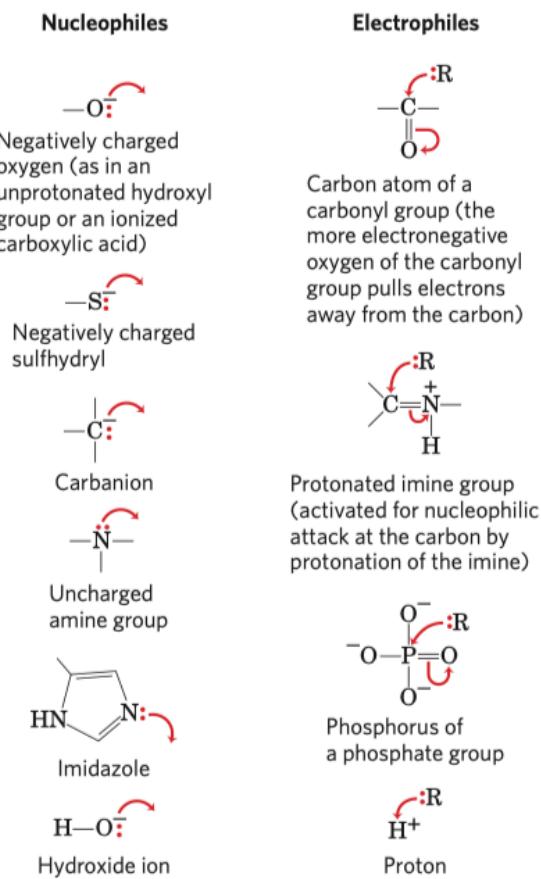
[NUKLEOFILY A ELEKTROFILY]

Nukleofil

Molekula, které přebývají elektrony, chce se jich zbavit.

Elektrofil

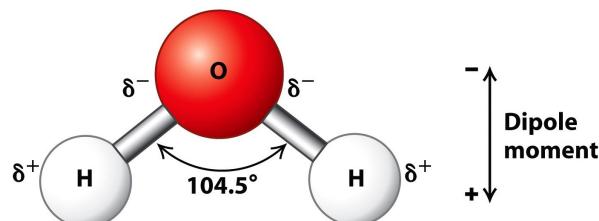
Molekula, kteréchybí elektrony, chtěla by nějaké dostat. Často jí jsou předány nukleofilem.



Obrázek 2.2: Příklady nukleofilů a elektrofilů

2.1 Voda

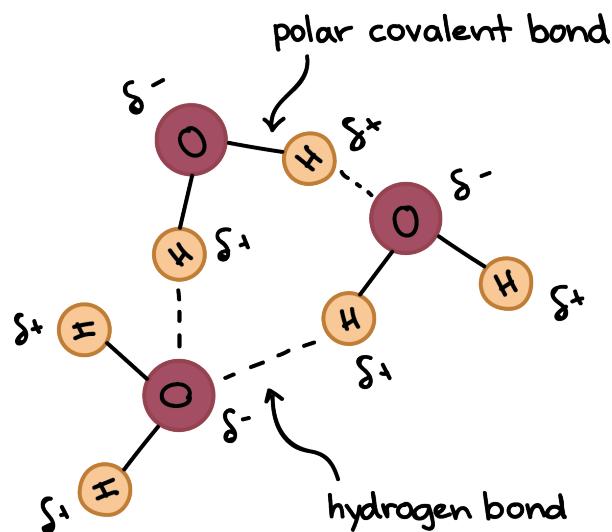
- molekula vody je asymetrická
 - sp³ hybridizace: vazby směřují do vrcholů čtyřstěnu, ve dvou jsou vodíky a ve dvou nevazebné elektronové páry
- tvoří elektrický dipól: na části molekuly je parciální elektrický náboj
 - kyslík je mnohem elektronegativnější, elektronegativita rozhoduje o distribuci elektronů na vazbě; kyslík přitahuje vazebný pár větší silou, elektronová hustota bude tedy posunuta ke kyslíku



Obrázek 2.3: Znázornění molekuly vody

[DŮLEŽITÉ VLASTNOSTI VODY]

- vysoká dielektrická konstanta => umí účinně separovat náboje
 - voda je v tom v rámci běžných rozpouštědel nejlepší => ionty, které by spolu normálně reagovaly, se udrží ve vodě zvlášť
- vysoká tepelná kapacita (pufr planety)
- vysoká měrná skupenská tepla => odpařováním účinně ochlazujeme systém
 - včely musí mávat křídly, když chtějí ochladit úl
- vyšší hustota vody ve srovnání s ledem => vodní nádrže zamrzají od povrchu
- vysoké povrchové napětí => týká se řady věcí
 - souvisí s tvorbou vodíkových můstků
- vysoká vodivost

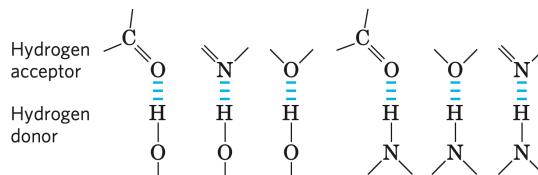


Obrázek 2.4: Schéma vodíkového můstku

Strukturu a vlastnosti vody silně ovlivňuje tvorba vodíkových můstků.

VODÍKOVÉ MŮSTKY

- O–H vazba má ze 33% iontový charakter
- tvoří se hlavně mezi dvěma molekulami vody
 - mohou se ale tvořit i s jinými (částečně) polárními látkami => polární látky se ve vodě dobře rozpouštějí
 - * příklady skupin reagujících s vodou: hydroxylová, keto, karboxylová (dokonce se třemi molekulami)
- parciálně kladně nabity H se naváže na volné el. páry, které také míří do vrcholů čtyřstěnu
 - nic jiného než vodík není tak malé, aby to dovedlo
- energie vazby cca 20kJ/mol, asi o řád méně než typická kovalentní vazba (např. C–C má asi 350kJ/mol).
 - vzniká jich ovšem mnoho, čili i přes nízkou energii mají velký vliv
- vzdálenost je jen 1.8 Å, což je méně než VdW vzdálenost (2.6 Å) bez této interakce
- každá molekula vody může vázat 4 partnery (dva jako donor, dva jako akceptor)
 - u ledu tomu tak opravdu je, jeho krystaly mají hexagonální tvar => má nižší hustotu než voda
 - v kapalině je tato vlastnost také skoro zachována: vysoké procentomoekul má 4 partnery, samotní konkrétní partneři se ale stále mění
 - * fluktuující struktury obsahující desítky molekul: stále se tvoří a zanikají (co 10–11 sekund) => tvorba až sedmičlenných clusterů
 - * vysoká mobilita molekul; donedávna jsme netušili, jak extenzivní ty interakce jsou (jde o celou jejich síť)
- ionty OH[−] a H₃O⁺ jsou vysoce mobilní (viz obrázek)

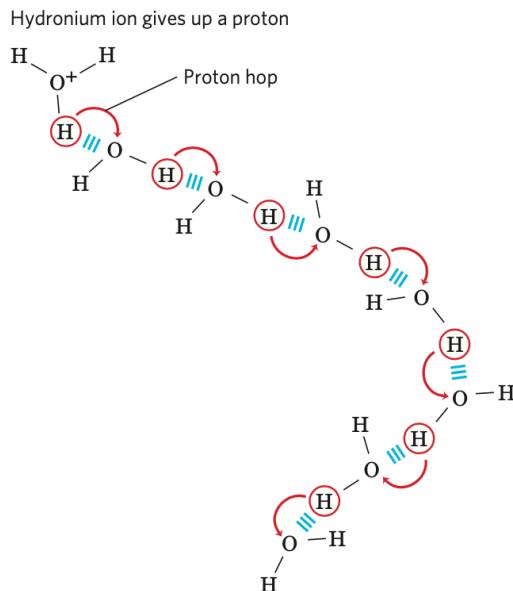


Obrázek 2.5: H-můstky běžné v biomolekulách

SROVNÁNÍ VODY S JINÝMI ROZPOUŠTĚDLY

- dielektrická konstanta zdaleka nejvyšší, i když ty molekuly jsou si jinak podobné
 - dielektrická konstanta udává míru odporu při vytváření elektrického pole v rámci nějaké látky vzhledem k vakuu
 - např. aceton je také asymetrický s dipólovým momentem => tento jev není způsoben dipolaritou
- má vysoká měrná skupenská tepla

- např. při odpařování musíme dodat kromě normálního tepla ještě teplo navíc, abychom rozbili H-můstky
- dobře separuje ionty => ve vodě mohou být látky rozpuštěné v daleko vyšší koncentraci než v jiných rozpouštědlech



Obrázek 2.6: Protonové skoky mezi molekulami vody

TVORBA MICEL

- (1) nepolární látka L (nebo látka s nepolární částí) s vodou neinteraguje, molekuly vody jsou maximálně na VdW vzdálenost
- (2) kolem L vzniká vrstvička vody s omezenou pohyblivostí (nemůže se k ní přiblížit)
- (3) tato vrstvička se váže přes H-můstky na další molekuly, ty zase na další, ... => mnoho molekul má najednou omezený počet stupňů volnosti
- (4) systém směřuje k maximální entropii => molekuly se L shlukují k sobě, v součtu tím omezí (= uspořádají) nejmenší možný počet molekul vody

Body 1. a 2. probíhají ve všech polárních rozpouštědlech, avšak chování a unikátnost vody v tomto (opět) silně ovlivňují H-můstky. Tento princip stojí za tvorbou *biologických membrán*. Dal by se popsat následující rovnicí

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

kde ΔS značí změnu entropie, ΔH změnu entalpie. Pokud je $\Delta G > 0$, děj samovolně neprobíhá; při rozpouštění nepolárních látek ve vodě je $\Delta S < 0$ a tedy $\Delta G > 0$.

Hydrofobní kolaps

Hypotetický způsob vzniku terciální struktury proteinů; podle této hypotézy se proteiny zfoldují na základně hydrofobického efektu popsaného výše.

Hydrofobní interakce jsou vlastně **negativně vyvolané reakce**: jsou vyvolané absencí přitažování molekul rozpouštědla a rozpouštěné látky

2.1.1 Acidobazické vlastnosti vody a kyselin

Brønstedova kyselina

Látka, která může poskytnout protony. Obdobně zásada je látka, která může protony přijmout. Po ztrátě protonu se Brønstedova kyselina stává svou **konjugovanou zásadou**.

pufr

Acidobazický pufr je směs slabé kyseliny a její konjugované zásady v roztoku, který má pH blízké pK_a kyseliny.

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = -\log[\text{H}^+] = pK_a - \log \frac{[\text{HA}]}{\text{A}^-} \text{ pro vodu} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+],$$

přičemž předposlední rovností se říká Hendersonova-Hasselbalchova rovnice a popisuje vztah mezi složením pufru a jeho kyslostí. Pro vodu zároveň platí

$$K_{eq} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]},$$

což vychází z obecnější rovnice

$$\text{A} + \text{B} \rightleftharpoons \text{C} + \text{D} : K_{eq} = \frac{[\text{C}][\text{D}]}{[\text{A}][\text{B}]}$$

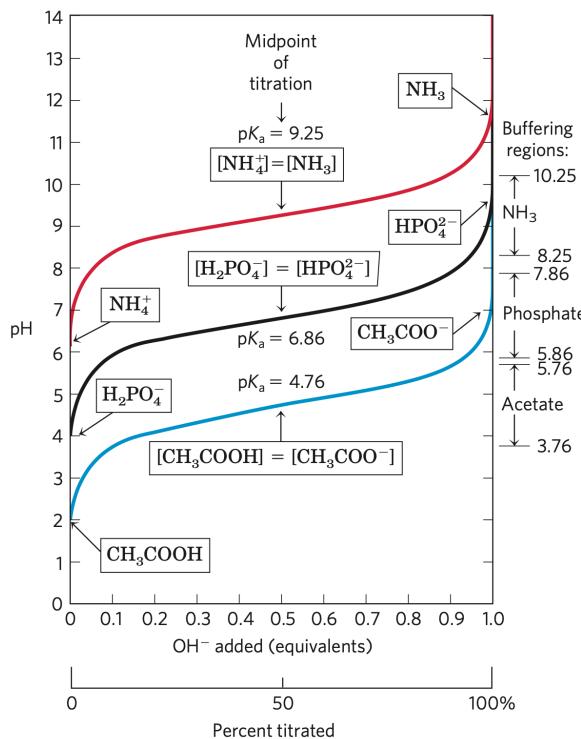
Z měření vychází, že při 25 ° C $[\text{H}_2\text{O}] = 55.5$, a tedy

$$K_{eq} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{55.5} \Rightarrow 55.5 K_{eq} = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = K_w,$$

kde K_w značí *iontový součin* vody a je za běžných podmínek roven 10^{-14} .

TITRACE

- používá se k zjištění množství kyseliny v roztoku
- do roztoku se přidává NaOH (nebo jiná silná zásada) o známé koncentraci, dokud se roztok neneutralizuje
- z koncentrace a objemu použité zásady se spočítá pH původního roztoku
 - vývoj pH roztoku v závislosti na množství přidané zásady se zaznamnává do tzv. titrační křivky, viz obrázek
 - * křivku lze popsat Hendresson-Hasselbachovou rovnicí
 - * v inflexním bodě platí $\text{pH} = \text{p}K_a$
 - * v části, kde pH roste jen pomalu, se systém chová jako pufr



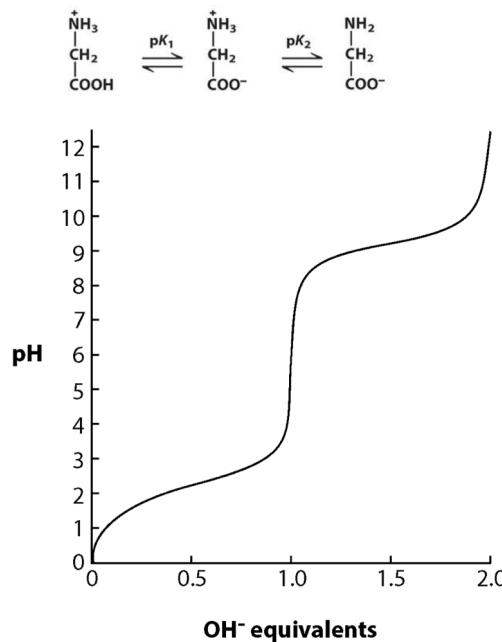
Obrázek 2.7: Titrační křivka

Pokud budeme vybírat pufr, musíme volit tak, aby poměr soli a kyseliny byl roven jedné právě v oblasti, ve které budeme pracovat.

POLYPROTNÍ KYSELINY

- acidobazické skupiny v jedné molekule se navzájem ovlivňují
- pokud se $\text{p}K_a$ jejich různých ionizačních stupňů liší více než o 2 až 3 jednotky pH, můžeme je při výpočtech pH úspěšně považovat za směs jednotlivých slabých kyselin

- pro polyprotní kyseliny s hodnotami pK lišícími se méně než o tuto hodnotu jsou pozorované molekulové ionizační konstanty prostě vztaženy na mikroskopické ionizační konstanty disociujících skupin.

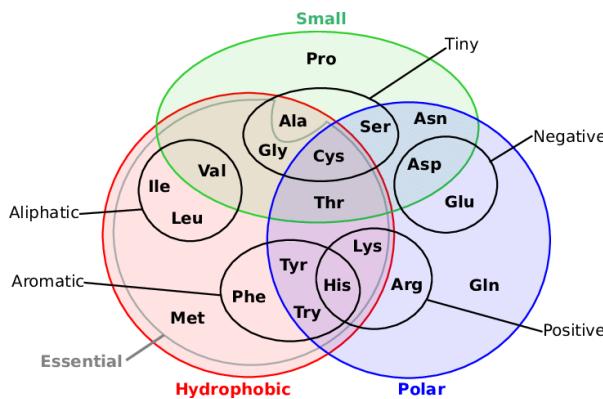


Obrázek 2.8: Titrační křivka polyprotní kyseliny

2.2 Aminokyseliny

META

Předpokládají se základní znalosti struktury a vlastností AK, viz např. Zápis z bioinformatiky nebo zápis z biopolymerů. Je nutné znát i jednotlivé zkratky a umět nakreslit chemickou strukturu každé AK.



Obrázek 2.9: Základní vlastnosti AK

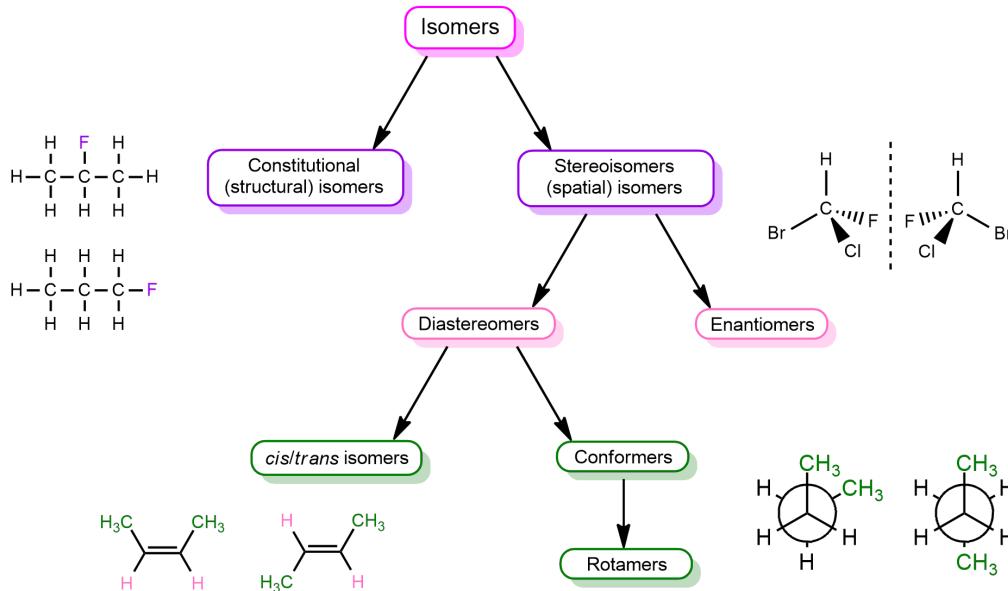
DŮLEŽITÉ VLASTNOSTI AK

- náboj, titrační křivka (viz dále)
- velikost (viz obrázek níže)
- charakter skupin na R, zda jsou či nejsou aromatické
 - pozn. prolin není aromatický, jeho cyklus ale významně ovlivňuje vlastnosti řetězce
 - je v daném místě méně pružný
- leucin, izoleucin, valin, jsou vybaveny větveným alifatickým řetězcem
 - izobutylová skupina je chováním podobná alifatickému uhlovodíku => je hydrofobní
- S–H skupina v cysteinu bude oxidovaná či redukovaná v závislosti na prostředí, může tvořit S–S můstky ať už s jiným cysteinem, nebo s jinými látkami
- jeden konec lysinu se chová polárně, druhý ne
 - aminoskupina má kolem pH 7 kladný náboj
 - alifatický řetězec je hydrofobní
- optická aktivita
- všechny až na Gly jsou asymetrické
 - Gly má na flexibilitu řetězce opačnou vlastnost než Pro, zvyšuje ji

Všechny tyto vlastnosti se různě kombinují a přispívají tak k celkovým vlastnostem dané AK.

OPTICKÁ AKTIVITA AK

- AK tvoří stereoizomery, tzv. *entantiomery*, jsou svým zrcadlovým obrazem
- nejsou chemicky rozlišitelné, ale stáčejí rovinu polarizovaného světla na různé strany
 - pozor, ne vždy L doleva a D doprava
- běžně se vyskytují L-formy
- jejich názvosloví se odvozuje od Fisherovy projekce u cukrů
- Thr a Ile mají více center asymetrie (více chirálních uhlíků)
 - tvoří tzv. *diastereometry* (narozdíl od enantiomerů nejsou svým zrcadlovým obrazem)
 - rozlišuje se pak například L-Thr a L-allo-Thr

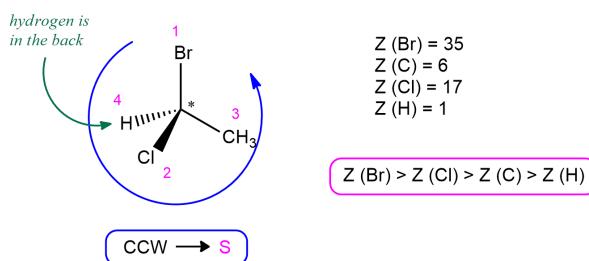


Obrázek 2.10: Rozdíly mezi diastereometry a enantiometry

Existuje i jiný systém pojmenovávání stereozomerů L a D, a to tzv. *R/S systém* (neboli Cahn-Ingold-Prelog).

R/S SYSTÉM

- nakreslíme šipku od substituentu s nejvyšší prioritou k tomu s nejnižší prioritou
 - priorita substituentů je určována podle velikosti skupiny
 - vodík se umístí tak, aby byl za uhlíkem
- pokud jde šipka po směru hodinových ručiček, jedná se o R sloučeninu (rectus = pravý), jinak se jedná o S sloučeninu (sinister = levý)
- všechny AK v těle, s výjimkou cysteinu, jsou (S)- sloučeniny



Obrázek 2.11: Pojmenování R/S systémem

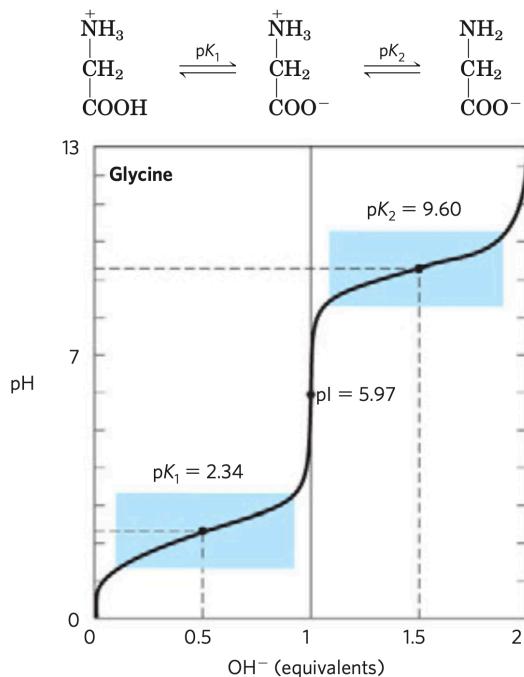
BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY ODVOZENÉ OD AK

- histamin: význam v alergických reakcích (nastane dekarboxylace histidinu, vznikne histamin)
 - histidin získáváme z potravy, neumíme ho syntetizovat
- dopamin: prekurzor neurotransmitterů, regulačně aktivní látka

- kyselina gama-aminomáselná (vzniká dekarboxylací kyseliny glutamové)
- látky odvozeny jednoduchými reakcemi z AK (velmi důležité)
- některé AK jsou součástí metabolismu látek, které se běžně v proteinech nevyskytují
 - citrulin (Arg) a ornitin (Lys) jsou součástí cyklu močoviny

2.2.1 Acidobazické vlastnosti AK

Příklad disociační křivky na Gly.



Obrázek 2.12: Titrační křivka Gly

[POZNÁMKA]

Tato křivka se týká volné AK – pro Gly vázaný v proteinu by takto nevypadala. Gly na C- nebo N- konci si však jednu skupinu zachová, což může hrát roli.

Jedná se o zjednodušený model toho, jak se chová látka s více disociovatelnými skupinami. Např. Lys se bude chovat mnohem složitěji, protože má tři acidobazické skupiny, které navíc nejsou dostatečný počet pH bodů od sebe, čili se ovlivňují.

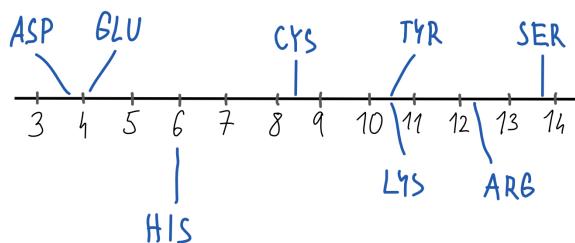
DISOCIAČNÍ KŘIVKA GLY

- při velice nízkém pH je glycín plně protonovaný
- tvar křivky vychází z Hendersonovy-Hasselbachovy rovnice
- obě disociace jsou si velmi vzdálené => neovlivňují se
- v bodě PI, tzv. *izoelektrický bod*, má AK nulový náboj => nepochybuje se v elektrickém poli
- v bodech pK_1 a pK_2 jsou už plně disociované skupiny COOH a NH₃, respektive
- pK karboxylové skupiny je asi 2.2, pK aminoskupiny je asi 9.4

META

Je prý důležité umět popsat chování oněch dvou disociujících se skupin (jednoduché, oba body daleko od sebe a neovlivňují se). Kromě toho je také nutné umět nakreslit disociační křivku.

Protein se skládá z řádově stovek AK, bude proto mít velice složitou disociační křivku. Některé AK budou acidobazicky zajímavé pouze, když budou na konci proteinu; jiné budou zajímavé i jindy, a to při různých hodnotách pH (viz obrázek).



Obrázek 2.13: pKa jednotlivých aminokyselin

Jakmile se např. Asp dostane do pH7, bude ze větší části již naprosto disociovaná a nebude se již chovat jako kyselina. Obecně, pokud zvyšujeme pH (= zvyšujeme zásaditost prostředí), budou se skupiny zbavovat protonů — mění se ale to, jaký náboj tímto AK získají.

Důležitá je imidazolová skupina, která má jako *jediná pKa* blízké pH fyziologických systémů (konkrétně kolem 6), čili kolem tohoto neutrálního pH bude mít právě polovinu skupin deprotonovanou.

2.2.2 Posttranslační modifikace AK

- úpravy proteinu po translaci
- methylace: důležité na histonech
- fosforylace: zásadní regulační funkce
 - serin, threonin, tyrosin

- acetylace: typicky Lys, vnik amidové vazby, která mění pH (při pH 7 pak už Lys nebude kladně nabity)
 - když Lys acetylujeme v jádře, ovlivňujeme interakce proteinů s NK (ty jsou totiž záporně nabité)
- karboxylace

Například kurděje jsou avitaminóza poškozující schopnost hydroxylace prolinu, který je potřeba pro pojivové tkáně: první projev je krvácení z dásní, způsobené problémy s extracelulární matrix.

2.3 Kovalentní struktura proteinů

META

Primární, sekundární, terciární i kvarterní struktura proteinů je rozebrána i zde: Zápisy z bioinformatiky nebo zápisy z biopolymerů.

Proteiny jsou tvořeny AK spojenými peptidickou vazbou, nebo S–S vazbou mezi cysteiny (nejedná se o můstek, nýbrž o plnohodnotnou vazbu). Např. u inzulinu tím vzniká složitejší kovalentní struktura.

POJMY

- cis, trans uspořádání
 - vazby po prolinu i v cis, asi z 10%
- torzní úhly ψ a ϕ
- rezonance ve vazbě, planarita
 - pokud chceme planaritě zabránit, musíme udělat z rezonanční vazby vazbu jednoúhlovou (ovlivněním náboje, ovlivnění C–O)
- rotace kolem $C\alpha$
- denaturace (ztráta pevné 3D struktury)
- primární, sekundární, terciární, kvarterní struktura
- fibrilární a globulární proteiny
 - fibrilární jsou založené na neustálém opakování sekundárních struktur
 - první analýzy se dělaly na fibrilárních proteinech, je to jednodušší
- tři druhy helixů
- paralelní a antiparalelní uspořádání beta-řetězců

Všechny tyto pojmy lze nalézt popsány v odkazech výše.

ALFA HELIX

- NH a CO skupiny, které jsou součástí peptidové kostry, nejsou volné, ale jsou vůči sobě orientovány a interagují H-můstky
 - můstky budou téměř rovnoběžné s osou helixu
 - všechny vnitřní skupiny jsou angažovány => stabilizace struktury
- NH a CO skupiny na koncích nejsou součástí H-můstků a tak získáváme částečně nabítou strukturu, která má dipólový moment a podle toho se bude orientovat v el. poli
 - NH parciální kladný náboj, CO parciální záporný
- R skupiny AK směřují vně helixu
- jedna rotace helixu je dlouhá 3.6 AK => pokud např. každou 4. AK vybavíme hydrofobicitou, budeme tvořit válec, který bude z jedné strany hydrofobní
 - a když máme dva takové, tak bude docházet k hydrofobním interakcím, přilnou k sobě
- uprostřed struktury není místo, nevezde se tam molekula rozpoštědla
- stabilita záleží na řetězcích R (např. dva kladně nabité R vedle sebe by mohly snižovat stabilitu helixu)

AK tedy můžeme rozdělit dle dalšího kritéria, *compatibility s helikální strukturou* — dá se změřit např. tak, že z helixu odebíráme jednu AK po druhé a vždy změříme jeho stabilitu. Díky tomu lze poté z (části) primární struktury proteinu predikovat, zda zaujmě tvar helixu, či nikoli.

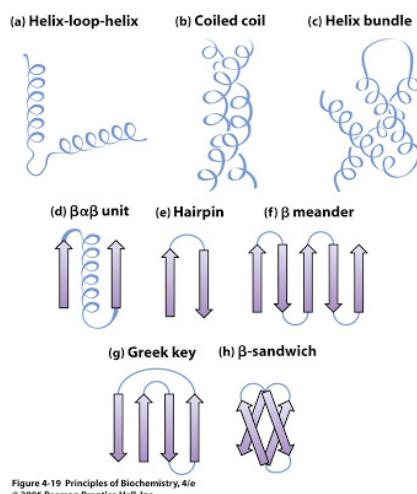
Podobně se dají predikovat i jiné sekundární struktury, například levotočivý **polyprolinový II helix**, který se nachází v kolagenu a obecně všude tam, kde je mnoho Pro.

BETA LIST

- R míří nad a pod řetězec, můžeme opět tvořit strukturu s různými vlastnostmi na dvou stranách
- většinou max 6 AK na 6 AK, někdy ale i větší (např. beta-keratiny)

SUPERSEKUNDÁRNÍ MOTIVY

- beta-alfa-beta
- beta vlásenka
- alfa-alfa
- motiv řeckého klíče

Figure 4.19 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Obrázek 2.14: Strukturní motivy na proteinech

Kombinace sekundárních a supersekundárních struktur tvoří **domény** — útvary, které zaujmou stabilní konformaci i když jsou exprimovány odděleně od zbytku proteinu (= samostatné jednotky, co se foldu týče).

DOMÉNY

- alfa domény
 - svazky čtyř helixů v cytochromu b562 u E. coli, lidský růstový hormon
- beta domény
 - beta sendvič: imunoglobulinový motiv
 - * dva přeložené beta-listy tvoří sendvič, stabilizace je dána tím, že vnitřní strana je hydrofobní
 - beta barrel: retinol-vazebný protein
 - * pokud budeme beta list stáčet jako papír, bude mít tendenci se zkrucovat, vytvoří soudek (beta barrel)
 - * může sloužit jako pór pro molekuly vody
 - kombinace řeckých klíčů: bakteriální amidáza
 - beta-listy, které dělají částečně plošné struktury
 - * na okrajích listů se tvoří vazebná místa, aktivní centra
- alfa-beta domény
 - alfa-beta barrel: součást trióza-fosfát-izomerázy
 - * jeden z nejstabilnějších proteinových tvarů v přírodě

Takovýchto struktur jsou řádově stovky (tj. relativně málo).

2.3.1 Síly udržující stabilitu proteinů

K pro rozrušení nátnivní konformace proteinu dlouhého 100 AK je třeba dodat cca 40kJ/mol.

[POZNÁMKA]

Energie 40kJ/mol k rozrušení proteinu se může zdát jako málo — energie kovalentní vazby je přeci cca 300kJ/mol. Struktura proteinu je ale udržována mnoha silami, a to často i protichůdnými, navzájem se oslabujícími.

Protein musí být po splnění své funkce snadno degradovatelný, aby z jeho částí mohl být syntetizován protein nový. Pokud se tak neděje, a v těle se objeví nějaká superstabilní struktura, bývá to často příčinou onemocnění (Alzheimer, prionové choroby, atd.).

Solvatace

Obalení rozpustené látky molekulami rozpouštědla.

IONTOVÉ ELEKTROSTATICKÉ INTERAKCE

- jsou sice silné, ale přispívají ke stabilitě proteinů relativně málo
- tvorba iontového páru není provázena velkým poklesem volné energie vzhledem k solvaci
- velmi málo iontových párů se nachází uvnitř proteinu
- iontové páry na povrchu proteinu nejsou konzervovány v evoluci

H-MŮSTKY

- přispívají ke stabilizaci proteinů jako takových relativně málo (kolem 2 až 8 kJ/mol), ale jsou významné pro sekundární struktury
- silnější jsou můstky v hydrofobním vnitřku proteinu
- většina vodíkových můstků se vytváří pouze mezi blízko se nacházejícími AK, jsou tedy pouze lokální
- 68 % můstků v proteinech se vytváří mezi atomy peptidové kostry, zbylé můstky jsou většinou mezi atomy vzdálenými max 5 AK
- neangažované můstky na koncích dodají struktuře parciální náboj, který může být dále využitý (např. k reakci s R skupinami či s okolím)
 - ve sbalené struktuře ale bývají angažované (skoro) všechny donory i akceptory

S-S DISULFIDICKÉ MŮSTKY

- tvoří se spojením skupin cysteinu, jsou nekovalentní
- nejsou rozhodující pro zaujetí nátnivní konformace, ale jsou důležité

INTERAKCE DIPÓL–DIPÓL

- jsou sice slabé, ale přispívají ke stabilitě proteinu významně

HYDROFOBNÍ INTERAKCE

- přispívají rozhodujícím způsobem ke stabilitě nativní konformace

Například sbalení hemoglobinu (globulární struktura) je zapříčiněno především hydrofobními interakcemi — uvnitř sbaleného proteinu skončí AK s hydrofobními skupinami, na povrchu AK polární. Kdybychom tuto strukturu narušili nějakým činidlem (např. 8M močovina), a pak jím přestali působit, opět se sbalí do původního tvaru.

CHAOTROPNÍ IONTY

- soli, které mají destabilizující vliv na hydrataci proteinu a způsobují jeho denaturaci
- reagují s vodou méně, než molekuly vody samotné, a proto málo interferují s H-můstky

Hofmeisterova lyotropní řada

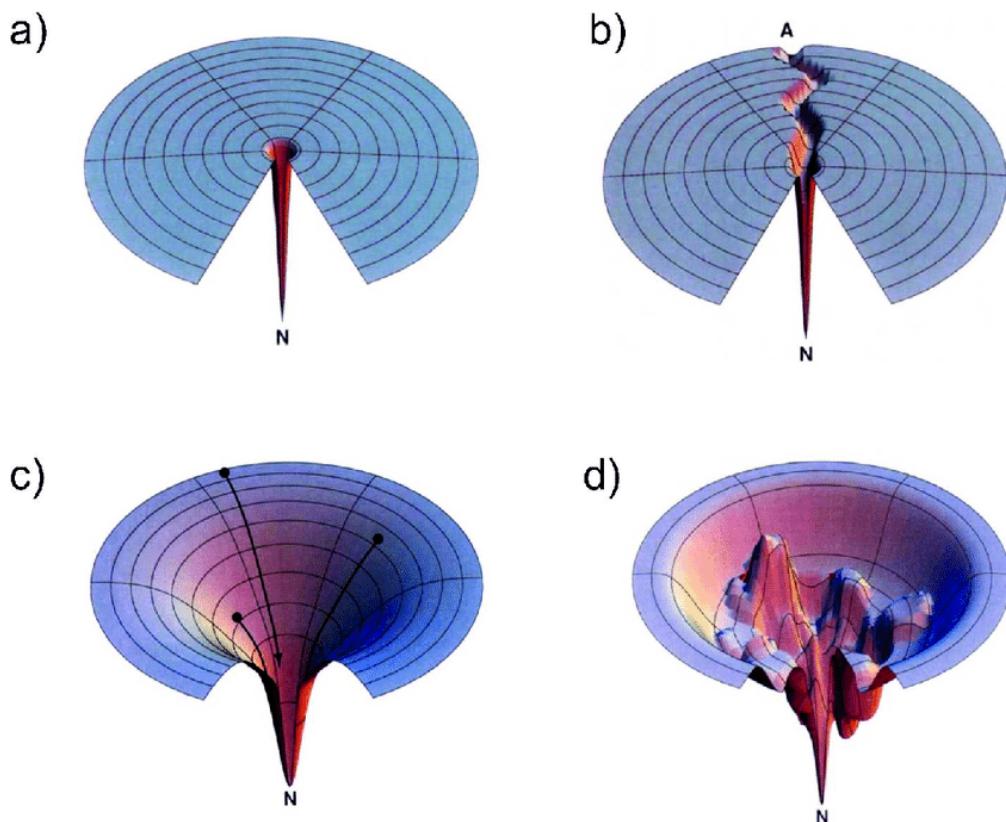
Řada aniontů a kationtů, seřazená podle toho, jak velká koncentrace daného iontu je potřeba k vysrážení vaječného bílku (tedy podle snižujícího se molárního povrchového napětí).

2.3.2 Protein folding

Levinthalův paradox

Pokud bychom měli protein se 100 AK, pro každý torzní úhel uvažovali pouze 3 hodnoty a každou sekundu vyzkoušeli 10^{13} různých možností, potřebovali bychom k vyzkoušení všech prostorových konfigurací našho proteinu 10^{87} sekund (což je asi 2×10^{69} -krát více než je předpokládané stáří vesmíru, pozn. redaktora).

Jak se zdá z Levinthalova paradoxa, dělá to příroda nějak jinak.



Obrázek 2.15: Několik ilustrací volné energie foldujícího se proteinu

PROTEIN FOLDING TEORETICKY

- obr. a) popisuje představu z Levinthalova paradoxu (musíme se po ploše náhodně pohybovat, dokud nenalezneme bod N)
- obr. b) popisuje starou a překonanou představu, že se proteiny foldují po cestě mezistavů
- obr. d) popisuje současnou představu: proteiny hledají stav energetického minima (obrázek představuje hladinu volné energie)

PROTEIN FOLDING V PRAXI

- po odstranění denaturačního činidla proteiny v řádu ms zaujmou tvar, který pak připomíná nativní konformaci
 - nastává rychlý **hydrofobní kolaps**
- pak následuje několik vteřin, kdy se to sesypává, stabilizuje, dochází ke drobným úpravám
- až po desítkách vteřin či minutách dostáváme finální konformaci
- celková struktura je podmíněná částečnými, například sekundárními, strukturami (folding probíhá hierarchicky)
 - lokální úsek má svou autonomii, nehledě na okolí se (zpravidla, s vyjímkami) po-skládá do své jedné sekundární struktury
 - potažmo tedy lokální složení AK rozhoduje o vzniku vyšších struktur

Někdy se může protein dostat do "pasti" (je nutné překonat stav s vyšší energií, než se bude možné dostat ke globálnímu minimu) — tu mu mohou pomoci překonat **chaperony**.

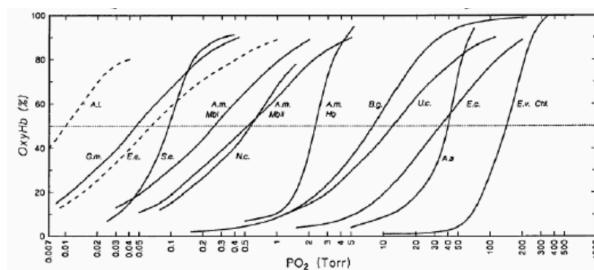
PROTEINOVÉ STRUKTURY

- alfa-keratin je příkladem superhelixu
 - helixy se skládají do dimerů, ty do protofilament a ty do mikrofibril
 - * na obrátku je ve dvojitém helixu pouze 5.1, na rozdíl od 5.4 v alfa-helixu
 - * každá 4. a 6. (tj. poslední na otáčku) AK je hydrofobní a dva helixy se tak zazipují do dimeru (hydrofovními AK k sobě)
 - pružnost keratinu klesá s rostoucím množstvím příčných disulfidových vazeb mezi protofibrilami
- fibroin je příkladem beta skládaného listu, je to složka např. hedvábí nebo pavučin
 - v -strukturách se střídají vrstvy postranních řetězců glycinu s řetězci alaninu a serinu
- kolagen, složka např. chrupavek, je příkladem trojitého helixu
 - každým třetím zbytkem jeho polypeptidu je glycín, obsahuje ale také relativně mnoho prolinu a hydroxyprolinu
 - vytváří strukturu podobnou lanu, která je velice pevná v tahu
 - molekuly kolagenu agregují v posunutém (střídavém) uspořádání a vytvářejí fibrily, které jsou kovalentně příčně spojeny skupinami, odvozenými od postranních řetězců histidinu a lysinu
 - prolyl-hydroxyláza vyžaduje jako kofaktor vitamin C
- elastin, jak napovídá jeho název, má elastické vlastnosti a tvoří prostorovou síť vláken s nepravidelnou strukturou
 - jeho polypeptidová vlákna jsou spojena podobným způsobem jako u kolagenu.

2.3.3 Struktura a funkce globinů

[POZNÁMKA]

Přenos kyslíku je dobrý příklad, nebot je důležitý pro všechny větší organismy — jeho rozpustnost v krvi je omezená, všechny organismy si proto musí nějak vypomáhat. To většinou dělají sloučeninami založenými na železu nebo mědi, například hemoglobinem (v savích tetramer), myoglobin (monomer).



Obrázek 2.16: Vstřebávání kyslíku v různých tlacích

- organismy žijí v různých parciálních tlacích kyslíku
 - kyslík je vázaný s různou afinitou
- křivky (vnesené pro různé organismy) mají sigmoidní tvar (viz obrázek): daný organismus má přenašeč, který v nízkých koncentracích nebude vázat nic, a až ve vyšších všechno
 - systém je nastaven tak, že funguje v určitém rozmezí kyslíku a právě v tom jej umí vázat či uvolnit
 - tato vlastnost je dána tím, že se jedná o oligomerní molekuly, které jsou schopny spolu kooperovat
 - v jiném případě by se mohlo stát, že organismus sice bude vázat kyslík, ale nebude schopen jej v tkáních uvolňovat

Saturační křivka

Na ose x je tlak O_2 v torrech, na ose y je saturace O_2 v procentech. $p50$ je parciální tlak, při kterém jsou přenašeče saturována z 50%.

Hemerythrin

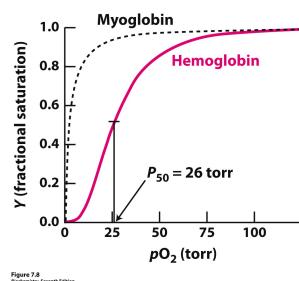
Obdoba hemoglobinu, je také vícepodjednotkovým komplexem. Mají ho hlavatci, rameonožci.

Hemocyanin

Má jej třeba ostrorep, také existuje jako oligomer.

Myoglobin

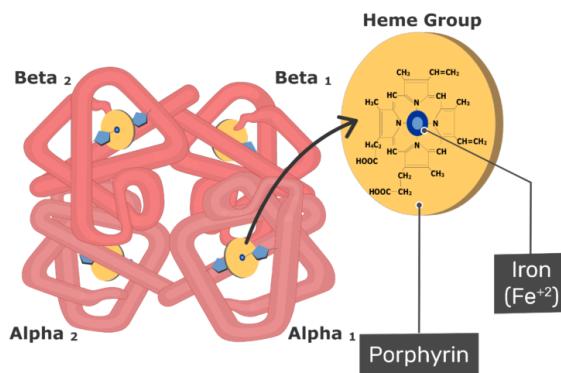
Monomer, není tedy schopen zajistit kooperativní sigmoidní chování. Saturační křivka má tvar hyperboly (viz obrázek).



Obrázek 2.17: Saturační křivka hemoglobinu a myoglobinu

Hemoglobin

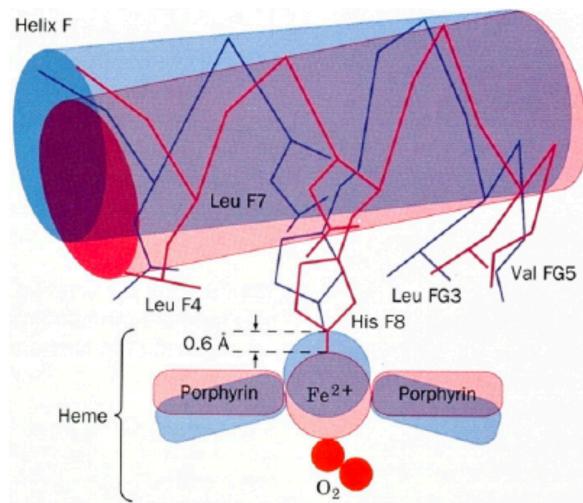
- tetramer se dvěma alfa a dvěma beta podjednotkami, každá z nich má konjugovaný heterocyklický systém s Fe^{2+} (HEM), hemoglobin tedy jejich prostřednictvím umí vázat 4 molekuly kyslíku
- po vazbě kyslíku se mění kvartérní struktura
 - např. u konce molekuly jedné podjednotky vůči druhému konci jiné
 - dále se mění i díra uprostřed (oxygenací se zmenší)
 - dochází k natočení dvou podjednotek vůči ostatním



Obrázek 2.18: Struktura hemoglobinu

Ve interakci podjenotek spočívá sigmoidní chování.

- podjednotky jsou nekovalentně spojené, ale přesto se významně ovlivňují
- máme-li situaci bez kyslíku, přicházejí molekuly postupně (1., 2., 3. 4.)
- vazba první molekuly *pozitivně ovlivní* vazbu těch dalších => když už je tam jedna, ostatní se váží snáz



Obrázek 2.19: Změny ve struktuře po vazbě kyslíku

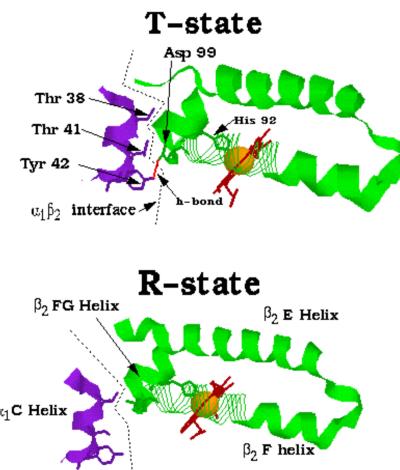
ZMĚNY PŘI VAZBĚ KYSLÍKU

- v deoxygenovaném stavu (= **R**, relaxed) je molekula porfyrinu deformována, není rovinná
=> vázaný hem je umístěn v dutině (kavité)
 - to má za následek řadu dalších změn, ke kterým v rámci podjednotky dochází
 - mám tzv. *domovou strukturu*, kyslík se setkává s nižší afinitou, než kdyby byl hem "vystrčený"
 - je to způsobeno vazbou u železa, které jsou bez vázaného kyslíku delší a vytvoří onu proláklinu
- po vazbě kyslíku (= **T**, tense) se porfyrin narovná a přes blízký histidin (*proximální histidin*) přesune část pohybu i na helix F (viz obrázek), ten přesune pohyb i na zbývající podjednotky v molekule
 - struktura funguje jako mechanický převodník
 - hem se trochu vystrčí a má vyšší afinitu ke kyslíku

KONTAKTY MEZI PODJEDNOTKAMI

- 1 + 1: 35 AK kontaktů
- 1 + 2: 19 AK
- 1 + 2: vlastně žádný
- analogicky pro 2

Podjetnotky 1 + 1 jsou tedy téměř nepohyblivě spojené, struktura se tedy dá vnímat jako dva dimery spíše čtyři monomery. Mezi těmito dvěma podjednotkami bude docházet k pohybům, při oxygenaci se vůči sobě otočí o 15 °. Také sezmění pozice tyrosinu z C helixu vůči histidinu, viz obrázek.



Obrázek 2.20: Stavy T a R na rozhraní podjednotek

[POZNÁMKA]

Změny stavů a posouvání molekul se dají srovnat s pohybem a vzájemným posunem dvou pěstí; vždy se posunou o jeden prst, jakýkoli mezistav bude náročné udržet.

Sigmoidní tvar je tedy způsoben tím, že první kyslík se váže relativně složitě (hem je zastrčený), po jeho navázání ale vnitřní daná podjednotka rovněž tvar porfirinu i ostatním podjednotkám a další kyslíky se už váží čím dál snadněji. Po nasycení hemoglobinu se saturační křivka opět vyrovná. Kdybychom měli oligomer s více než čtyřmi podjednotkami, mohl by se chovat ještě více kooperativně a mít ještě prudší křivku.

Pokud bychom oslabili nějaká spojení, získali bychom plošší křivku, oslabilo se kooperativní chování (jednotky by se tak neovlivňovaly). Pokud by se naopak posílily vazby, dlouho by se nic nevázalo, dokud by parciální tlak nevzrostl až do určité hodnoty — první navázání kyslíku by mělo před sebou více práce; čím pevnější vazby mezi podjednotkami budou, tím se bude celek chovat kooperativněji, stylem všechno nebo nic.

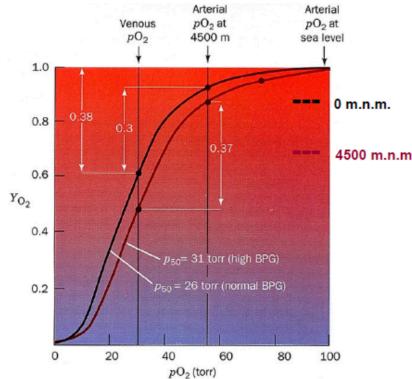
Homotropní efekt

Druh alosterického efektu, při kterém látka ovlivňuje afinitu molekuly k sobě samé (jako např. zde s kyslíkem, kdy kyslík usnadňuje vázání kyslíku). Rozděluje se na pozitivní a negativní (kyslík je příkladem toho pozitivního). Opakem by byl heterotropní efekt.

Hemoglobin tedy umožňuje při určité koncentraci kyslík vázat a při jiné uvolňovat. Tuto jeho vlastnost je ale možné dále regulovat.

REGULACE AFINITY

- slouží k přizpůsobení změnám v koncentraci kyslíku v prostředí
- dá se vypozorovat například ze saturačních křivek v 0 m.n.m. a 4500 m.n.m.
 - běžně je v kapilárách tlak as 25 torrů, v plicích (a v prostředí) 100: při 100 saturujeme, při 25 desaturujeme
 - ve 4500 m.n.m.: tlak je asi 50, pracovali bychom tedy s nižší kapacitou, musíme snížit afinitu ke kyslíku



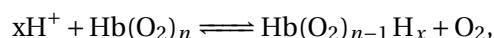
Obrázek 2.21: Koncentrace kyslíku v různých nadmořských výškách

O tyto změny se stará **kyselina bisfosfoglycerová**.

KYSELINA BISFOSFOGLYCEROVÁ

- odvoditelná z glykolýzy, v erytrocytech se jí dají tvořit různé koncentrace
- váže se na pozitivně nabité zbytky (má fosfátové skupiny a karboxylskupiny)
- váže se do dutiny v hemoglobinu, a váže se tam silnou vazbou, pokud je dutina dostatečně velká, aby se uplatnily všechny interakce s kyselinou — a to je pouze v deoxygenovaném stavu
- 2,3-BPG po vazbě posouvá rovnováhu oxy-deoxy k deoxy stavu
- skrze BPG tedy máme schopnost změnou koncentrace jedné látky ovlivnit afinitu pro kyslík
 - podobně i změna pH vede k posunu afinity pro kyslík (opět prostřednictvím BPG)
 - pohybujeme-li se ke kyselejšímu, snižujeme afinitu ke kyslíku

V souvislosti s oxy a deoxy hemoglobinem můžeme psát rovnici



kde se x protonů váže na hemoglobin, který váže n kyslíků. Zleva doprava probíhá deoxygenace, zároveň se s tím váže proton nebo dva podle parametru x — vazba protonů je spřažena s vazbou kyslíku a obráceně, stejně jako pro protony to platí právě pro kyselinu BPG a i pro další látky.

LÁTKY MODIFIKUJÍCÍ AFINITU KE KYSLÍKU

- BPG
 - ta funguje těmto způsobem např. u savců, u ptáků máme jinou, všeobecně to bývají nějaké nabité sloučeniny
- protony (potažmo pH)
 - v plicích bude vyšší pH, méně CO₂, méně uhličitanu, méně chloridových iontů => hemoglobin naloží hodně nákladu a putuje do kapilár
 - svalová námaha vede k okyselení a poklesu pH, což sníží afinitu pro kyslík => ve svalech se vyloží ještě více kyslíku
- CO₂
 - při dýchání vzniká v tkáních, snižuje tam afinitu hemoglobinu ke kyslíku a hemoglobin tak vyloží více kyslíku, než kdyby tam nebyl
- Cl⁻
 - do erytrocytů se dostává v souvislosti s rozpouštěním CO₂

Celý orchestr je zorganizován tak, aby se využila maximální transportní kapacita. Efekt ovlivnění desaturace Hb pomocí pH a CO₂ (a teploty) se jmenuje **Bohrův efekt**.

BOHRŮV EFEKT

- usnadňuje transport kyslíku
- deoxyHb je zásaditější než nasycený Hb
 - změna konformace proteinu mění bodové pK' o několik procent
- způsoben tím, že se k imidazolu přiblíží záporný náboj, čímž stabilizujeme výskyt kladného náboje na něm (jeho protonovanou formu)
 - posouváme pK' imidazolu
 - jen přiblížením-oddálením (aspartát-imidazol, v tomto případě) měníme acidobazické vlastnosti, schopnosti vázat a uvolňovat protony v daném pH
 - disociovatelné skupiny ovlivňují okolí
 - * v pH 6.5, což je pK' imidazolu, by ho byla protonována cca polovina, ale je-li tam přiblížený aspatát, tak je protonována větší část

Bohrův efekt je vlastně v principu analogický k působení bisofoglycerové kyseliny, chloridových iontů a podobně.

BPG nemění strmost křivky, pouze ji celou posouvá doprava (měníme p50). Strmost křivky se mění pouze změnou proteinu samotného, protože je závislá na míře kooperativního chování. Je sice jednoduché udělat křivku méně strmou (např. denaturací), ovšem opaku je relativně složité dosáhnout.

Modely alosterie

Popisujeme v nich chování hemoglobinu jako modelu, obdobně se budou chovat i další systémy, saturace se dá nafitovat. Dnes se již používají pokročilé postupy, zde jsou uvedené dva historické.

SYMETRICKÝ MODEL

- vychází z představy, že hemoglobin je symetrický oligomer identických protomerů
 - každý protomer může existovat ve stavech T (tensed) a R (relaxed), které mají nízkou a vysokou afinitu ke kyslíku, respektive
 - změna stavů protomerů se děje pouze konformační změnou, a to u všech protomerů najednou (aby zůstala zachována symetrie)
- vychází z konceptu zámku a klíče
 - vazba kyslíku je možná jen do aktivního centra s danými vlastnostmi
 - ligand je klíč, zámek je molekula (místo, kam se kyslík váže)
- vazbou se posouvá koncentrace směrem z T do R

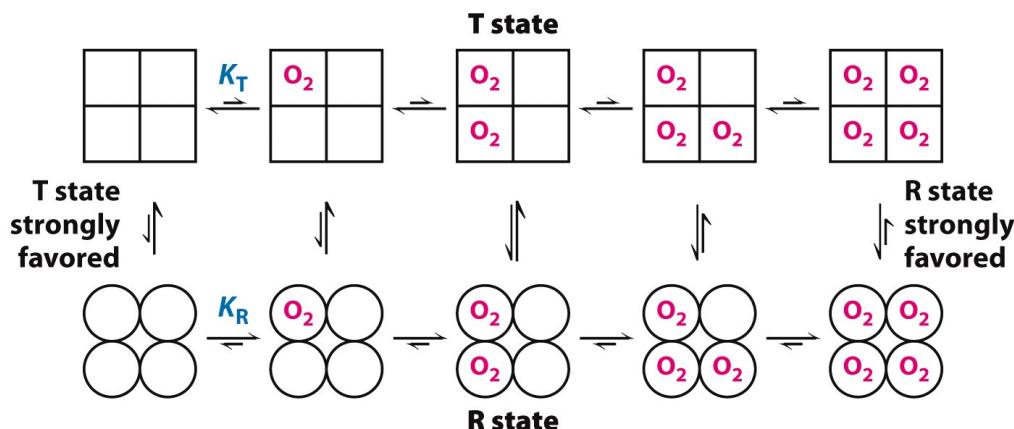


Figure 7.12
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Obrázek 2.22: Symetrický model

SEKVENČNÍ MODEL

- používá koncept indukovaného přizpůsobení, oligomer nezachovává symetrii
- vazba ligandu na jeden protmer vyvolá konformační změnu, která ovlivní sousední protomery
 - síla kooperativních interakcí je závislá na typu spojení podjednotek
 - na počátku jsou všechny ve stavu T
- afinita protomeru pro vazbu ligandu se mění s množstvím ligandu navázaného v oligomeru
- není to vše nebo nic
 - vazba ligandu vede k částečné změně, tzv. *induced fit*

- tento model proto více odpovídá realitě

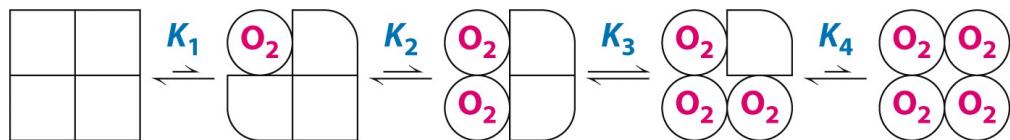


Figure 7.14
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Obrázek 2.23: Sekvenční model

ČÁST 3

ENZYMY A ENZYMOVÁ KINETIKA

Enzymy

Buněčné katalyzátory, proteiny s katalytickými schopnostmi. Katalyzátory jsou látky urychlující chemické reakce, aniž by do nich přímo vstupovaly – ovlivňují reakci, ale samy se chemicky nemění.

Thomas R. Cech, objevil to, čemu se dnes říká ribozymy, což jsou proteiny

Katabolické dráhy

Metabolické dráhy, které rozkládají složité látky na jednodušší za vzniku energie. Opakem jsou dráhy **anabolické**.

HISTORIE

- Jöns Jacob Berzelius
 - jako první použil pojem enzym a vyslovil teorii, že reakce v živých organismech neprobíhají neexistovaně, že existují nějaké molekuly, které se na reakcích podílí a urychlují je
 - byl to chemik
- L. Pasteur
 - popsal, že v buňkách je něco navíc, co způsobuje např. kvašení (pozoroval kvasinky)
 - byl to vitalista; věřil tomu, že živé organismy mají v sobě něco nehmataelného, vis vitalis, a dokazoval to tak, že když kvasinky zabil povařením, tak už glykolýzu neprováděly
- Eduard Büchner
 - vyvrátil kocept vis vitalis, zabil kvasinky jinak než povařením (rozdrtil je, vytvořil tím bezbuněčné lyzáty, a enzymy stále fungovaly)
- Emil Fischer

- pracoval na cukrech; cukry mají spoustu izomerů, které se jen mírně liší strukturou, ale přesto jen některé z nich jsou katalyzovány enzymy
- přišel s teorií zámku a klíče, která tvrdí, že enzym má vazebné místo, které tvarově odpovídá molekule substrátu a to tak dokonale, že většina enzymů může katalyzovat jen jeden substrát - Maud Leonora Mentenová
- kanadská badatelka, pracovala v Německu, věnovala se enzymové kinetice - James B. Sumner
- jako první izoloval čistý enzym, ureázu
 - * ureáza je protein, který rozkládá močovinu
- dokázal, že enzymy jsou proteiny

[POZNÁMKA]

James B. Sumner měl jen jednu ruku, tu druhou mu v mládí ustřelili při honu. *insert joke about single-handedly solving big enzymology problems*

Enzymy urychlují reakce, jsou tedy nezbytné pro život — například energie z cukru by bez nich nešla vydolovat, protože cukr se sám o sobě protě nerozloží a energii neuvolní.

ZÁSADNÍ VLASTNOSTI ENZYMU

- pro reakce stačí mírnější podmínky
 - oproti anorganickým katalyzátorům, které potřebují extrémní teploty, tlaky, pH
 - většina dalších organismů žije a má teplotní optimum v normálním tlaku, neutrálním pH a teplotě 30–40°
- vyšší specificita reakce
 - enzymy se málokdy pletou, pracují jen se svým substrátem a to ještě k tomu velice rychle
 - např. proteosyntéza umí syntetizovat dlouhý řetězec bez chyby, naproti tomu u anorganické syntézy je pouze 30–40 AK nasynthetizováno neomylně
- schopnost regulace
 - anorganické katalyzátory někam nasypeme a tam dělají to, čeho jsou schopny, zatímco enzymy mohou být regulovány
 - regulace rychlosti je velice důležitá pro spolupráci katabolických drah s anabolickými

3.1 Stavba enzymů

Koenzym

Neproteinová část enzymu; ne všech enzymy ji však mají.

Apoenzym

Proteinová část enzymu.

$$(\text{holo})\text{enzym} = \text{apoenzym} + [\text{koenzym}]$$

Koenzymů je celá řada.

KOENZYMY: ANORGANICKÉ IONTY

- nabité molekuly, které se podílí na struktuře holoenzymu
- měďnaté ionty
 - důležitým enzymem je **cytochrom oxidáza**, je členem elektrontransportního řetězce uvnitř mch, který se stará o přenos elektronů a tvorbu ATP
 - cytochrom oxidáza je posledním enzymem této dráhy, kde se kyslík redukuje na vodu — měďnaté ionty slouží jako akceptory elektronů, které jsou v rámci této dráhy přenášeny
- železité ionty
 - opět cytochrom oxidáza, fungují úplně stejně jako ty měďnaté
 - hemoglobin
- draslík
 - pyruvát kináza, důležitý enzym glykolýzy - hořečnaté ionty
 - většina enzymů, které pracují s ATP, obsahují hořečnaté ionty, protože jejich náboje interagují s fosfátovými skupinami ATP
- zinek
 - alkohol dehydrogenáza, důležitý enzym sloužící k syntéze nebo k odbourávání ethanolu
 - karbonát anhydráza, enzym důležitý pro přenos oxidu uhličitého v organismu při dýchání

KOENZYMY: VITAMÍNY

- větší molekuly, hlavně ze skupiny B
- několikrero druhů
 - molekuly pevně vázané na povrch enzymu
 - molekuly, které se mohou oddisociovat (fungují jako jeden ze substrátů enzymu)

Druhý zmíněný druh poté může sloužit k různým účelům:

- mohou akceptovat nějakou funkční skupinu, pak se zase odpojit a přenést ji dále
- podílejí se na karboxylacích (přenáší karboxylovou skupinu z jedné části enzymu na jinou, slouží jako takové pohyblivé raménko)

- důležité jsou koenzymy flavin adenin dinukleotid (FAD), který přenáší elektrony, a niko-tinamid adenin dinukleotid (NAAD), který přenáší hydridové ionty

3.2 Názvosloví enzymů

Jméno enzymu vždy končí na "—áza". Kromě toho má každý enzym přidělený kód Evropskou enzymovou komisí: ECXXXX, kde X značí číslo a EC je zkratka pro Enzyme Commision.

První číslo je vždy v rozmezí 1–6, protože se jedná o rozdělení enzymu do jedné z následujících kategorií, podle toho, jaký druh reakce katalyzuje:

- (1) **oxido-reduktázy**: katalyzují reakce, při kterých se přenáší redukční ekvivalenty, směr přenosu je řízen redoxním potenciálem
 - dehydrogenázy, peroxidázy, reduktázy... (biologické oxidace často probíhají jako dehydrogenace)
- (2) **transferázy**: enzymy, které přenáší nějakou funkční skupinu z jedné molekuly na druhou
 - typické jsou fosfo-transferázy, které přenáší fosfátovou skupinu z ATP na nějakou jinou molekulu
 - např. v glykolýze, první glykolytický enzym přenáší fosfát na glukózu a tvoří se glukóza-6-fosfát
- (3) **hydrolázy**: za adice vody štěpí nějakou molekulu na dvě
- (4) **lyázy**: enzymy, které provádí syntézu molekuly ze dvou molekul
- (5) **izomerázy**: provádí přestavbu nějaké molekuly
- (6) **ligázy**: lepí molekuly dohromady, za současného odštěpení nějaké malé molekuly
 - např. spojování Okazakiho fragmentů

[POZNÁMKA]

Enzymy katalyzující syntézy se nazívají **sytázy** nebo **syntetázy**. Rozdíl mezi nimi je ten, že *syntetázy* potřebují makroergní molekulu, zatímco *sytázy* ne.

[PŘÍKLAD 1]

Pokud máme například následující reakci:



Jedná se o první reakci glykolýzy; glukóza, která vstoupila do buňky, je fosforylována. Význam této reakce je dvojí:

- (1) energizace cukerné molekuly
- (2) strukturní změna, která zabrání tomu, aby se glukóza dostala zase ven z buňky (dostává se tam pomocí přenašeče, který je univerzální na obě strany)

Enzym by se dal nazvat ATP:glukózo fosfotransferáza (přenáší fosfát z ATP na glukózu). Pro zjednodušení by byl také možný název *glukokináza* (kinázy jsou enzymy, které něco fosforylují). A jak bychom tento enzym očíslovali?

- [2], patří mezi transferázy, tedy do druhé enzymové třídy
- [7], přenáší fosfát
- [1], ...na hydroxylovou skupinu glukózy
- [2], cílová skupina se nachází na glukóze

Jedná se tedy o protein E.C. 2.7.1.2. Podobný enzym, hexokináza E.C. 2.7.1.1, je schopen fosforylovat i jiné hexózy (proto ta jednička na konci).

[PŘÍKLAD 2]

Enzym E.C. 1.1.1.1 je

- oxido-reduktáza
- působí na CHOH skupinu donoru
- využívá NAAD
- donorem CHOH skupiny je ethanol

Je to tedy akoholdehydrogenáza.

3.3 Regulace enzymatické aktivity

Probíhá buďto změnou kvantity samotného enzymu (musí nastat aktivace proteosyntézy toho enzymu, změna exprese apod.), nebo regulací samotného enzymu — to je mnohem rychlejší.

REGULACE ENZYMU

- regulace změnou dostupnosti reaktantu
 - netýká se to přímo regulace aktivity enzymu, ale pokud nedodáme substrát, nemůže reakce běžet
 - např. glykolýza
- alosterická regulace

3.3. REGULACE ENZYMATICKÉ AKTIVITY ENZYMY A ENZYMOVÁ KINETIKA

- alosterické enzymy jsou takové, jejichž aktivita je regulována navázáním molekuly, jiné, než samotný substrát
- regulace kovalentními modifikacemi
 - např. pomocí protein-kinázy (adenylát-cykláza aktivuje protein-kinázu A a ta zase fosforyluje něco jiného)
 - opět dochází ke změnám konformace
- regulace prostřednictvím regulačních proteinů
- regulace proteolýzou, ovlivněním konformace, změnou lokalizace
- regulace zastoupením izoenzymů
 - izoenzymy jsou různé proteiny se stejnou funkcí, které katalyzují stejnou reakci, i když nejsou chemicky totožné

ALOSTERICKÁ REGULACE

- nejčastější typ enzymové regulace
- existují alosterické aktivátory i inhibitory
- např. enzym na počátku metabolické dráhy může být alostericky inhibován produktem té stejné dráhy, naopak aktivátorem může být ATP
 - časté řízení metabolické dráhy
 - produkt váže se na alosterické místo a tím snižuje aktivitu enzymu (negativní zpětná vazba)
 - je-li ho v buňce hodně (a málo produktu dráhy), tak se ATP váže na jiné alosterické místo a tvorbu produktu zrychluje
- funguje na základě změny konformace enzymu, který má poté k substrátu jinou afinititu

REGULACE PROTEOLÝZOU

- některé enzymy se syntetizují v buňce v ER jako tzv. preenzymy: tvoří je jedno vlákno, jeden různě poskládaný a spojený řetězec pomocí disulfidických můstků
- tyto enzymy jsou zpočátku v inaktivním stavu, aby neškodily a neodbourávaly proteiny, které nemají
- teprve při po procestování ER a GA jsou z nich některé úseky vyštípnuty a tím se z nich vytvoří funkční enzym

Příkladem regulace zastoupením izoenzymů je laktát-dehydrogenáza.

- laktát-dehydrogenáza katalyzuje přeměnu pyruvátu na kyselinu mléčnou
- běžně se to děje v lidských svalech za nedostatku kyslíku, za intenzivní námahy (\Rightarrow zásobení tkáně kyslíkem není dostatečné na to, aby došlo k aerobnímu odbourávání)
- existují dva izoenzymy laktát-dehydrogenázy, M (muscle) a H (heart)
 - jsou ze čtyř podjednotek a existuje řada forem enzymu, které se liší zastoupením M a H podjednotek

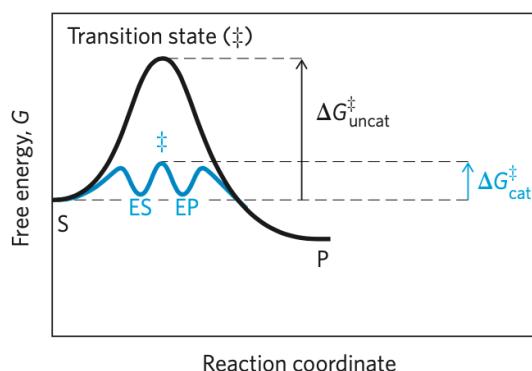
- srdce poměrně často využívá kyselinu mléčnou jako zdroj energie, na rozdíl od kosterních svalů
- v srdci je stálé a dokonalé zásobení kyslíkem a tam ta laktát-dehydrogenáza funguje opačným směrem: přeměňuje laktát na pyruvát

3.4 Jak enzymy pracují

Budeme se pro zjednodušení bavit o *monosubstrátových* reakcích, ačkoliv převážná většina reakcí v těle je disubstrátových.

Aktivační energie

Energie, kterou musí molekula dostat, aby překonala energetickou bariéru a uvolnila energii (zreagovala).



Obrázek 3.1: Průběh Gibbsovy energie při reakci, černě bez katalyzátoru, modře s katalyzátorem

FUNKCE ENZYMU

- aktivní místo a substrát vytvoří komplex enzym-substrát
 - při této vazbě substrátu na aktivní místo dojde k řadě interakcí, při kterých se uvolní energie, a ta pak umožní průběh reakce
- enzymy pomáhají překonat peak (transition state) s vysokou Gibbsovou energií
 - reálný rozdíl je mnohonásobně větší, než jde z obrázku poznat
 - pravděpodobnost katalyzované reakce je mnohonásobně vyšší

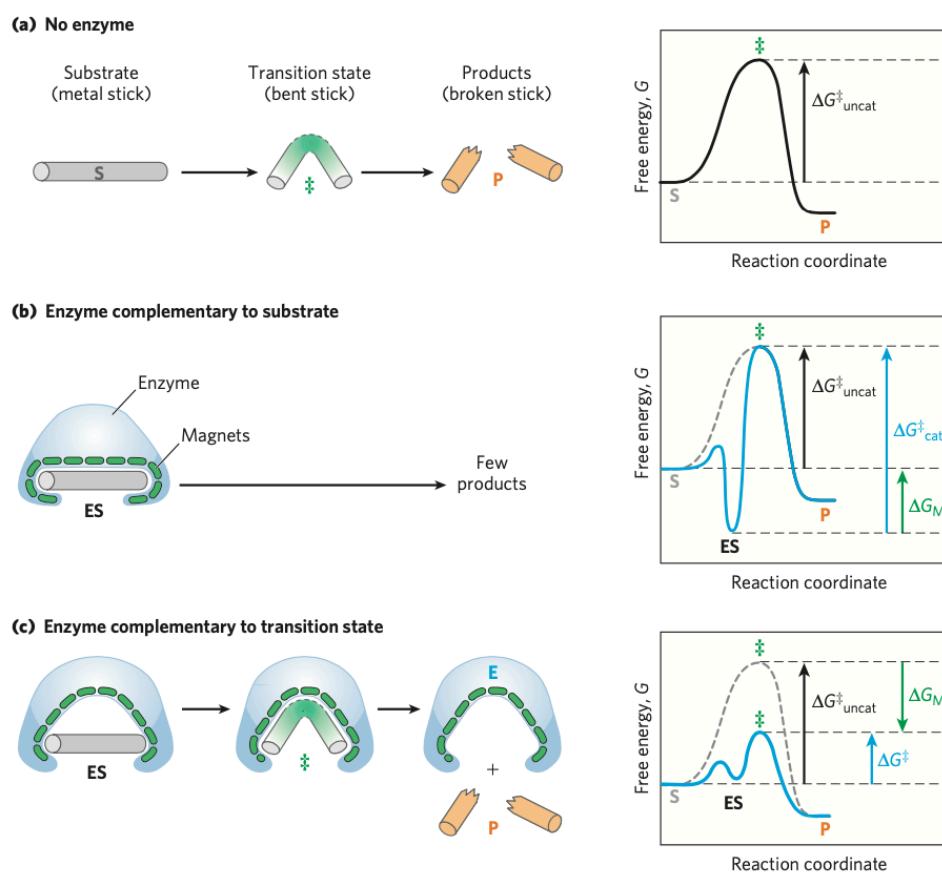
O tom, jak konkrétně enzym snižuje potřebnou energii se zmiňuje několik různých teorií.

TEORIE ZÁMKU A KLÍČE

- substrát do enzymu "zypadne", jak fyzicky (tvarem), tak chemicky
- mezi substrátem a enzymem vznikne množství nekovalentních interakcí, jako např. H-můstky, elektrostatické interakce, nepolární interakce
- kdyby to tak ale bylo ve skutečnosti, molekula prostě do enzymu zapadne a v klidu tam zůstane — k žádnému snižování energie by nedošlo

TEORIE INDUKOVANÉHO PŘIZPŮSOBENÍ.

- vazebné místo odpovídá klíči jen přibližně a teprve při přichycení se začínají tvořit další vazby
- vznikne napětí a dojde ke změnám konformace substrátu i enzymu
 - u toho se uvolňuje vazbená energie, takže reakce může probíhat snadněji
- vysvětlení na modelu kovové tyčky, viz obrázek
- tato teorie je experimentálně ověřena



Obrázek 3.2: Srovnání teorií funkce katalýzy a jejich energetických křivek

3.5 Enzymová kinetika

Základní rovnice je rovnice Michaelise a Mentenové. Ti vycházeli z poznatků Victora Henryho.

ZÁKLADNÍ ROVNICE ENZYMOVÉ KINETIKY

- vychází se z toho, že molekuly substrátu a enzymu vytvoří komplex, vznikne produkt a enzym se regeneruje — tyto reakce jsou vratné a jsou charakterizovány rychlostními konstantami
 - k_1 vznik komplexu enzym-substrát
 - k_{-1} rozpad komplexu
 - k_2 vznik produktů a regenerovaného enzymu

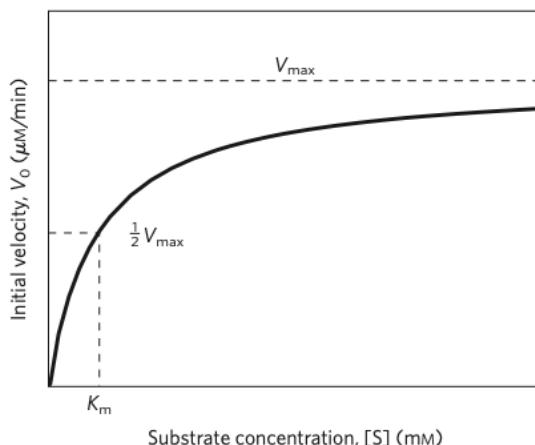
Nechť sledujeme rovnici



poté základní rovnice M-M rovnice vypadá následovně

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]},$$

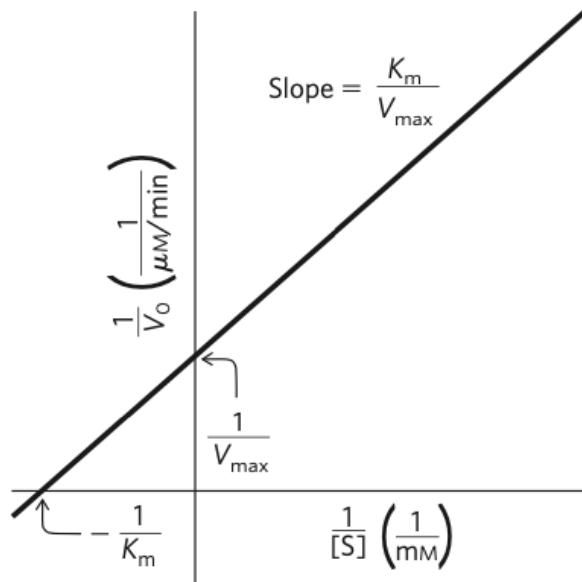
kde v_0 je počáteční rychlosť reakce (v průběhu reakce se rychlosť průběhu zpomaluje), V_{max} je maximální rychlosť reakce (ovlivněná koncentrací enzymu, která určuje maximální počet vazebných míst), $[S]$ je koncentrace substrátu a K_M je **Michaelisova konstanta**.



Obrázek 3.3: Závislost počáteční rychlosti na počáteční koncentraci substrátu

Jak jde vidět z obrázku, K_M je taková koncentrace substrátu, při které je počáteční rychlosť rovna polovině maximální rychlosti. Enzymy se hodnotou K_M silně odlišují, enzymy s nižší hodnotou reagují se substrátem mnohem ochotněji.

Graf můžeme linearizovat (vznikne *dvojitě reciproční graf*), aby bylo jednodušší vyčíst z něj hodnoty K_M a V_{max} .



Obrázek 3.4: Dvojitě reciproční (nebo také Lineweaver-Burk) graf

Někdy se uvádí také **katalytická konstanta** k_{cat} ,

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T},$$

kde $[E]_T$ značí celkovou koncentraci enzymu. Vyjadřuje, kolik molekul substrátu je enzym za vysoké koncentrace za jednotku času schopen přeměnit.

Protože koncentrace substranu in vivo je mnohem nižší než aby mohlo být dosaženo maximální rychlosti, zavádí se ještě **konstanta specificity**, která se počítá jako poměr k_{cat} a K_M .

TABLE 6–8 Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 M^{-1}s^{-1}$)

Enzyme	Substrate	K_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

Obrázek 3.5: Michaelisova konstanta, katalytická konstanta a konstanta specificity pro vybrané enzymy

KATALÁZA

- odbourává v peroxisomech peroxid vodíku, mění jej na vodu a kyslík
- má sice vysokou katalytickou konstantu, avšak také K_M (není jen tak ochotna začít pracovat)

ACETYLCHOLINESTERÁZA

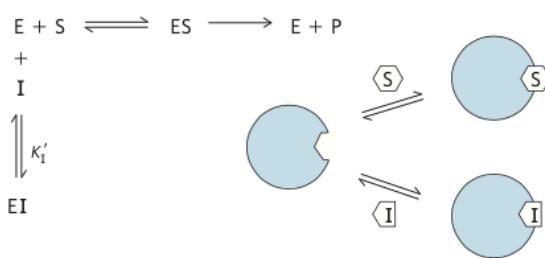
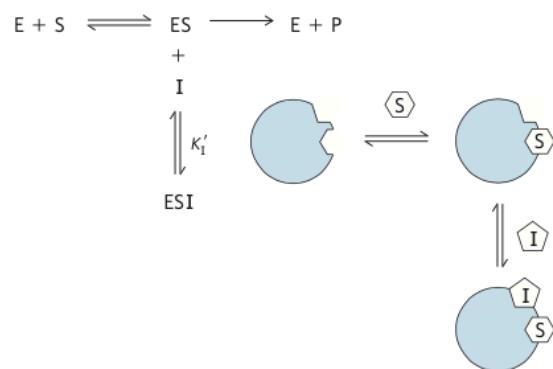
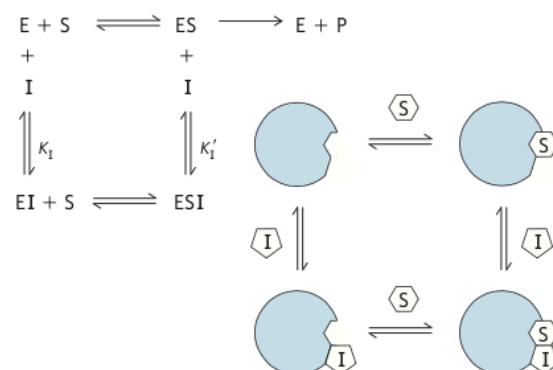
- odbourává nervový přenašeč acetylcholin na neurosvalové ploténce
- vychází dobře z tabulky výše, dosáhla vlastně enzymové dokonalosti (o moc lépe už to nejde)

HEXOKINÁZA

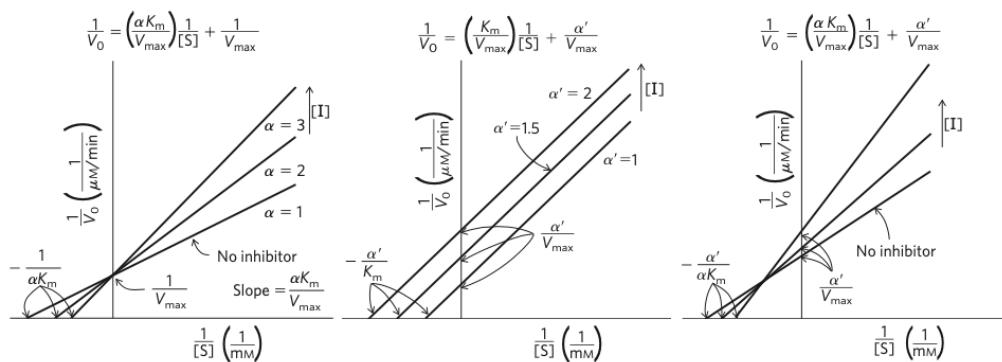
- reaguje s hexózami
- M.konstanta pro fruktózu je třicetkrát vyšší, než pro glukózu
 - když někde bude stejně glukózy a fruktózy, tak bude mnohem raději reagovat s glukózou

3.6 Enzymová inhibice

Často probíhá skrze farmaka.

(a) Competitive inhibition**(b) Uncompetitive inhibition****(c) Mixed inhibition**

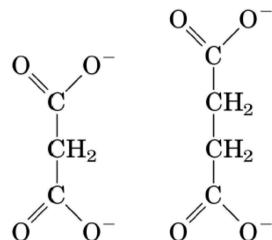
Obrázek 3.6: Druhy inhibice enzymů



Obrázek 3.7: Dvojitě převrácené grafy při různých inhibicích

3.6.1 Kompetitivní inhibice

- o vazebné místo soutěží substrát a inhibitor
- inhibitor není metabolizovatelný a tak když se tam naváže, neděje se už nic
- typickým příkladem je inhibice sukcinát-dehydrogenázy malonátem
 - sukcinát-dehydrogenáza je enzym v Krebsově cyklu
- dalším příkladem je léčba metanolové otravy
 - zvyšuje se koncentrace ethanolu jako správného substrátu, ze kterého vzniká neškodný acetaldehyd, oproti metanolu jako špatnému substrátu, ze kterého vzniká formaldehyd
- nemění se V_{max} , ale mění se K_M (viz FIGURE 1)



Obrázek 3.8: Sukcinát a malonát

3.6.2 Akompetitivní inhibice

- vazba inhibitoru na enzym je podmíněna vazbou substrátu
- po navázání substrátu se nějak změní struktura enzymu a vznikne nové vazebné místo, na které se naváže inhibitor
 - způsobeno změnou konformace

- mění se jak V_{max} , tak K_M (viz FIGURE 2)

3.6.3 Smíšená inhibice

- může se stát úplně všechno, inhibitor se naváže před substrátem, po substrátu
- mění se obě hodnoty, ale vždy se jedno zvyšuje a druhé snižuje (viz FIGURE 3)

3.6.4 Irreverzibilní inhibice

Tři druhy zmíněné výše se daly "přebít" zvýšením koncentrace substrátu. Následující inhibice jsou však **nevratné**.

KYSELINA ACETYLSALICILOVÁ (ASPIRIN)

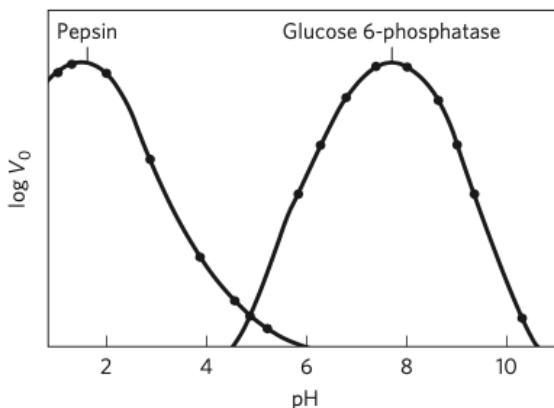
- protizánětlivá látka, proti horečnatým stavům
- funguje na úrovni syntetické dráhy tak, že modifikuje OH zbytek enzymu COX a ten pak už nemůže tvořit záněty a horečky
- horečka by měla sloužit jako obranný mechanismus proti infekci a je otázka, zda je dobré se ji snažit srazit

HNOJNÍK INKOUSTOVÝ

- nesmí se po něm požívat alkohol
- obsahuje irreverzibilní inhibitor alkohol-dehydrogenázy (je v něm látka, která se jinak používá k léčbě alkoholismu), dráhu zablokuje u přeměny acetaldehydu na kyselinu octovou
- acetaldehyd se pak hromadí v těle

3.7 Vliv pH na enzymy a bisubstrátové reakce

- enzymy se obecně vyznačují tím, že fungují v mírných podmírkách (pH 7.4), ale není to 100 % pravda
- např. pepsin (a jiné žaludeční enzymy) má optimum kolem pH 2
- známe i takové, které fungují nezávisle na pH (papain)
- extrémy jsou však i v buňce, např. enzymy v lysosomech jsou aktivní až v pH 5 (jinak by rozložily ER i GA)

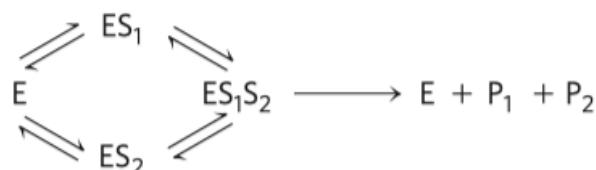


Obrázek 3.9: Enzymatická aktivita při různých hodnotách pH

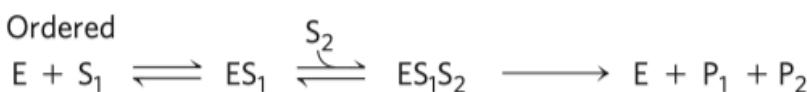
Bisubstrátové reakce jsou v těle vůbec nejčastější.

(a) Enzyme reaction involving a ternary complex

Random order



Ordered



(b) Enzyme reaction in which no ternary complex is formed



Obrázek 3.10: Druhy bisubstrátových enzymatických reakcí: následné (a) a ping-pongové (b)

NÁSLEDNÉ REAKCE

- reakce, které zahrnují tvorbu ternárního komplexu
- substráty se na enzym vážou buď v náhodném pořadí, nebo v přesně uspořádaném pořadí
- teprve po navázání jednoho substrátu se vytvoří vazebné místo pro druhý

PING-PONGOVÉ REAKCE

- naváže se první substrát a vznikne první produkt, v průběhu reakce dojde ke změně konformace enzymu tak, že je schopen navázat druhý substrát, vznikne druhý komplex

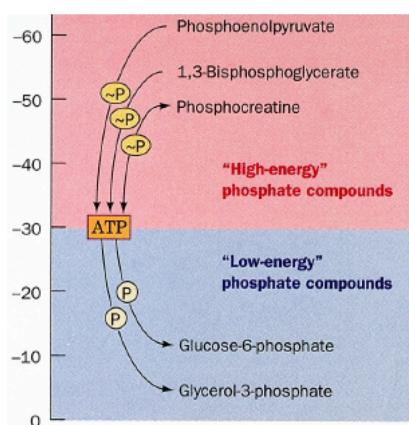
a následně druhý produkt

- a tak dokola

3.8 Makroergní molekuly

[MAKROERGNÍ MOLEKULY]

- nejznámější jsou ATP a spol., ale nejsou jediné
- obecně jejich hydrolyzou vznikne více energie než 30kJ/mol (případně 25kJ/mol)
- někdy je to sporné
 - např. glukóza se považuje za energetickou molekulu, přestože se její hydrolyzou tolík energie neuvolní
 - musí se v mnoha enzymových krocích pracovat, aby se z ní ta energie dostala



Obrázek 3.11: Změna volné energie makroergní molekuly při glykolýze, potenciál přenosu fosfátové skupiny

Na obrázku jsou seřazeny molekuly od té s nejvyšší energií po tu s nejnižší. Nejvyšší má pyruvát, 60kJ/mol, zatímco např. při orthofosfátovém štěpení (ATP \rightarrow ADP) se uvolní kolem 30kJ/mol.

SKUPINY MAKROERGNÍCH MOLEKUL

- **enolfosfáty**
 - zde je i úplně energeticky nejbohatší molekula, fosfoenolpyruvát (objeví se při glykolýze)
- **thioestery:**
 - např. difosfoglycerát (také se objeví při glykolýze)
 - mohou sloužit jako koenzymy
- **acylfosfáty:** fosfoderiváty organických sloučenin

- např. 1,3-bisfosfoglycerát (opět z glykolýzy)
- **fosfageny:** zásobní látky
 - např. fosfokreatin (43kJ/mol), u člověka je ve svalech jako nejrychlejší zásobárna energie
 - * může vstupovat do reakce kreatin + ATP, vzniká fosfokreatin a ADP, to se děje, je-li fosfát v nadbytku; jinak se reakce otočí **sloučeniny s pyrofosfátovou vazbou:** všechny nukleosid-triosfáty
 - ATP, GTP, UTP, CTP atd.
 - účastní se tvorby nukleotidů
 - mohou se štěpit různými způsoby, v buňce však probíhá pouze hydrolyza ATP na ADP a fosfát
 - pyrofosfátové štěpení je na AMP a pyrofosfát, tam je větší zisk energie

ACETYL KOENZYM A

- univerzální přenašeč acylů
- vazba mezi ním a merkaptoskupinou, kterou má na konci, je také makroergní

TODO

Vylepšit kvalitu následujících obrázků (nejspíše přepsat do tabulky).

Phosphoenolpyruvate (pyruvate + P _i)	-62.2	
1,3-Bisphosphoglycerate (3-phosphoglycerate + P _i)	-49.6	
Creatine phosphate (creatine + P _i)	-43.3	

Obrázek 3.12: Makroergní molekuly (1)

Acetyl phosphate (acetate + P _i)	-43.3	
Glucose-1-P (glucose + P _i)	-21.0	
Fructose-1-P (fructose + P _i)	-16.0	
Glucose-6-P (glucose + P _i)	-13.9	
sn-Glycerol-3-P (glycerol + P _i)	-9.2	
Adenosine-5'-monophosphate (adenosine + P _i)	-9.2	
Adenosine-5'-triphosphate (ADP + P _i)	-35.7 [†]	
Acetyl-coenzyme A (acetate + CoA)	-31.5	

Obrázek 3.13: Makroergní molekuly (2)

3.8.1 ATP

- velice stabilní, i když má tolik energie, protože má vysokou aktivační energii hydrolyzy
- struktura
 - adenin, báze
 - cukr, pentóza (ribóza)
 - trifosfát, tři molekuly fosfátu

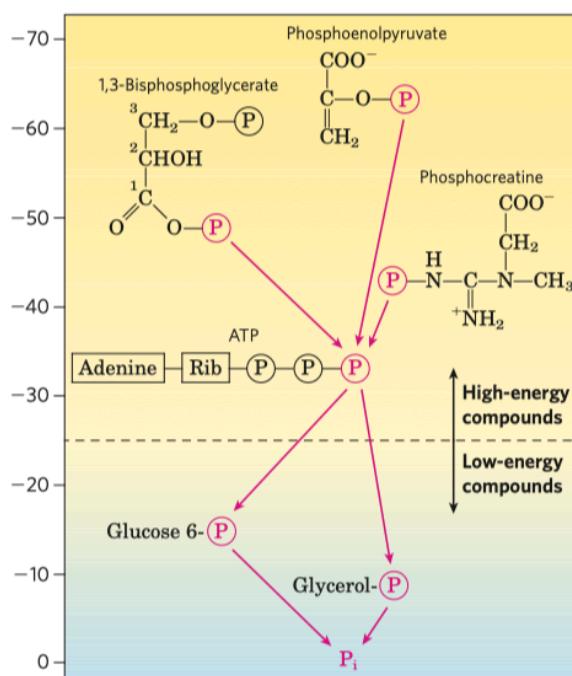
- samotné bázi se říká *adenin* a s cukrem je to *adenozin*
- člověk vyrobí 64476g ATP za den (váží-li 75kg)

PŮVOD ENERGIE

- za fyziologického pH se oddělí vodíky od fosfátů, původní OH skupiny nesou záporné náboje a vzniká velké odpuzování skupin — v tom pnutí tkví ta makroergnost
- není to vlastně v samotné vazbě, ale v uvolnění molekuly při štěpení.

HYDROLÝZA ATP

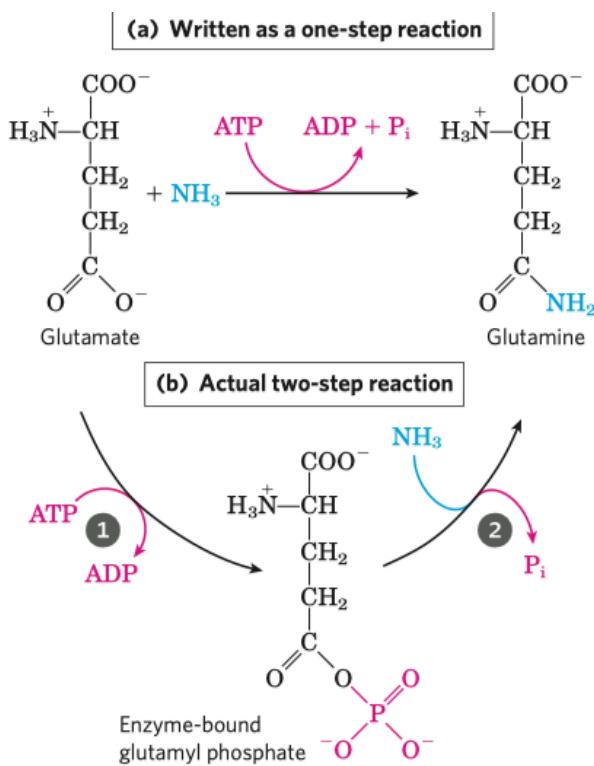
- (1) orthofosfátové štěpení, to je to normální (na ADP a fosfát), odštěpí se γ fosfát
- (2) pyrofosfátové štěpení, oddělí se pyrofosfát (neboli také difosfát), vznikne AMP a PP (pyrofosfát)
 - při tomto štěpení se uvolní více energie, pro některé reakce v buňce nestačí těch 305kJ/mol — u této reakce se totiž následně hned pyrofosfatázou štěpí PP na P + P, u čehož se uvolní další energie navíc



Obrázek 3.14: ATP jako mediátor energie

PŘEDÁVÁNÍ ENERGIE

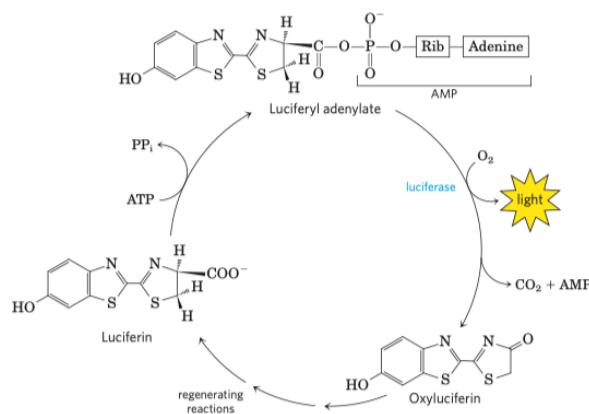
- ATP umí přebírat energii od jiných makroergních sloučenin a dále ji předávat jiným, běžným molekulám (viz obrázek výše)
- samotné předávání probíhá ve dvou krocích (viz obrázek níže)
 - vzniká fosforylovaný meziprodukt, který je vázaný na enzym
 - dojde k navázání (zde) aminoskupiny a uvolnění fosfátu



Obrázek 3.15: Předání energie ve dvou krocích

ATP NA SVÍCENÍ

- luciferin je aktivován adenylací, využije se ATP
- enzym luciferáza



Obrázek 3.16: Důležité části bioluminačního cyklu světlušky

3.9 Metabolismus a enzymologie

Živé organismy jsou z termodynamického hlediska otevřené systémy v ustáleném stavu.

Ustálený stav

Ustálený stav je flexibilním stavem s maximální možnou termodynamickou účinností. Je charakteristickým stavem pro živé systémy.

V rámci metabolismu si ve větším detailu na několika příkladech popíšeme, k čemu na struktuře enzymu dochází. Všechny reakce jdou popsat **reakční trajektorií**, kde se na x vynáší průběh reakce a na y relativní hodnota volné energie obou reaktantů (souhrn entropie a entalpie).

VLASTNOSTI ENZYMŮ (OPROTI KATALYZÁTORŮM OBECNĚ)

- přinášejí schopnost katalyzovat reakce za (pro organismus) běžných podmínek
- jsou specifické (např. konkrétní enzym reagovat jen s jediným cukrem)
 - s několika cukry může běžet několik reakcí katalyzováných různými enzymy, které mohou být nezávisle na sobě regulovány
 - veliký počet reakcí probíhá v jediném kompartmentu či v několika málo kompartmentech (např. v ER nebo v mch); současně je tam ohromě moc regulovaných reakcí, ale ty se díky specifitě vzájemně neovlivňují
 - dává vzniknout danému konkrétnímu izomeru
- jsou regulovatelné tím, že měníme dostupnost substrátu a reaktantů
 - když se koncentrace substrátu sníží pod určitou minimální hranici, enzym už ho neuvidí, s katalýzou se přestane
- jsou regulovatelné i "seshora"buňkou, která může dle potřeby měnit svou expresi

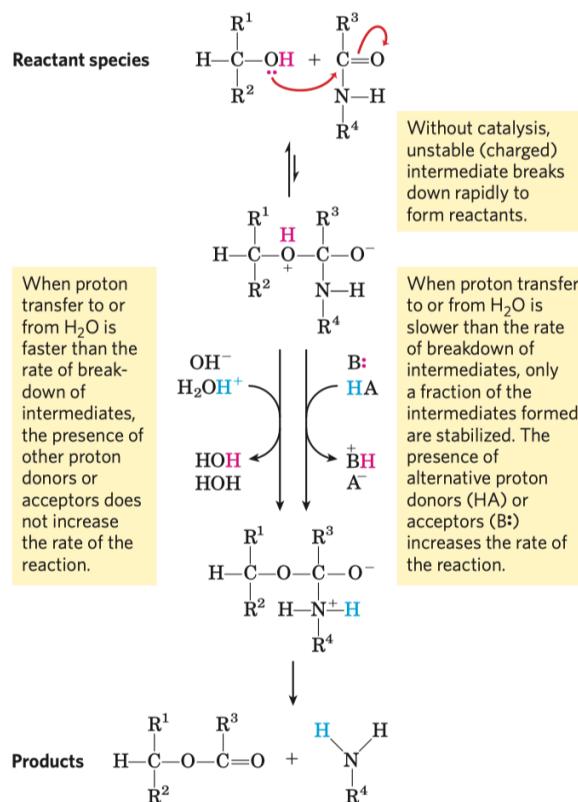
3.9.1 Princip katalýzy

Běžné mechanismy katalýzy, avšak kombinované na jedné molekule: vedou k vysoce specifickým reakcím s vysokými výtěžky a s vysokou účinností. Je minimalizován vznik nežádoucích vedlejších produktů.

Acidobazická katalýza

- aktivnímu centru nabídneme kyselinu nebo zásadu
- přenos protonu od Brønstedovy kyseliny nebo na Brønstedovu zásadu snižuje volnou energii přechodového komplexu
- typicky je součástí: hydrolýzy esterů, peptidů, reakcí fosfátových skupin, tautomerizací (keto-enol)

- např. hydrolyza RNA v rámci reakce ribonukleasy A
 - imidazolová skupina na histidinu 12 bude odjímat proton, což nakonec povede ke štěpení vazby; později se bude chovat naopak jako kyselina a odcházející skupině proton poskytne

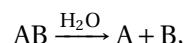


Obrázek 3.17: Acidobazická katalýza, specifická (vlevo) a obecná (vpravo)

Kovalentní katalýza

- přechodně se tvoří vazba mezi katalyzátorem a substrátem
 - nukleofilní reakce mezi katalyzátorem a substrátem za tvorby kovalentní vazby
 - posun elektronů z reakčního centra (na substrátu) směrem k elektrofilnímu centru katalyzátoru — tato změna usnadní změnu uspořádání reakčního centra
 - eliminace katalyzátoru (obrácení první reakce)
- vznik kovalentní vazby umožní změnu uspořádání a průběh reakce, katalyzátor pak bude zase oddělen
- rychlostně limitující fází katalyzované reakce je buď fáze nukleofilní, nebo elektrofilní (dle toho je pak katalytický efekt souhrnně označován)
 - dobrý kovalentní katalyzátor: vysoce nukleofilní a zároveň snadno eliminovatelný

Např. z reakce



se po katalýze stane reakce



PŘÍKLADY

- aminoskupina Lys, thiolová Cys, karboxylová Asp, hydroxylová Ser, imidazolová His
- koenzymy thiaminpyrofosfát a pyridoxalofosfát

Katalýza kovovými ionty

Metaloenzymy

Mají pevně vázané kovy (Fe, Cu, Zn, Mn, Co), využívají je pro vazbu a orientaci substrátu, pro oxido-redukční reakce. Polarizují substrát.

Enzymy aktivované kovovými ionty

Volně váží kovové ionty (především ionty kovů alkalických zemin: Na, K, Mg, Ca.) z roztoku, vyžadují je pro svoji aktivitu.

PARTICIPACE KOVOVÝCH IONTŮ

- (1) vazbou/orientací substrátů
- (2) zprostředkováním oxido-redukčních reakcí
- (3) elektrostatickou stabilizací nebo stíněním negativních nábojů

ANHYDRÁZA KYSELINY UHLIČITÉ

- katalyzuje vznik hydrogenuhličitanu z oxidu uhličitého (jinak by se CO_2 hromadil v tkáních)
- proces
 - (1) zinek je koordinován imidazolovými skupinami v aktivním centru
 - stabilizuje a polarizuje substrát.
 - (2) molekuly vody tvoří síť elektrostatických interakcí
 - (3) další imidazolová skupina (z His) se přiklání k molekule vody a tvoří se řetězec
 - (4) molekula vody je polarizována
 - (5) imidazolová skupina působí nukleofilně
 - polarizace molekuly vody umožní nukleofilní reakci ve směru substrátu

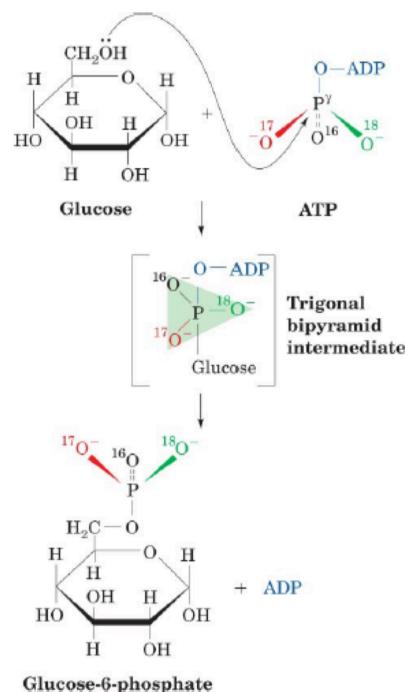
Elektrostatická katalýza

- eliminace vody z aktivního centra vede ke snížení dielektrické konstanty a k zesílení elektrostatických interakcí
- uspořádání nábojů v aktivním centru konstanty stabilizuje přechodové stavy reakcí
- distribuce nábojů kolem aktivního centra přivádí substrát do centra rychleji než by tomu bylo prostou difuzí

Například *hexokinázová reakce*, ve které figuruje i hořečnatý iont.

Katalýza proximitním a orientačním efektem

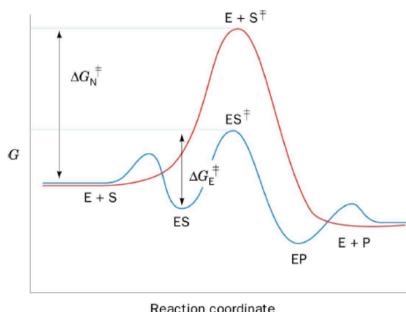
- stabilizace relativní orientace skupin vůči sobě a omezení jejich pohybu
- opět např. u hexokinázové reakce
 - hydroxylová skupina glukózy atakuje elektronodeficientní na gama fosfátu ATP
 - skupina musí přistupovat ke druhé molekule reaktantu (γ -fosfátu) tak, že je orientována ve směru osy vazby



Obrázek 3.18: Katalýza části hexokinázové reakce

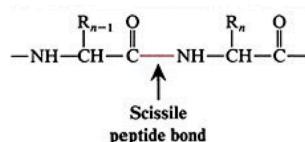
Katalýza preferenční vazbou přechodového stavu

- nejvýznamnější
- enzym váže přechodový stav s relativně vyšší afinitou než substrát nebo produkt
- preferenční vazba přechodového stavu zvyšuje jeho koncentraci, což se odrazí ve zvýšení rychlosti reakce
 - snižuje peak ES komplexu, který se může rozpadnout na dvě strany: ES a nebo E + P (z toho se poté hůř vrací, viz obrázek)



Obrázek 3.19: Katalýza preferenční vazbou přechodového stavu: nekatalyzovaná reakce (červeně) a katalyzovaná reakce (modře)

3.9.2 Chymotrypsin



Obrázek 3.20: Jak probíhá proteolýza

CHYMOTRYPSIN

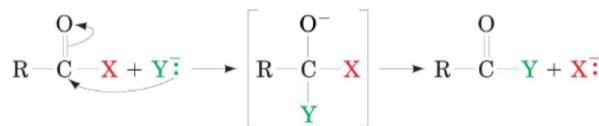
- proteináza, která je aktivní jako enzym zodpovědný za štěpení živin v trávicím traktu
- obecný mechanismus proteolýzy je ale všudypřítomný a nepostradatelný pro život
 - procesů závislých na proteolýze je nespočet (signální, ontogenetické, atd.)
- dochází ke štěpení peptidové vazby, peptidová vazba je substituovaná vazba mezi dvěma zbytky AK

SPECIFICKITA SERINOVÝCH PROTEÁZ

- budou si vybírat peptidové vazby jen v sousedství určitých R skupin
- např. pro chymotrypsin musí na R_{n-1} být nějaký velký aromatický zbytek a na R_n nesmí být prolin
- pro trypsin na R_{n-1} musí být arginin nebo lysin

- požadavek na arginin je sice dosti řídké síto, ale to přesně chceme (štěpit peptidy na mnoha místech)
- větší specificita někde jinde v buňce by byla např. zařízena požadavky na R_{n-3} a R_{n-2}

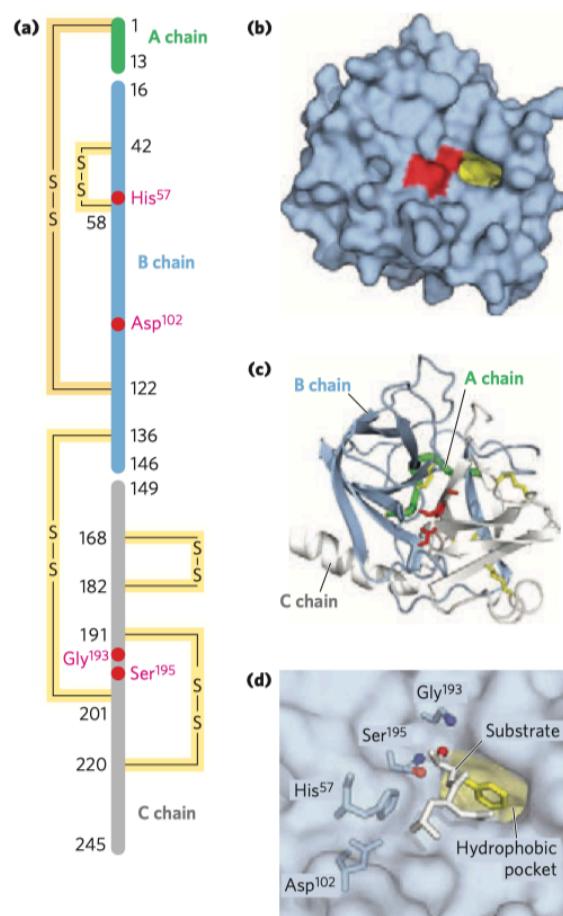
Mechanismus serinové protolytické reakce



Obrázek 3.21: Protolytická reakce

OBECNÝ POPIS

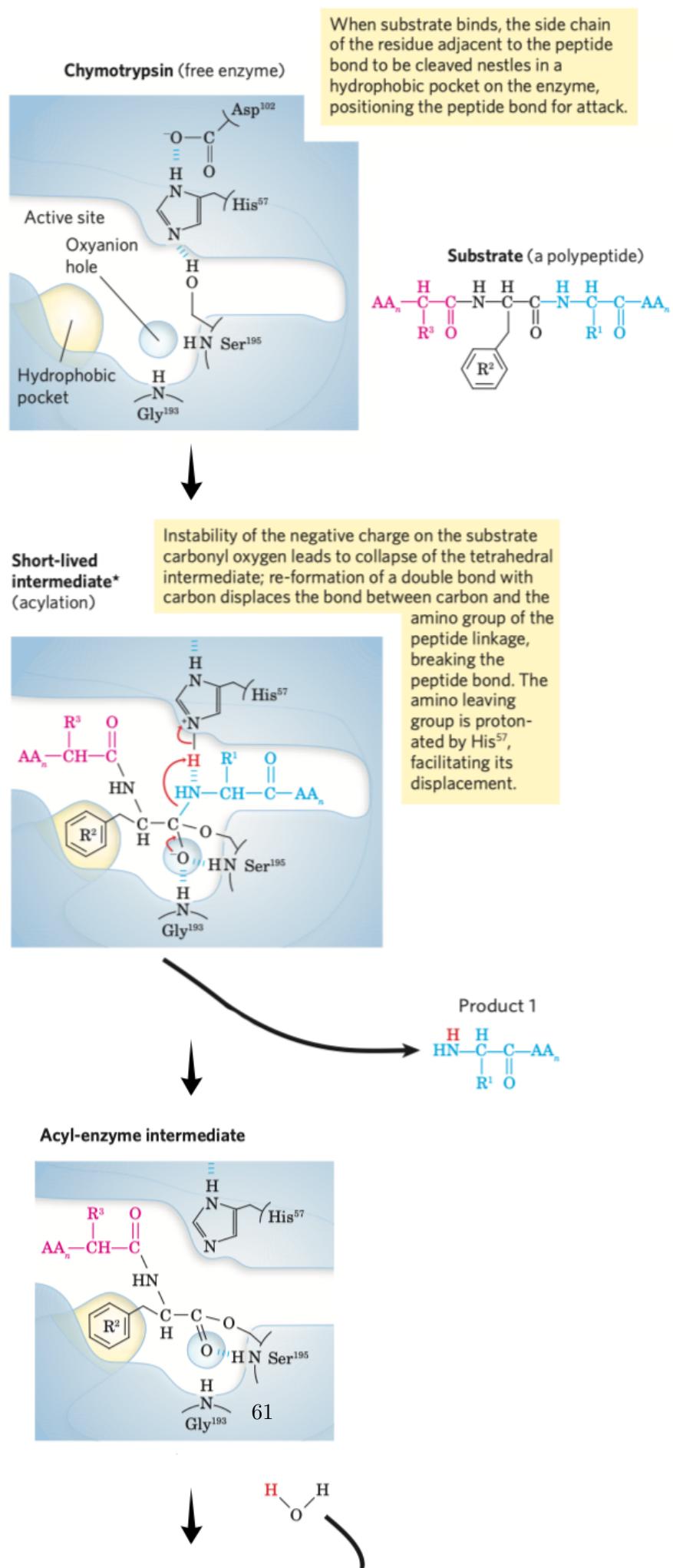
- přenos acylové skupiny, který bude zahrnovat tvorbu přechodového stavu (intermediátu)
- intermediát bude ve tvaru čtyřstěnu, uhlík bude uprostřed a substituenty ve vrcholech
 - přechodový stav bude charakterizován oxy-anionem
 - nabízí se pole pro elektrostatickou katalýzu, výskyt této molekuly budeme moci stabilizovat nabídnutím kladných částic do okolí
- přenos bude ukončen vpravo, kdy dojde k uvolnění substituentu, tedy k rozštěpení peptidové vazby a uvolnění nového konca proteinu



Obrázek 3.22: Struktura aktivního místa chymotrypsinu

POPIS AKTIVNÍHO CENTRA

- **katalytická triáda**
 - Ser 195 (hydroxylová skupina), His 57 (imidazolová skupina) a Asp 102 (karboxylová skupina)
 - * OH skupina Ser a její nukleofilní působení začíná celý proces štěpení vazby
- **hydrofobní kapsa**
 - do ní se váže peptidový řetězec, z jejího tvaru plyne požadavek na velkou hydrofobní AK na pozici R_{n-1} v substrátu
 - * tato hydrofobní interakce dodá vazebnou energii pro substrát, vznik E-S komplexu
 - každá peptidáza je trošku jiná, každá bude mít trochu jiný požadavek na skupiny, které se tam mají nacházet
- **oxyaniontová díra**
 - uspořádání nukleofilních skupin, které by byly k dispozici pro případný oxy-aniont, který by se v jejich blízkosti vyskytl



POPIS REAKCE

- (1) Ser je v triádě aktivovaný, chová se jako skvělé nukleofilní činidlo (a)
 - vzájemné elektrostatické působení
 - Ser získává unikátní vlastnosti
- (2) dojde k nukleofilnímu ataku, tvoří se tetrahedrální přechodový stav (c)
 - současně s tím byl odejmut proton z hydroxylové skupiny serinu, čemuž napomáhá blízkost imidazolové skupiny na pozici 57
 - acidobazická katalýza, zároveň vzniká kovalentní intermediát, tedy i kovalentní katalýza, navíc se uplatňuje i proximitní a orientační efekt
- (3) přechodový stav se rozpadá za štěpení peptidové vazby a vzniku komplexu enzym-[část původního substrátu] (e)
 - není stabilní, je to jen metakomplex, dochází k němu pouze v okamžiku překonávání bariéry
- (4) vazba molekuly vody, hydrolýza peptidové vazby, podruhé dochází k tvorbě čtyřstěnového intermediátu (g)
- (5) intermediát se znova rozpadá za vzniku karboxykonce uvolňovaného s enzymem (i)

Reakce má tedy dvě fáze, v obou dochází k nukleofilnímu působení: v tom prvním využíváme hydroxylovou skupinu serinu a dochází ke štěpení peptidové vazby, ve druhém použijeme molekulu vody, opět vzniká čtyřstěnový intermediát a pak dochází ke štěpení vazby na Ser 195 a uvolnění nového C koncem.

EXPERIMENTÁLNÍ ZJIŠTĚNÍ

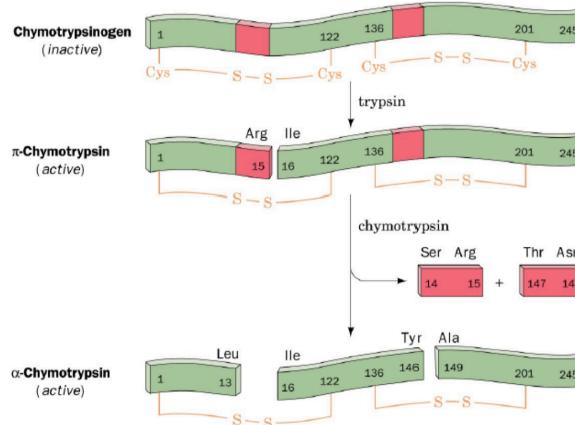
- imidazolová skupina His bude na konci reakce usnadňovat protonaci hydroxylové skupiny
 - slouží tam jako takový katalyzátor, nejdříve protony sebere, pak je zase vrátí
- intermediát je pokaždé nabitý, oxy-aniont zde musí být stabilizován
 - to se děje tím, jak je vystrčen do okolí NH skupin, které jsou s ním schopny elektrostaticky interagovat
- pomocí cílených bodových mutací (např. Asp) se dá ověřit, že je daná AK důležitá pro efektivitu enzymu
- tvoří se nízkobariérové vodíkové můstky
 - <= Asp a His mají podobné hodnoty pK'

Přirozená regulace

- také pracuje s tvarem enzymu
- aktivní chymotrypsin vzniká z neaktivního prekurzoru (chymotrypsinogen) jeho štěpením
 - (1) mezi zbytky 15 a 16 probíhá proteolytické štěpení, které používá příbuznou proteázu, trypsin

- (2) vzniká částečně aktivní chymotrypsin
 - Ser se do blízkosti triády posune až štěpením
- (3) chymotrypsin je autokatalyticky štěpen, vyštěpí se červené části
- (4) konečný produkt je pospojován do jednoho celku S-S můstky

Další možnosti regulace jsou např. existence neštěpitelného pseudosubstrátu, který blokuje aktivní místo, nebo nepřítomnost kofaktoru, který k činnosti enzymu nezbytný.



Obrázek 3.24: Chymotrypsinogen

[EVOLUČNÍ VÝZNAM TRIÁDY]

Podobná triáda se za milióny let vyvinula nezávisle na sobě u mnoha enzymů — očividně se jedná o dobrý mechanismus.

ČÁST 4

SACHARIDY A GLYKOLÝZA

Monosacharidy

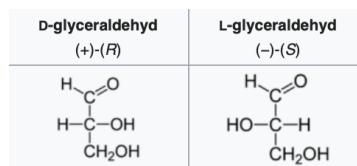
Monosacharidy jsou aldehydové (**aldózy**) nebo ketonové deriváty polyhydroxyalkoholů s alespoň třemi uhlíky v řetězci, nelze je hydrolyzovat na jednodušší.

Nejstabilnější jsou cyklické sacharidy, většinou mají 5 nebo 6 uhlíků.

D a L forma

Sacharidy jsou opticky aktivní látky, monosacharidy mají jedno chirální centrum, delší řetězce pak i více (tvoří 2^n izomerů, kde n je počet chirálních uhlíků).

D forma je taková, kdy nejvzdálenější OH skupina od chirálního uhlíku má stejnou konformaci jako D-glyceraldehyd — hydroxylovou skupinu má **napravo**.

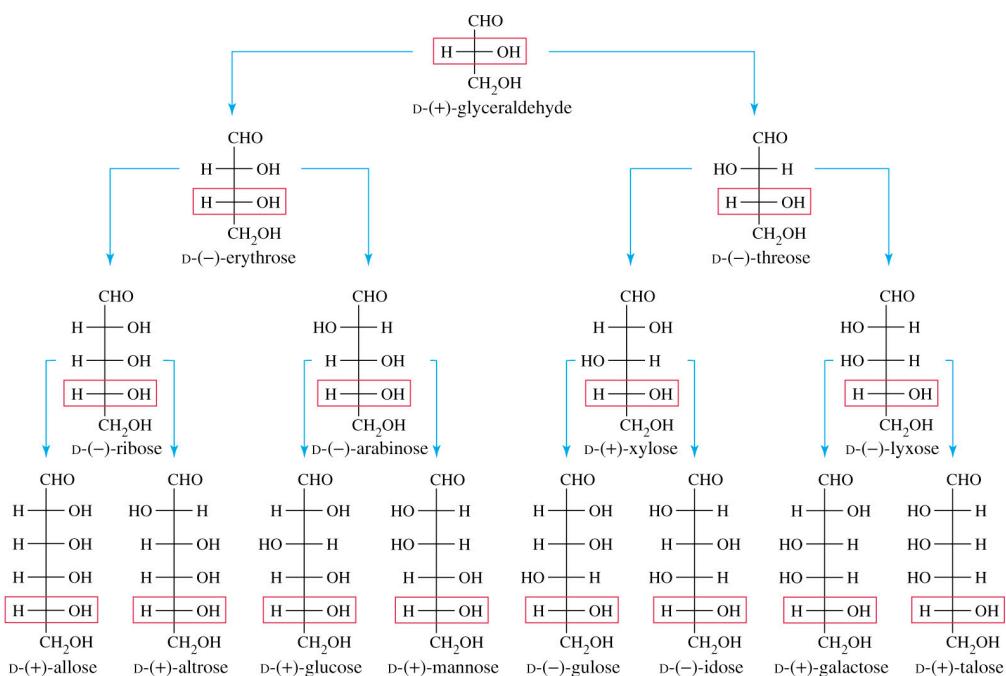


Obrázek 4.1: Glyceraldehyd

FUNKCE CUKRŮ

- zásobní funkce (glykogen, škrob)
- zdroj energie
- signální funkce (heteropolysacharidy, proteoglykany)
- stavební funkce (celulóza, exoskelet bezobratlých)

4.1 Významné aldózy a ketózy

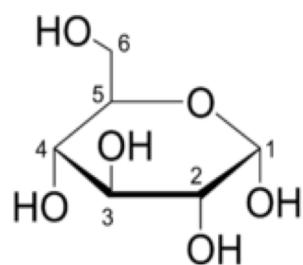


Obrázek 4.2: Všechny aldózy

D-GLUKÓZA

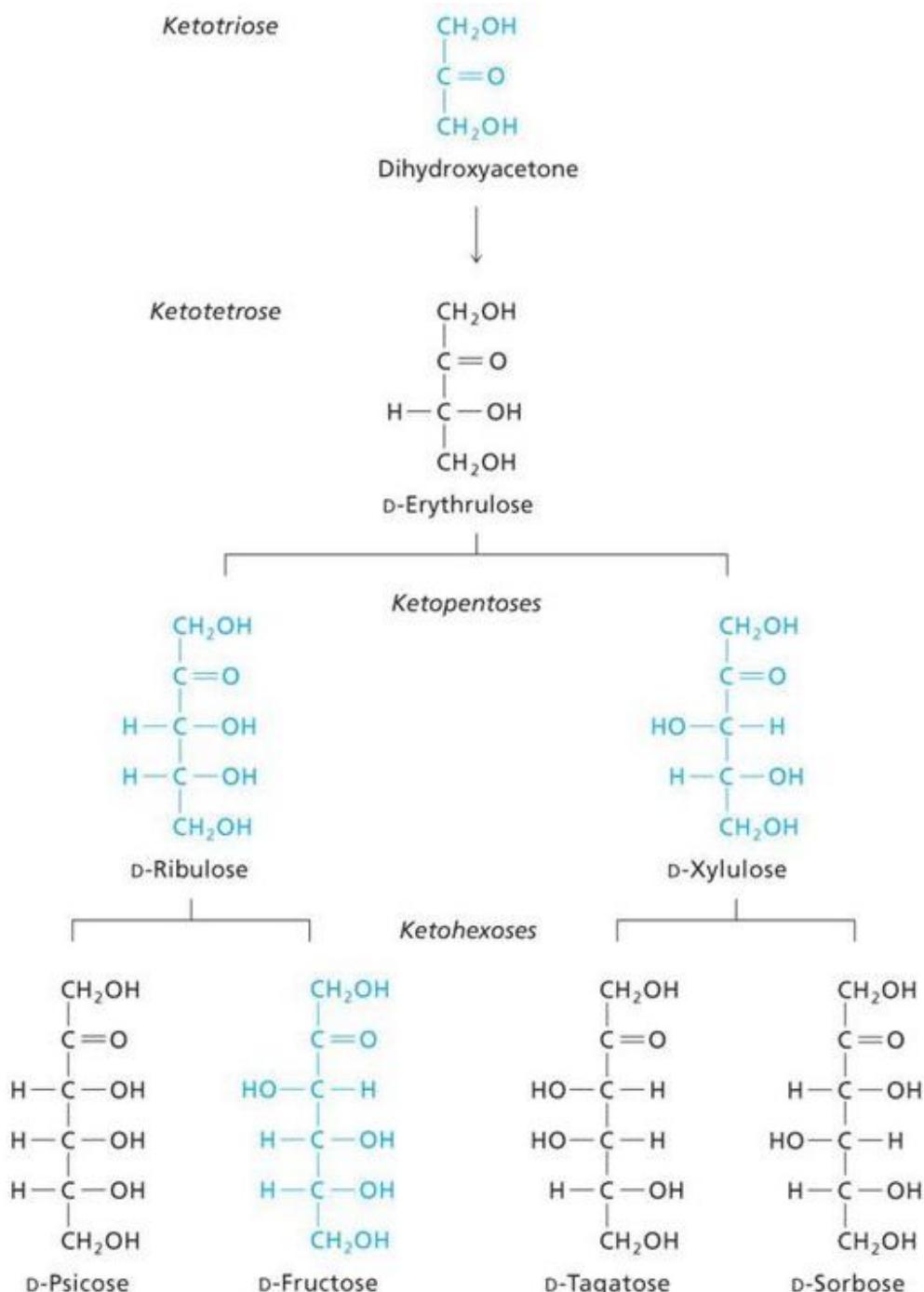
- aldohexóza, hroznový cukr
- centrální metabolit, hlavní zdroj energie napříč organismy
- jeden z mála monosacharidů, které se vyskytují ve formě monomerů v celé řadě buněk

- někde se můžeme setkat i s názvem dextróza (což je označení pouze pro D-formu)



Obrázek 4.3: D-glukóza

Dále ještě galaktóza (je součástí laktózy, sacharidu, který se vyskytuje v mléce placentálů), manóza a idóza — poslední dvě zmíněné jsou v mezibuněčné hmotě v podobně glykosamido-glykanů. Z aldopentóz poté ribóze, která je součástí DNA a RNA.



Obrázek 4.4: D-ketózy

D-fruktóza (častý zdroj energie, důležitý metabolit některých drah, je v medu, v sacharóze) a D-ribulóza (účastní se metabolismu pentózo-fosfátové dráhy a zejména fotosyntézy).

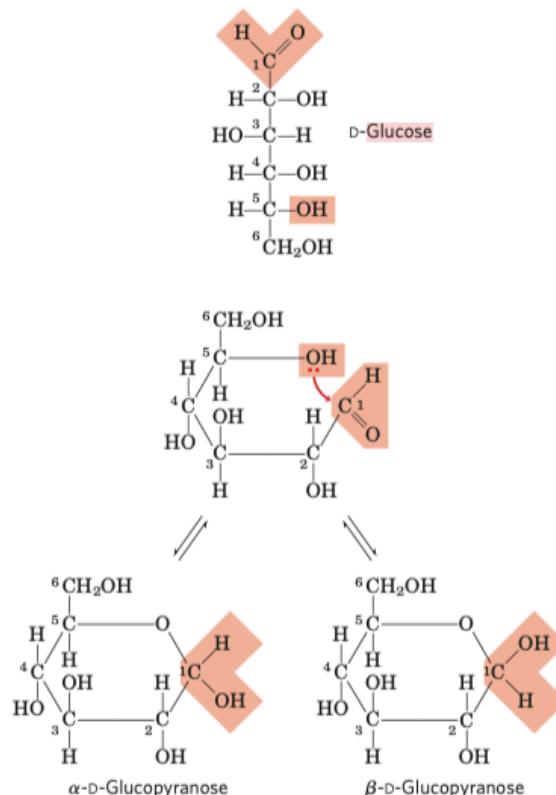
[POZNÁMKA]

Na názvosloví sacharidů se kromě Fischera podílel i český chemik Emil Votoček a jeho žák

Vladimír Prelog; zavedl univerzální pravidla pro popis konfigurace včetně stereoizomerů.

4.2 Cyklické formy

- aldehydová a ketoskupina jsou reaktivní a mají tendenci reagovat s alkoholy na druhé straně molekuly
- alkoholová + aldehydová skupina -> hemiacetál (s keto je to hemiketal)



Obrázek 4.5: α a β forma glukopyranózy

NÁZVOSLOVÍ CYKLICKÝCH SACHARIDŮ

- "pyro" = odvoditelné od pyranu, šestičetného cyklu
- α/β = na prvním uhlíku je nové chirální (tzv **anomerní**) centrum, vznikají dva anomery
- Haworthova projekce
- podobně pro fruktózu (α/β D-fruktofuranóza)

Z lineární glukózy vznikají α/β formy v určitém poměru, který je typický pro každý sacharid. Po určité době nastane v roztoku rovnováha, výsledný úhel stočení světla je dán váženým

průměrem obou forem. Tomuto jevu ustanovení rovnováhy se říká **mutarotace**. Kdyby stáčely stejně a vznikaly půl na půl, tak úhel bude ve výsledku nula (**racemická směs**).

Cyklické sacharidy se vyskytují ve vaničkové a židličkové konformati; židličková je ta stabilnější => častější.

4.3 Deriváty monosacharidů

Aldolové kyseliny

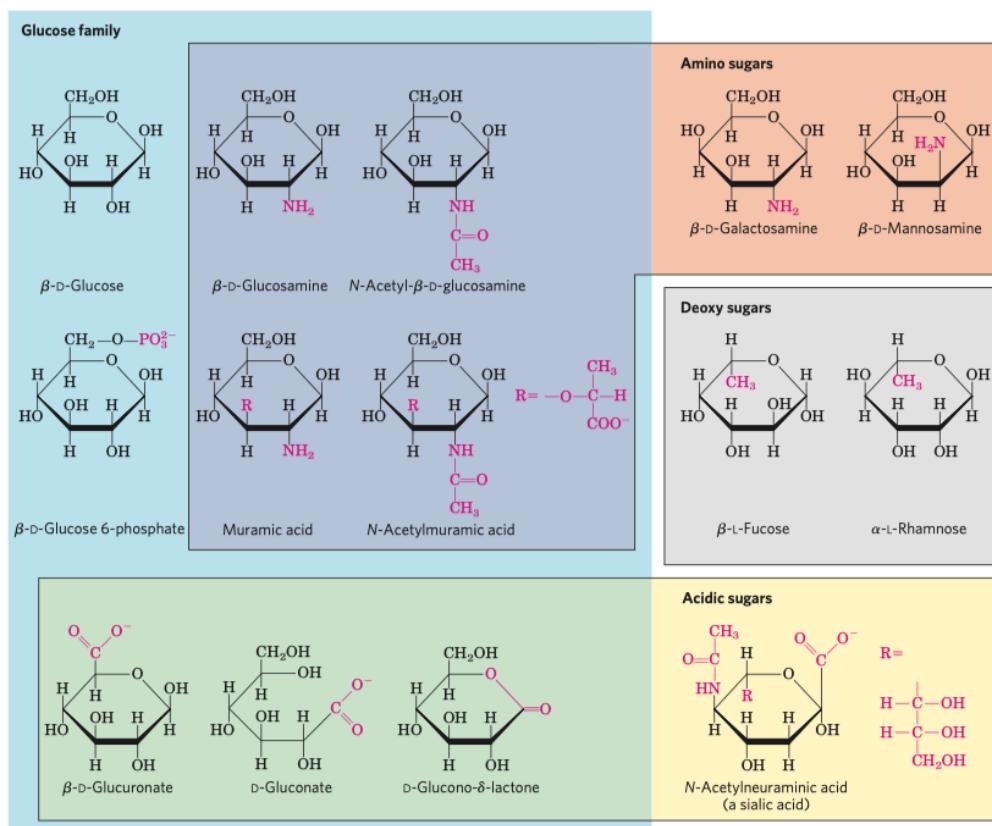
Vznikají oxidací aldehydové skupiny. Typicky nejsou v lineární podobě, jejich skupiny opět reagují s těmi alkoholovými — probíhá **esterifikace**, reakce kyseliny s alkoholem, vznikají **laktony**. Nejdůležitější lakton je kyselina-L-askorbová (vitamín C).

Alduronové kyseliny

Vznikají oxidací uhlíku na jiné skupině.

Alditoly

Vznikají redukcí aldehydové skupiny.



Obrázek 4.6: Rodina glukózy

DEOXY CUKRY

- mají místo hydroxyskupiny jen vodík.
- např. *rhamnóza* a *fukóza*, složky zásobních polysacharidů nižších rostlin.

AMINO CUKRY

- *N-acetylglukosamin* (odvozen od glukózy a N-acetylu)
- skupina je často vázaná na složku buněčných stěn bakterií a je i podjednotkou chitinu
- *N-acetylmuramová* kyselina, složka buněčných stěn bakterií (\Rightarrow mureinová stěna)
- *N-neuramínová* neboli sialová kyselina, často se vyskytuje na glykoproteinech zvnějšku plasmatické membrány, podílí se na jejím záporném náboji

GLYKOSIDICKÁ VAZBA

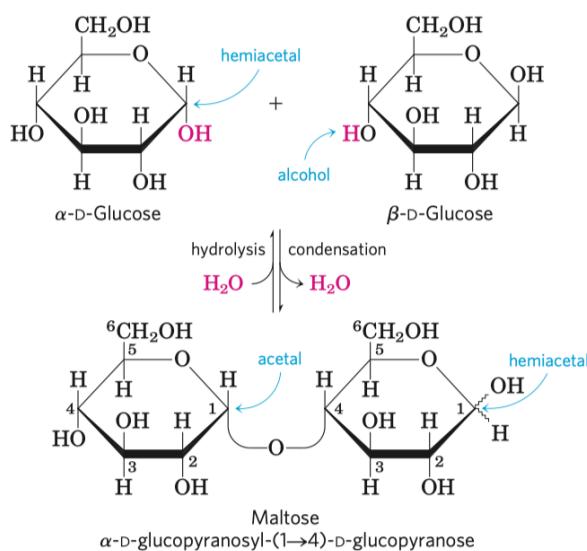
- monosacharidy mohou reagovat s alkoholy za vzniku glykosidů
- methylglukosid, methylalfa-gukosid a methylbeta-glukosid
- glykosidická vazba je zodpovědná za spojení monosacharidových podjednotek do disacharidů, oligosacharidů, polysacharidů

4.4 Disacharidy

Redukující a neredukující disacharidy

Redukující mají volnou aldo či keto skupinu. Anomerní uhlíky — ty z keto či aminoskupiny — jsou jako jediné schopné redukovat a u neredukujících disacharidů jsou navzájem vázané glykosidickou vazbou.

- podjednotky jsou spojené glykosidickou vazbou
- příklady
 - sacharóza se skládá z glukózy a fruktózy spojených α -1,2 glykosidickou vazbou,
 - laktóza, mléčný cukr, z glukózy a galaktózy propojených β -1,4 glykosidickou vazbou
 - ostatní ze dvou glukóz, různě propojených
- způsob propojení má zásadní podíl na vlastnostech vzniklé látky
 - redukující disacharidy mají glykosidickou vazbu 1,4 nebo 1,6 (např. laktóza, maltóza)
 - neredukující disacharidy mají glykosidickou vazbu 1,1, nebo 1,2 a jsou tak obsazeny obě poloacetalové OH skupiny



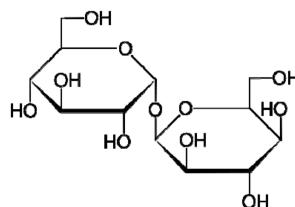
Obrázek 4.7: Glykosidická vazba

[POZNÁMKA]

Některé druhy placentálů, zejména ty v polárních oblastech, nemají v mléca laktózu; její úlohu zastanou tuky a bílkoviny.

TREHALÓZA

- důležitý pro odolnost organismu vůči mrazovému stresu napříč organismy od kvasinek po obratlovce
- účastní se anabiozy
- má kryoprotektivní účinky
- vyskytuje se i v krvi některých bezobratlých místo glukózy



Obrázek 4.8: Trehalóza

4.5 Polysacharidy

Homopolysacharidy a heteropolysacharidy

Homopolysacharidy se skládají ze stejných podjednotek, heteropolysacharidy z různých.

Příkladem homopolysacharidu je celulóza (glukóza, $\beta 1 \rightarrow 4$) a chitin (N-acetyl-glukosamin, $\beta 1 \rightarrow 4$).

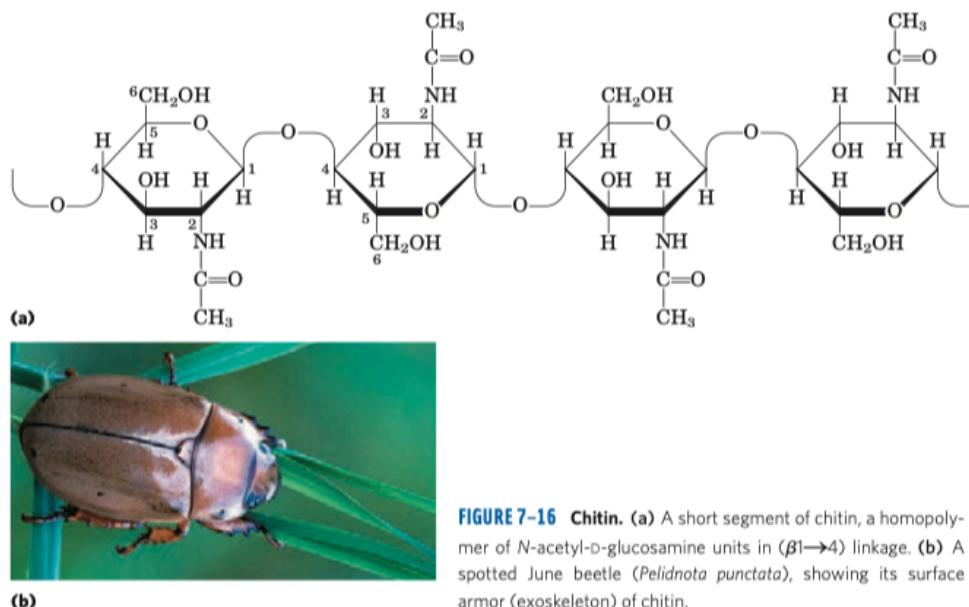
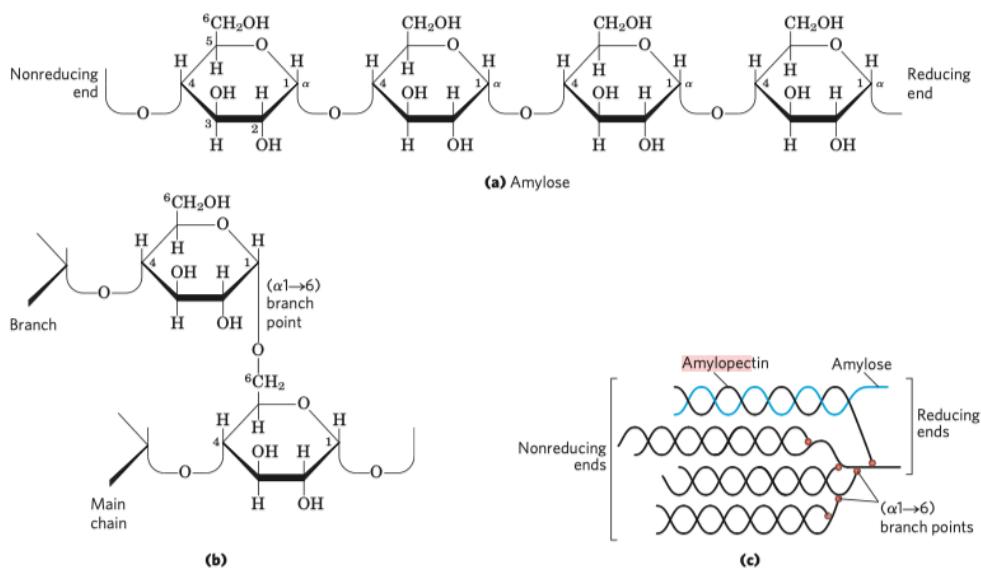


FIGURE 7-16 Chitin. (a) A short segment of chitin, a homopolymer of N-acetyl-D-glucosamine units in ($\beta 1 \rightarrow 4$) linkage. (b) A spotted June beetle (*Pelidnota punctata*), showing its surface armor (exoskeleton) of chitin.

Obrázek 4.9: Chitin

STAVEBNÍ POLYSACCHARIDY

- celulóza, chitin
- pevnost těchto stavebních polysacharidů je dána jejich prostorovým uspořádáním, např. celulóza vytváří fibrily o mnoha tisících podjednotek (sousední paralelní vlákna jsou posunuta o polovinu, jako cihly na zdi)
 - maximální propojení vodíkovými můstky v rovině i nad sebou v prostoru, maximalní využití Van der Waalsových interakcí
 - ve stěnách rostlin navíc není samostatně, ale mohou tam být další látky, např. *lignin*, které dohromady tvoří kompozitní strukturu jako např. železobeton
- tunika pláštěnců je také z celulózy



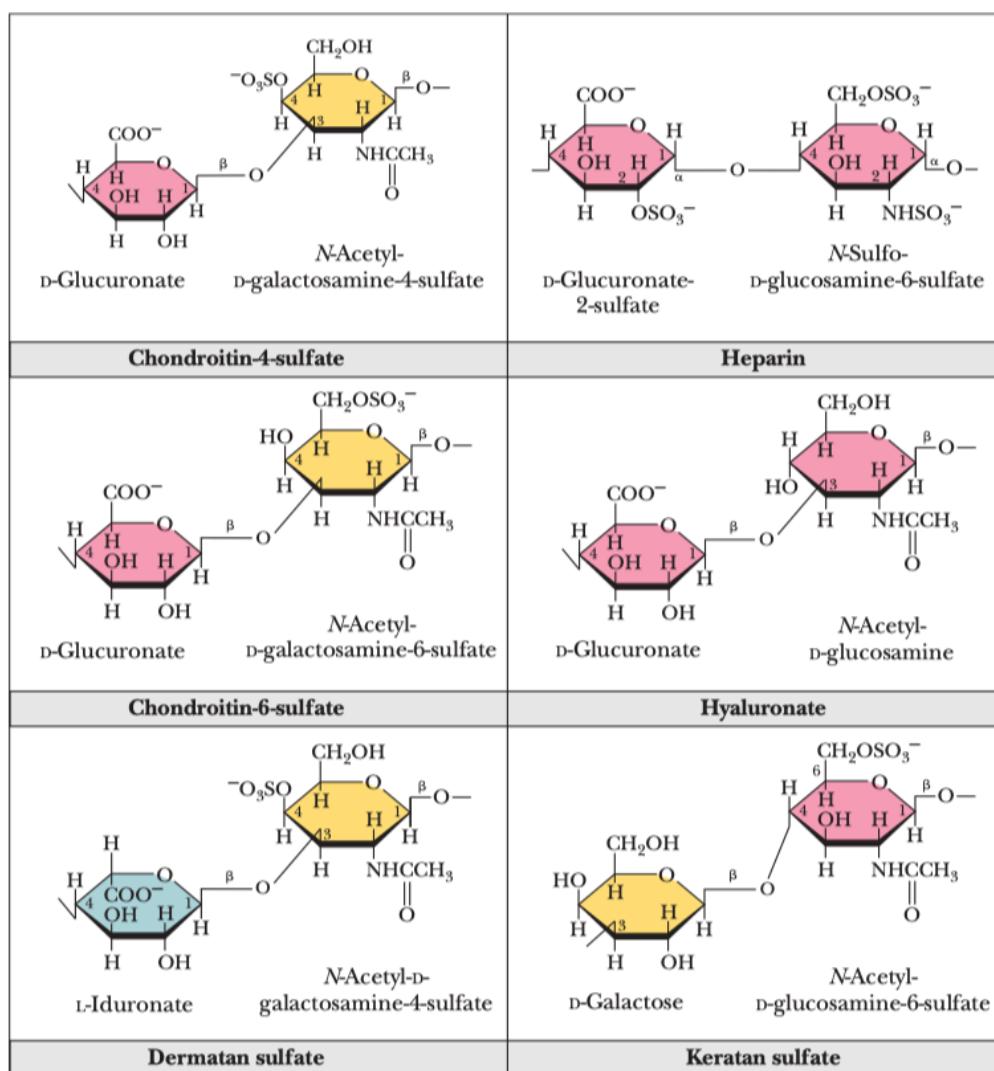
Obrázek 4.10: Amylóza (a), zlom/rozvětvení ve struktuře amylopektinu (nebo glykogenu) (b), struktura amylózy a amylopektinu (c)

ZÁSOBNÍ POLYSACCHARIDY

- např. škrob u rostlin, glykogen u živočichů
- škrob se vyskytuje ve 2 formách, *amylóza* a *amylopektin*
 - glukózy, α -1,4
 - 20% je tvořeno amylózou jejíž helixy nejsou příliš pevné
 - 80% je tořeno amylopektinem, po cca 24–30 jednotkách se větví
 - \Rightarrow mnoho neredučních konců \Rightarrow rychlejší odbourávání (probíhá právě od těch neredučních konců)
 - * jen jeden redukující konec

4.5.1 Glykosaminoglykany

Příklad heteropolysacharidů.



Obrázek 4.11: Glukosaminoglykany

STRUKTURA

- na prvním místě je sacharid, na druhém je amino sacharid a alespoň jeden z nich obsahuje zápornou sulfátovou nebo karboxylátovou skupinu

FUNKCE

- jsou jednou z nejdůležitějších složek mezibuněčné hmoty živočichů, složkou proteoglykanů
- mají v mezibuněčné hmotě funkci mechanickou (působí jako tlumiče nárazů na tkáně)
 - často se jmenují podle místa výskytu, například chondroitin-sulfát v chrupavce, dermatan-sulfát v dermis, keratan-sulfát v rohovině
 - hyaluronát je v celé mezibuněčné hmotě
- jsou schopny se hydratovat či dehydratovat: umí vázat velké množství Na^{2+} , K^+ či Ca^{2+} iontů a poté (de)hydratací jsou schopné až tisíckrát změnit svůj objem

- mají i důležitou signální funkci jako růstové faktory (směrování buněk v embryonálním vývoji, při migraci buněk i v dospělém organismu)
- jsou důležité i pro imunitní systém a nádory, jejich proliferaci

HEPARIN

- reakce s antithrombinem, brání srážení krve
- silně záporně nabity, sulfatovaný, vyskytuje se vlastně jen v žírných buňkách
- podobný je heparansulfát, ten je v endotelu a v mozku

Jsou součástí **proteoglykanů**.

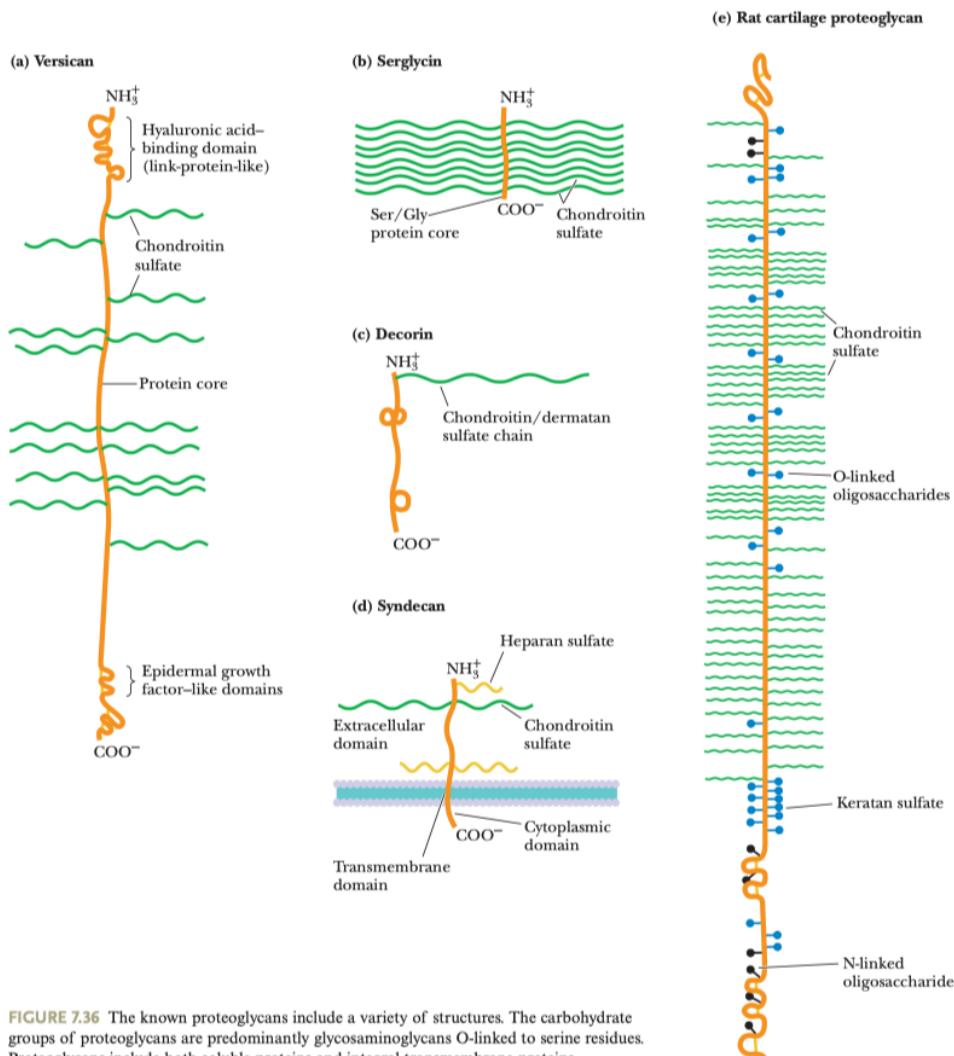


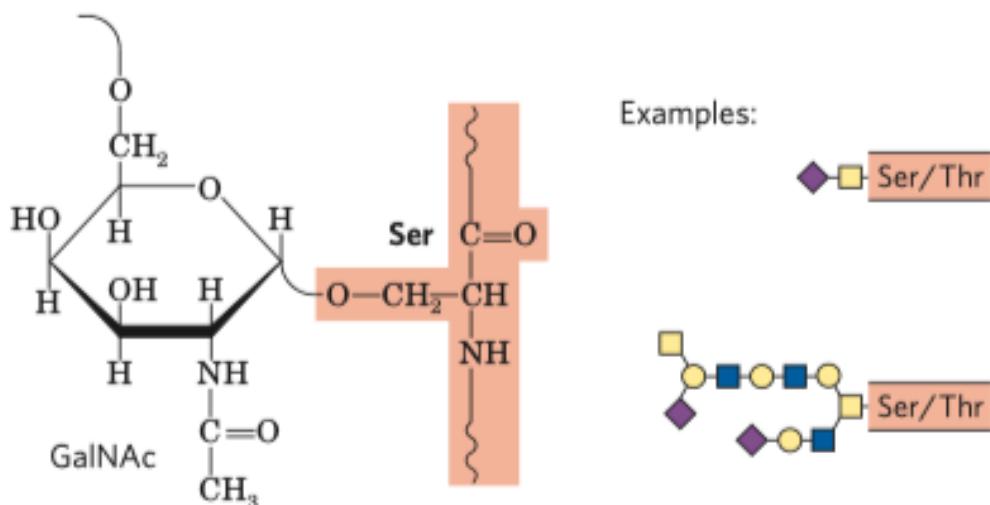
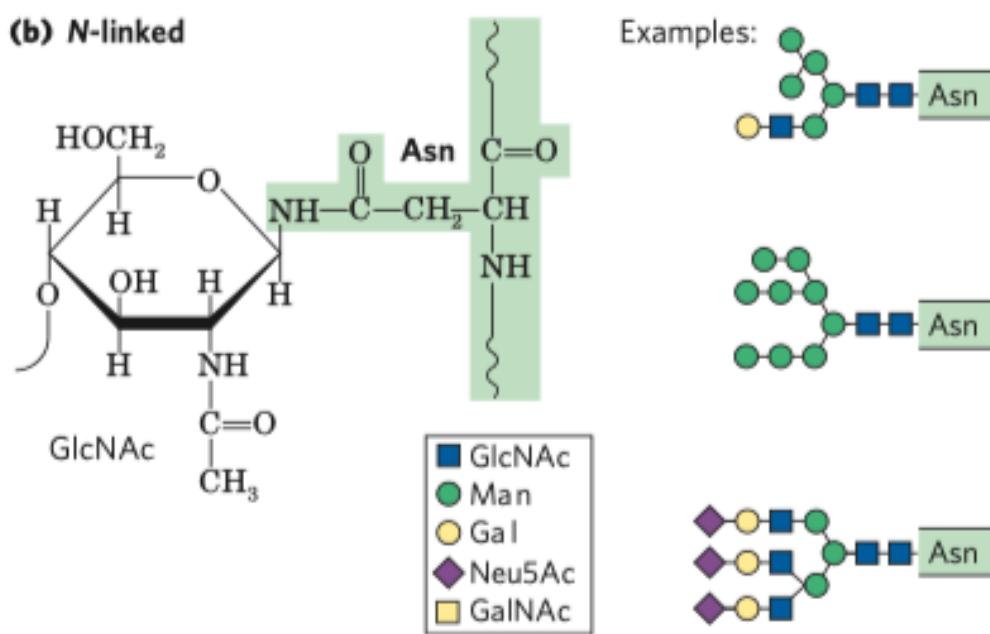
FIGURE 7.36 The known proteoglycans include a variety of structures. The carbohydrate groups of proteoglycans are predominantly glycosaminoglycans O-linked to serine residues. Proteoglycans include both soluble proteins and integral transmembrane proteins.

Obrázek 4.12: Proteoglykany

PROTEOGLYKANY

- velké komplexy proteinů a heteropolysacharidů v bezbuněčné hmotě

- jejich struktura se označuje jako **kartáčová** (viz obrázek)
 - páteř tvoří kyselina hyaluronová, na ní jsou vázány *Core* proteiny a na ně pak řetězce gylkosaminogylkanů
 - core protein* na sobě má navázány N- a O- glykosylované sacharidy a řetězce glykosaminoglykanu
- jen asi 5% proteoglykanů tvoří proteinová složka, 95 % je cukerná

(a) O-linked**(b) N-linked**

Obrázek 4.13: Spojení sacharidu a proteinu v glykoproteinech

GLYKOPROTEINY

- většina proteinů v těle
- vazba přes N- a O- glykosylaci
 - N- je přes NH skupinu (na Asp)
 - * např. imunoglobuliny: funkce mohou ovlivňovat dobu života proteinů v oběhu, jeho aktivitu včetně katalytické aktivity, rozpoznávací funkci, jeho rozpoznávání jiným signálním proteinem, účastní se mezibuněčných interakcí atd.
 - O- je ta běžná přes OH (na Ser nebo Thr)
 - * kromě výše zmíněých funkcí ještě může alternovat s fosforylací, což slouží k signalizaci
 - * je také zodpovědná za krevní skupiny a za rozdílnost antigenů
- glykoproteiny na vnějšku plasmatické membrány jsou modifikovány kyselinou sialovou, která je zodpovědná za jejich záporný náboj

PEPTIDOGLYKAN

- sacharidy jsou důležité i pro prokaryota => peptidoglykan slouží k tomu, aby pro hostitele bylo obtížnější si jich všimnout
- nachází se ve stěně G⁺ i G⁻ bakterií
- v zásadě se skládá z heteropolysacharidových řetězců navzájem propojených glyciny a krátkým řetězcem AK (např. D-aminokyselinami jako D-alanin)
- u bakterií se vyskytuje také kyselina N-acetylmuramová a N-acetylglukosamin

4.6 Glykolýza

- vlastní témař všem živočichům (kromě pár bakterií)
- zdroj energie
- jedna z hlavních regulačních reakcí glykolýzy
 - ty bývají na začátku (zablokování tvorby meziproduků) a konci metabolických drah (pro hromadění meziproduktů)
- sestává se z deseti biochemických reakcí, behem kterých se glukóza mění na pyruvát
- další procesy závisejí na prostředí
 - **za anaerobních podmínek:**
 - * dochází k procesu fermentace = kvašení (mléčné, alkoholové)
 - **za areobních podmínek:**
 - * dochází k aerobní oxidaci v Krebsově (cytrátovém) cyklu a následně k oxidativní fosforylacii

HISTORIE STUDIA GLYKOLÝZY

- Pasteur se domníval, že za kvašení mohou mikroorganismy
- později se zjistilo, že proces probíhá i s mrtvými kvasinkami (díky jejich enzymům)
- na přelomu 19. a 20. století se zjistilo, že se glykolýzy účastní jak enzymy, tak neenzymatické látky
- mechanismus byl ve 40. letech 20. století objasněn

GLYKOLÝZA MÁ DVĚ ČÁSTI

- **přípravná**
 - 5 fází
 - přeměna glukózy na dvě změnitelné triózy
- **výkonná**
 - 5 fází
 - generování ATP (energetický zisk)
 - redukce koenzymu NADP

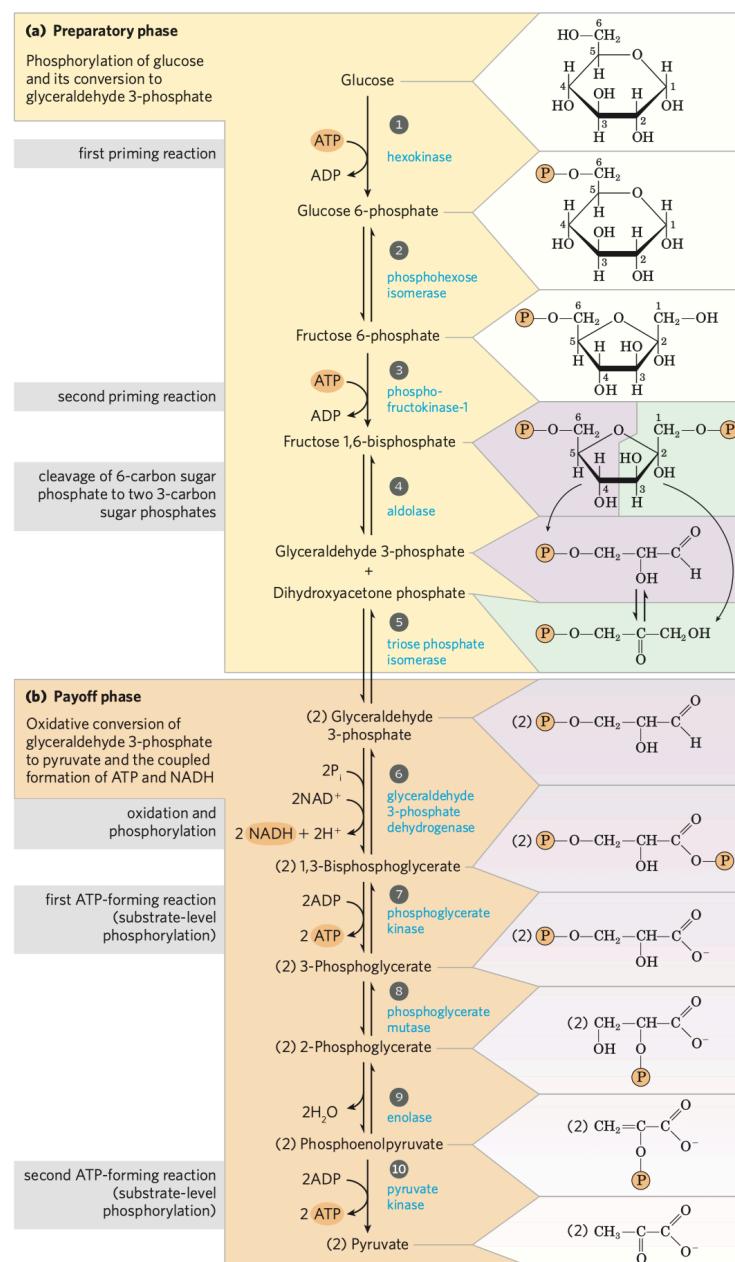


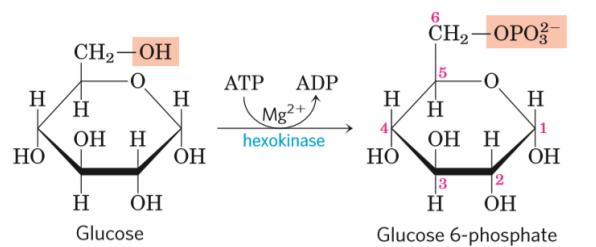
FIGURE 14–2 The two phases of glycolysis. For each molecule of glucose that passes through the preparatory phase (a), two molecules of glyceraldehyde 3-phosphate are formed; both pass through the payoff phase (b). Pyruvate is the end product of the second phase of glycolysis. For each glucose molecule, two ATP are consumed in the preparatory

phase and four ATP are produced in the payoff phase, giving a net yield of two ATP per molecule of glucose converted to pyruvate. The numbered reaction steps correspond to the numbered headings in the text discussion. Keep in mind that each phosphoryl group, represented here as P , has two negative charges ($-\text{PO}_3^{2-}$).

Obrázek 4.14: Schéma celé glykolýzy

4.6.1 Reakce glykolýzy

První reakce



Obrázek 4.15: První reakce

HEXOKINÁZA

- nespecifický enzym (může katalyzovat celou řadu reakcí)
- katalyzuje první reakci
- kinázy patří mezi transferázy = enzymy přenášející fosfát
 - mění glukózu na glukózu-6-fosfát
 - * tzn. přenese fosfát na hexózu
- hexokináza fosforyluje:
 - ve většině tkáních glukózu, manózu, ...
 - ve slinivce a játrech jen glukózu = glukokináza
 - * účastní se udržování hladiny glukózy v krvi

STRUKTURA HEXOKINÁZY

- 2 laloky
- **glukóza nasedá na katalytické místo mezi laloky**
- **změna konformace katalytického místa**
 - uzavření katal. místa mezi laloky
 - mimo jiné kvůli vytěsnění vody
 - * dojde ke změně elektrostatických sil, což umožní vazbu substrátu v konkrétním místě (fosfát by se jinak výrazně jednodušeji navázal na vodu)
- **pevné navázání glukózy do buňky**
 - bez fosforylace může procházet volně přes membránu
 - glukóza může být zpracována

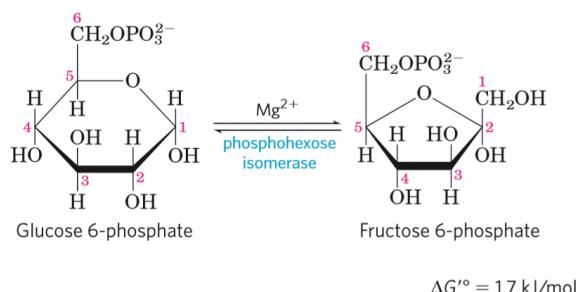
GLUKÓZA-6-FOSFATÁZA

- enzym z jaterních buněk
- schopný defosforylace, tj. uvolnění glukózy z buněk
- ve většině tkání není, a tak se tam musí glukóza spotřebovat

HOŘČÍKOVÉ KATIONTY

- kofaktorem reakcí valné většiny kináz
- stíní náboj na kyslíkových atomech (na beta-galaktofosfátu na ATP)
- usnadňuje přenos fosfátové skupiny

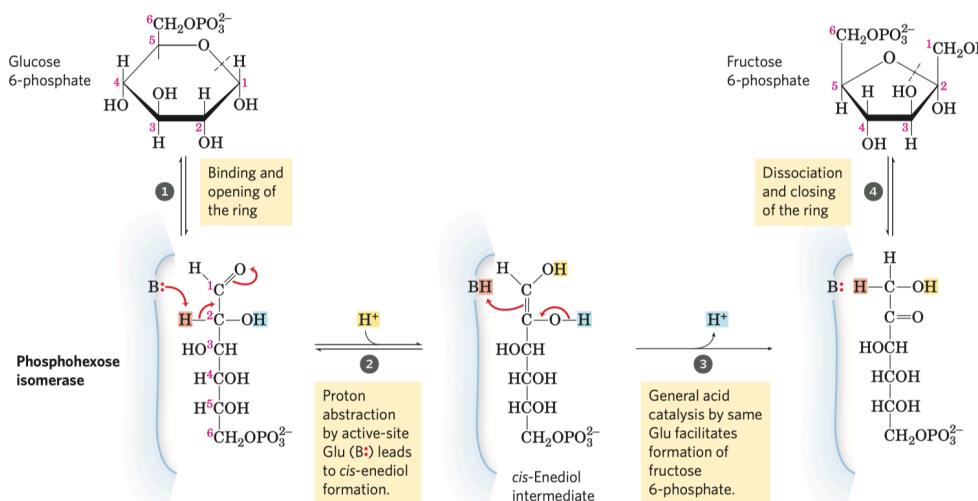
Druhá reakce



Obrázek 4.16: Druhá reakce

DRUHÁ REAKCE

- izomerizace glukóza-6-fosfátu na fruktóza-6-fosfát (aldosa na ketosu)
- katalyzovaná glokóza-fosfát-izomerázou
- přípravná reakce
 - fruktóza je lépe štěpitelná
- stereospecifická reakce
- acidobazická reakce
 - otevření šestičetného cyklu kyselinou, zavření pětičetného bází

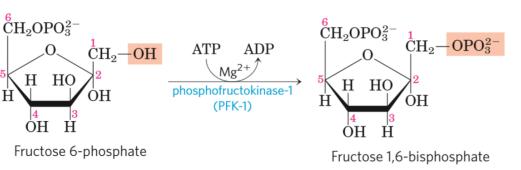


Obrázek 4.17: Druhá reakce v detailu

Stereospecifická reakce

Reakce, jejíž stereochemický výstup je dán konfigurací výchozích látek — dává různé stereoizomery produktů pro různé stereoizomery reaktantů, nebo s určitými stereoizomery reaktantů vůbec nereaguje.

Třetí reakce



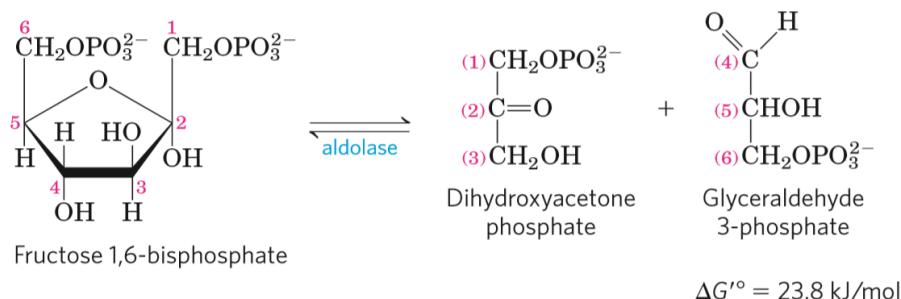
Obrázek 4.18: Třetí reakce

TŘETÍ REAKCE

- fosforylace fruktóza-6-fosfátu na fruktózu-1,6-bisfosfát (dále jen *F16BP*)
- nejdůležitější regulační reakce glykolýzy
- katalyzována fosfofruktokinázou
 - fosforyluje fruktóza-6 fosfát
- inhibována ATP (značí dostatek energie v buňce) a citrátem
- stimulována AMP (značí nedostatek energie v buňce)

- znovu dochází k uzavření aktivního místa a vytěsnění vody
- kofaktor: hořečnaté ionty

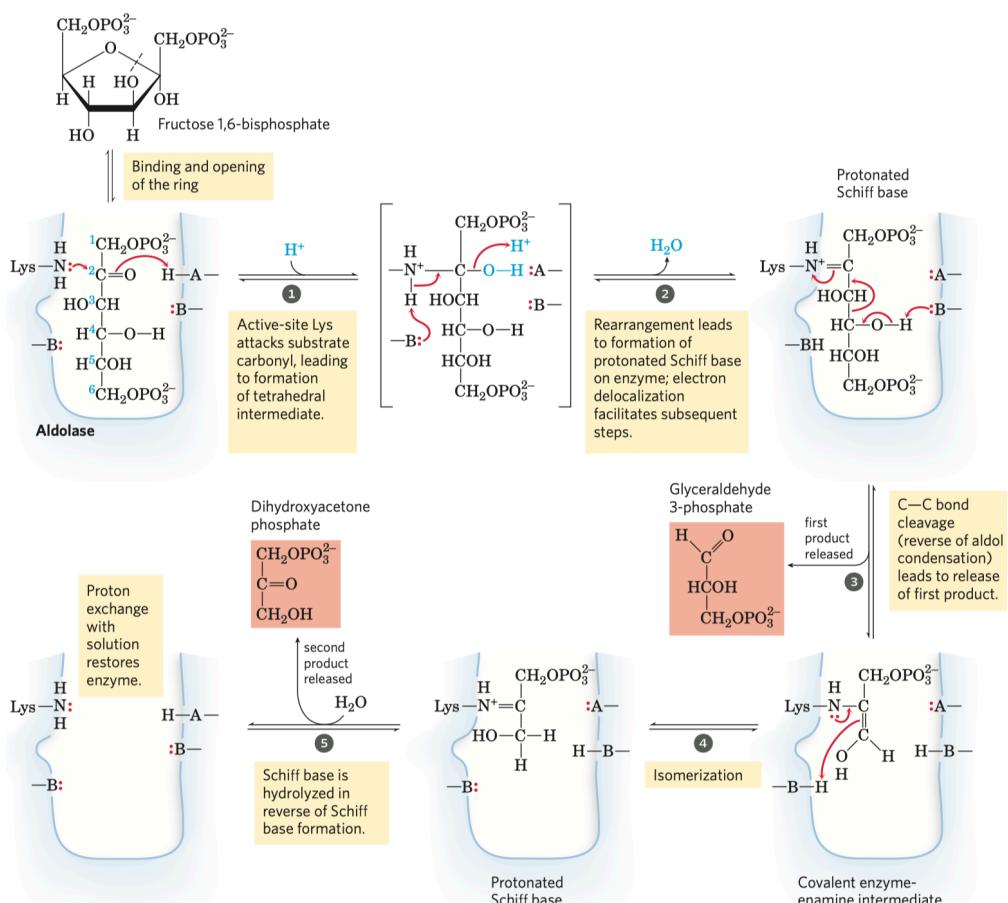
Čtvrtá reakce



Obrázek 4.19: Čtvrtá reakce

ČTVRTÁ REAKCE

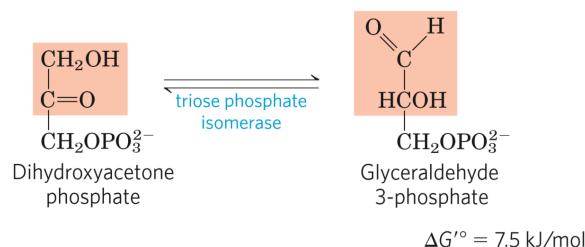
- F16BP je štěpena na 2 triózy:
 - glyceraldehyd-3-fosfát
 - dihydroxyacetonfosfát
- aldolázová reakce
 - katalyzována aldolázou (Schiffova báze)
 - dochází k aldolovému štěpení
 - * štěpení C-C vazeb (obtížné)
 - * F16BP spolu s aktivním centrem enzymu vytváří tzv. protonovanou Schiffovu bázi, v důsledku toho se delokalizují elektrony a je busnadvěno štěpení C-C vazby
 - důležitá přítomnost karbonylové skupiny na C(2) a hydroxylové skupiny na C(4)
 - dvě třídy aldoláz
 - Schiffova báze
 - zinečnaté kationty
 - * některé plísňe
 - * využití: vývoj plísňových inhibitorů



MECHANISM FIGURE 14–6 The class I aldolase reaction. The reaction shown here is the reverse of an aldol condensation. Note that cleavage between C-3 and C-4 depends on the presence of the carbonyl group at C-2, which is converted to an imine on the enzyme. A and B represent amino acid residues that serve as general acid (A) or base (B).

Obrázek 4.20: Čtvrtá reakce v detailu

Pátá reakce



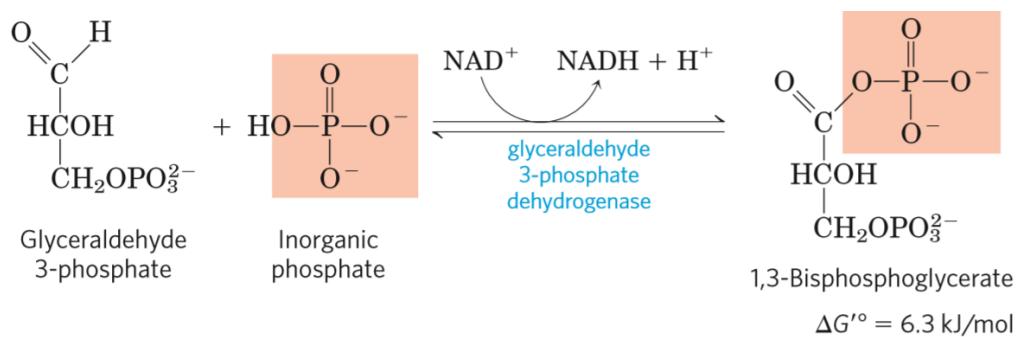
Obrázek 4.21: Pátá reakce

PÁTÁ REAKCE

- poslední z přípravné fáze
- reakce enzymu trióza-fosfát-izomerázy

- schopný vzájemně izomerizovat vzniklé triózy (z minulé reakce)
- alfa-beta barel z osmi beta-listů ukotvených osmi alfahelixu (častá struktura enzymů)
- uvnitř soudku je katalytické centrum
- uzavíratelný
- dokonalý enzym
 - * rychlosť reakcie limitovaná pouze rychlosťí srážky enzymu a substrátu
- acidobazická katalýza
- vzniká endiolový meziprodukt
- funguje v obou směrech

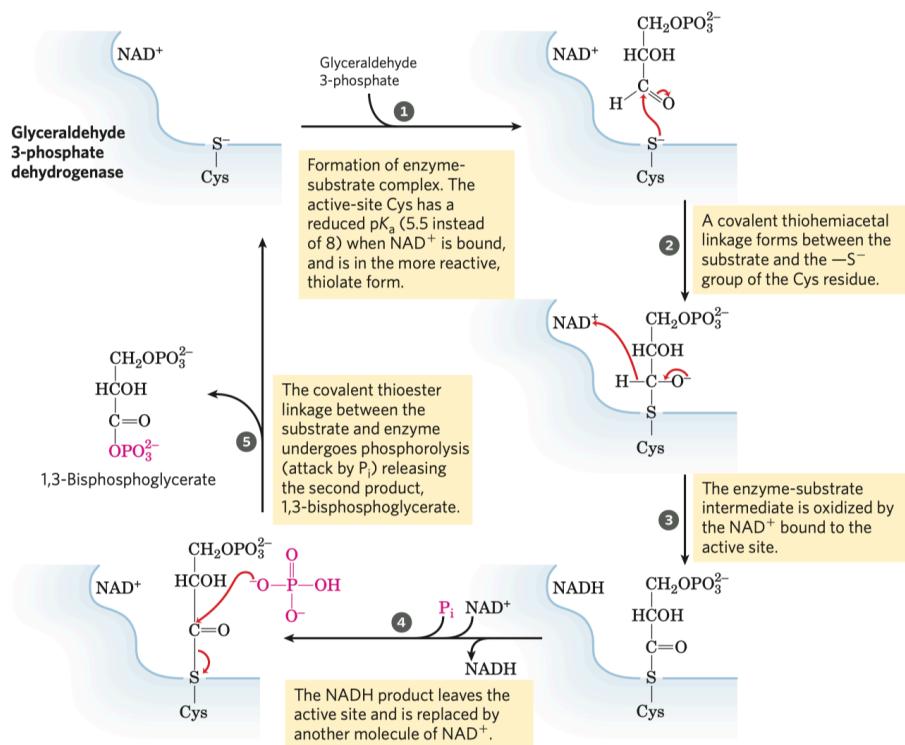
Šestá reakce



Obrázek 4.22: Šestá reakce

ŠESTÁ REAKCE

- katalýza glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy
- dochází k uskladnění chemické energie, která je využitelná pro další reakce a tvorbu ATP



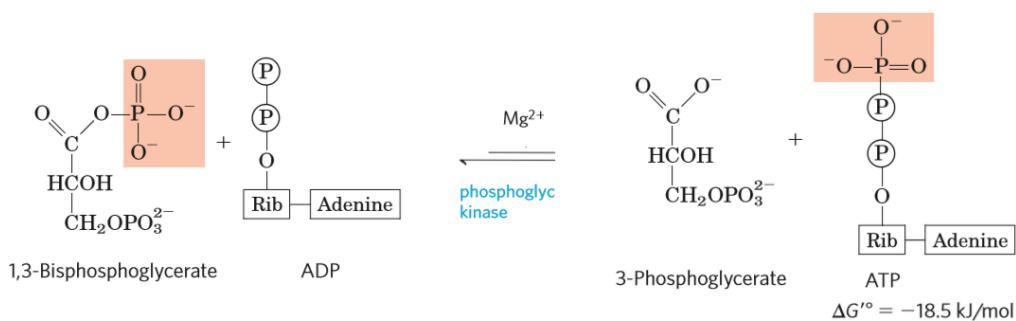
MECHANISM FIGURE 14–8 The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase reaction.

Obrázek 4.23: Šestá reakce v detailu

PRŮBĚH

- (1) glyceraldehyd-3-fosfát interaguje s SH skupinou v aktivním centru enzymu a vzniká thiohemiacetál
- (2) oxidace thiohemiacetálu pomocí oxidovaného koenzymu NAD^+ na acylthioester (karboxylová kyselina)
- (3) uvolňuje se energie, s její pomocí dojde k zabudování anorganického fosfátu z prostředí do glyceraldehyd-3-fosfátu za vzniku 1,3-bisfosfoglycerové kyseliny
- (4) tato energie bude využita v následující reakci k tvorbě ATP

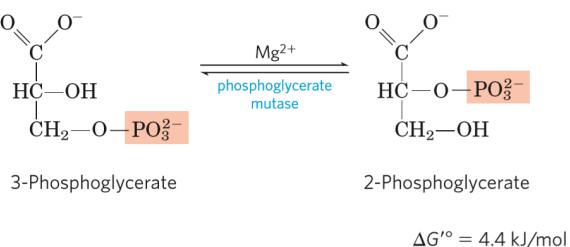
Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza se tak vyskytuje na všech možných místech, kde je požádána energie, např. ve spermích.

Sedmá reakce

Obrázek 4.24: Sedmá reakce

SEDMÁ REAKCE

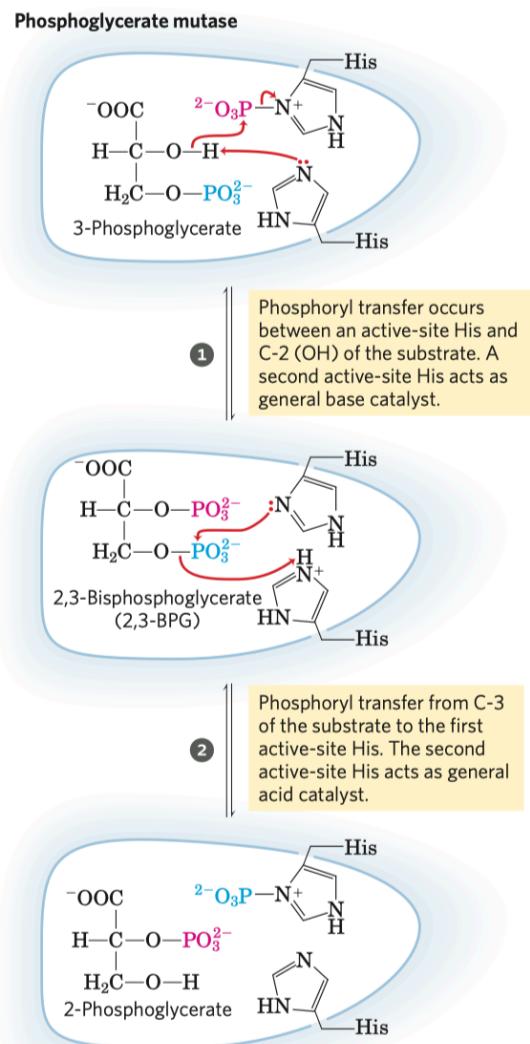
- katalyzována fosfoglycerátkinázou
 - mění 1,3-bisfosfoglycerát na 3-fosfoglycerát
 - tvorba ATP
- kofaktorem jsou hořčíkové kationty
- k tvorbě ATP je zde využit anorganický fosfát zabudovaný v šesté reakci
- v této reakci vzniká jedna molekula ATP na dvě molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu, ale z původní molekuly glukózy jsou to 2 molekuly ATP (z jedné glukózy se získají dvě triózy)
- odbočka: vznik 2,3-bisfosfoglycerátu
 - molekula snižující afinitu hemoglobinu pro kyslík
 - důsledek:
 - * mutace v hexokináze:
 - bude vznikat méně 2,3-bisfosfoglycerátu
 - větší afinita ke kyslíku,
 - * defekt v pyruvát-kináze
 - bude se hromadit 1,3-bisfosfoglycerát
 - nižší afinita ke kyslíku

Osmá reakce

Obrázek 4.25: Osmá reakce

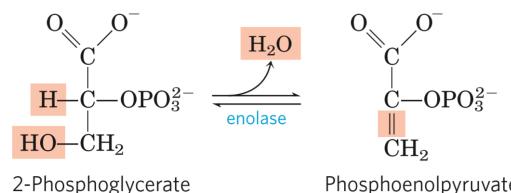
OSMÁ REAKCE

- přípravná reakce (ale ne v přípravné fázy glykolýzy)
- katalyzována fosfoglycerátmutázou
- přeměnu 3-fosfoglycerátu na 2-fosfoglycerát
- přes meziprodukt 2,3-bisfosforlycerát
- v katalytickém centru AK je histidin, který předává fosfát na druhý uhlík a následně je prohodí



MECHANISM FIGURE 14–9 The phosphoglycerate mutase reaction.

Obrázek 4.26: Osmá reakce v detailu

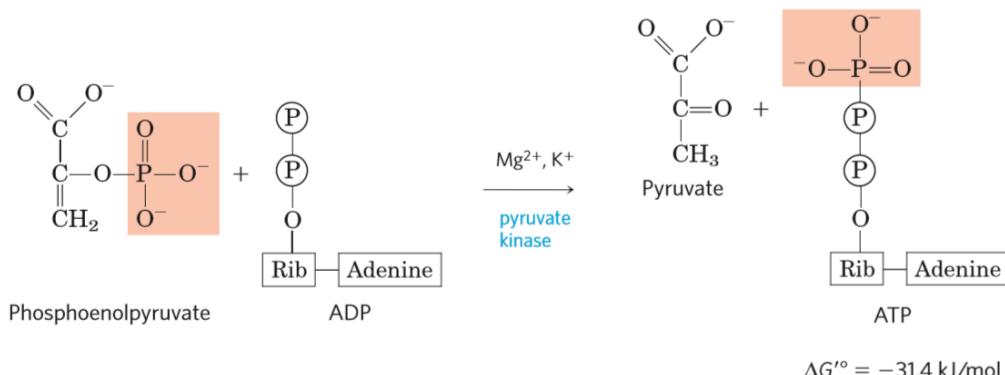
Devátá reakce

$$\Delta G'^\circ = 7.5 \text{ kJ/mol}$$

Obrázek 4.27: Devátá reakce

DEVÁTÁ REAKCE

- **enolázová reakce**
- katalyzovaná enolázou
- 2-fosfoglycerát se mění na fosfoenolpyruvát
- dehydrogenace
 - v první fázi dojde k odštěpení vodíkového protonu
 - v druhé fázi k odštěpení hydroxylové skupiny
- vzniká makroergní sloučenina fosfoenolpyruvát
 - ta bude v poslední reakci opět využita ke tvorbě ATP

Desátá reakce

$$\Delta G'^\circ = -31.4 \text{ kJ/mol}$$

Obrázek 4.28: Desátá reakce

DESÁTÁ REAKCE

- katalyzuje pyruvátkináza
- kofaktory: Mg a K kationt (stabilizace meziproduktu)
- tvorba ATP za využití energie z fosfoenolpyruvátu vzniklého v předchozím kroku
- Fosfoenolpyruvát \rightarrow enolpyruvát \rightarrow pyruvát

- enolpyruvát tutomerizován na pyruvát
 - * vysoká změna energie, ta je využita k syntéze ATP
- na jednu molekulu glukózy další 2 molekuly ATP

4.6.2 Zpracování pyruvátu za anaerobních podmínek

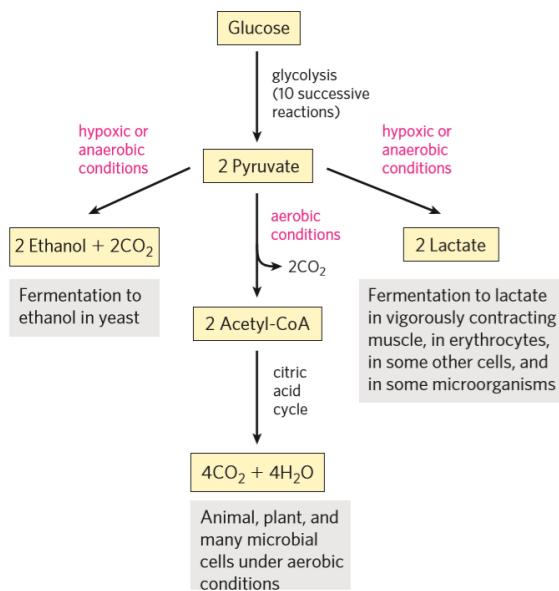
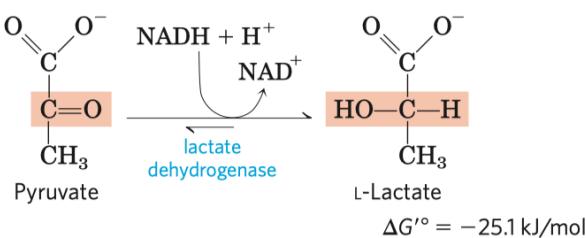


FIGURE 14-4 Three possible catabolic fates of the pyruvate formed in glycolysis. Pyruvate also serves as a precursor in many anabolic reactions, not shown here.

Obrázek 4.29: Kam se ubírá pyruvát poté, co vznikne v glykolýze

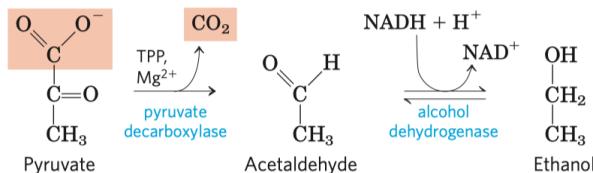
- po glykolýze v anaerobních podmínkách dochází k fermentaci
- jejím hlavním účelem je reoxidace koenzymu NADP na NAD⁺
 - NAD⁺ je potřeba pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázovou reakci



Obrázek 4.30: Laktátové kvašení

LAKTÁTOVÉ KVAŠENÍ

- pyruvát se mění na laktát
- dochází k reoxidaci NADP



Obrázek 4.31: Alkoholové kvašení

ALKOHOLOVÉ KVAŠENÍ

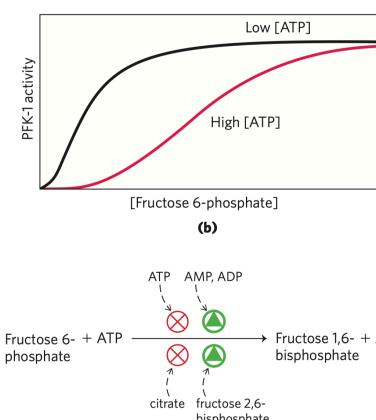
- má dva kroky (viz obrázek), prochází před meziprodukt acetaldehyd
 - důležitým kofaktorem té první reakce je thiaminpyrofosfát,
 - obecně se účastní dekarboxylací v buňce (např. dekarboxylací AK, proto thiamin patří mezi vitamíny řady B)
 - při druhé reakci dochází k reoxidaci, jako kofaktor zde slouží zinek

4.6.3 Regulace glykolýzy

ÚROVNĚ REGULACE

- lokální a globální
 - pomocí hormonů
 - geneticky
 - ovlivněním exprese
 - alostericky
 - pomocí alosterických inhibitorů a aktivátorů
 - posttranslačními modifikacemi
 - fosforylací

Většina glykolytických enzymů navíc potřebuje kofaktory (u všech kináz jsou to ionty Mg).



Obrázek 4.32: Vliv koncentrace ATP na funkci PFK

PŘÍKLADY

- do glykolýzy mohou vstupovat i jiné substráty, než glukóza
 - například fruktóza-6-fosfát ve svalových a jaterních buňkách
 - * hexokináza ve svalech schopná fosforylovat jak glukózu, tak fruktózu
 - * v jaterních buňkách není, jsou tam specifické enzymy fosfoglukokináza a fosfofruktokináza
 - galaktóza-1-fosfát -> glukóza-6-fosfát
 - manóza -> manóza-6-fosfát -> fruktóza-6-fosfát

[SIGNÁLNÍ FUNKCE GLYKOLÝZY]

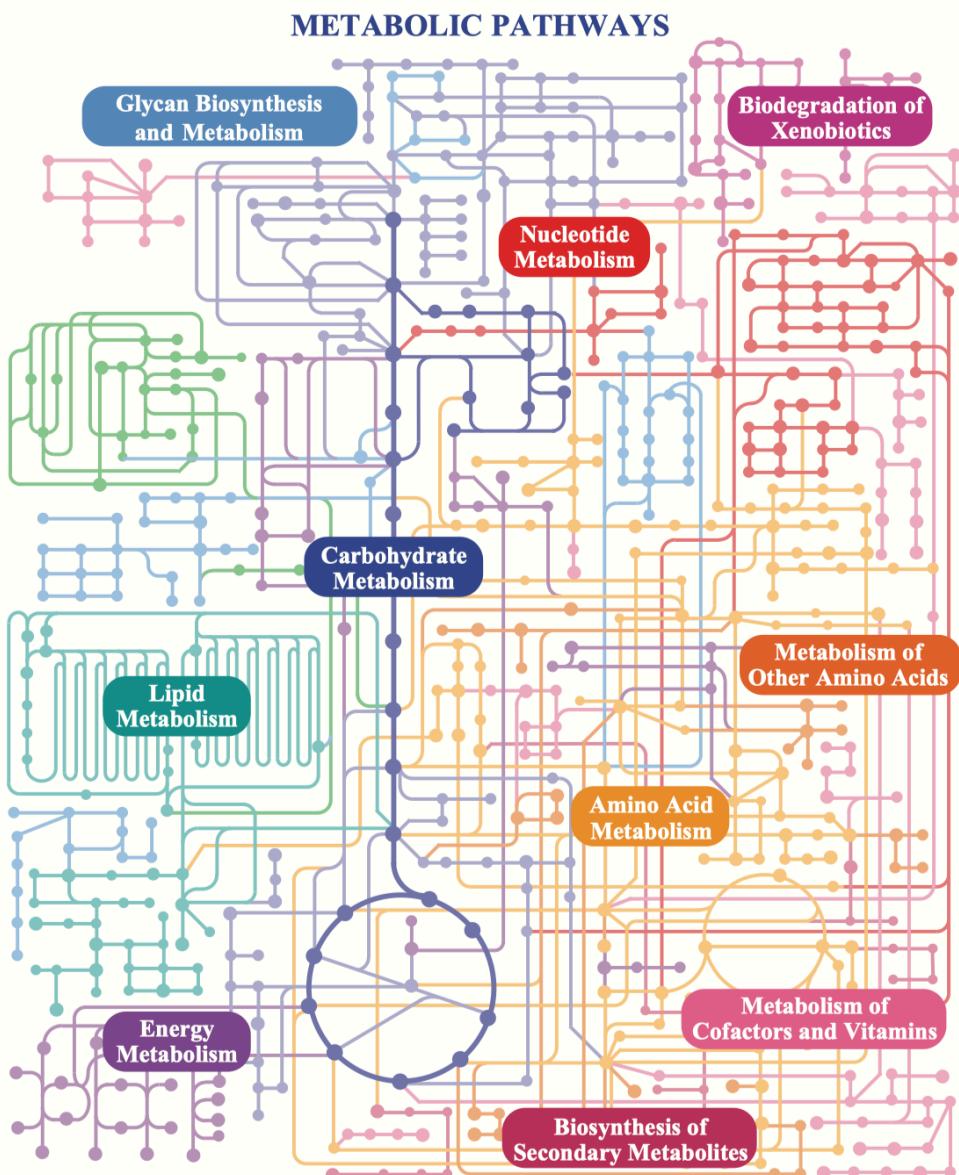
- glykolitické enzymy mají i signální funkce
 - hexokináza
 - * regulace transkripce
 - glyceraldehyd
 - * vazba NAD⁺
 - * replikace
 - * transkripce
- nádorové buňky používají glykolýzu i za anaerobních podmínek, čímž tvoří kyselé vnější prostředí

4.7 Cyklus kyseliny citronové

- má mnoho jmen
 - cyklus kyseliny citronové (CKC)
 - * tak jej nazval objevitel
 - cyklus trikarboxylových kyselin
 - * kyselina citrónová byla zpochybněna jako intermediát cyklu
 - * vědělo se ale, že tam je nějaká trikarboxylová kyselina
 - Krebsův cyklus
 - * podle objevitele (pozn. redaktora viz níže)

META

Der Krebs je německy cancer. Go figure.



Obrázek 4.33: Metabolická mapa, tečky jsou intermediáty enzymatických reakcí, čárky jsou přímo reakce

POPIS OBRÁZKU

- tlustou svislou čarou je vyznačena glykolýza, končí na **pyruvátu** (kyselině pyrohroznové)
- pyruvát vstupuje do velkého množství reakcí, např. mléčného kvašení, lakteátdehydrogenázové reakce a alkoholového kvašení, většinou však přes další molekulu vstupuje právě do CKC

Na pyruvátu a dalších molekulách se dá demonstrovat vlastnost katabolismu, který využívá energeticky bohaté sloučeniny z potravy na ATP a zisk buněčné energie.

ENERGETICKY BOHATÉ MOLEKULY

- proteiny, lipidy, sacharidy
- získáváme je zvenčí, v organismu jsou poté degradovány — všechny tyto vysoko rozdílné molekuly se v rámci katabolismu sjednotí a setkají se v jedné univerzální molekule, acetyl koenzym A
- získáváme je zvenčí, v organismu jsou poté degradovány — všechny tyto vysoko rozdílné molekuly se v rámci katabolismu sjednotí a setkají se v jedné univerzální molekule, **acetyl koenzymu A** (acetyl-CoA)
 - acetyl-CoA je univerzální přenašeč acylových skupin (COOH po odtržení OH)
 - acetyl-CoA je také přenašeč acetyllové skupiny (CH_3CO)

[POZNÁMKA]

Jak KC vznikl? Dráha (někdy neúplná) probíhá v některých bakteriích, část i obráceně (slouží k redukci).

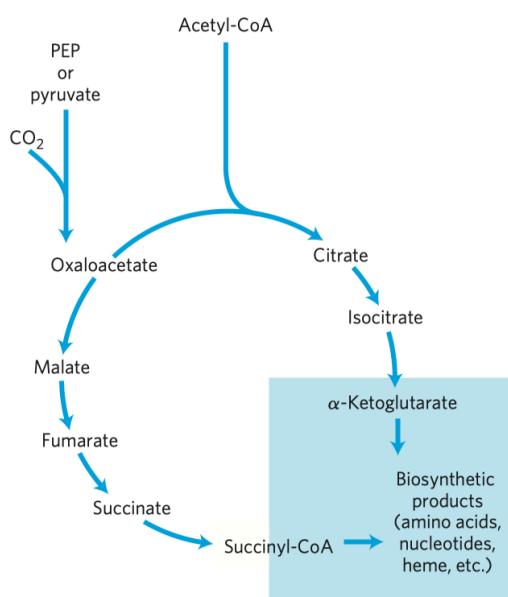


FIGURE 16–15 Biosynthetic precursors produced by an incomplete citric acid cycle in anaerobic bacteria. These anaerobes lack α -ketoglutarate dehydrogenase and therefore cannot carry out the complete citric acid cycle. α -Ketoglutarate and succinyl-CoA serve as precursors in a variety of biosynthetic pathways. (See Fig. 16–14 for the “normal” direction of these reactions in the citric acid cycle.)

Obrázek 4.34: Neúplný KC v anaerobních bakteriích

Celá dráha kromě zpracování acetyl-CoA a uvolnění NADH tvoří také různé intermediáty, které jsou užitečné pro syntézy.

Některé AK se na acetyl-CoA nemění; vždy ale dochází k oxidaci (přenos elektronů), což zařizuje **glyceraldehydfosfát-dehydrogenáza**. Vzniká NADH, který je poté někdy použit v mch na syntézu ATP v rámci elektrontransportního řetězce.

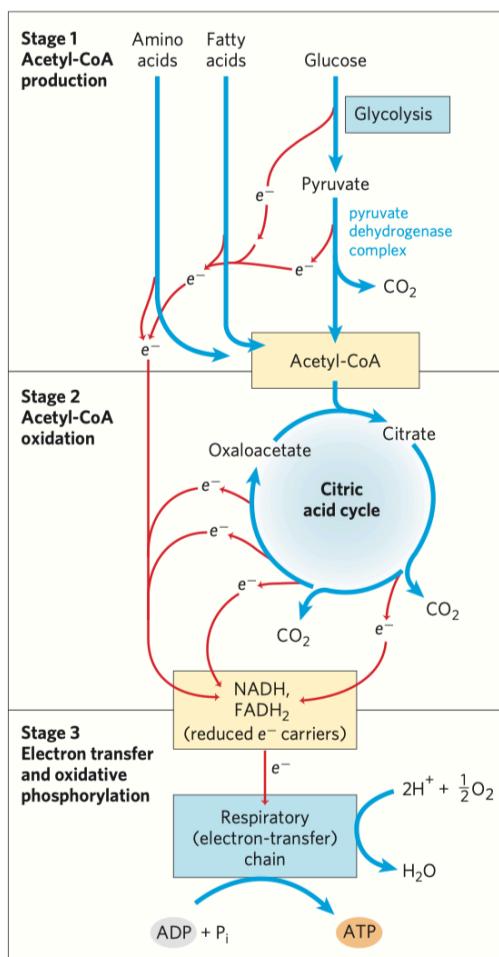


FIGURE 16–1 Catabolism of proteins, fats, and carbohydrates in the three stages of cellular respiration. Stage 1: oxidation of fatty acids, glucose, and some amino acids yields acetyl-CoA. Stage 2: oxidation of acetyl groups in the citric acid cycle includes four steps in which electrons are abstracted. Stage 3: electrons carried by NADH and FADH₂ are funneled into a chain of mitochondrial (or, in bacteria, plasma membrane-bound) electron carriers—the respiratory chain—ultimately reducing O₂ to H₂O. This electron flow drives the production of ATP.

Obrázek 4.35: Pohled na metabolismus cukrů, tuků a bílkovin

TŘI FÁZE KATABOLISMU V METABOLICKÝCH DRAHÁCH

- (1) konvergující dráhy vedoucí k acetyl-CoA
 - glykolýza, beta-oxidace mastných kyselin, rozštěpení na dvě triózy
- (2) Krebsův cyklus
- (3) oxidativní fosforylace

[KONVERGUJÍCÍ DRÁHY]

- z různých látek vznikne jen několik produktů
- energetické molekuly směřují k acetyl-CoA
- pak je cyklus trikarboxylových kyselin, z nich se tvoří molekula GTP (nebo ATP), dvě molekuly CO₂ a redukované koenzymy
 - na jednu molekulu glukózy vznikají redukované koenzymy na šesti místech a všechny nesou vysokoenergetické elektrony, které odejmuli při oxidačních reakcích
 - energie může být využita k syntéze ATP oxidací těchto koenzymů

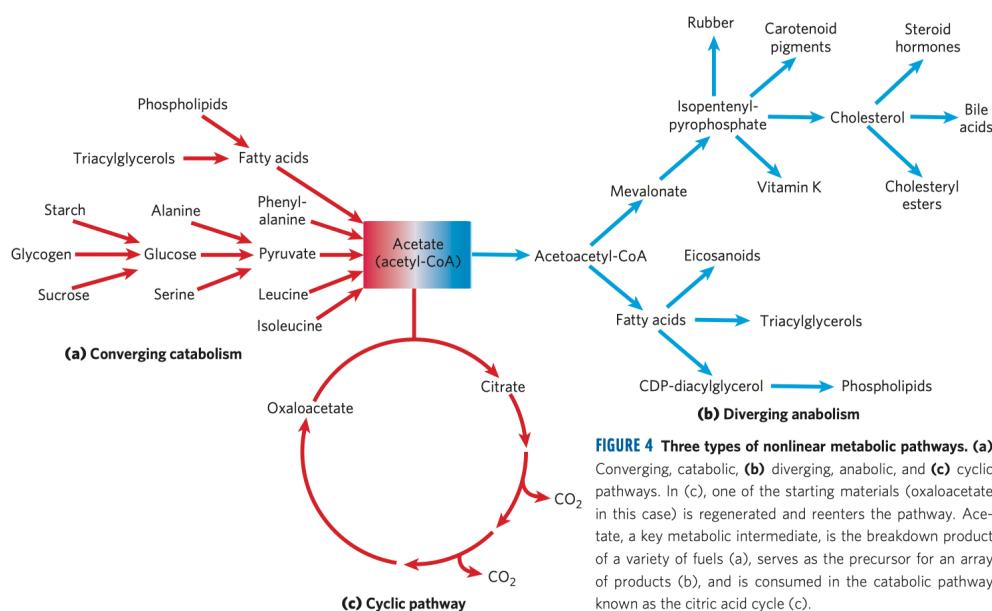
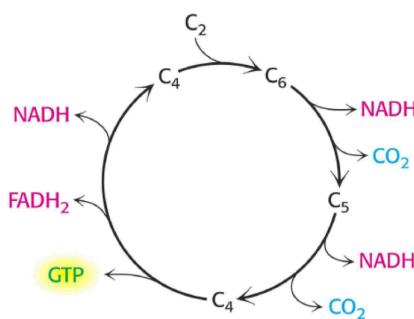


FIGURE 4 Three types of nonlinear metabolic pathways. (a) Converging catabolic, (b) diverging, anabolic, and (c) cyclic pathways. In (c), one of the starting materials (oxaloacetate in this case) is regenerated and reenters the pathway. Acetate, a key metabolic intermediate, is the breakdown product of a variety of fuels (a), serves as the precursor for an array of products (b), and is consumed in the catabolic pathway known as the citric acid cycle (c).

Obrázek 4.36: Aerobní katabolismus, příklady konvergentních, cyklických i divergentních metabolických drah

CYKLUS ZJEDNODUŠENÉ

- (1) vstupuje dvojuhlíkatý (C2) acetyl-CoA a s C4 oxalacetátem tvoří C6
- (2) ta je ve sledu sedmi reakcí dvakrát dekarboxylována, uvolní se dvě molekuly CO₂ (co je většina toho CO₂, který vydechujeme)
- (3) dva uhlíky se uvolní během cyklického pochodu
- (4) další uvolňované molekuly jsou čtyři redukované koenzymy
- (5) jako bonus vzniká jedna molekula makroergního fosfátu (např. GTP, ale to záleží na organismu)



Obrázek 4.37: Krebsův cyklus, základní schéma

[O LOKALIZACI CKC]

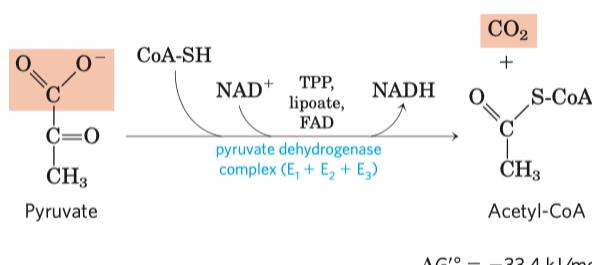
Krebsův cyklus je lokalizován v mch, glykolýza byla v cytoplasmě, pyruvát po pyruvát-kinázovou reakci je ještě v cytoplasmě. Pyruvát pak přejde dovnitř mch, kde už je zbytek reakcí.

[POZNÁMKA]

H. Krebs na cyklus neobjevil sám, pracovali na tom i jiní; postupně objevovali jednotlivé molekuly, určovali pořadí, používali inhibitory, koukali, co se kde hromadí. Pracovali se na preparátu rozemletého prsního svalu holuba, protože je to hodně aerobně aktivní tkáň, a cyklus je zde také velmi aktivní. Když ale sval rozemleli, rozemleli s ním i mch. Krebs objevenou lineární dráhu uzavřel do cyklu, to je jeho přínos.

4.7.1 Komplex pyruvát dehydrogenázy (PDC)

Stará se přeměny pyruvátu, který je výstupem glykolýzy, na acetyl-CoA, který potřebujeme v KC.



Obrázek 4.38: Vznik acetyl-CoA, pyruvát dehydrogenázová reakce

O REAKCI

- oxidativní dekarboxylace, ztratí se jeden CO_2 a dva elektrony
- průběh reakce není tak jednoduchý jak by napovídala obrázek, pyruvát-dehydrogenázový enzym je komplex enzymů E1, E2, E3 a pěti koenzymů
- změna volné energie je silně záporná, acetyl-CoA je tedy makroergní sloučenina

Struktura

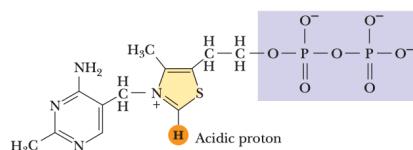
TODO

Předělat následující do tabulky.

PŘEHLED ENZYMŮ A KOENZYMŮ

- E1 katalyzuje oxidativní dekarboxylaci pyruvátu
 - pevně váže koenzym TPP (thiamin pyrofosfát)
- E2 (dihydrolipoyl-transacetyláza) katalyzuje přenos acetlyové skupiny vzniklé v první reakci na acetyl-CoA
 - pevně váže koenzym kyselinu lipoovou, která je vázána na amidovou skupinu (proto se jmenuje lipoamid)
 - volně váže CoA, který pro E2 funguje jako substrát
- E3 (dihydrolipoyl-dehydrogenáza) regeneruje oxidovanou formu lipoamidu
 - pevně váže koenzym FAD (flavin-adenin-dinukleotid), na který jdou elektrony
 - volně váže koenzym NAD^+ (nicotinamid adenin dinukleotid), který pro E3 funguje jako substrát
- v komplexu se u *E. coli* objevuje 24 krát E1, 24 krát E2 a 12 krát E3, celý komplex má 4500Da

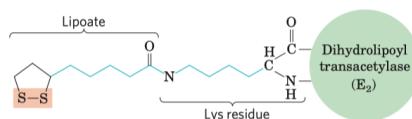
Přiblížíme si ty pevně vázané a jeden z těch volných.



Obrázek 4.39: Thyamin-pyrofosfát, TPP

THYAMIN-PYROFOSFÁT

- ze dvou cyklických částí, je tam pyrofosfátová skupina
- vyskytuje se v celé řadě enzymů, kde se přenáší nějaké skupiny, zde přenáší acetlyovou
- jeho zdrojem je vitamín thiamin
 - tělo jej neumí samo syntetizovat, nedostatek vede k nemoci beri-beri



Obrázek 4.40: Lipoamid

LIOPAMID

- skládá se z vlastní kyseliny lipoové
- kyselina lipoová může být oxidovaná či redukovaná, protože síra může nést redukující ekvivalenty
- je možná ještě třetí forma — síra může nést acetylouovou skupinu
- funguje jako přenašeč, je připojený na molekulu lysinu
 - Lys je dlouhý, kys. lipoová také => spolu tvoří dlouhé rameno, které se může pohybovat mezi dvěma aktivními místy dvou enzymů
 - rameno může v jedné pozici převzít redukční ekvivalenty a acetylouovou skupinu, přehoupnout se jinam a tam náklad odevzdat a redukovat se
 - někdy se tomu říká lipoyl-lysin

[POZNÁMKA]

Na síru jsme narazili i u Cys. Ten umí dělat disulfidické můstky, které jsou důležité např. při tvorbě terciální struktury proteinu (např. u inzulinu).

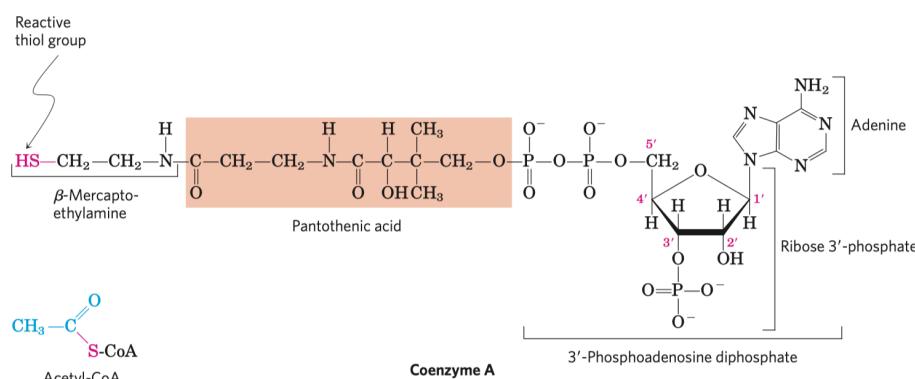


FIGURE 16-3 Coenzyme A (CoA). A hydroxyl group of pantothenic acid is joined to a modified ADP moiety by a phosphate ester bond, and its carboxyl group is attached to β -mercaptoproethylamine in amide linkage. The hydroxyl group at the 3' position of the ADP moiety has a phosphoryl group not present in free ADP. The $-SH$ group of the mercaptoethylamine moiety forms a thioester with acetate in acetyl-CoA (Acetyl-CoA) (lower left).

Obrázek 4.41: Koenzym A

KOENZYM A

- poměrně veliká molekula, má motiv společný pro mnoho biomolekul
- obsahuje adenin, ribózu, pyrofosfát
 - vypadá jako NAD nebo ADP ale je tam ribóza fosforylovaná na C3
- merkapto-ethylamin může tvořit vazbu s acetylouovými skupinami (např. v acetyl-CoA)

A dále ještě NAD(H).

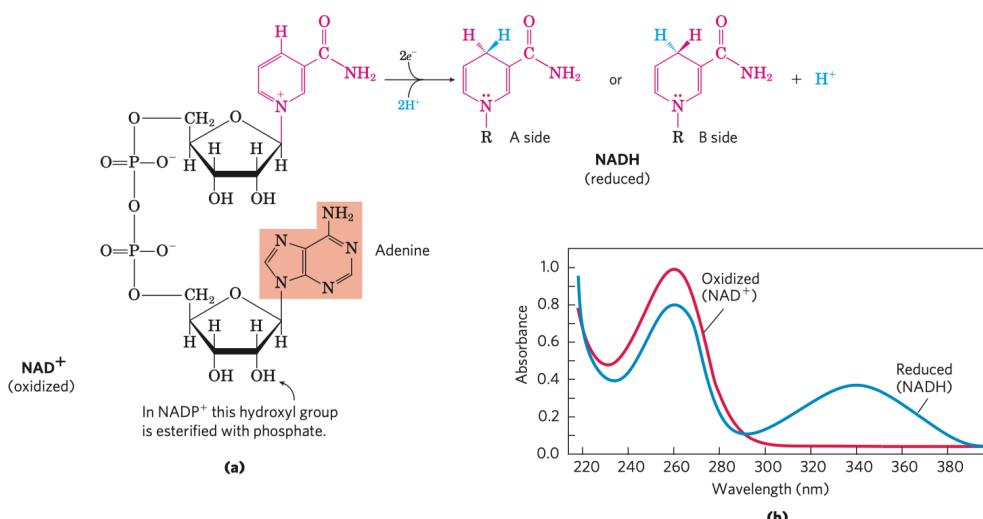


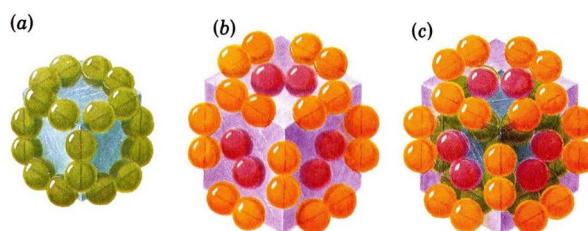
FIGURE 13-24 NAD and NADP. (a) Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺, and its phosphorylated analog NADP⁺ undergo reduction to NADH and NADPH, accepting a hydride ion (two electrons and one proton) from an oxidizable substrate. The hydride ion is added to either the front (the A side) or the back (the B side) of the planar nicotinamide ring (see Table 13-8). (b) The UV absorption spectra of NAD⁺ and

NADH. Reduction of the nicotinamide ring produces a new, broad absorption band with a maximum at 340 nm. The production of NADH during an enzyme-catalyzed reaction can be conveniently followed by observing the appearance of the absorbance at 340 nm (molar extinction coefficient $\epsilon_{340} = 6,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Obrázek 4.42: NAD(H) a NADP(H)

CELKOVÁ STRUKTURA

- u E. coli (a dalších prokaryot a G⁺ bakterií) je organizován do dvou pomyslných krychlí
 - na vnitřní jsou E2 (8 vrcholů, na každém jsou tři E2, celkem 24)
 - na vnější jsou E1 (2 na 12 hranách, tj. 24) a E3 (2 na 6 stěnách, tj. 12)
 - dohromady máme 60 podjednotek tvořících PDC
- u lidí a G⁻ bakterií je to složitější, PDC je organizován do dvou vnořených dvanáctistěnu
 - jeden vvnitř (20 krát E2), jeden vně (30 krát E1 tetramer na každé hraně, 12 krát E3 dimer na každé stěně)
 - celkem 204 podjednotek, 10MDa
 - tento komplex je v mch matrix a všechny proteiny jsou kódovány v jádře => musí se tam nějak dostat a pak se poskládat do dvanáctistěnu
 - * genetické vady ve struktuře/transportu/poskládání jsou letální



Obrázek 4.43: Celková struktura PDC u E. coli: (a) je vnitřní krychle s 24 E2, (b) je vnější krychle s 24 E1 (oranžová) a 12 E3 (červená), (c) je (a) + (b)

Funkce

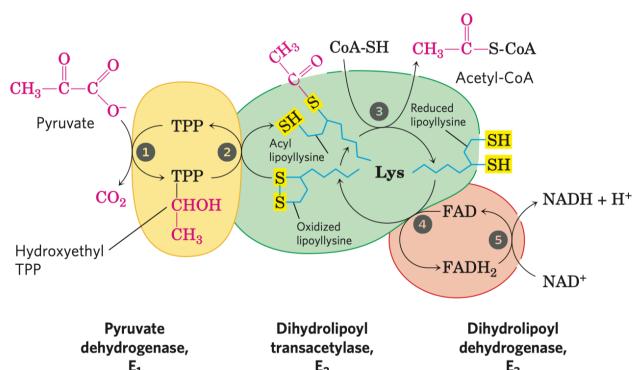


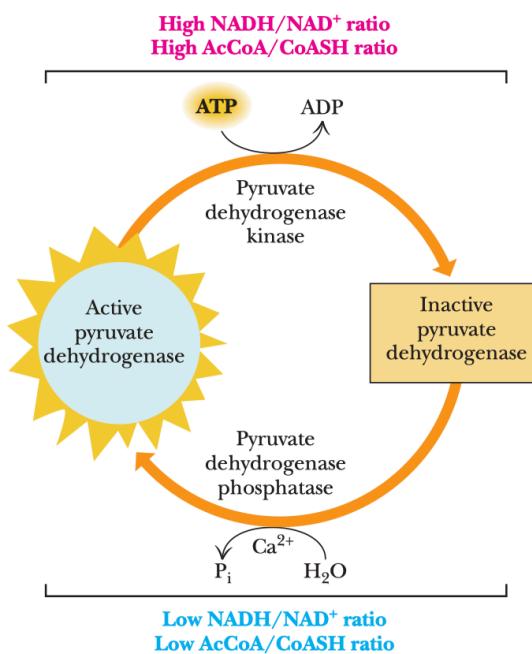
FIGURE 16–6 Oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA by the PDH complex. The fate of pyruvate is traced in red. In step ① pyruvate reacts with the bound thiamine pyrophosphate (TPP) of pyruvate dehydrogenase (E_1), undergoing decarboxylation to the hydroxyethyl derivative (see Fig. 14–15). Pyruvate dehydrogenase also carries out step ②, the transfer of two electrons and the acetyl group from TPP to the oxidized form of the lipoyllysyl group of the core enzyme, dihydrolipoyl transacetylase (E_2), to form the acetyl thioester of the reduced lipoyl group. Step ③ is

a transesterification in which the $-SH$ group of CoA replaces the $-SH$ group of E_2 to yield acetyl-CoA and the fully reduced (dithiol) form of the lipoyl group. In step ④ dihydrolipoyl dehydrogenase (E_3) promotes transfer of two hydrogen atoms from the reduced lipoyl groups of E_2 to the FAD prosthetic group of E_3 , restoring the oxidized form of the lipoyllysyl group of E_2 . In step ⑤ the reduced $FADH_2$ of E_3 transfers a hydride ion to NAD^+ , forming $NADH$. The enzyme complex is now ready for another catalytic cycle. (Subunit colors correspond to those in Fig. 16–5b.)

Obrázek 4.44: Oxidativní dekarboxylace pyruvátu na acetyl-CoA PDH komplexem

POPIS REAKCE (TAKÉ VIZ OBRÁZEK)

- (1) pyruvát se dekarboxyluje, vzniká acetyllová skupina vázající se na TPP
- (2) na lipoamid je přenesena acetyllová skupina a je redukována jedna sirná skupina na ky-selině lipoové
- (3) acetyllová skupina je přenesena na CoA a redukuje se i druhá síra na lipoamidu
 - produkty již vznikly, je už jen potřeba vrátit enzym do původního stavu
- (4) FAD se redukuje na $FADH_2$, síry na E_2 jsou nyní opět oxidovány
 - vodíky mu dopraví raménko z E_2
- (5) $FADH_2$ předá vodíky NAD^+ ($\rightarrow NADH + H^+$), E_3 je nyní v původním stavu
 - $NADH + H^+$ předá protony do elektron-transportního řetězce na membráně, kam se k enzymu pevně připoutaný FAD nedostane



Obrázek 4.45: Regulace PDC

PRINCIPY REGULACE

- kromě alosterické regulace je komplex regulován i kovalentními modifikacemi, fosforylací a defosforylací
 - jsou na ní Ser či Thr skupiny, kam se může fosfátová skupina vázat
 - kináza-pyruvátdehydrogenáza a fosfatázy, které ten fosfát zase odštěpí
- regulace závisí na koncentraci produktů a reaktantů
 - když je nadbytek acetyl-CoA nebo NADH, čili jednoho z produktů, tak je kináza aktivní a PDC brzdí
 - když je moc pyruvátu či ADP, tak se kináza inaktivuje a celé se to zrychlí
 - kináza je ke komplexu připojena stále
 - fosfatáza je aktivována hlavně vápníkem (*důležitý druhý posel*), připojuje se ke komplexu jen dočasně

INHIBICE

- arsen se váže na thiolové skupiny lipoátu, zamezí tím navázání acetylové skupiny a přenos acetátu z prvního enzymu na koenzym A
 - tzv. **chelatují** (obsadí) enzym
- využití arsenu
 - jedy
 - za války se používal lewisit (sloučenina arsenu), Britové používali british antilewisid
 - * antilewisid se navázel na lewisid a sloučenina se vyloučila v moči
 - léčba (např. syfilis), preantibiotikum

- * některí parazitičtí prvoci (trypanosomy, plasmodia a další,) mají PDC citlivější než my, když se vytítruje správná koncentrace, nás to nezabije, ale je ano
- příklady otravy: Napoleon, kloboučník z Alenky (proto byl šílený), původní fotografové

POZNÁMKA BOKEM

4.7.2 Reakce KC

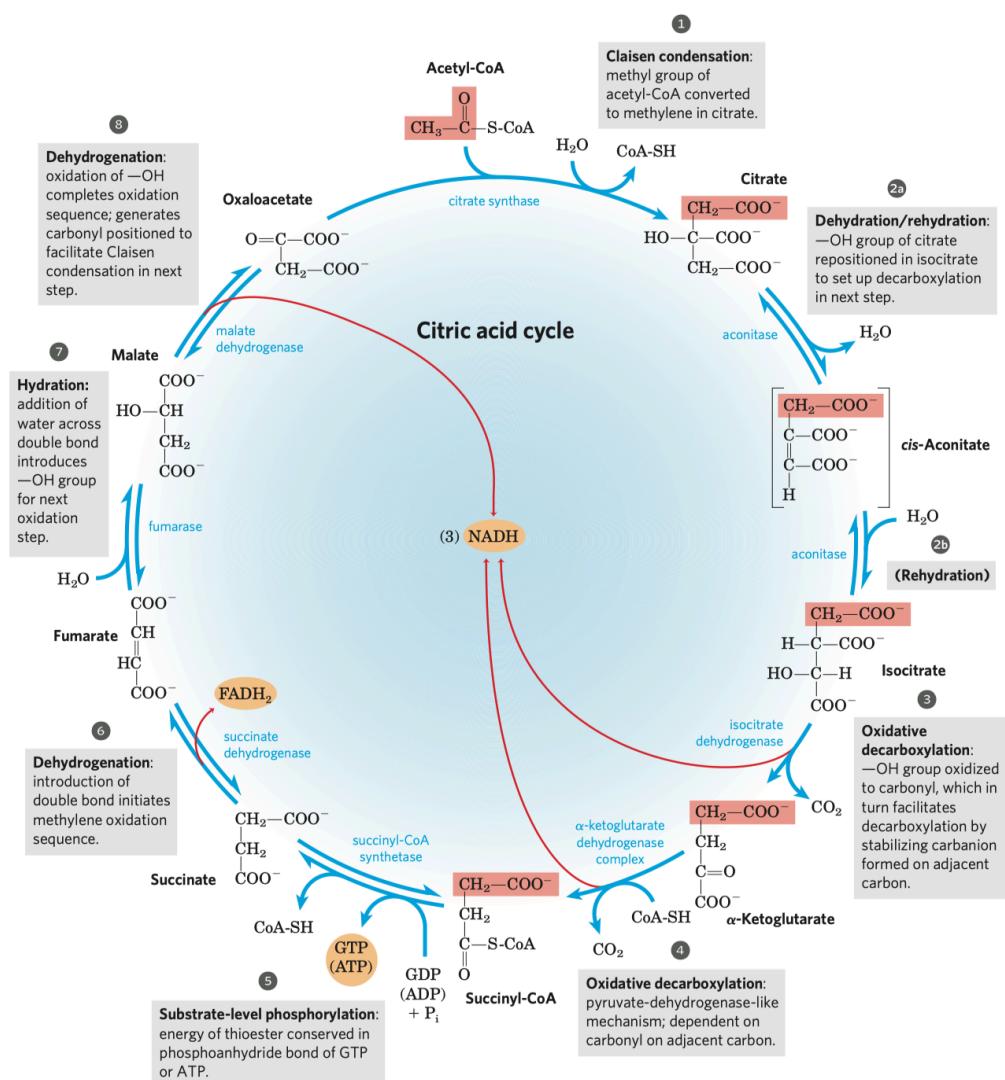


FIGURE 16–7 Reactions of the citric acid cycle. The carbon atoms shaded in pink are those derived from the acetate of acetyl-CoA in the first turn of the cycle; these are not the carbons released as CO₂ in the first turn. Note that in succinate and fumarate, the two-carbon group derived from acetate can no longer be specifically denoted; because succinate and fumarate are symmetric molecules, C-1 and C-2 are indistinguishable from C-4 and C-3. The number beside each reaction step corresponds to a numbered heading on pages 640–647). The red arrows show where energy is conserved by electron transfer to FAD or NAD⁺, forming FADH₂ or NADH + H⁺. Steps ①, ③, and ④ are essentially irreversible in the cell; all other steps are reversible. The nucleoside triphosphate product of step ⑤ may be either ATP or GTP, depending on which succinyl-CoA synthetase isozyme is the catalyst.

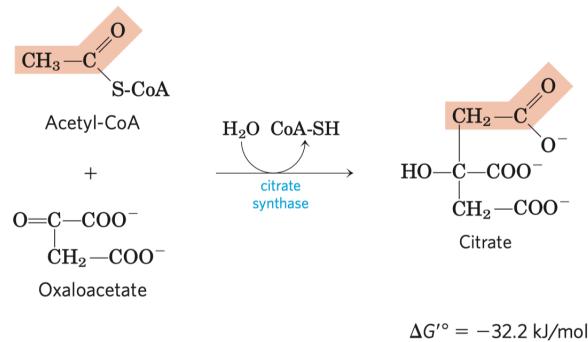
ber beside each reaction step corresponds to a numbered heading on pages 640–647). The red arrows show where energy is conserved by electron transfer to FAD or NAD⁺, forming FADH₂ or NADH + H⁺. Steps ①, ③, and ④ are essentially irreversible in the cell; all other steps are reversible. The nucleoside triphosphate product of step ⑤ may be either ATP or GTP, depending on which succinyl-CoA synthetase isozyme is the catalyst.

Obrázek 4.46: Krebsův cyklus v detailu

Hlavní průběh (produkty, enzymy, atp.) viz obrázek. Následují pouze poznámky k jednotlivým fázím.

POZNÁMKA BOKEM

První reakce



Obrázek 4.47: První reakce (citrát-syntázová)

PRVNÍ REAKCE (CITRÁT-SYNTÁZOVÁ)

- exergonická
- typický příklad uspořádané enzymatické reakce: nejprve se naváže oxalacetát a až pak se může navázat acetyl-CoA
- syntáza (ne syntetáza) => nepotřebuje makroergní molekulu

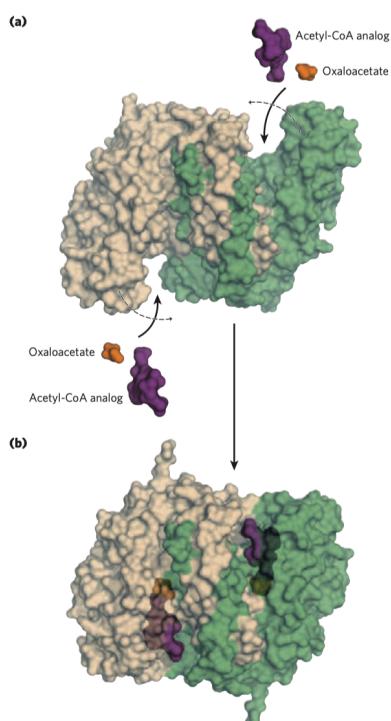


FIGURE 16-8 Structure of citrate synthase. The flexible domain of each subunit undergoes a large conformational change on binding oxaloacetate, creating a binding site for acetyl-CoA. **(a)** Open form of the enzyme alone (PDB ID 5CSC); **(b)** closed form with bound oxaloacetate and a stable analog of acetyl-CoA (carboxymethyl-CoA) (derived from PDB ID 5CTS). In these representations one subunit is colored tan and one green.

Obrázek 4.48: Struktura citrát-syntázy

[PROCHIRALITA CITRÁTU]

Prochirální molekuly

Organické molekuly, které ač nejsou chirální, mají potenciál reagovat asymetricky, pokud se výžou na asymetrická vazebná místa.

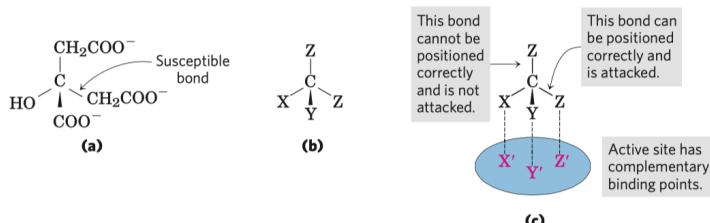
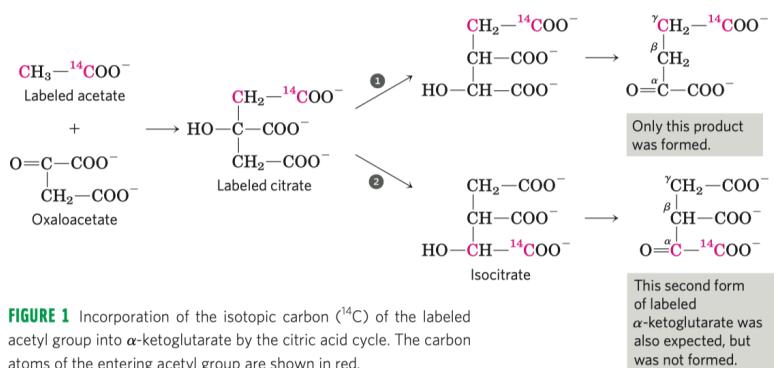


FIGURE 2 The prochiral nature of citrate. **(a)** Structure of citrate; **(b)** schematic representation of citrate: $X = -\text{OH}$; $Y = \text{COO}^-$; $Z = -\text{CH}_2\text{COO}^-$. **(c)** Correct complementary fit of citrate to the binding

site of aconitase. There is only one way in which the three specified groups of citrate can fit on the three points of the binding site. Thus only one of the two $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ groups is bound by aconitase.

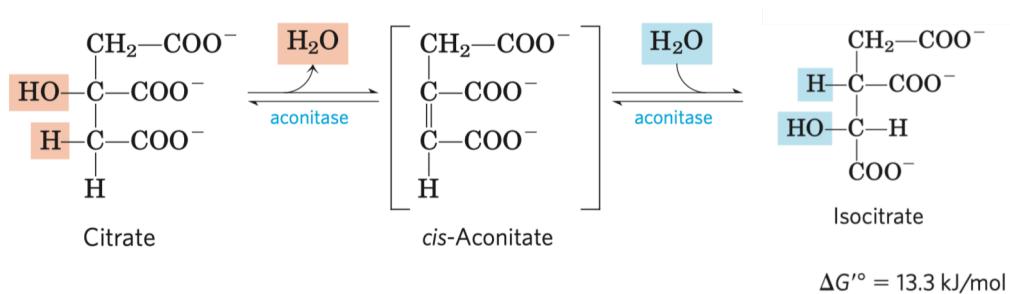
Obrázek 4.49: Prochirálnost citrátu

CITRÁT

- viz obrázek
- citrát je symetrická molekula
 - má dvě stejné COO^- skupiny, ze kterých se uhlíky po reakci objeví na dvou různých místech v α -ketoglutarátu
 - dalo by se čekat, že oba uhlíky z citrátu skončí na obou místech v molekule se stejnou pravděpodobností (symetricky)
- po pokusech s označenými izotopy uhlíku se ale ukázalo, že jeden uhlík vždy skončí na tom prvním a druhý vždy na tom druhém místě
 - z toho se vyvodilo, že ať už se na α -ketoglutarát mění cokoli, nic symetrického to není — tedy určitě ne citrát
 - * proto se měnil název cyklu
- nakonec se zjistilo, že je to opravdu citrát, ale že se chová prochirálně — na enzymu jsou tři vazebná místa, na která se citrát musí přesně strefit, a to jde pouze jedním způsobem
 \Rightarrow citrát reaguje **asymetricky**, přestože je symetrický \Rightarrow konkrétní uhlík vždy skončí na stejném místě

POZNÁMKA BOKEM

Druhá reakce



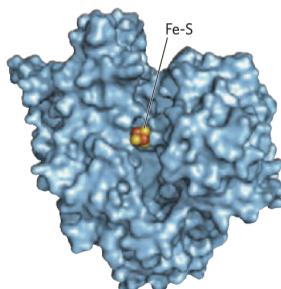
Obrázek 4.50: Druhá reakce

DRUHÁ REAKCE

- přeměnu sekundárního alkoholu na terciální (přenos hydroxylové skupiny z jednoho uhlíku na druhý)
- molekula izocitrátu je totiž snadněji oxidovatelná (dekarboxylovatelná), než molekula samotného citrátu

INHIBITOR DRUHÉ REAKCE

- tzv. *sebevražedný substrát*
- látka sama o sobě inhibující není, až po vstupu do metabolismu se stane jedovatou a inhibuje
- např. některé rostliny jako obranu proti nepřátelům tvoří fluoro-acetát
 - fluoro-acetát \rightarrow fluoro-acetyl-CoA \rightarrow fluoro-citrát \rightarrow ireversibilní inhibice akonitázy



Obrázek 4.51: Akonitáza

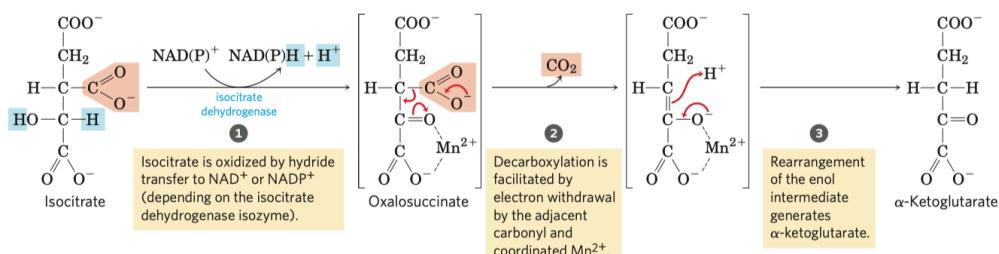
AKONITÁZA

- má železosirné jádro
- síra je tam dvojího typu
 - organická (v cysteinu), váže se na tři atomy Fe
 - anorganická, koordinuje celý komplex
- kromě tří cysteinem vázaných Fe je tam jeden atom nevázaný, ten interaguje s karboxylovou skupinou citrátu a s vodou — tam běží přeměna

CIS-AKONITÁZA

- nalzena i v cytoplazmě
- akonitáza v cytoplasmě slouží jako regulátor hladiny železa v cytoplasmě
 - velká koncentrace Fe -> uvolňování radikálů
- když je Fe hodně, v akonitáze se ukládají 4 atomy
- když je Fe málo, tak se železosirný komplex uvolní a místo vazebného místa pro Fe vznikne vazebné místo pro vlásenku mRNA
- podle toho, o jaké mRNA se jedná, se mění i regulační funkce akonitázy
 - mRNA **feritinu**
 - * feritin je protein, který zabaluje Fe do zásobních balíků
 - * když se na mRNA naváže akonitáza, zastaví se translace feritinu
 - mRNA **transferinu**
 - * transferin nosí železo z okolí buňky dovnitř buňky
 - * mRNA je akonitázou stabilizována, míra translace se zvýší

Třetí role akonitázy souvisí s nukleotidy: shluhy mch DNA a proteinů. V mch je u člověka několik set kopií cirkulárních molekul, jeden z proteinů, který je drží u sebe, je právě akonitáza.

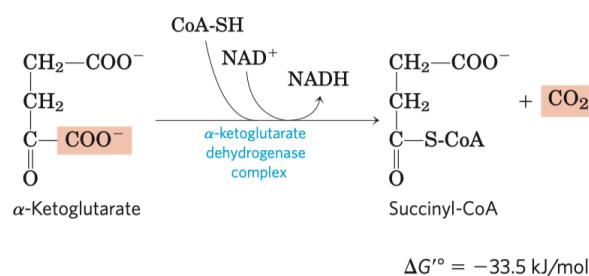
POZNÁMKA BOKEM**Třetí reakce**

Obrázek 4.52: Třetí reakce

Toto je první dekarboxylační reakce.

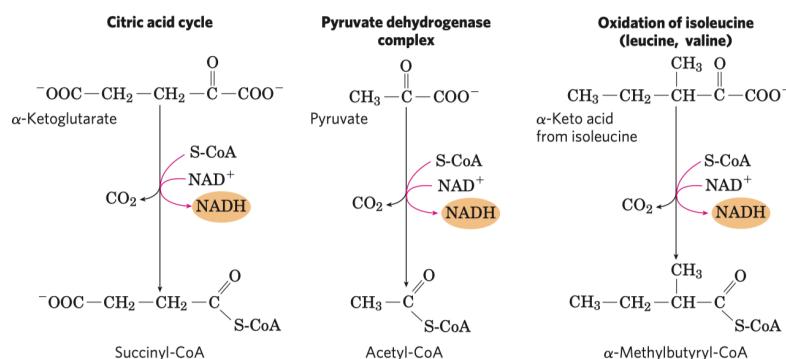
POZNÁMKA BOKEM

Čtvrtá reakce



Obrázek 4.53: Čtvrtá reakce

Sukcinylo-CoA je opět makroergní molekula.

**FIGURE 16-12** A conserved mechanism for oxidative decarboxylation.

The pathways shown employ the same five cofactors (thiamine pyrophosphate, coenzyme A, lipoate, FAD, and NAD⁺), closely similar multi-enzyme complexes, and the same enzymatic mechanism to carry out oxidative decarboxylations of pyruvate (by the pyruvate dehydrogenase

complex), alpha-ketoglutarate (in the citric acid cycle), and the carbon skeletons of the three branched-chain amino acids, isoleucine (shown here), leucine, and valine. A fourth reaction, catalyzed by glycine decarboxylase, involves a very similar mechanism (see Fig. 20-22).

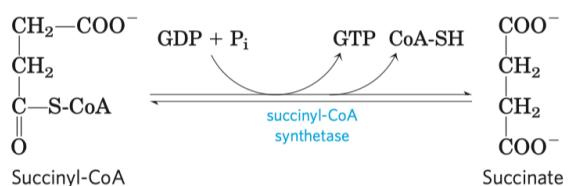
Obrázek 4.54: Podobnost mechanismu oxidativní dekarboxylace

PODOBNOST ALFA-KETOGLUTARÁTDEHYDROGENÁZY S PDC

- podobný mechanismus funkce (viz obrázek)
- enzymy E1, E2, E3
- inhibice arsenem
- jen substráty jsou odlišné

POZNÁMKA BOKEM

Pátá reakce

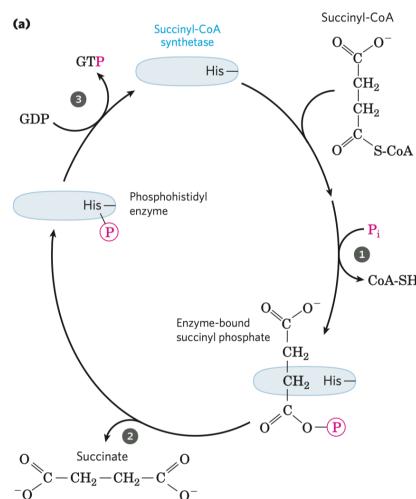


$$\Delta G'^{\circ} = -2.9 \text{ kJ/mol}$$

Obrázek 4.55: Pátá reakce

PÁTÁ REAKCE

- katalyzováno sukcinyl-CoA syntetáza (jméno má podle reakce opačného směru)
 - spíše z historických důvodů, reakce většinou běží směrem sukcináza \rightarrow sukcinát
- tvoří se kyselina jantarová, neboli sukcinát
- energie vazby s CoA je využita na syntézu makroergní sloučeniny, např. GTP



Obrázek 4.56: Detailní průběh páté reakce

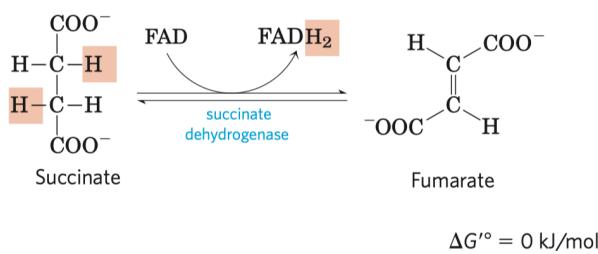
PRŮBĚH PÁTÉ REAKCE (VIZ OBRÁZEK)

- (1) vznik sukcinyl-fosfátu
- (2) vznik sukcinátu, přenesení fosfátu na His zbytek v enzymu \rightarrow vznik makroergní formy enzymu
- (3) fosfát je přenesen na GDP (nebo ADP a podobně), tvoří se GTP (nebo ATP a podobně)

Probíhá tedy tzv. **syntéza ATP na substrátové úrovni**, která probíhá i v glykolýze. Druhý způsob syntézy ATP je v mch na základě oxidativní fosforylace.

POZNÁMKA BOKEM

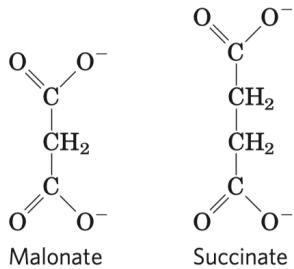
Šestá reakce



Obrázek 4.57: Šestá reakce

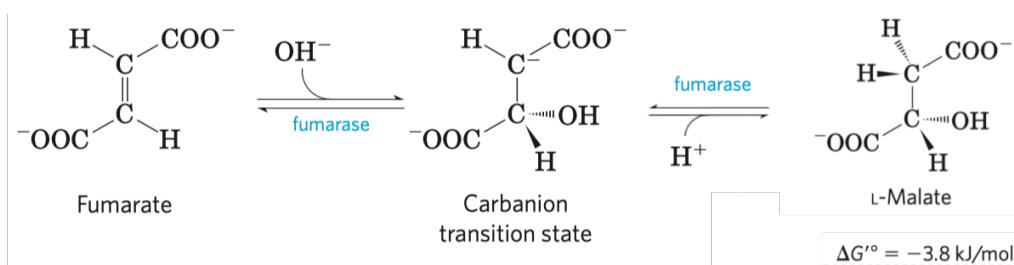
ŠESTÁ REAKCE

- enzym sukcinát-dehydrogenáza, koenzym FAD
 - FAD funguje zde, v reakci pyruvát \rightarrow acetyl-CoA a v oxidativní fosforylací (jako komplex II)
- na rozdíl od ostatních enzymů v KC je vázaný na membránu
 - je integrálním membránovým proteinem ve vnitřní mch membráně \Rightarrow může efektivně předávat elektrony
- (doslova) učebnicový příklad enzymu manifestujícího *kompetitivní inhibici*
 - kyselina malonová je stejně jako sukcinát také dikarboxylová a liší se od něj pouze v jedné skupině
 - řešením je přidat více sukcinátu
 - inhibiční vlastnosti malonátu přišly vhod při zkoumání KC



Obrázek 4.58: Malonát a sukcinát

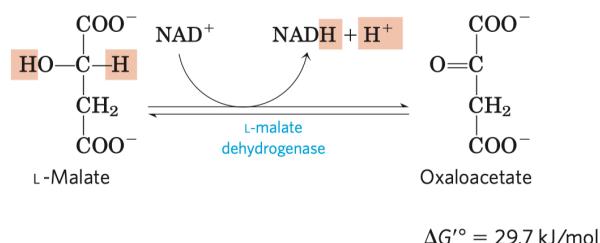
POZNÁMKA BOKEM

Sedmá reakce

Obrázek 4.59: Sedmá reakce

Malát je jiným názvem *kyselina jablečná*.

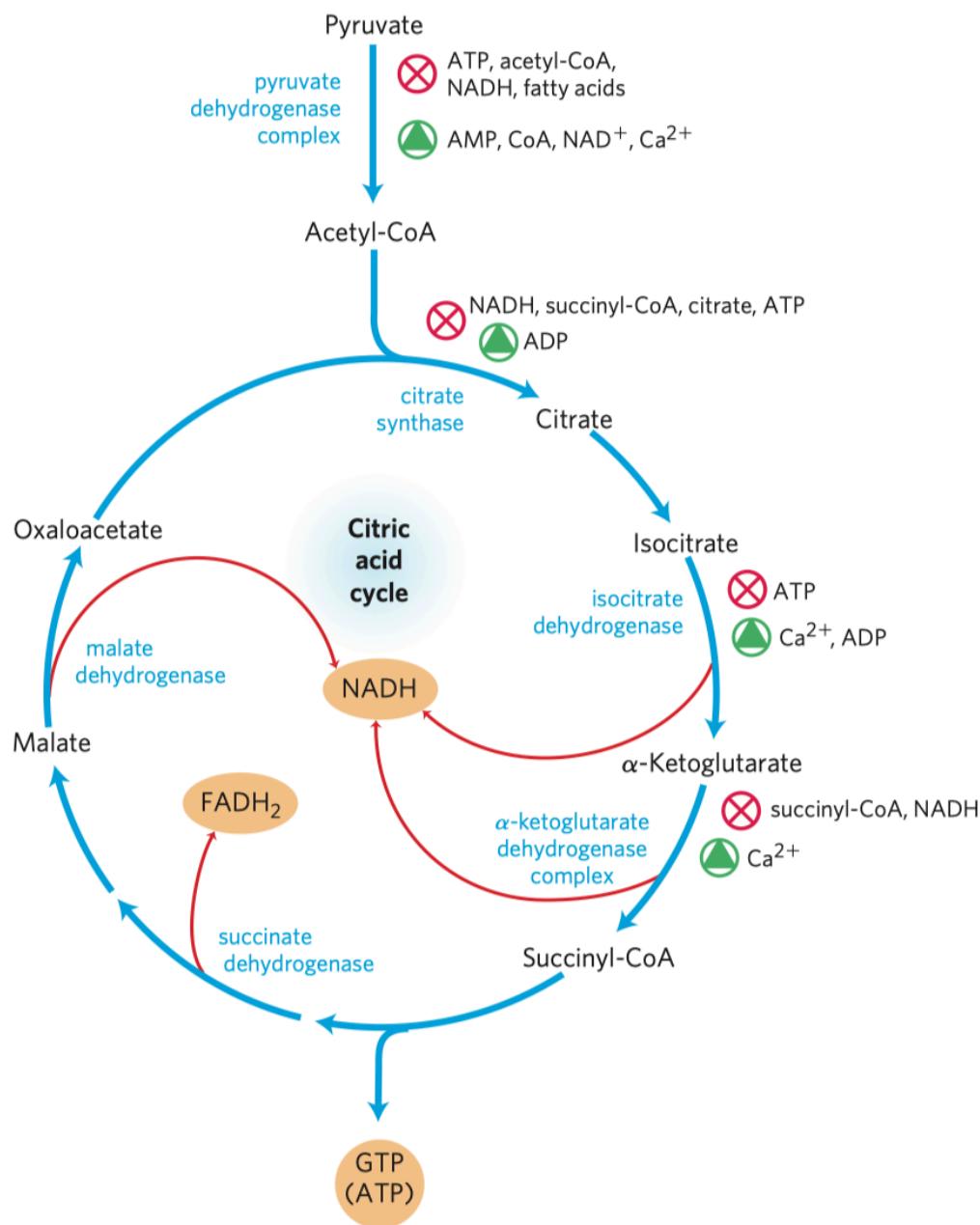
POZNÁMKA BOKEM

Osmá reakce

Obrázek 4.60: Osmá reakce

Probíhá **regenerace oxalacetátu**.

4.7.3 Regulace KC



Obrázek 4.61: Regulační místa KC

REGULAČNÍ MECHANISMY

- nejdůležitější jsou následující tři enzymy (jejich inhibice/aktivace)
 - citrát-syntázová reakce
 - izocitrát-dehydrogenáza
 - alfa-ktetoglutarát-dehydrogenáza

4.8 Intermediáty KC

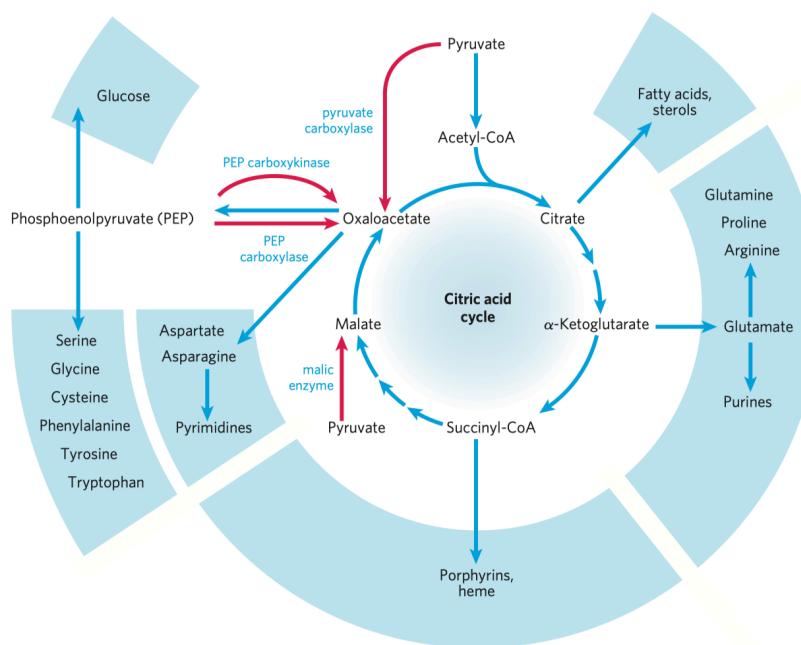


FIGURE 16–16 Role of the citric acid cycle in anabolism. Intermediates of the citric acid cycle are drawn off as precursors in many biosynthetic pathways. Shown in red are four anaplerotic reactions that replenish depleted cycle intermediates (see Table 16–2).

Obrázek 4.62: Využití meziproduktů KC v buňce

Citrát si musí "odskočit" do cytoplasmy, kde probíhá syntéza mastných kyselin; další intermediáty slouží k dalším syntézám. Celý cyklus má tedy **katabolický i anabolický** charakter.

Anaplerotické reakce

- někdy dojde oxalacetát, protože na různých místech utíkají intermediáty do syntéz
- anaplerotické (= doplňující) reakce doplňují oxalacetát přes malát, viz červené šipky na obrázku
- výchozí molekulou jsou intermediáty metabolismu cukrů (2 pyruváty, 2 fosfoenolpyruváty, poslední dvě molekuly glykolýzy, té, která běží v cytoplasmě)

TABLE 16-2 Anaplerotic Reactions

Reaction	Tissue(s)/organism(s)
Pyruvate + HCO ₃ ⁻ + ATP $\xrightleftharpoons{\text{pyruvate carboxylase}}$ oxaloacetate + ADP + P _i	Liver, kidney
Phosphoenolpyruvate + CO ₂ + GDP $\xrightleftharpoons{\text{PEP carboxykinase}}$ oxaloacetate + GTP	Heart, skeletal muscle
Phosphoenolpyruvate + HCO ₃ ⁻ $\xrightleftharpoons{\text{PEP carboxylase}}$ oxaloacetate + P _i	Higher plants, yeast, bacteria
Pyruvate + HCO ₃ ⁻ + NAD(P)H $\xrightleftharpoons{\text{malic enzyme}}$ malate + NAD(P) ⁺	Widely distributed in eukaryotes and bacteria

Obrázek 4.63: Čtyři různé anaplerotické reakce

V poslední (reakce s jablečným enzymem) je zdrojem uhlíku místo CO₂ bikarbonát. Reakce probíhá také při syntéze NADPH, ale obráceně.

[POZNÁMKA]

VSTUP AK DO KC

- přes α-ketoglutarát
 - přes sukcinyl-CoA
 - Asp, Phe, Tyr přes fumarát
-

4.9 Glyoxalátový cyklus

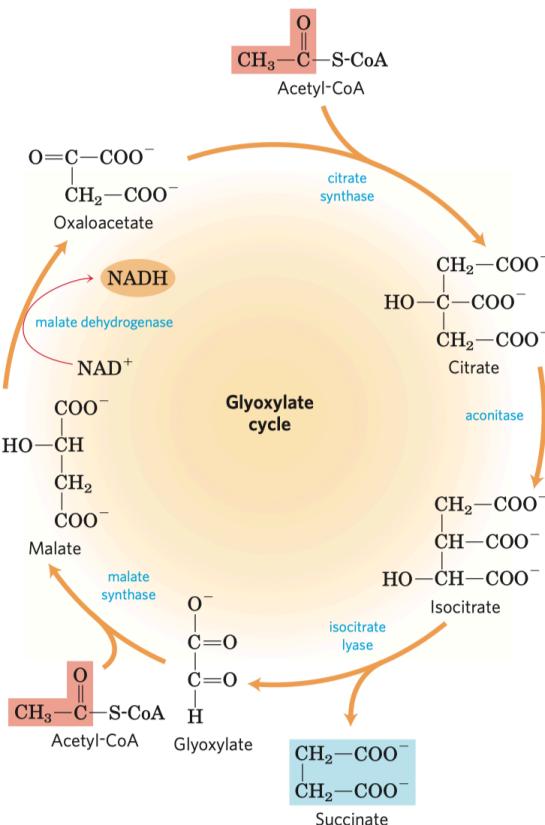


FIGURE 16–22 Glyoxylate cycle. The citrate synthase, aconitase, and malate dehydrogenase of the glyoxylate cycle are isozymes of the citric acid cycle enzymes; isocitrate lyase and malate synthase are unique to the glyoxylate cycle. Notice that two acetyl groups (light red) enter the cycle and four carbons leave as succinate (blue). The glyoxylate cycle was elucidated by Hans Kornberg and Neil Madsen in the laboratory of Hans Krebs.

Obrázek 4.64: Glyoxalátový cyklus

GLYOXALÁTOVÝ CYKLUS

- společné rysy s KC, je to dráha zahrnující některé podobné enzymy, ale je tam o dva enzymy navíc
- probíhá v **glyoxysomech**, což jsou modifikované peroxisomy
 - v semenech olejnataých rostlin

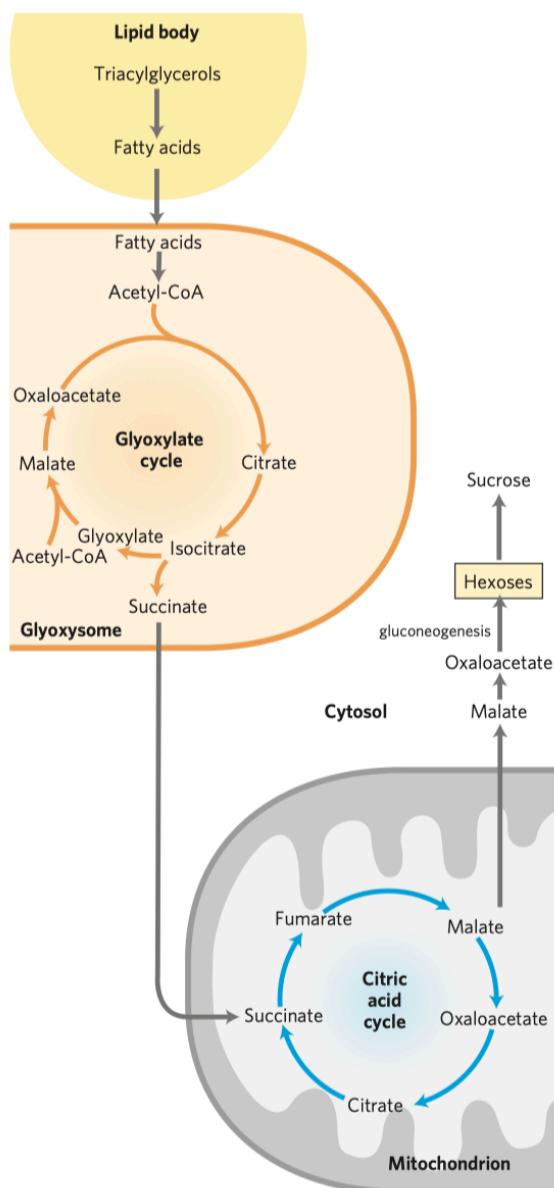
[PEROXISOMY]

- detoxifikační centra
 - odbourávají se tam jedy jako ethanol, léky

- látky se oxidují, stávají se rozpustnými a mohou se vylučovat močí
 - vzniká zde peroxid vodíku
-

PRŮBĚH

- (1) citrát syntázová rekce, vznik citrátu
- (2) citrát je následně izomerizován na izocitrát, jako v KC (akonitáza)
- (3) **izocitrát lyáza** rozštěpí šestiuhlíkatou kyselinu na sukcinát a glyoxalát
- (4) glyoxalát vstupuje do **malátsyntázové reakce**, jež z něj a z acetyl-CoA udělá malát
- (5) malát už zase vstupuje do klasické reakce KC (malát-dehydrogenáza)
- (6) a regeneruje se oxalacetát

**FIGURE 16–24** Relationship between the glyoxylate and citric acid cycles.

The reactions of the glyoxylate cycle (in glyoxysomes) proceed simultaneously with, and mesh with, those of the citric acid cycle (in mitochondria), as intermediates pass between these compartments. The conversion of succinate to oxaloacetate is catalyzed by citric acid cycle enzymes. The oxidation of fatty acids to acetyl-CoA is described in Chapter 17; the synthesis of hexoses from oxaloacetate is described in Chapter 20.

Obrázek 4.65: Vztah glyoxalátového cyklu a KC

Proč jsou glyoxysomy v semenech?

SYNTÉZA CUKRU

- semena mají dva typy zásobních substrátů: škrob, tuky

- olejnatá semena u klíčení potřebují cukry, protože samotné tuky nejdou pomocí KC zpracovat -> musí nasynthetizovat sacharidy z tuků
 - v KC nepřebývají žádné uhlíky, které by byly použitelné k syntéze sacharidů
 - z glyoxalátového cyklu se uvolní sukcinát, který se může účastnit KC, a později nepřímo poslouží k tvorbě glukózy (viz obrázek)

4.10 Oxidativní fosforylace

Dále již jen zkráceně OF.

- dvě reakce: oxidace (transport elektronů z redukovaných koenzymů) a fosforylace
- ADP → ATP
- reakce bez sebe nemohou být, jsou spjaty
- probíhá v mch, kde se (při dostatku kyslíku) vyrábí 96% ATP (zbytek vzniká při glykolýze a jedna molekula v KC)
- mch mají všechny aerobní organismy (potažmo všechna eukaryota, jen některá je mají pozměněné

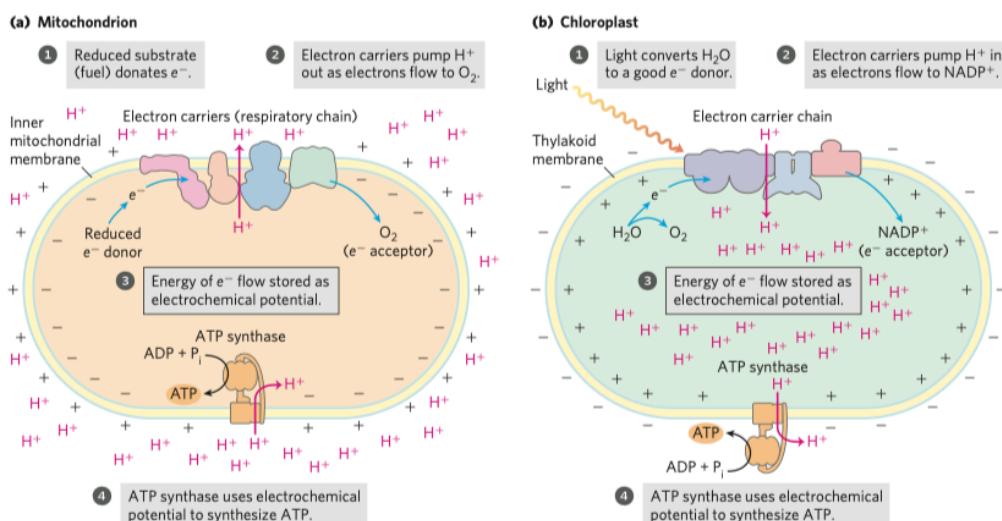


FIGURE 19-1 The chemiosmotic mechanism for ATP synthesis. (a) In mitochondria, electrons move through a chain of membrane-bound carriers (the respiratory chain) spontaneously, driven by the high reduction potential of oxygen and the relatively low reduction potentials of the various reduced substrates (fuels) that undergo oxidation in the mitochondrion. (b) In chloroplasts, the movement of electrons through a chain of membrane-bound

carriers is driven by the energy of photons absorbed by the green pigment chlorophyll. In both organelles, electron flow creates an electrochemical potential by the transmembrane movement of protons and positive charge. In both cases this electrochemical potential drives ATP synthesis by a membrane-bound enzyme, ATP synthase, that is fundamentally similar in both mitochondria and chloroplasts, and in bacteria and archaea as well.

Obrázek 4.66: Přehled oxydativní fosforylace

4.10.1 Mitochondrie

HISTORIE OBJEVU MITOCHONDRIÍ

- Otto Warburg dostal roku 1931 NC za objevy kolem mch
- mch byly popsány na přelomu 19. a 20. století, poměrně brzy byla zjištěna jejich úloha v oxidativním metabolismu
- až v 50. letech (George E. Palade) byla na Rockefelově univerzitě poprvé postavena dobrá centrifuga, která dovedla oddělovat buněčné kompartmenty
 - až tehdy se dala studovat čistá mch frakce
 - Palade dostal NC v roce 1974 spolu s Christianem de Duve (který objevil peroxisomy) a Albertem Palade

Struktura mch

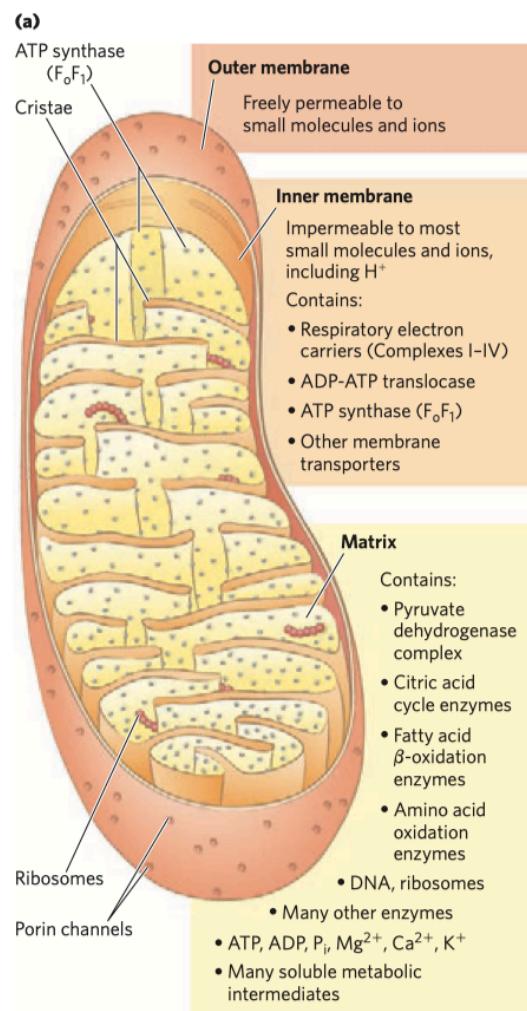


FIGURE 19–2 Biochemical anatomy of a mitochondrion. (a) The outer membrane has pores that make it permeable to small molecules and ions, but not to proteins. The convolutions (cristae) of the inner membrane provide a very large surface area. The inner membrane of a single liver mitochondrion may have more than 10,000 sets of electron-transfer systems (respiratory chains) and ATP synthase molecules, distributed over the membrane surface. (b) The mitochondria of heart muscle, which have

Obrázek 4.67: Stavba mch

VNĚJŠÍ MEMBRÁNA

- má póry z porinů, které slouží k transportu proteinů do mch – tedy je dost propustná

MEZIMEMBRÁNOVÝ PROSTOR

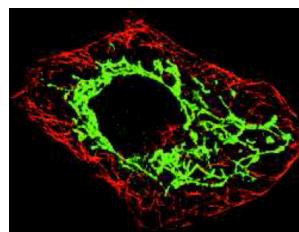
- reakce s metabolismem nukleotidů, např. při udržování úrovně nukleotidů (ADP ⇌ ATP) doveď měnit nukleotidy v sebe sama
- jsou to i důležité signální molekuly ohledně energentického stavu buňky

VNITŘNÍ MEMBRÁNA

- nařasená kristami
 - původní představa velkých vchlípenin se ale opouští, současný názor je takový, že vchlípeniny jsou spíše tunýlkы
 - tunýlkы teoreticky mohou měnit průměr svého vstupu (přelomu mezi tunýlkem a mezinembránovým prostorem), čímž by se mohl tvořit v mezinembránovém prostoru nějaký gradient
- jsou v ní zanoržené komplexy OF
- je vlastně nepropustná, neprojde přes ní nic, pro co tam není transportní systém (kromě krátkých MK a plynů)
 - CO_2 vzniká v KC a kyslík je tam potřeba jako finální akceptor elektronů
 - neprojdou ale třeba protony, to je základ OF

SEMPIAUTONOMIE

- mch jsou **sempiautonomní**, obsahují vlastní DNA
- mch genů je u člověka 13, všechny kódují nějaký protein patřící do komplexu z OF
 - postupem času se geny přesouvaly z mch do jádra
 - těch 13 proteinů zůstalo, protože jsou natolik hydrofobní, že by nemuseli přečkat cestu přes cytoplasmu
- komplexy se většinou skládají z mch i běžných proteinů, které jsou do mch transportovány z cytoplasmy
 - **mitopatie** = chyby v koordinaci skládání (celkem časté)



Obrázek 4.68: Buňka, fluorescenčně obarvená (červeně cytoskelet, zeleně mch) — důkaz existence mch retikula

CELKOVÁ MORFOLOGIE

- původní představa: mch mají na délku asi $2\mu\text{m}$, jsou tedy velikostní podobné bakteriím
- současná představa: mch jsou spíše **dynamickým retikulem**
 - existuje dynamická síť mch, které se neustále slučují, pohybují, mění tvar
 - nejspíše ve všechn buňkách kromě svalových (tam není místo) a spermíí (tam jsou mch kolem bičíku)
- v mch se tvoří kyslíkové radikály => rychle stárnu, jsou rychle odstraňovány (autofagocytózou) a obnovovány

- ke změnám ve tvaru a uspořádání mch může dojít otravou, zablokováním OF, ale tvar mohou měnit i v závislosti na energetickém stavu buňky
 - potřeba vysoké produkce ATP => zvýšení objemu
 - v opačném případě fragmentace a snížení objemu

4.10.2 Oxidace (elektron-transportní řetězec)

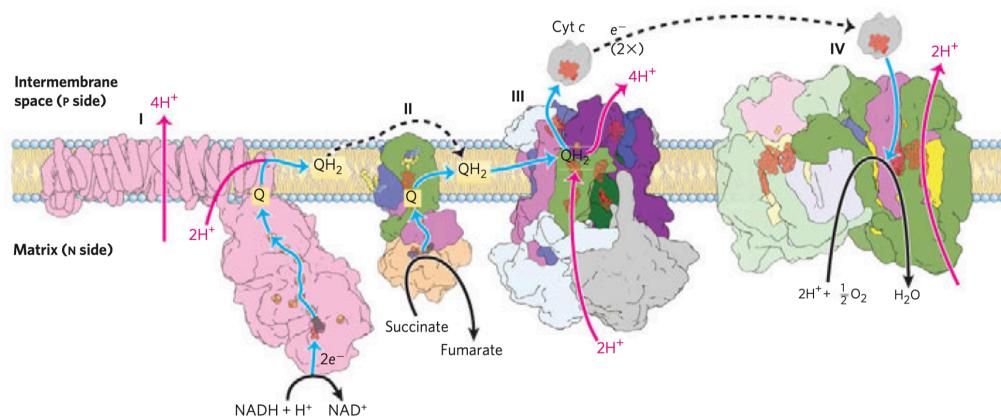


FIGURE 19-16 Summary of the flow of electrons and protons through the four complexes of the respiratory chain. Electrons reach Q through Complexes I and II. The reduced Q (QH_2) serves as a mobile carrier of electrons and protons. It passes electrons to Complex III, which passes them to another mobile connecting link, cytochrome c. Complex IV then transfers electrons from reduced cytochrome c to O_2 . Electron flow through Complexes I, III, and IV is accompanied by

proton flow from the matrix to the intermembrane space. Recall that electrons from β oxidation of fatty acids can also enter the respiratory chain through Q (see Fig. 19-8). The structures shown here are from several sources: Complex I, *Thermus thermophilus* (PDB ID 3M9S); Complex II, porcine heart (PDB ID 1ZOY); Complex III, bovine heart (PDB ID 1BGY); cytochrome c, equine heart (PDB ID 1HRC); Complex IV, bovine heart (PDB ID 1OCC).

Obrázek 4.69: Schéma elektron-transportního řetězce

TRANSPORT ELEKTRONŮ

- probíhá při redoxních reakcích (donor se oxiduje, akceptor redukuje)
- v oxidační části je elektronový pár nesen z primárního donoru (redukovaný koenzym NADH nebo FADH_2) přes přenášeče až na finální akceptor O_2
- z jednodušený nákres ukazuje, že se řetězec skládá ze čtyř komplexů (I-IV), které jsou všechny ukotveny ve vnitřní mch membráně
 - kromě těchto čtyř velikých proteinových komplexů jsou tam ještě dva mobilní přenášeče, kteří se pohybují mezi těmi velkými
 - * **koenzym Q** ($1 \leftrightarrow 3, 2 \leftrightarrow 3$)
 - * **cytochrom C** ($3 \leftrightarrow 4$)
- látky vstupují buď na místě I, NADH, nebo na II, kde je sukcinát-dehydrogenáza s flavinovým koenzymem FADH_2

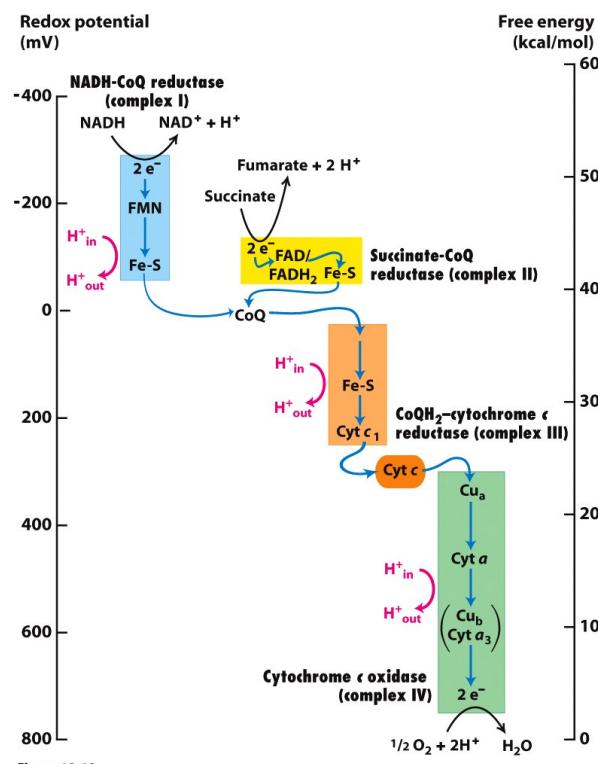


Figure 12-18
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Obrázek 4.70: Redoxní potenciál jednotlivých komplexů

REDOXNÍ POTENCIÁL

- jedna osa ukazuje redox potenciál v milivoltech, druhá osa ukazuje volnou energii, která se při přenosu uvolní
- nejvýše je soustava NADH-NAD
- obecně platí, že putují elektrony ze soustavy o nízkém redox potenciálu na soustavu s vyšším potenciálem
- zde je rozdíl více než 1V, a podle Nernstovy rovnice se dá spočítat, jak velká energie se při takovémto přenosu uvolní
 - více než 200kJ/mol, tam se vejde cca 7 molekul ATP

PŘEPUMPOVANÉ PROTONY

- za dvě "kola": 8 (I) + 0 (II) + 8 (III) + 4 (IV) = 20, průměrně za jedno kolo tedy 10
 - to platí pouze pokud reoxidujeme NADH
- pokud reoxidujeme FAD, přeskakujeme první komplex a přepumpujeme tedy jen 6 protonů

[PRODUKCE TEPLA ROSTLINAMI]

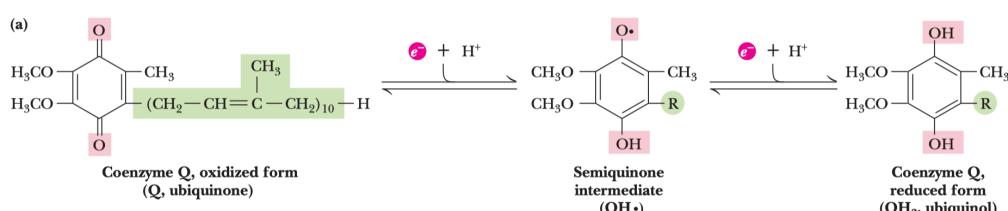
- některé rostliny umí ten gradient využívat na teplo

- obsahují alternativní oxidázy redukovaných koenzymů, které tvoří teplo díky přenosu oněch redukčních ekvivalentů
- rostou díky tomu ve sněhu
- jiné rostliny gradient využívají k ryhlejší emitaci pachových molekul

U lidí se energie oxidace také využívá, k netřesové termogenezi.

Redoxní centra

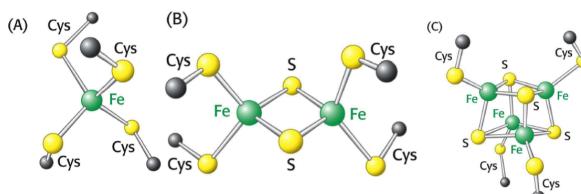
- molekuly, které umí měnit svůj oxidační stav
- starají o to, aby byl elektron na jedné straně přijat a na druhé odevzdán



Obrázek 4.71: Koenzym Q

KOENZYM Q

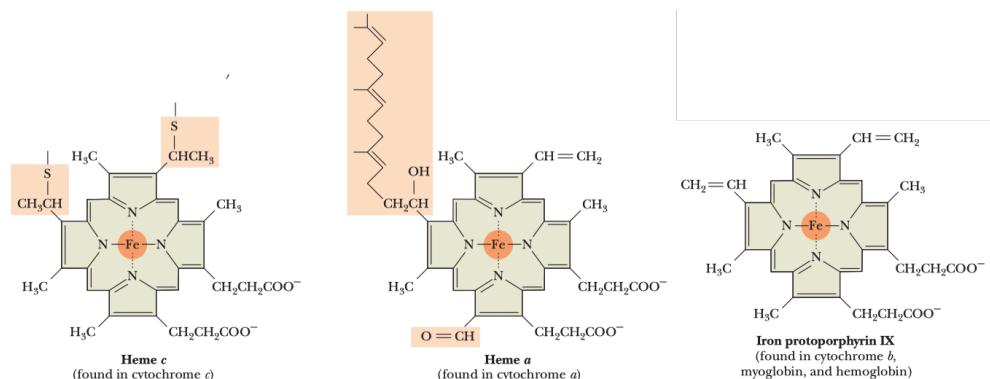
- jiné názvy: ubiquinon, ubichinon (byl nalezen všude možně po buňce, byl tedy *ubiquitous*), koenzym Q10 (viz níže)
- pohyblivý přenašeč elektronů, běhá ve vnitřní membráně a nosí elektrony mezi komplexy
- má dlouhý hydrofobní ocásek, celý je tedy také hydrofobní
 - proto je uvnitř membrány
 - v ocásku se desetkrát opakuje jeden motiv -> název koenzym Q10
 - * jsou různé typy koenzymů od Q1 až po Q10
- může být v **radikálové formě** a vázat jen jeden elektron, nebo může být v plně oxidované a vázat dva



Obrázek 4.72: (A) Fe + 4Cys (u bakterií), (B) 2Fe + 2S + 4Cys (sír je celkově 6), (C) 4Fe + 4S + 4Cys (sír je celkově 8)

AKONITÁZA

- má v sobě železosirný komplex
- účastní se reakce tak, že uvolní Fe^{2+} a spustí Fentonovu reakci



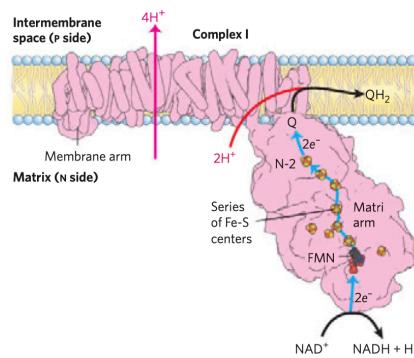
Obrázek 4.73: Tři příklady porfyrinového cyklu

CYTOCHROMY

- proteiny s hemovým železem, hemem
- tvoří se **porfyrinový kruh** přes 4 N je vázáno jedno Fe (může přecházet na Fe^{2+} a Fe^{3+})
- je několik typů cytochromů
 - dělí se podle toho, jaké typy hemů jsou v nich vázány — A, B či C
 - hemy A, B a C se liší ukotvením v proteinu a postranními řetězci navázanými na porfyrinový kruh
- ještě se tam podílí měď, ale není v žádném komplexu
- cytochromy jsou důležité pro experimenty, různě absorbuje světlo
 - CytC při třech vlnových délkách absorbuje silně
 - navíc absorbuje různě v oxidovaném a redukovaném stavu -> dobrý způsob jak měřit průběh metabolismu v organismu je sledování změny absorbance

Komplex I

Jinými názvy též NADH dehydrogenáza, NADH:koenzym Q oxidoreduktáza.



Obrázek 4.74: Struktura komplexu I

STRUKTURA

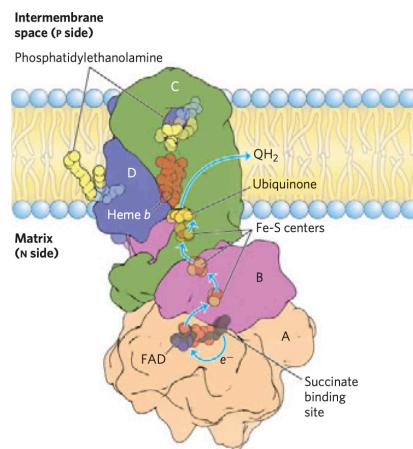
- má tvar L, jsou rozlišitelné dvě domény
- transmembránový Lys, hlavička je zanořená do lumen
- jsou na něm redoxní centra
 - na špičce je místo pro redukovaný koenzym
- je to jedno z největších takových center, má až 45 podjednotek
 - bakteriální mají kolem 15 podjednotek, v průběhu evoluce se postupně přidávaly další a další
 - 7/45 podjednotek se kóduje v mch DNA, zbytek v jádrovém DNA

FUNKCE

- (1) na špičku se napojí redukovaný koenzym
- (2) předá dva elektrony prvnímu redoxnímu centru, tím se oxiduje
- (3) elektrony putují po dalších centrech
 - téhoto center je v komplexu 7–10
 - flavín-mononukleotid (FMN) -> série železo-sirných center s různým proteino-vým prostředím
 - redoxní potenciál se postupně zvyšuje - v průběhu se z matrix vypumpují čtyři protony

Komplex II

Jinými názvy též sukcinát-dehydrogenáza, sukcinát:koenzym Q oxidoreduktáza.

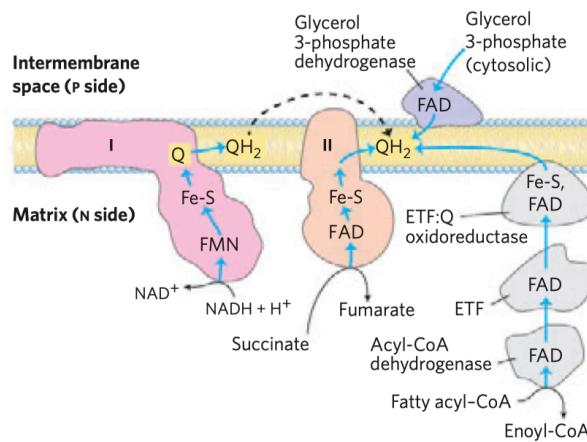


Obrázek 4.75: Struktura komplexu II

STRUKTURA KOMPLEXU II

- komplex ze 4 podjednotek
 - žádná není kódována v mch
- několik redoxních center
 - tři železo-sirná centra
 - jeden FAD

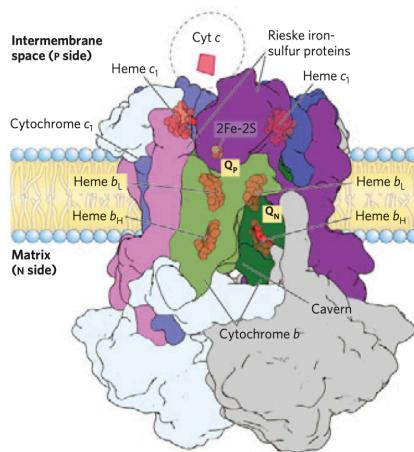
Koenzym Q se však redukuje i jinými způsoby než přes komplexy I a II, viz obrázek níže. Jde zároveň vidět, že FAD figuruje i na jiných místech, např. v oxidaci mastných kyselin.



Obrázek 4.76: Různé způsoby redukce koenzymu II

Komplex III

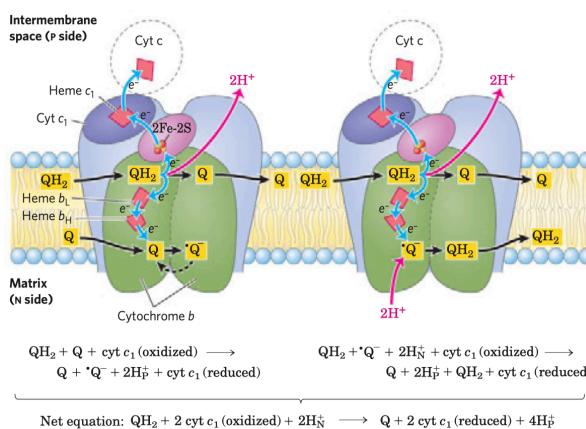
Neboli cytochrom B-C1.



Obrázek 4.77: Struktura komplexu III

STRUKTURA KOMPLEXU III

- obsahuje cytochromy B a C1 (-> jméno) a kromě nich ještě obsahuje jeden Fe-S komplex, který se nazývá **Rieskeho protein**
- funguje jako dimer (na obrázku světlejší a tmavší odstíny barev) a každý z monomerů je asi z 10 podjednotek (dodnes to není jisté a různé organismy to mají různě)
 - pouze 1/10 je kódován v mch



Obrázek 4.78: Rozdělení dvojelektronového toku v komplexu III

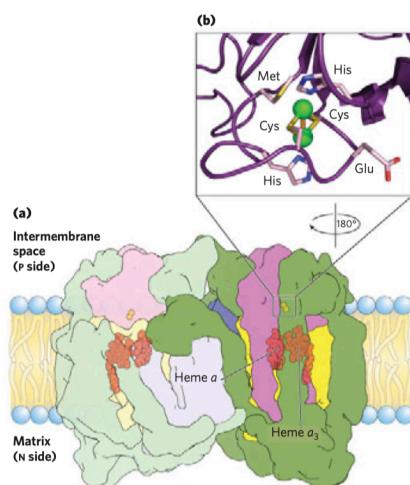
FUNKCE

- dochází k rozdělení dvouelektronového přenosu na jednoelektronový — dvoufázový **Q cyklus**, viz obrázek
- během Q cyklu se přepumpují 4 protony (dvě fáze, ve kterých se obě H z QH₂ vypumpuje mimo matrix)
- pro funkci je důležité, že jsou všechna vazebná místa lokalizována na různých místech komplexu

- pro pumpování je důležité, že je vazebné místo pro Q blízko transmembránové části (protony pak jednodušeji odletí)

Komplex IV

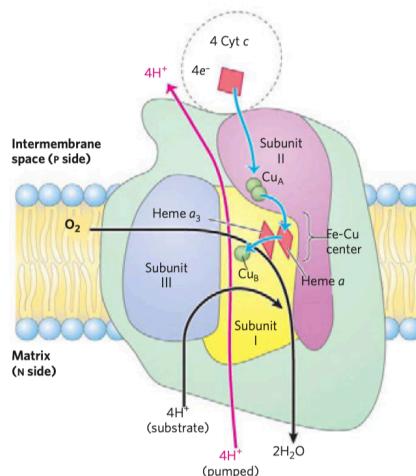
Jiným názvy též cytochromoxidáza, cytochrom C:kyslík oxido-reduktáza, cytochrom A-A3, nebo COX.



Obrázek 4.79: Struktura komplexu IV

STRUKTURA KOMPLEXU IV

- obsahuje asi 12 podjednotek, z toho 3 jsou kódovány v mch
- funguje jako dimer, důležité komponenty jsou čtyři redoxní centra
 - všechna redox centra jsou kódována v mch
- dva cytochromy, A a A3
- obsahuje atomy mědi, které jsou koordinovány přes Cys a His



Obrázek 4.80: Průchod elektronů komplexem IV

FUNKCE

- dovede elektrony a protony předávat na kyslík tak, že vznikne molekula vody
 - primitivnější to nedokáží a dělají místo toho peroxid vodíku — ten je však také radikálový a nebezpečný, katalázový systém ho musí pak tedy rozložit na vodu a kyslík, aby nedělal paseku
- průběh
 - (1) čtyři redukované H jsou neseny přes podjednotku 2 na binukleární komplex s atomy mědi
 - (2) poté jsou přes hemy neseny na druhou měď
 - (3) zároveň jsou na kyslík předávány 4 elektrony a do jeho blízkosti i 4 protony
 - (4) nakonec vzniknou dvě molekuly vody
- při tom všem jsou přepumpovány 4 elektrony (dva páry)

[RESPIRAZÓMY]

RESPIRAZÓMY

- superkomplexy oxidační fosforylace (komplexy I–V)
- metabolické celky -> ulehčení pohybu Q a cytochromu C, transport mezi komplexy je rychlý
- kontroverzní, neví se, zda existují

Co se ovšem ví, je fakt, že ATP syntázy se do větších celků shlukují. Jak se zdá, jsou tyto superkomplexy zčásti zodpovědné za morfologii vnitřní membrány v mch (konkrétně za kristy) — vyskytují se totiž přesně v místech, kde kristy prudece zahýbají. Mutanti bez těchto superkomplexů mají strukturu krist silně narušenou.

Kyslíkové radikály

- byly objeveny relativně nedávno a zpočátku se jim přisuzovala jen negativní úloha
 - mohou však sloužit i jako signální molekuly – informují o hladině kyslíku,
- na jejich existenci a produkci je založena teorie stárnutí
 - jejich produkce postupně ničí mch a snižuje výkonnost buněk a produkci energie -> organismus stárne a zahyne
- jako hlavní místo produkce kyslíkových radikálů (*reactive oxygen species*, ROS) se uvádí koenzym Q, ale není to přesné, hlavním místem je komplex BC1, kde dochází k rozdelení přenosu elektronů

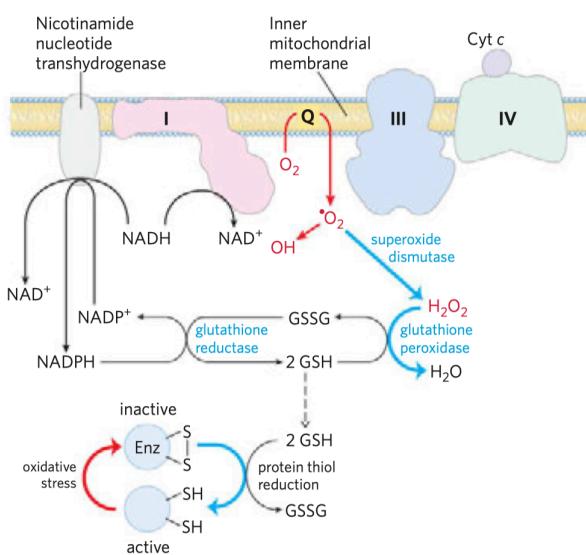


FIGURE 19-18 ROS formation in mitochondria and mitochondrial defenses. When the rate of electron entry into the respiratory chain and the rate of electron transfer through the chain are mismatched, superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$) production increases at Complexes I and III as the partially reduced ubiquinone radical ($\cdot\text{Q}^-$) donates an electron to O_2 . Superoxide acts on aconitase, a 4Fe-4S protein, to release Fe^{2+} . In the presence of Fe^{2+} , the Fenton reaction leads to formation of the highly reactive hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$). The reactions shown in blue defend the cell against the damaging effects of superoxide. Reduced glutathione (GSH; see Fig. 22-29) donates electrons for the reduction of H_2O_2 and of the oxidized Cys residues ($-\text{S}-\text{S}-$) of enzymes and other proteins, and GSH is regenerated from the oxidized form (GSSG) by reduction with NADPH.

Obrázek 4.81: Vznik a zpracování kyslíkových radikálů

AKTIVNÍ ZPŮSOBY NIČENÍ ROS

- superoxid-dismutáza: $\text{O}^\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
- glutathion-peroxidáza: $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
 - nejdůležitější
 - aktivní látka glutathiol

GLUTATHIOL

- tripeptid, je tam důležitá molekula Cys
- síra může být redukována i oxidována, umí dělat disulfidický můstek
 - jako dimer může být spojen disulfidickým můstkom a jako jedna molekula a může tuto peroxidázu pufrovat

4.10.3 Fosforylace

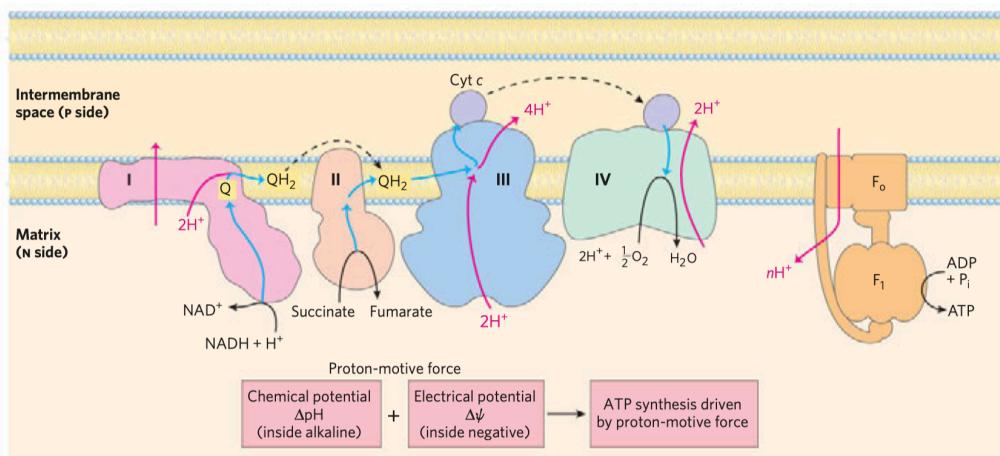


FIGURE 19-19 Chemiosmotic model. In this simple representation of the chemiosmotic theory applied to mitochondria, electrons from NADH and other oxidizable substrates pass through a chain of carriers arranged asymmetrically in the inner membrane. Electron flow is accompanied by proton transfer across the membrane, producing both a chemical gradient (ΔpH)

and an electrical gradient ($\Delta \psi$) (combined, the proton-motive force). The inner mitochondrial membrane is impermeable to protons; protons can reenter the matrix only through proton-specific channels (F_o). The proton-motive force that drives protons back into the matrix provides the energy for ATP synthesis, catalyzed by the F_1 complex associated with F_o .

Obrázek 4.82: Znázornění chemiosmotického modelu

CHEMIOSMOTICKÁ HYPOTÉZA

- už je potvrzena
- Peter D. Mitchell
- tvrzení, že ATP se tvoří v mch na základě protonového gradientu
 - po vytvoření gradientu během první fáze OF se poté v **komplexu V**, častěji nazývanému **mch ATP syntáza**, tvoří ATP

PROTONOVÝ GRADIENT

- někdy též proton-motivní síla
- chemická, koncentrační složka
- elektrická složka
 - hodnota potenciálu je asi 15mV
- rozdíl napětí na membráně a rozdíl koncentrace => je tam rozdílné pH

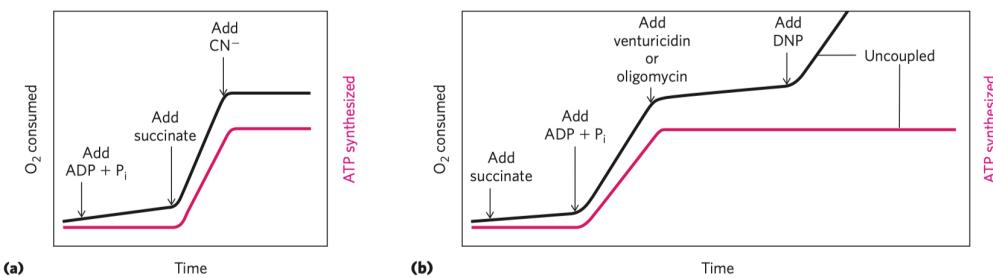


FIGURE 19-20 Coupling of electron transfer and ATP synthesis in mitochondria. In experiments to demonstrate coupling, mitochondria are suspended in a buffered medium and an O_2 electrode monitors O_2 consumption. At intervals, samples are removed and assayed for the presence of ATP. (a) Addition of ADP and P_i alone results in little or no increase in either respiration (O_2 consumption; black) or ATP synthesis (red). When succinate is added, respiration begins immediately and ATP is synthesized.

sized. Addition of cyanide (CN^-), which blocks electron transfer between cytochrome oxidase (Complex IV) and O_2 , inhibits both respiration and ATP synthesis. (b) Mitochondria provided with succinate respiration and synthesize ATP only when ADP and P_i are added. Subsequent addition of venturicidin or oligomycin, inhibitors of ATP synthase, blocks both ATP synthesis and respiration. Dinitrophenol (DNP) is an uncoupler, allowing respiration to continue without ATP synthesis.

Obrázek 4.83: Spřaženost obou fází OF

Reakce jsou běžně spřažené, pouze když přidáme látku, která udělá díry v membráně a zruší tím protonový gradient, preparát začne spotřebovávat kyslík, ale už nedělá ATP.

[VSUVKA (SOLNÉ MŮSTKY)]

-dotaz na solný můstek: skutečně solný můstekem se rozumí zařízení, kterým se vyrovnává náboj při měření redox potenciálu: máme dvě soustavy ve dvou nádobkách a měříme napětí mezi nimi – tendenci přecházet z jedné na druhou a protože se přenáší i náboj, potřebuje se solný můstek, např. KCl nebo NaCl a ty náboj vyrovnávají.

-sold-bridge-bold také existuje a je to slabá interakce zahrnující vodíkové můstky a elektrostatické interakce uplatňuje se to při skládání proteinu (aspartát, glutamát mohou reagovat a aminoskupinami např. lysinu vod. můstky a elektrostatickými silami) – takže se to může najít i v tomhle významu

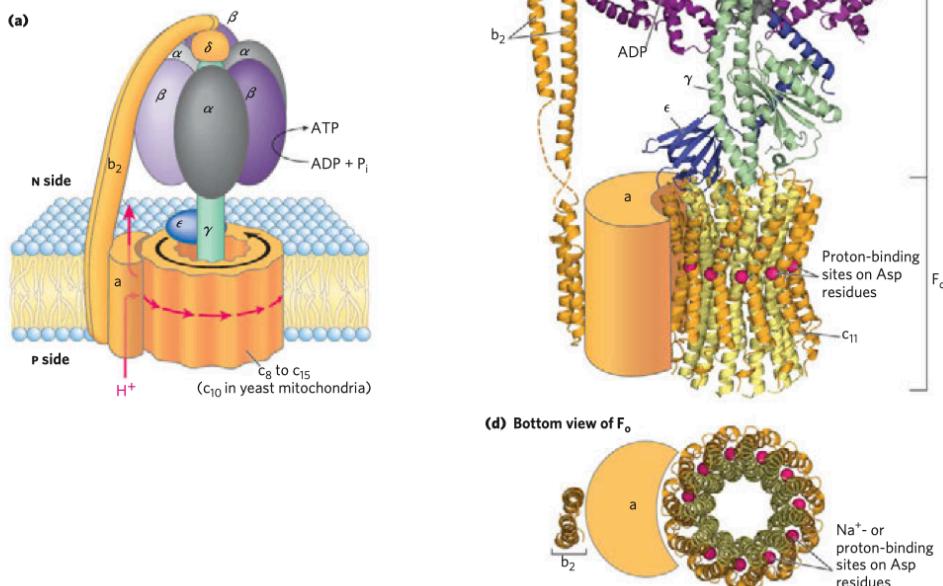
BAKTERIÁLNÍ ELEMETÁRNÍ EXPERIMENT

- (1) přidáme na membránu bakteriorodopsin
 - bakteriorodopsin pumpuje protony poté, co je stimulován světlem
- (2) přidáme na membránu mch ATP syntázu
- (3) posvíťme na membránu -> začne se generovat ATP

Struktura ATP syntázy

FIGURE 19-25 Mitochondrial ATP synthase complex. (a) A cartoon view of the F_0F_1 complex. (b) (PDB ID 1BMF and PDB ID 1JNV) F_1 viewed from above (that is, from the N side of the membrane), showing the three β (shades of purple) and three α (shades of gray) subunits and the central shaft (γ subunit, green). Each β subunit, near its interface with the neighboring α subunit, has a nucleotide-binding site critical to the catalytic activity. The single γ subunit associates primarily with one of the three $\alpha\beta$ pairs, forcing each of the three β subunits into slightly different conformations, with different nucleotide-binding sites. In the crystalline enzyme, one subunit (β -ADP) has ADP (yellow) in its binding site, the next (β -ATP) has ATP (red), and the third (β -empty) has no bound nucleotide.

(c) The entire enzyme viewed from the side (in the plane of the membrane). The F_1 portion (PDB IDs 1BMF, 1JNV, and 2A7U) has three α and three β subunits arranged like the segments of an orange around a central shaft, the γ subunit (green). (Two α subunits and one β subunit have been omitted to reveal the γ subunit and the binding sites for ATP and ADP on the β subunits.) The δ subunit confers oligomycin sensitivity on the ATP synthase, and the ϵ subunit may serve to inhibit its ATPase activity under some circumstances. The F_0 subunit consists of one a subunit and two b subunits (PDB ID 2CLY and PDB ID 1B9U), which anchor the F_0F_1 complex in the membrane and act as a stator, holding the α and β subunits in place. F_0 also includes the c ring, made up of a number (8 to 15, depending on the species) of identical c subunits, small, hydrophobic proteins. The c ring and the a subunit interact to provide a transmembrane path for protons. Each c subunit has an Asp residue near the middle of the membrane, which can bind or give up a proton. In this structure (PDB ID 1YCE), we have shown the homologous c_{11} ring of the Na^+ -ATPase of *Illyobacter tartaricus*, for which the structure is well established. The Na^+ -binding sites in it, which correspond to the proton-binding sites of the F_0F_1 complex, are shown with their bound Na^+ ions (red spheres). (d) A view of F_0 perpendicular to the membrane. Each of the c subunits in F_0 has a critical Asp residue near the middle of the membrane, which undergoes protonation/deprotonation during the catalytic cycle of the ATP synthase. As in (c), red spheres represent the Na^+ - or proton-binding sites in Asp residues.



Obrázek 4.84: Struktura ATP syntázy

Skládá se ze dvou podjednotek, F_1 a F_0 .

PODJEDNOTKA F_1

- název se odvíjí z historie

- při působení ureázou se F1 oddělil v jednom celku, kterému se říkalo faktor 1
- je z pěti podjednotek, jsou označeny řecky po α – ϵ , jsou zde v poměru 3:3:1:1:1
 - tato stechiometrie (poměr) je zachována v celém spektru sledovaných organismů, přestože samotné proteiny se liší
 - * očividně stechiometrie a struktura vyplývají z mechanismu

STAVBA F1

- α a β jsou v kruhu, střídají se (seskupení podobné pomeranči)
 - tam, kde se stýkají, je vazebné místo pro nukleotidy/ATP
- dovnitř je zasunutá γ podjednotka
 - je to taková asymetrická smyčka (na obrázku (c) světle zelená)
 - protože je asymetrická, ovlivňuje konformaci α a β podjednotek (viz níže)
 - * γ se v průběhu syntázy otáčí a periodicky mění konformace jednotlivých α a β podjednotek
- podjednotky δ a ϵ zprostředkovávají kontakt γ s ostatními transmembránovými podjednotkami

KONFORMACE ALFA A BETA PODJEDNOTEK

- (1) **těsná (T)** (na obrázku oblé), je zde navázáno ATP
- (2) **volná (L)** (na obrázku oblé roky), je zde navázáno ADP
- (3) **otevřená (O)** nebo též **empty** (na obrázku hranaté), není zde vázáno nic

Průběh změn konformace je T -> O -> L -> T -> ...

PODJEDNOTKA FO

- FO proto, že je inhibována oligomycinem
- v tom nejjednodušším případě je ze tří podjednotek
 - (1) A, protonový kanál
 - (2) B, venkovní stonek
 - (3) C multimerní prstenec, jenž je uložen ve vnitřní mch membráně
 - tužkový model C podjednotky: je to prstenec tvořený různým počtem podjednotek (u bakterií 12, u člověka 8) a je velice důležitý pro výkonnost celého enzymu
- u savců je v ní ještě více podjednotek, které se podílí především na stavbě vnějšího stonku (D, F6, atd.) a na stavbě kanálu
 - mají hlavně regulační funkci

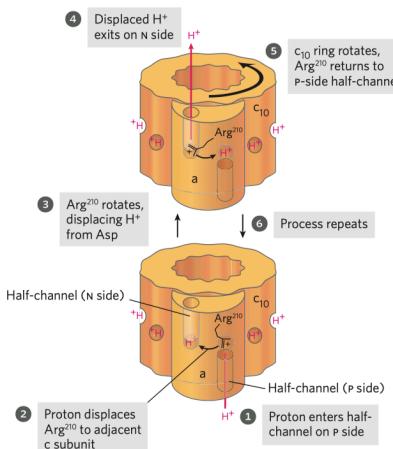
Princip funkce

- pracuje jako *molekulární motor*

- skládá se ze statoru a rotoru, otáčení rotoru způsobuje syntézu ATP

PRINCIP ROTACE

- (1) když protékají protony přes kanál tvořený A, roztáčí prstenec C (viz níže)
- (2) na C je přes δ a ϵ připojená podjednotka γ , která se tedy otáčí s C
 - celý **rotor** je tedy $C + \gamma + \delta + \epsilon$
 - samotná δ se ale neotáčí, je pevně uchycena k B
- (3) otáčení γ způsobuje syntézu ATP



Obrázek 4.85: Detailní rozkreslení rotace C prstence

PRINCIP ROTACE C PRSTENCE

- A podjednotka má dva hydrofilní půlkanály, jeden vedoucí z P a druhý vedoucí na N stranu membrány
- každá C podjednotka (např. v kvasinkách jich je 10) má přibližně v polovině Asp zbytek, který může přijmout/odštěpit proton
- A podjednotka má Arg, který na počátku reaguje s Asp přilehlé C podjednotky
- průběh
 - (1) kanálem z P strany přijde proton
 - (2) proton se naváže na Asp, což oslabí jeho vazbu s Arg v A podjednotce
 - (3) Arg se otočí směrem k protonovanému Asp vedlejší C podjednotky a naváže se na něj
 - (4) uvolněný proton odejde kanálem na N stranu
 - (5) C prstenec se otočí tak, aby nový Arg-Asp páru byl natočený ke kanálu vedoucímu z P strany
 - (6) nový cyklus může započít
- počet protonů, které musí komplexem projít, aby se dokončila jedna otáčka, je tím pádem roven počtu podjednotek v C prstenci

Dle měření se zdá že proběhne přibližně **100 otáček za sekundu**.

[MINDFUCK — JAK BYLO DOKÁZÁNO, ŽE DOCHÁZÍ K ROTACI]

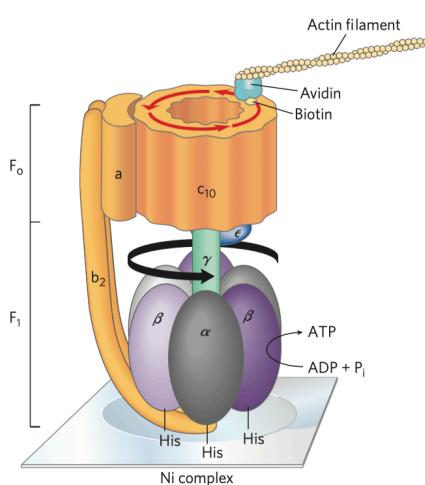
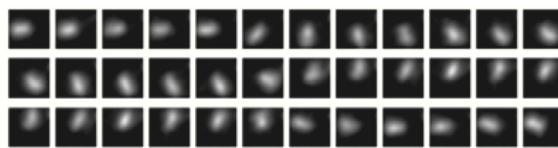


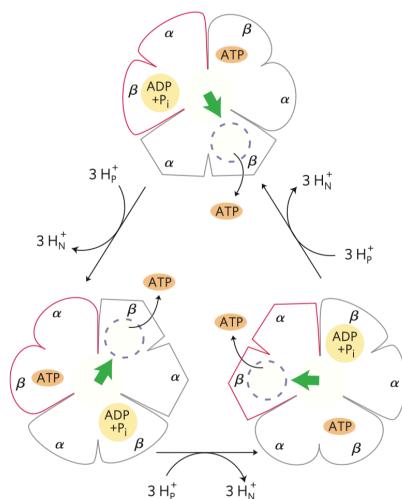
FIGURE 19–27 Experimental demonstration of rotation of F_0 and γ . F_1 genetically engineered to contain a run of His residues adheres tightly to a microscope slide coated with a Ni complex; biotin is covalently attached to a c subunit of F_0 . The protein avidin, which binds biotin very tightly, is covalently attached to long filaments of actin labeled with a fluorescent probe. Biotin-avidin binding now attaches the actin filaments to the c subunit. When ATP is provided as substrate for the ATPase activity of F_1 , the labeled filament is seen to rotate continuously in one direction, proving that the F_0 cylinder of c subunits rotates. In another experiment, a fluorescent actin filament was attached directly to the γ subunit. The series of fluorescence micrographs (read left to right) shows the position of the actin filament at intervals of 133 ms. Note that as the filament rotates, it makes a discrete jump about every eleventh frame. Presumably the cylinder and shaft move as one unit.



Obrázek 4.86: K rotující C podjednotce bylo připojeno dlouhé, fluorescenčně označené aktinové vlákno. Po přidání ATP se celá struktura dala do pohybu, rotace aktinového vlákna byla zaznamenána na obrázku napravo.

PRINCIP SYNTÉZY

- viz obrázek níže
- šipka označuje orientaci γ
- když protečou tři protony, dojde k pootočení gamy o 120°
 - tím se změní konformace všech tří dvojic ($T \rightarrow O \rightarrow L \rightarrow T \rightarrow \dots$)
- v kroce $[L \rightarrow T]$ probíhá kinetická katalýza
 - mezi α a β jsou navázané ADP a P
 - otočením se změní pozice substrátů tak, že se mezi nimi vytvoří makroergní vazba
=> sloučí se do ATP
- na jeden cyklus (tři otočení), při kterém vzniknou tři molekuly ATP, je potřeba 9 protonů

Obrázek 4.87: Princip syntézy při rotaci γ

[REÁLNÝ ZISK ATP]

- teoretický zisk: něco málo přes 3 ATP na jeden reoxidovaný NADH
 - 10 protonů za jeden NADH, na jedno ATP potřebujeme 3 protony
- reálný zisk je kolem 2,5 ATP
 - k výrobě ATP potřebujeme kromě protonů i ADP a fosfát
 - * k přenosu ADP do mch se používá adenindinukleotidový translokátor (prohodí ATP a ADP)
 - * anorganický substrát je transportován symportem s protony, tedy na jedno ATP reálně potřebujeme 3 + 1 protonů -> za 10 protonů získáme jen 2,5 ATP
- za FADH je to ještě méně, jen 1.5

[POHYB BAKTERIÍ]

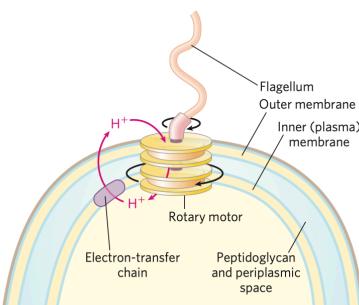


FIGURE 19–41 Rotation of bacterial flagella by proton-motive force. The shaft and rings at the base of the flagellum make up a rotary motor that has been called a “proton turbine.” Protons ejected by electron transfer flow back into the cell through the turbine, causing rotation of the shaft of the flagellum. This motion differs fundamentally from the motion of muscle and of eukaryotic flagella and cilia, for which ATP hydrolysis is the energy source.

Obrázek 4.88: Rotace bičíku

Některé bakterie využívají mechanismus ATP syntázy k pohybu (v opačném směru, tedy ATP → rotace).

Inhibitory

TABLE 19–4 Agents That Interfere with Oxidative Phosphorylation or Photophosphorylation

Type of interference	Compound*	Target/mode of action
Inhibition of electron transfer	Cyanide	Inhibit cytochrome oxidase
	Carbon monoxide	
	Antimycin A	Blocks electron transfer from cytochrome <i>b</i> to cytochrome <i>c</i> ₁
	Myxothiazol	
	Rotenone	Prevent electron transfer from Fe-S center to ubiquinone
	Amytal	
Inhibition of ATP synthase	Piericidin A	
	DCMU	Competes with Q _B for binding site in PSII
Inhibition of ATP synthase	Aurovertin	Inhibits F ₁
	Oligomycin	
	Venturicidin	Inhibits F ₀ and CF ₀
Uncoupling of phosphorylation from electron transfer	DCCD	Blocks proton flow through F ₀ and CF ₀
	FCCP	
	DNP	Hydrophobic proton carriers
	Valinomycin	K ⁺ ionophore
Inhibition of ATP-ADP exchange	Thermogenin	In brown adipose tissue, forms proton-conducting pores in inner mitochondrial membrane
	Atractyloside	Inhibits adenine nucleotide translocase

Obrázek 4.89: Inhibitory a jejich cíle

INHIBITORY

- kromě výše uvedených ještě **malonát**, což je inhibitor kompetující se sukcinátem
 - objevil ho Krebs
- **protohofory** (FCCP, dinitrofenol)

- hydrofobní molekuly, které se mohou protonovat
- mimo membránu se protonují, poté vstoupí do matrix a depronují se, čímž zničí protonový gradient

ROZPŘAHOVACÍ PROTEINY

- umí rozpřáhnout oxidaci a fosforylací
- používají se v experimentech, ale i v těle, kde mají podobu proteinů vnitřní mch membrány fungujících jako kanál
 - vybíjejí protonový gradient -> netřesová termogeneze
 - u člověka to umí jen děti těsně po narození, u savců jen při hibernaci
 - děje se to v hnědé tukové tkáni

HNĚDÁ TUKOVÁ TKÁŇ

- u člověka mezi lopatkami a v břišní dutině
- obsahují hodně cytochromů – pohybují se v absorpci světla cca 500 až 600nm
- slouží při adaptaci na změnu okolní teploty, slouží jako ohřívač krve vedoucí k mozku a dalším orgánům
- buňky mají elektron-transportní řetězec končící rozpřáhujícím proteinem
- kanály jsou přísně regulované, jsou aktivovány mastnými kyselinami a inhibovány nukleotidy

Reoxidace glykolytického NADH

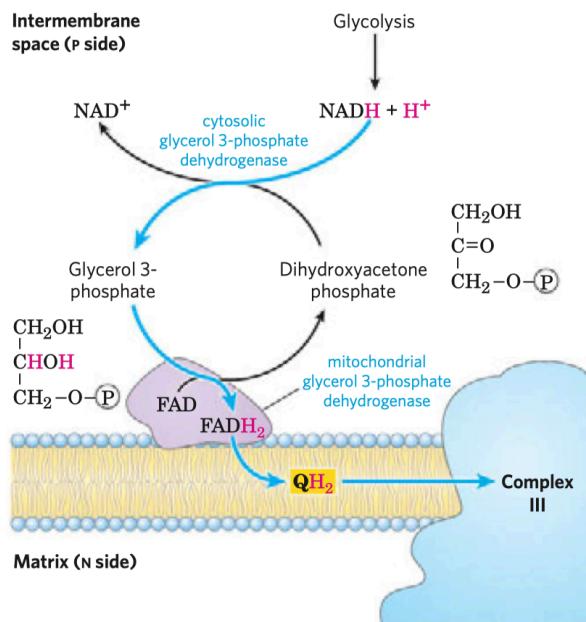


FIGURE 19–32 Glycerol 3-phosphate shuttle. This alternative means of moving reducing equivalents from the cytosol to the mitochondrial matrix operates in skeletal muscle and the brain. In the cytosol, dihydroxyacetone phosphate accepts two reducing equivalents from NADH in a reaction catalyzed by cytosolic glycerol 3-phosphate dehydrogenase. An isozyme of glycerol 3-phosphate dehydrogenase bound to the outer face of the inner membrane then transfers two reducing equivalents from glycerol 3-phosphate in the intermembrane space to ubiquinone. Note that this shuttle does not involve membrane transport systems.

Obrázek 4.90: Glycerolfosfátový člunek

GLYCEROLFOSFÁTOVÝ ČLUNEK

- využívá různě orientované izoenzymy
- průběh viz obrázek
 - pozn. NADH je využito na redukci dihydroxyacetonfosfátu v enolázové reakci (hexóza => dvě triózy) a pak je zas mch dehydrogenázou reoxidováno
- nevýhoda: FAD přeskočí komplex I, čili zbytečně přijde o 4 protony

Izoenzymy

Izoenzymy jsou enzymy, které katalyzují stejnou reakci, ale mají odlišnou strukturu.

U člověka je častější následující cyklus.

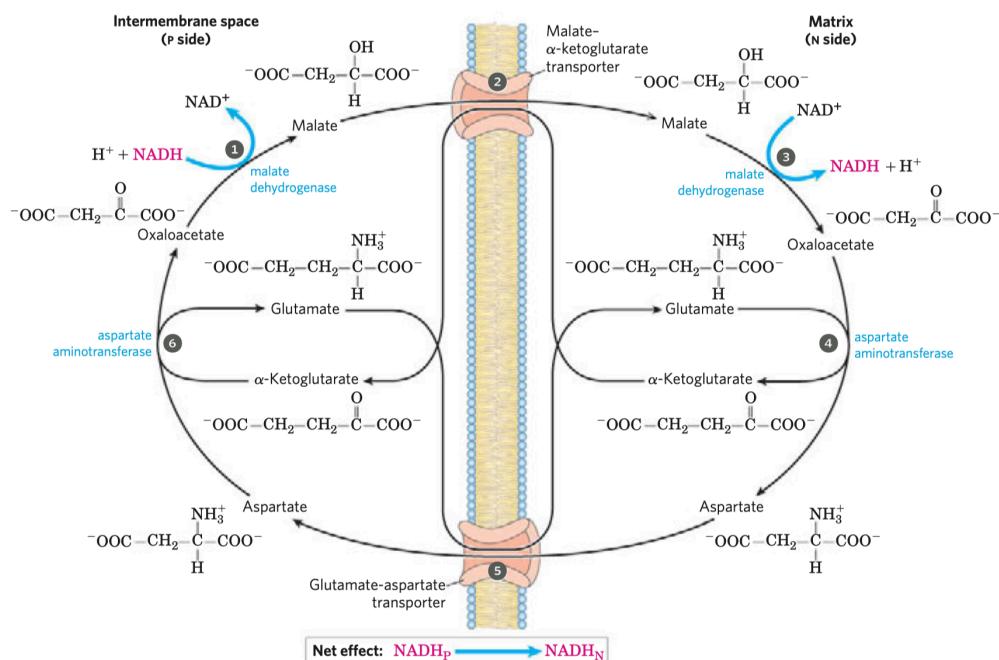


FIGURE 19-31 Malate-aspartate shuttle. This shuttle for transporting reducing equivalents from cytosolic NADH into the mitochondrial matrix is used in liver, kidney, and heart. ① NADH in the cytosol enters the intermembrane space through openings in the outer membrane (porins), then passes two reducing equivalents to oxaloacetate, producing malate. ② Malate crosses the inner membrane via the malate- α -ketoglutarate

transporter. ③ In the matrix, malate passes two reducing equivalents to NAD⁺, and the resulting NADH is oxidized by the respiratory chain; the oxaloacetate formed from malate cannot pass directly into the cytosol. ④ Oxaloacetate is first transaminated to aspartate, and ⑤ aspartate can leave via the glutamate-aspartate transporter. ⑥ Oxaloacetate is regenerated in the cytosol, completing the cycle.

Obrázek 4.91: Malát-aspartátový člunek

MALÁT-ASPARTÁTOVÝ ČLUNEK

- přenos redukčních ekvivalentů je zabezpečen dvěma izoenzymy malát-dehydrogenázy
- zbytek viz obrázek (stačí znát základní cyklus, který je pod obrázkem v bodech popsán)

[ENERGETICKÉ SHRNUJÍ GLYKOLÝZY]

TABLE 19-5 ATP Yield from Complete Oxidation of Glucose

Process	Direct product	Final ATP
Glycolysis	2 NADH (cytosolic) 2 ATP	3 or 5* 2
Pyruvate oxidation (two per glucose)	2 NADH (mitochondrial matrix)	5
Acetyl-CoA oxidation in citric acid cycle (two per glucose)	6 NADH (mitochondrial matrix) 2 FADH ₂ 2 ATP or 2 GTP	15 3 2
Total yield per glucose		30 or 32

*The number depends on which shuttle system transfers reducing equivalents into the mitochondrion.

Obrázek 4.92

4.10.4 Regulace OF

- typicky regulace produktem (aby se nehromadil)
 - hexokinázová reakce, pyruvátdehydrogenázový komplex
- často jsou také enzymy aktivovány či inhibovány molekulami informujícími o tom, jak je na tom buňka energeticky
 - dostatek energie → hodně NADH a ATP → inhibice nějakých kroků
 - nedostatek energie → hodně ADP, anorganického fosfátu a neredukovaných koenzymů → stimulace nějakých kroků

ČÁST 5

LIPIDY, MASTNÉ KYSELINY A JEJICH METABOLISMUS

Lipidy

Různorodá skupina látek, které spojuje to, že jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Nejběžnějším příkladem jsou triacylglyceroly.

Triacyglyceroly

Estery glycerolu — na glycerolu (trojsytném alkoholu) jsou esterovou (hydroxylová+karboxylová) vazbou napojeny tři mastné kyseliny (viz obrázek níže).

Glycerofosfolipidy

Hlavní složky membrán, ampifatické molekuly, mají dva ocásky z MK a na třetím je navázáno něco polárního, např. fosfatydilcholin, alkohol atp.

Vosky

Estery MK a alkoholů s dlouhým řetězcem.

Terpeny

Molekuly z izoprenových podjednotek.

Izopren je 2-methyl-1,3-butadien, tvoří aromatické látky, a vyskytuje se hlavně v rostlinných hormonech.

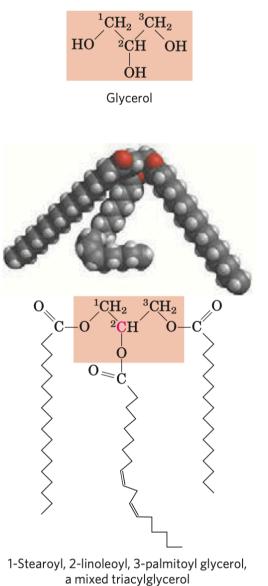


FIGURE 10-3 Glycerol and a triacylglycerol. The mixed triacylglycerol shown here has three different fatty acids attached to the glycerol backbone. When glycerol has different fatty acids at C-1 and C-3, C-2 is a chiral center (p. 17).

Obrázek 5.1: Příklad triacylglycerolu

5.1 Mastné kyseliny

- mají dlouhý řetězec, 4 a více uhlíků
- pojmenování
 - často jsou pojmenované triviálně, podle toho, z čeho byly izolovány
 - označují se i čísly, [# uhlíků] : [# dvojných vazeb] : [umístění dvojných vazeb] ?
 - * stearová je 18:0 (18 uhlíků, žádná dvojná vazba)
 - * olejová je 18:1:9 (18 uhlíků, dvojná vazba na devátém z nich)

Velice důležitá (dokonce esenciální) je pro nás kyselina **arachnidová** — je prekurzorem pro syntézu hormonů prostacyklinu, tromboxynu atd.

TABLE 10-1 Some Naturally Occurring Fatty Acids: Structure, Properties, and Nomenclature

Carbon skeleton	Structure*	Systematic name [†]	Common name (derivation)	Melting point (°C)	Solubility at 30 °C (mg/g solvent)	
					Water	Benzene
12:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	<i>n</i> -Dodecanoic acid	Lauric acid (Latin <i>laurus</i> , "laurel plant")	44.2	0.063	2,600
14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	<i>n</i> -Tetradecanoic acid	Myristic acid (Latin <i>Myristica</i> , nutmeg genus)	53.9	0.024	874
16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	<i>n</i> -Hexadecanoic acid	Palmitic acid (Latin <i>palma</i> , "palm tree")	63.1	0.0083	348
18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	<i>n</i> -Octadecanoic acid	Stearic acid (Greek <i>stear</i> , "hard fat")	69.6	0.0034	124
20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	<i>n</i> -Eicosanoic acid	Arachidic acid (Latin <i>Arachis</i> , legume genus)	76.5		
24:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	<i>n</i> -Tetracosanoic acid	Lignoceric acid (Latin <i>ignum</i> , "wood" + <i>cera</i> , "wax")	86.0		
16:1(Δ ⁹)	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	<i>cis</i> -9-Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid	1 to -0.5		
18:1(Δ ⁹)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid	Oleic acid (Latin <i>oleum</i> , "oil")	13.4		
18:2(Δ ^{9,12})	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	<i>cis,cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid (Greek <i>linon</i> , "flax")	1–5		
18:3(Δ ^{9,12,15})	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid	α-Linolenic acid	-11		
20:4(Δ ^{5,8,11,14})	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	<i>cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-Icosatetraenoic acid	Arachidonic acid	-49.5		

Obrázek 5.2: Příklady mastných kyselin

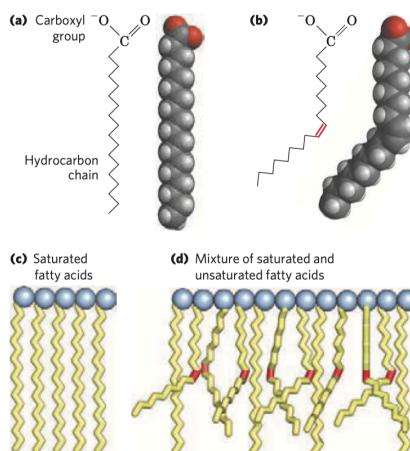
Nasycené MK

Nemají dvojnou vazbu. Opakem jsou nenasycené MK.

Polynenasycené

Mají více násobných vazeb.

O to, které jsou zdravé a nezdravé, se stále vedou spory — v současnosti se prosazují ty s mnoha nenasycenými vazbami, jako např. kukuřičný olej a olej světlíce barvířské.



Obrázek 5.3: Pro polynenasycené MK je složitější se uspořádat, proto mají nižší teplotu tání než nasycené MK, které u sebe dobře drží mnoha hydrofilními vazbami

5.2 Oxidace MK

UKLÁDÁNÍ ENERGIE DO MK

- oproti sacharidům a polysacharidům skladnější, v přepočtu uložené energie na hmotnost jsou výhodnější
 - např. ptáci by pouze s cukrovými zásobami dlouhé migrace nezvládli (buďto by měli málo energie, nebo by se neunesli)
 - i člověk má tuk jako zásobní substrát
 - ale trvá dlouho, než se energie zmobilizuje
- zvířata závislá na tuku: zpravidla s omezeným přístupem k pitné vodě, jsou tedy závislé na metabolické vodě, ta vzniká na komplexu 4

TABLE 23–5 Available Metabolic Fuels in a Normal-Weight, 70 kg Man and in an Obese, 140 kg Man at the Beginning of a Fast

Type of fuel	Weight (kg)	Caloric equivalent (thousands of kcal (kJ))	Estimated survival (months)*
Normal-weight, 70 kg man			
Triacylglycerols (adipose tissue)	15	140 (590)	
Proteins (mainly muscle)	6	24 (100)	
Glycogen (muscle, liver)	0.23	0.90 (3.8)	
Circulating fuels (glucose, fatty acids, triacylglycerols, etc.)	0.023	0.10 (0.42)	
Total		165 (690)	3
Obese, 140 kg man			
Triacylglycerols (adipose tissue)	80	750 (3,100)	
Proteins (mainly muscle)	8	32 (130)	
Glycogen (muscle, liver)	0.23	0.92 (3.8)	
Circulating fuels	0.025	0.11 (0.46)	
Total		783 (3,200)	14

*Survival time is calculated on the assumption of a basal energy expenditure of 1,800 kcal/day.

Obrázek 5.4: Běžné množství uložené energie ve třech jedincích

SPRINTEŘI, MÍLAŘI A MARATONCI

- sprinteři: ATP ve svalech -> kreatinfosfát -> anaerobní glykolýza
- mílaři: aerobní glykolýza (glykogen -> CO₂) -> nastupuje tuková tkáň
- maratonci: oxidace mastných kyselin

ZPRACOVÁNÍ TUKŮ PRO ENERGI

- (1) rozložení tuků na MK a transport MK do buněk
- (2) rozložení MK v buňce
 - (I) aktivace MK
 - (II) transport MK do mch
 - (III) β-oxidace, rozložení MK
 - (IV) KC, OF

5.2.1 Rozložení tuků na MK

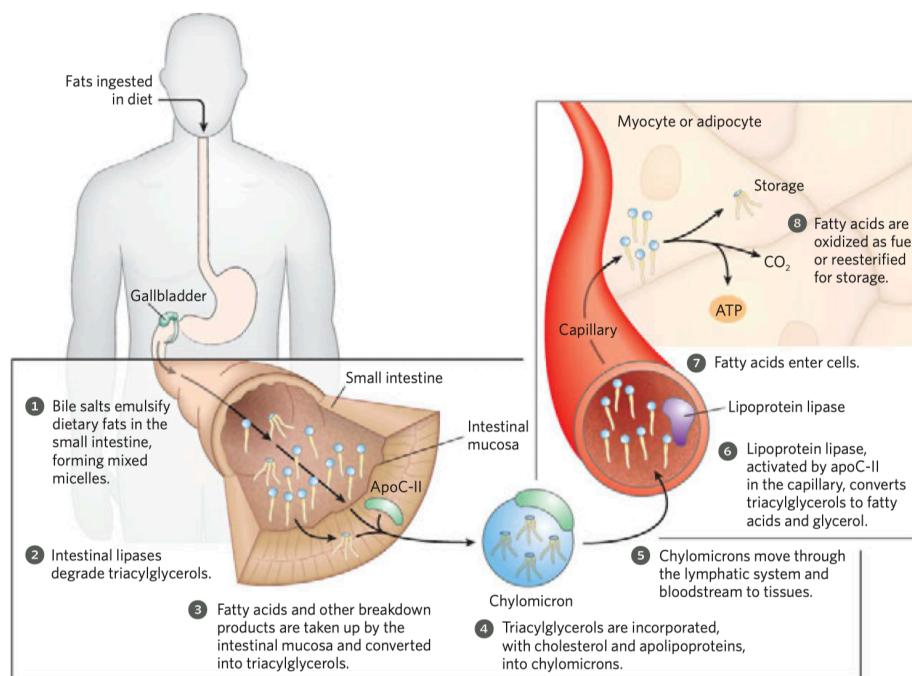


FIGURE 17-1 Processing of dietary lipids in vertebrates. Digestion and absorption of dietary lipids occur in the small intestine, and the fatty acids released from triacylglycerols are packaged and delivered to muscle and adipose tissues. The eight steps are discussed in the text.

Obrázek 5.5: Cesta lipidů skrz člověka

ROZLOŽENÍ TUKŮ NA MK

- tuky v trávicí soustavě tvoří kapénky, jež jsou špatně napadnutelné enzymy
 - <= tuky jsou velice hydrofobní
 - je nutné je **emulgovat**
- žlučové kyseliny a jejich soli tuky emulgují, tvoří se micely
- lipázy ve střevě odštěpují jednotlivé MK
- MK se dostávají přes membránu, stávají se z nich **chylomikrony**
 - chylomikron je útvar tvořený jednovrstevnou membránou s triacylglyceroly a estery uvnitř
- chylomikrony jdou přes stěnu střevní sliznice do krve
- v krvi se rozpadnou na MK a jsou transportovány na místo určení
 - pokud jsou potřeba hned tak do myocytů (svalů)
 - pokud hned potřeba nejsou, jdou do bílé tukové tkáně, kde se z nich znova tvoří glyceroly a tukové kapénky
 - v krvi jsou MK vázány na sérový protein **albumin**

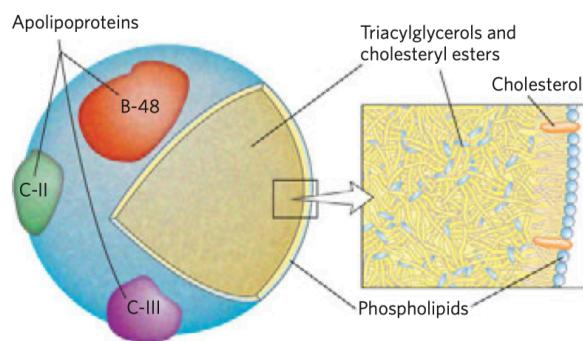
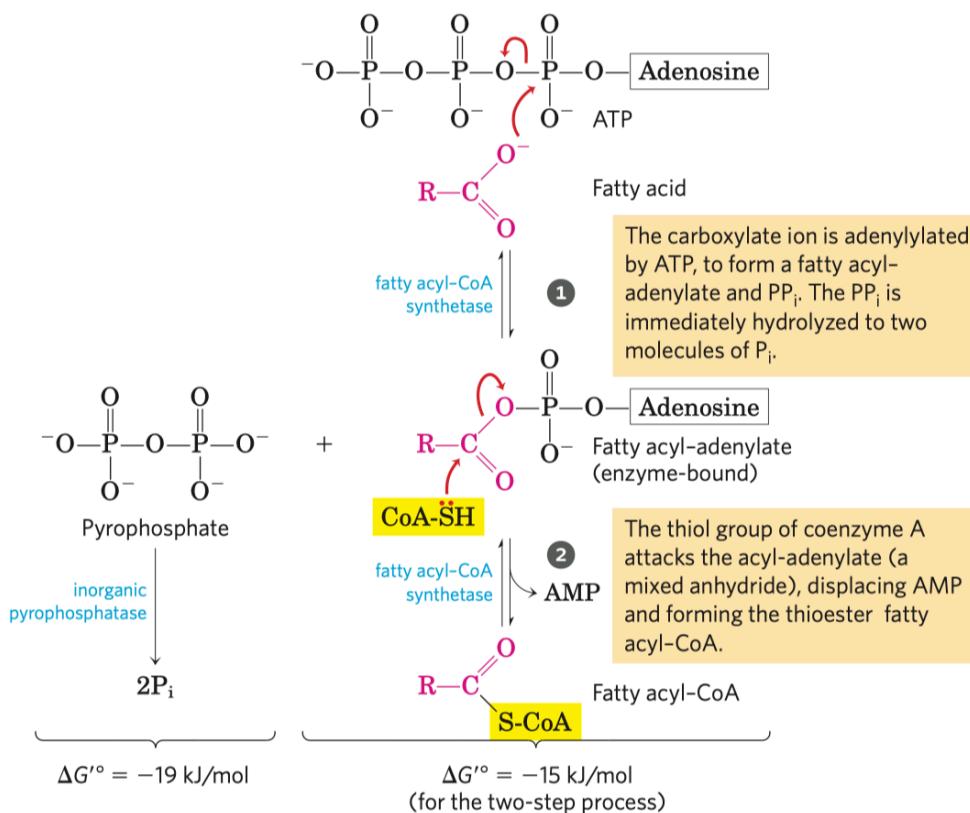


FIGURE 17-2 Molecular structure of a chylomicron. The surface is a layer of phospholipids, with head groups facing the aqueous phase. Triacylglycerols sequestered in the interior (yellow) make up more than 80% of the mass. Several apolipoproteins that protrude from the surface (B-48, C-III, C-II) act as signals in the uptake and metabolism of chylomicron contents. The diameter of chylomicrons ranges from about 100 to 500 nm.

Obrázek 5.6: Chylomikron

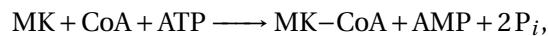
5.2.2 Aktivace MK

MK se musí dostat do mch, kde probíhá β -oxidace. Aby ale prošla dovnitř, musí být nejprve aktivována tím, že se z ní udělá acyl-CoA (ne acetyl, ten byl v KC).



Obrázek 5.7: Konverze MK na acyl-CoA

Celková přeměna je tedy



a je silně exergonická ($\Delta G'^\circ = -34 \text{ kJ/mol}$). U reakce je použito pyrofosfátové štěpení (ATP \rightarrow AMP).

5.2.3 Transport MK do mch

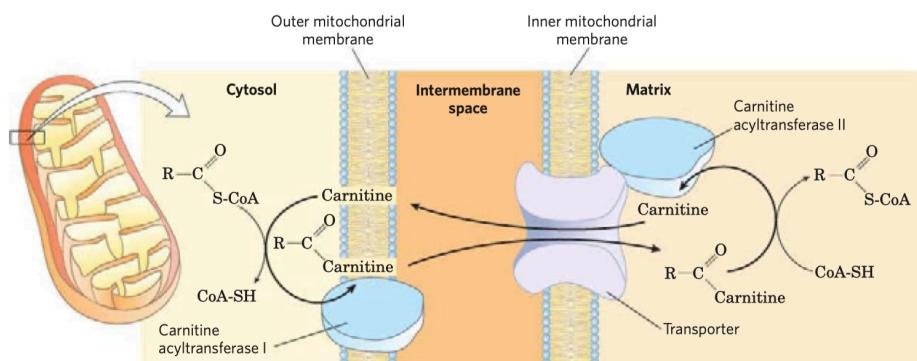


FIGURE 17-6 Fatty acid entry into mitochondria via the acyl-carnitine/carnitine transporter. After fatty acyl-carnitine is formed at the outer membrane or in the intermembrane space, it moves into the matrix by facilitated diffusion through the transporter in the inner membrane. In the matrix, the acyl group is transferred to mitochondrial coenzyme A,

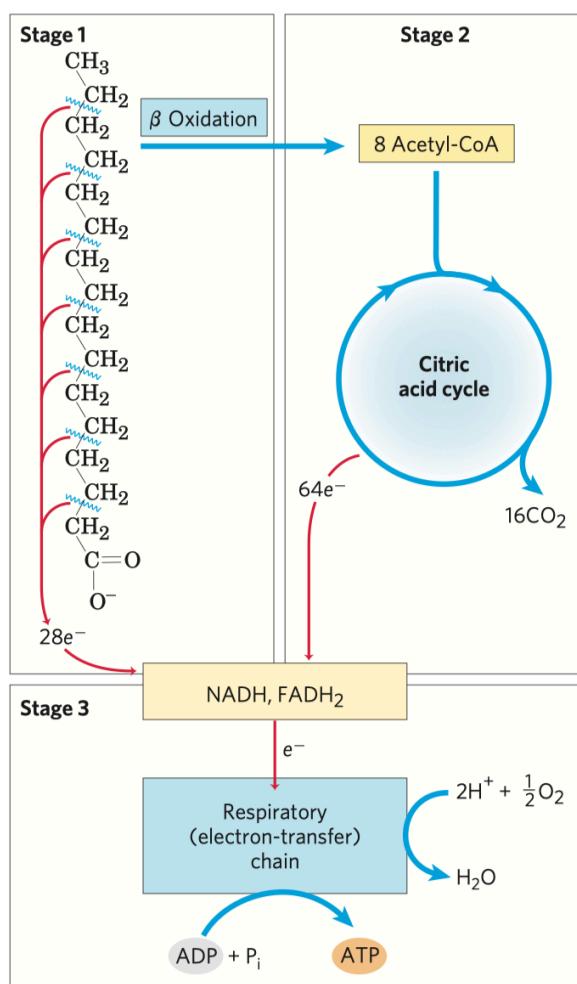
freeing carnitine to return to the intermembrane space through the same transporter. Acyltransferase I is inhibited by malonyl-CoA, the first intermediate in fatty acid synthesis (see Fig. 21-2). This inhibition prevents the simultaneous synthesis and degradation of fatty acids.

Obrázek 5.8: Karnitinový cyklus

PRŮCHOD ACYL-COA DO ABRMCH

- k tomu slouží molekula karnitin, součást acyl-CoA-karnitinového cyklu
 - karnitin je mnohem menší, než CoA, proto se lépe dostává přes membránu; zásobárny CoA v cytoplazmě a mch jsou oddělené
- v cyklu též figurují enzymy kartininacyltransferázy I (vnější membrána) a II (vnitřní membrána)
 - kartininacyltransferázy reálně tvoří komplex procházející přes obě membrány
- viz obrázek

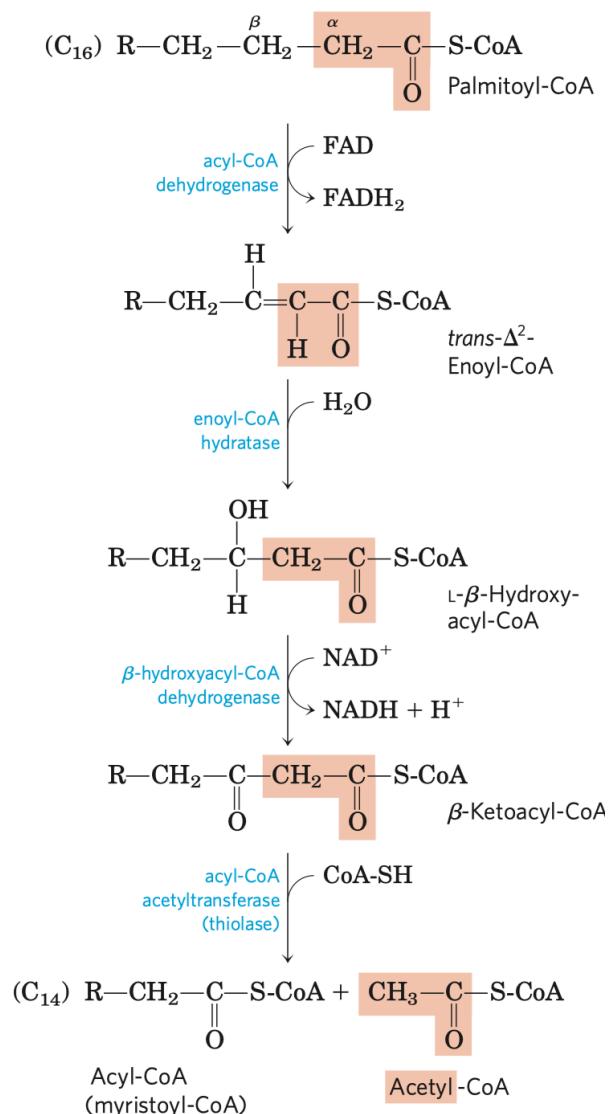
5.2.4 Beta-oxidace



Obrázek 5.9: Fáze zpracování MK v mch

BETA-OXIDACE

- ve výsledku rozštípá MK na dvojuhlíkaté zbytky, které poté jako acetyl-CoA vstupují do KC a kromě toho také uvolní 64 elektronů v podobně redukovaných koenzymů, které se poté účastní OF
- skládá se ze čtyř reakcí



Obrázek 5.10: Průběh β-oxidace

Viz obrázek, popisky jen doplňují detaily.

PRVNÍ REAKCE

- acyl-CoA dehydrogenáza oxiduje MK
- jako koenzym má FAD, které se redukuje a postupuje do OF

DRUHÁ REAKCE

- v enoyl-CoA je dvojná vazba mezi α a β uhlíky, které se chceme zbavit
- α uhlík proto hydratujeme

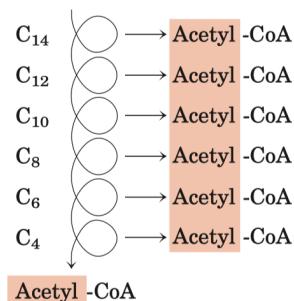
TŘETÍ REAKCE

- na β uhlíku vytvoříme karbonylovou skupinu
- u toho se redukuje NAD⁺

ČTVRTÁ REAKCE

- zbyde nám MK-acyl-CoA, přičemž MK je nyní o dva uhlíky kratší

β -oxidaci se někdy říká též **Lynenova spirála**



Obrázek 5.11: Lynenova spirála

[CO KDYŽ MÁ MK LICHÝ POČET UHLÍKŮ]

- na konci β -oxidace vznikne propionyl-CoA
- ten je potřeba přeměnit tak, aby mohl vstoupit do KC
 - přemění se na sukcinyl-CoA
- k procesu je potřeba vitamín B₁₂
- celou reakci není potřeba umět

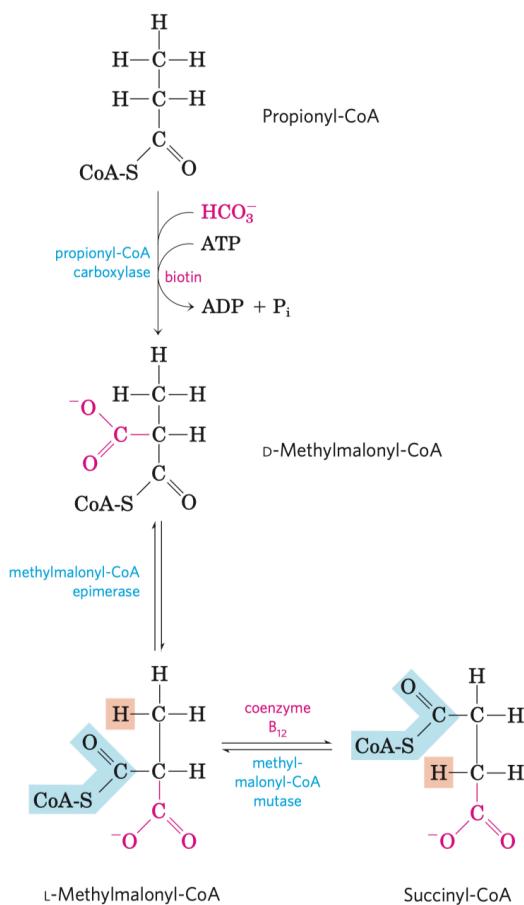


FIGURE 17-12 Oxidation of propionyl-CoA produced by β oxidation of odd-number fatty acids. The sequence involves the carboxylation of propionyl-CoA to D-methylmalonyl-CoA and conversion of the latter to succinyl-CoA. This conversion requires epimerization of D- to L-methylmalonyl-CoA, followed by a remarkable reaction in which substituents on adjacent carbon atoms exchange positions (see Box 17-2).

Obrázek 5.12: Změna propionylu-CoA na sukcinyl-CoA

[CO KDYŽ JE MK NENASYCENÁ]

- dvojné vazby je potřeba nahradit jednoduchými
- pak se normálně odbourávají (někdy probíhá například ω -oxidace)
- celou reakci není potřeba umět

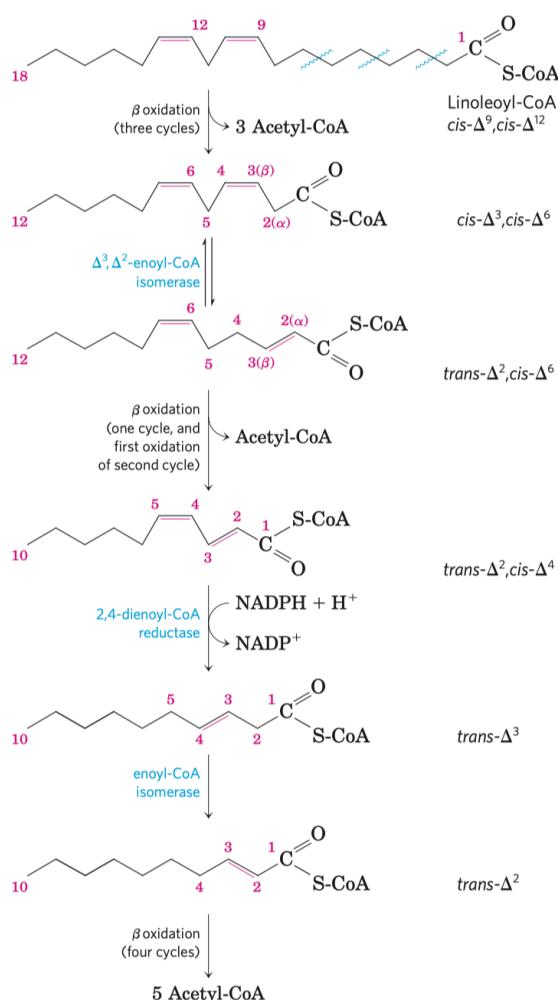


FIGURE 17-11 Oxidation of a polyunsaturated fatty acid. The example here is linoleic acid, as linoleoyl-CoA ($\Delta^{9,12}$). Oxidation requires a second auxiliary enzyme in addition to enoyl-CoA isomerase: NADPH-dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase. The combined action of these two enzymes converts a *trans*- $\Delta^2, \text{cis-}\Delta^4$ -dienoyl-CoA intermediate to the *trans*- Δ^2 -enoyl-CoA substrate necessary for β oxidation.

Obrázek 5.13: Průběh β -oxidace na polynenasycené MK

Zisk ATP

V následující tabulce můžeme vidět zisk z β oxidace jedné molekuly palmitoyl-CoA. Kdybychom počítali zisk z palmitátu, musíme ještě odečíst 2 ATP za jeho aktivaci na palmitoyl-CoA.

TABLE 17-1 Yield of ATP during Oxidation of One Molecule of Palmitoyl-CoA to CO₂ and H₂O

Enzyme catalyzing the oxidation step	Number of NADH or FADH ₂ formed	Number of ATP ultimately formed*
Acyl-CoA dehydrogenase	7 FADH ₂	10.5
β -Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	7 NADH	17.5
Isocitrate dehydrogenase	8 NADH	20
α -Ketoglutarate dehydrogenase	8 NADH	20
Succinyl-CoA synthetase		8†
Succinate dehydrogenase	8 FADH ₂	12
Malate dehydrogenase	8 NADH	20
Total		108

*These calculations assume that mitochondrial oxidative phosphorylation produces 1.5 ATP per FADH₂ oxidized and 2.5 ATP per NADH oxidized.

†GTP produced directly in this step yields ATP in the reaction catalyzed by nucleoside diphosphate kinase (p. 526).

Obrázek 5.14: Zisk ATP z β -oxidace

Lokalizace

- kromě mch probíhá i v peroxisomech, u rostlin dokonce výhradně tam
 - dráhy jsou vlastně principiálně shodné
 - * liší se tím, že v peroxisomech se oxidují MK s dlouhými řetězci (>20) na osmikrátce zbytky a ty poté pokračují do mch
 - * navíc v prvním kroku v mitochondriu vzniká o jeden redukovaný koenzym více
- enzymy pracují buďto jako samostatné entity, nebo v **superkomplexech**
 - peroxisomální a glyoxysomální komplexy mají různé počty vazebních míst pro MK různé délky

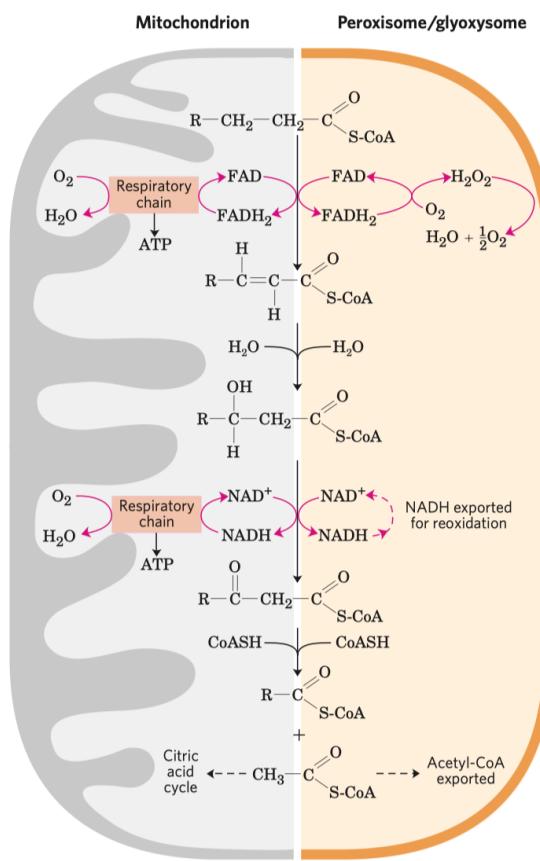


FIGURE 17-14 Comparison of β oxidation in mitochondria and in peroxisomes and glyoxysomes. The peroxisomal system differs from the mitochondrial system in three respects: (1) the peroxisomal system prefers very-long-chain fatty acids; (2) in the first oxidative step electrons pass directly to O_2 , generating H_2O_2 , and (3) the NADH formed in the second oxidative step cannot be reoxidized in the peroxisome or glyoxysome, so reducing equivalents are exported to the cytosol, eventually entering mitochondria. The acetyl-CoA produced by peroxisomes and glyoxysomes is also exported; the acetate from glyoxysomes (organelles found only in germinating seeds) serves as a biosynthetic precursor (see Fig. 17-15). Acetyl-CoA produced in mitochondria is further oxidized in the citric acid cycle.

Obrázek 5.15: Rozdíl průběhu β -oxidace v mch a v peroxisomu

5.2.5 Ketolátky

- aceton, acetoacetát, hydroxybutyrát
- běžný postup: MK \rightarrow acetyl-CoA \rightarrow KC
 - pokud je málo oxalacetátu, KC se zastaví
 - oxalacetát se běžně doplňuje anaplerotickými reakcemi, ale pro ty jsou výchozím substrátem produkty glykolýzy

- * KC se tedy při nedostatku cukru (např. u neléčených diabetiků, za okolností vyčerpání) zastaví
- * za takových okolností vznikají ze dvou acetyl-CoA právě ketolátky
- * lidem te poté z úst cítit aceton
- přestupují hematoencefalickou bariéru => mohou sloužit v mozku (a dalších tkáních) jako zdroj energie

ČÁST 6

DALŠÍ METABOLICKÉ DRÁHY CUKRŮ

6.1 Metabolismus glykogenu

- glykogen je zásobním polysacharidem živočichů,
- proč se vůbec využívá, když tuky poskytují dvakrát více energie
 - získání energie z polysacharidů je rychlejší než z tuků
 - z glykogenu lze získávat energii anaerobně
 - odbouráváním glykogenu vzniká glukóza, která se může podílet na udržování hladiny glukózy v krvi a může být dodávána do tkání
- v buňkách se nachází v cytoplasmatických granulích o velikosti 10 až 40nm, u obratlovců převážně na dvou místech
 - v játrech: glykogen může tvořit až 10 % hmotnosti jater a množství glykogenu v játrech závisí na stavu nasycenosti organismu (při hladovění klesá)
 - ve svalech: může tvořit 1-2 % hmotnosti svalu. Množství nesouvisí ani tak s nasyceností, jako s trénovaností (člověk je trénovaný -> množství glykogenu ve svalech roste)
 - * svalů je ale více než jater, takže v absolutních číslech je glykogenu nejvíce ve svalech
 - dále se malé množství nachází v mozku

STRUKTURA GLYKOGENU

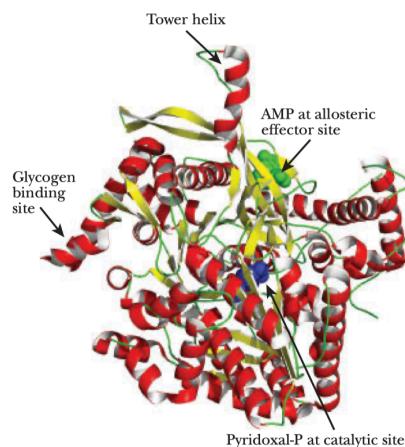
- stejná jako struktura amylopektinu
 - skládá se z glukózových podjednotek propojených α -1,4-glykosidickými vazbami a v místě větvení jsou α -1,6 glykosidické vazby
- glykogen je hustěji větven, než amylopektin, protože živočichové potřebují mobilizovat energii rychleji, než rostliny
 - jednotky mohou být odbourávány a všech větvích současně
 - 50% glukózových podjednotek ve struktuře se nachází před prvním místem větvení

- vždy má pouze jeden redukující konec

6.1.1 Odbourávání glykogenu

První reakce

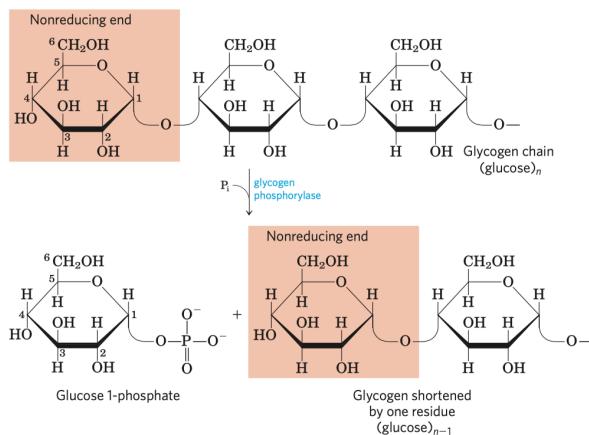
- prvním a zároveň nejdůležitějším enzym odbourávání glykogenu je **glykogenfosforyláza**
 - dimer, každý z monomerů má C' a N' terminální doménu
 - hlavní regulační enzym odbourávání glykogenu
 - má důležitý kofaktor, **pyridoxal-5-fosfát**
 - * pyridoxin je vitamín B₆



Obrázek 6.1: Struktura monomeru glykogen fosforylázy

STRUKTURA GLYKOGEN FOSFORYLÁZY

- katalytické místo
 - nachází se na rozhraní mezi N a C koncovou doménou
 - má též místo pro vazbu kofaktoru
- glycogen-vazebné místo
 - na rozhraní Nterminálních domén
 - vejde se do nej 4–5 glukózových podjednotek, avšak pouze v lineárním stavu (nevětvených)



Obrázek 6.2: Glykogen fosforylážová reakce

REAKČNÍ MECHANISMUS

- nemusíme znát v detailu
- dochází ke štěpení glykogenu v procesu **fosforolýzy**
 - podobné jako hydrolýza, ale místo vdy je zde kyselina fosforečná
 - mechanismem reakce je tedy fosforolýza škrabu, jedná se o acidobazickou katalýzu
- úloha pyridoxal-5-fosfátu v reakci je půjčovat proton zbytku kyseliny fosforečné, která štěpí vazbu mezi glukózovými podjednotkami
 - funguje jako protonové relé, které v průběhu reakce půjčí proton kyselině fosforečné a na konci si ho zase odebere
- enzym je s glykogenem stále v kontaktu, nemusí disociovat a resociovat po každé reakci
-> urychlení
 - glykogen projíždí kapsou v enzymu

Druhá reakce

Během první reakce vzniká glukóza-1-fosfát, do glykolýzy však potřebujeme glukózu-6-fosfát. O změnu z jednoho na druhé se stará druhá reakce odbourávání glykogenu.

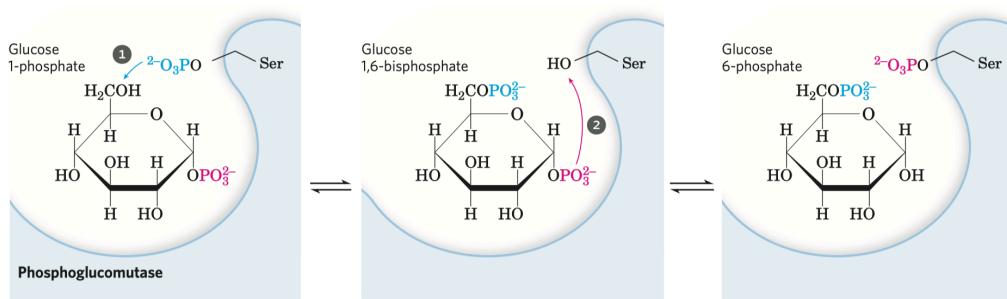


FIGURE 15–29 Reaction catalyzed by phosphoglucomutase. The reaction begins with the enzyme phosphorylated on a Ser residue. In step ①, the enzyme donates its phosphoryl group (blue) to glucose 1-phosphate, producing glucose 1,6-bisphosphate. In step ②, the phosphoryl group at C-1 of glucose 1,6-bisphosphate (red) is transferred back to the enzyme, reforming the phosphoenzyme and producing glucose 6-phosphate.

Obrázek 6.3: Fosfoglukomutázová reakce

FOSFOGLUKOMUTÁZOVÁ REAKCE

- viz obrázek
- probíhá přes meziprodukt, kde jsou fosforylovaná obě místa: glukózu-1,6-bisfosfát
 - v katalytickém centru enzymu tedy musí být skupina, která dodává ten druhý fosfát
-> obsahuje Ser, který váže fosfát
- podobnou reakci jsme probírali v glykolýze, kde se pomocí fosfoglycerátmutázy mění 3fosfoglycerát na 2-fosfoglycerát

Třetí reakce

- souvisí se strukturou glycogenfosforylázy, která umí zpracovat jen lineární glycogen
- když se dojde k místu větvení, následne linearizační enzym, který zbytky linearizuje

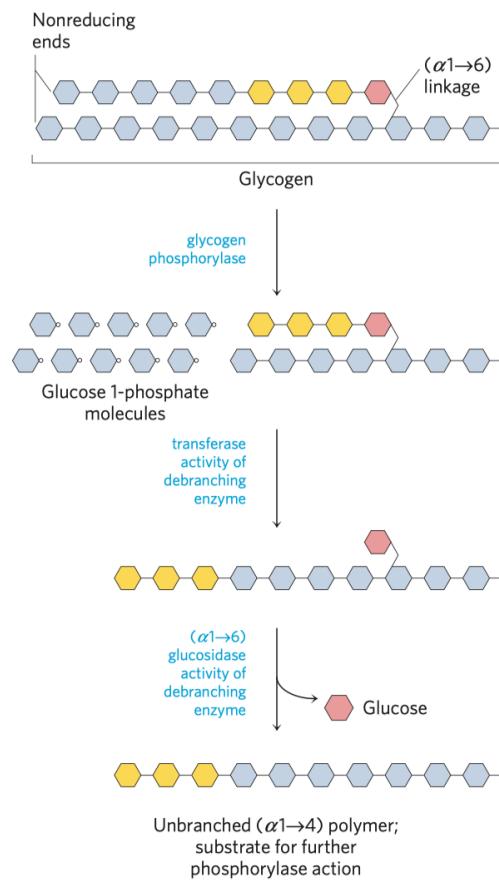


FIGURE 15-28 Glycogen breakdown near an $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ branch point.

Following sequential removal of terminal glucose residues by glycogen phosphorylase (see Fig. 15-27), glucose residues near a branch are removed in a two-step process that requires a bifunctional debranching enzyme. First, the transferase activity of the enzyme shifts a block of three glucose residues from the branch to a nearby nonreducing end, to which they are reattached in $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ linkage. The single glucose residue remaining at the branch point, in $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ linkage, is then released as free glucose by the debranching enzyme's $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ glucosidase activity. The glucose residues are shown in shorthand form, which omits the $-H$, $-OH$, and $-CH_2OH$ groups from the pyranose rings.

Obrázek 6.4: Linearizace glykogenu

PRŮBĚH REAKCE

- $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ -transglykosylázová aktivita
 - krátká část řetězce (např. na obrázku 4 jednotky, tzv. limitující systém) pospojovaného $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ vazbami je přesunuta
 - v původní větví zůstává už jen jedna glukóza, která je připojena na větvící místo vazbou $(\alpha 1 \rightarrow 6)$
 - ze dvou větví vytvoří jednu delší a jednu, která má už jen jednu glukózu
- $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ -glukosidázová aktivita
 - hydrolyzuje glukózový zbytek v místě větvení, který byl připojen $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ vazbou

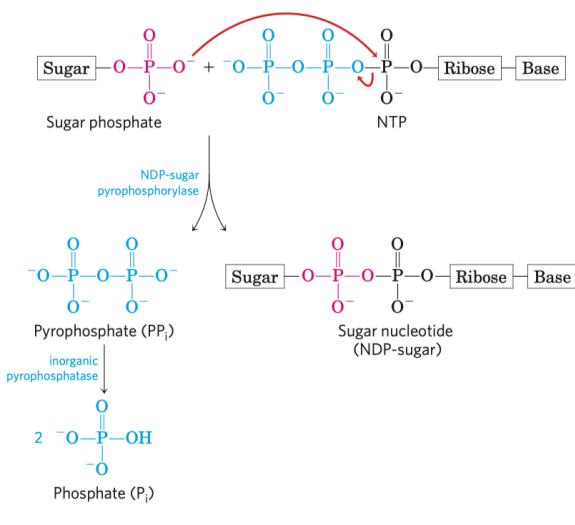
- tento se uvolňuje jako glukóza
- změna ($\alpha 1 \rightarrow 6$) na ($\alpha 1 \rightarrow 4$) není z energetického hlediska možná, proto dochází k hydrolýze

Kolem 90% glukózy z glykogenu se uvolňuje jako glukóza-6-fosfát, zbytek pochází z míst větvení a uvolňuje se jako glukóza.

6.1.2 Syntéza glykogenu

První reakce

Nejprve je potřeba připravit energeticky nabitou glukózu.



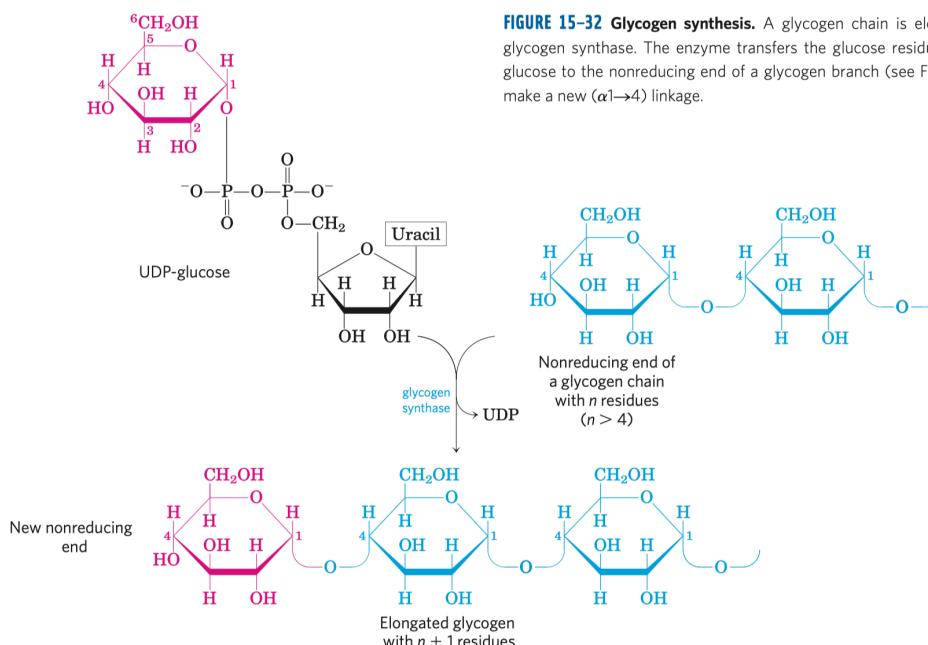
Obrázek 6.5: Syntéza UDP-glukózy

SYNTÉZA UDP-GLUKÓZY

- do reakce vstupuje glukóza-1-fosfát a UTP (uridintrifosfát)
- katalyzuje ji **UDP-glukózadifosforyláza**
 - enzym je pojedenovaný podle zpětné reakce
- vzniká pyrofosfát \rightarrow dělí se během reakce na dva fosfáty \rightarrow velké množství energie
- UTP je doplnováno reakcí UDP + ATP \longrightarrow UTP + ADP, celá reakce nás tedy "stojí" jedno ATP

Druhá reakce

Aktivovaná glukóza se dále využije k syntéze glykogenu.



Obrázek 6.6: Syntéza glykogenu z UDP-glukózy

SYNTÉZA GLYKOGENU Z UDP-GLUKÓZY

- (1) glukóza se připojí na již existující řetězec ($s \# \text{glukóz} > 4$)
- (2) na začátku reakce je potřeba *primer*, tím je hydroxylová skupina na Tyr na **glykogeninu**
 - na tu se naváže první glukózová podjednotka -> poté několik dalších -> potom už to jede pomocí glykogensyntázy
- (3) glykogensyntázová reakce je hlavní regulační reakcí syntézy glykogenu

Třetí reakce

Poslední reakcí je opak linearizace při rozkladu glykogenu — zde máme naopak větvící reakci a větvící enzym.

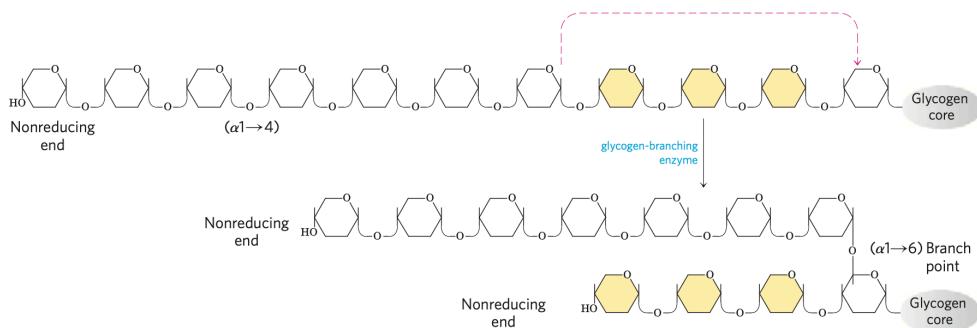
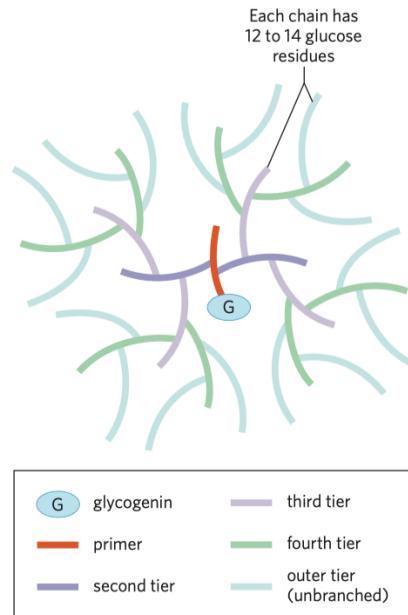


FIGURE 15-33 Branch synthesis in glycogen. The glycogen-branched enzyme (also called amylo (1→4) to (1→6) transglycosylase, or glycosyl-(4→6) transferase) forms a new branch point during glycogen synthesis.

Obrázek 6.7: Větvení glykogenu

VĚTVENÍ GLYKOGENU

- jediný enzym, má ale více jmen
 - (méně nejoblíbenější) amylo ($\alpha 1\rightarrow 4$) na ($\alpha 1\rightarrow 6$) transglykosyláza
 - $\alpha 1,4$ na $\alpha 1,6$ -transglykosyláza
 - glykosyl-(4→6) transferáza
- na dostatečně dlouhé větvi, která je tvořená ($\alpha 1\rightarrow 4$) glykosidickými vazbami, odštěpí glukózu a přilepí ji jinde vazbou ($\alpha 1\rightarrow 6$)
 - v tomto směru je to z energetického hlediska možné
 - "dostatečně dlouhá větev-alespoň 11 glukóz a alespoň 4 podjednotky od posledního místa větvení, z prostorových důvodů



Obrázek 6.8: Výsledná struktura glykogenu

6.1.3 Regulace glykogenfosforylázy

- dochází jak k alosterické regulaci (na alosterickém místě), tak k regulaci posttranslačními modifikacemi
- oba druhy regulace jsou provázané

[SPŘAŽENÍ METABOLISMU GLYKOGENU A GLYKOLÝZY]

- v játrech je glykogen odbouráván tehdy, když je potřeba zvýšit hladinu glukózy v krvi
 - např. při hladovění, nebo i při jiných zvýšených náročích na svalovou práci, kterou signalizují stresové hormony
 - odbourání glykogenu nemá to být rovnou spřaženo s glykolýzou, má glukózu jen uvolnit do krve, glykolýza je tedy inhibována
- ve svalech je odbouráván pro svalovou práci
 - zde je odbourávání glykogenu přímo pro glykolýzu

Jak to ale zařídit?

MECHANISMUS SPŘAŽENÍ

- fruktóza-6-bisfosfát je nejsilnější alosterický regulátor fosfofruktokinázy, hlavního glykolytického enzymu
 - ve svalech je při odbourávání glykogenu podporována tvorba tohoto produktu
 - v játrech je podporováno jeho odbourávání

Alosterická regulace

R a T forma enzymu

Enzym v R (relaxed) formě je, alespoň v kontextu metabolismu, vždy aktivnější než enzym v T (tense) formě. Jedná se o stejný enzym, ale ve dvou stavech.

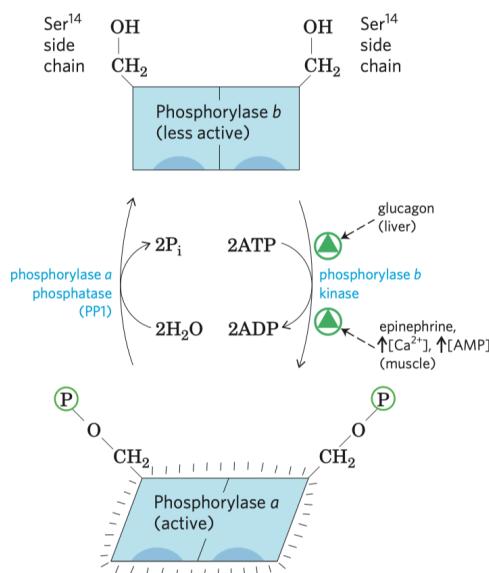


FIGURE 15–36 Regulation of muscle glycogen phosphorylase by covalent modification. In the more active form of the enzyme, phosphorylase *a*, Ser¹⁴ residues, one on each subunit, are phosphorylated. Phosphorylase *a* is converted to the less active form, phosphorylase *b*, by enzymatic loss of these phosphoryl groups, catalyzed by phosphorylase *a* phosphatase (also known as phosphoprotein phosphatase 1, PP1). Phosphorylase *b* can be reconverted (reactivated) to phosphorylase *a* by the action of phosphorylase *b* kinase. (See also Fig. 6–42 on glycogen phosphorylase regulation.)

Obrázek 6.9: Přechod z forforylázy A na fosforylázu B a naopak

A a B GLYKOGENFOSFORYLÁZA

- kromě R a T má glycogenfosforyláza i A a B formu
 - jediný strukturní rozdíl: A má fosforylovaný Ser₁₄, B ne
- funkční rozdíly
 - fosforyláza A
 - * aktivnější, nereaguje také na alosterickou regulaci
 - * za normálních okolností je v R stavu
 - * do T stavu je převedena pouze vysokou koncentrací glukózy
 - fosforyláza B
 - * je velice citlivá na alosterické regulátory
 - * je inhibována vysokou koncentrací ATP či glukózy-6-fosfátu
 - * za normálních okolností je v T stavu
 - * aktivována je vysokou koncentrací AMP
- přechod mezi A a B zajišťují dva různé enzymy
 - o A -> B se stará **fosfoprotein fosfatáza**
 - a B -> A zajišťuje **fosforyláza-kináza** (dříve **kináza-fosforylázy B**, protože fosforyluje Ser₁₄)

- k fosforylací či defosforylací dochází pouze v T formách

Fosforylace Ser u A a AMP na alosterickém místě u B podobným způsobem podporují R formu.

Regulace posttranslačními modifikacemi

- metabolismus glykogenu je regulován pomocí **bicyklické kaskády**
 - jeden enzym aktivuje druhý a ten aktivuje třetí.
 - výhody: na každém ”předání štafety“ je možné znásobit signál, detailněji signál regulovat atd. (zvlášt, když se přidá více úrovní než jen dvě)

REGULACE GLYKOGENFOSFORYLÁZY A GLYKOGENSYNTÁZY

- (1) vazba hormonu na receptor
- (2) uvolňování cyklického AMP (dále jen *cAMP*)
- (3) aktivace cAMP-dependentní kináza (jinak též proteinkináza A, dále jen *PKA*)
- (4) aktivace kinázy fosforylázy B, vede k aktivaci
- (5) fosforylace glykogenfosforylázy a glykogensyntázy
 - glykogenfosforyláza A je tím aktivována, glykogen se začne odbourávat -naopak glykogensyntáza je fosforylací deaktivována

Po glukózové infuzi tedy stoupne odbourávání glykogenu a zpomalí se jeho opětovná syntéza.

Hormonální regulace metabolismu sacharidů

JÁTRA (STAV: V KRVI JE MÁLO GLUKÓZY)

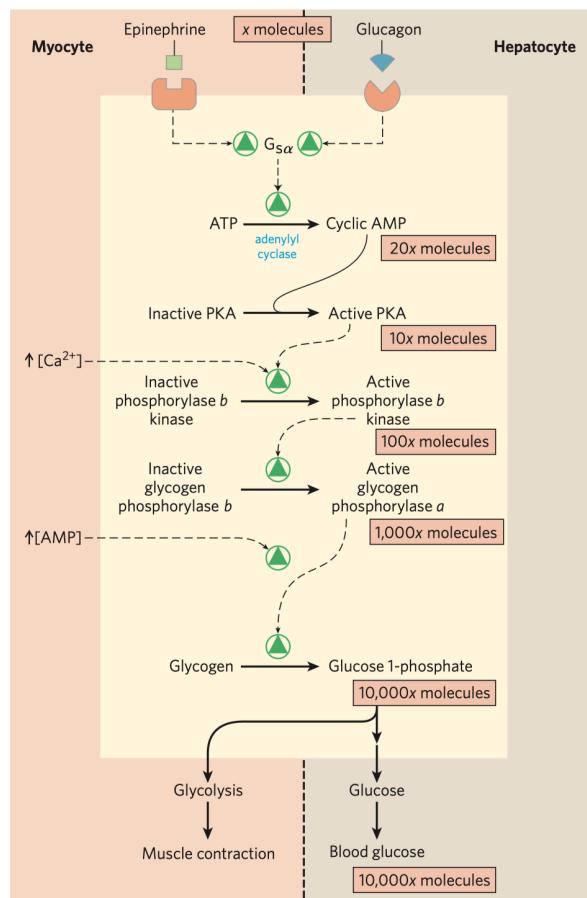
- (1) pankreatické α buňky vyplaví glukagon
- (2) ten se váže na svůj receptor na jaterní buňce, jenž je spřažen s adenylát-cyklázou -> tvoří se cAMP (*druhý posel*)
- (3) cAMP spustí bicyklickou kaskádu odbourávání glykogenu
- (4) glukóza se uvolňuje do krve, zvyšuje se její hladina

JÁTRA (STAV: V KRVI JE HODNĚ GLUKÓZY)

- (1) glukóza přímo proniká do jaterních buněk a tam inhibuje glykogenfosforylázu

JÁTRA (STAV: TĚLO JE VE STRESU)

- (1) na jaterní buňku se váže adrenalin, jsou tam na něj dva (α a β) receptory
- (2) β receptory \rightarrow adenylát-cykláza \rightarrow cAMP \rightarrow bicyklická kaskáda
- (3) α receptory \rightarrow štěpení fosfatidyl-inozitol-trifosfátu \rightarrow inozitoltrisfosfáty a diacylglyceroly (druží poslové, stejně jako cAMP)
- (4) působením inozitoltrisfosfátu se uvolňuje vápník \rightarrow aktivace kinázy-fosforylázy \rightarrow odbořávání glykogenu
- (5) glukóza se uvolňuje do krve
 - tentokrát to není proto, aby se zvýšila její hladina, ale kvůli dopravení do svalů



Obrázek 6.10: Signalizační kaskáda ve svalových a jaterních buňkách (není potřeba umět v detailu)

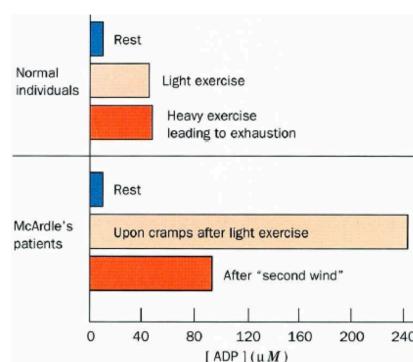
SVALY

- (1) aktivuje se adrenalinový receptor (svaly mají pouze β)
- (2) adenylát-cykláza
- (3) vznik cAMP
- (4) odbourávání glykogenu
 - ihned následuje glykolýza

Navíc při vysokých hladinách glukózy v krvi vyplavují buňky pankreasu do krve inzulín, který má (mimo jiné) za následek to, že jsou ve svalových buňkách transportéry pro glukózu GLU₄ přenášeny z cytoplasmy na membránu a umožňují glukóze vstupovat do buněk ve velkém množství.

[CHOROBY SPOJENÉ S METABOLISMEM GLYKOGENU]

Označují se jako **glykogenózy** a zpravidla jsou způsobeny tím, že je mutován nějaký enzym odbourávání nebo syntézy glykogenu ve svalech či játrech.



Obrázek 6.11: Hladiny ATP (ADP) u zdravých jedinců a u jedinců trpících McArdleovou chorobou

MCARDLEOVA CHOROBA

- defekt ve svalové glykogenfosforylázě
- při lehké zátěži se prudce zdvihne hladina ADP, protože svalová glykogenfosforyláza nereaguje na svalovou práci, dochází k odbourávání svalového glykogenu
- při dlouhotrvajícím cvičení je rozdíl menší, protože jsou svaly zásobeny z jaterního glykogenu

[METABOLISMUS GLYKOGENU A SPORT]

- 6 dnů před vytrvalostním závodem se omezí příjem cukrů a glykogenu v potravě
 - poslední 3 dny se jich naopak konzumuje větší množství
 - tělo má signalizován nedostatek a tak nejen, že doplní ten ztracený, ale ještě zvětší zásoby
-

6.1.4 Coriho cyklus

- (1) v odpočívajícím svalu se vytváří zásoby glykogenu, v aktivním probíhá reakce měnící glykogen -> laktát
- (2) laktát je transportován do krve, a krví do jater
- (3) v játrech se laktát účastní glukoneogeneze, tvoří se z něj opět glukóza

Cyklus je pojmenován podle manželů Coriových, absolventů Karlovy univerzity a nositelů Nobelovy ceny.

6.2 Glukoneogeneze

- dále jen *gng*
- syntéza cukrů z necukrů
- cukry jsou substrát pro vznik energie, ale jsou důležité i pro další energetické substráty (např. pro zpracování tuků v KC)

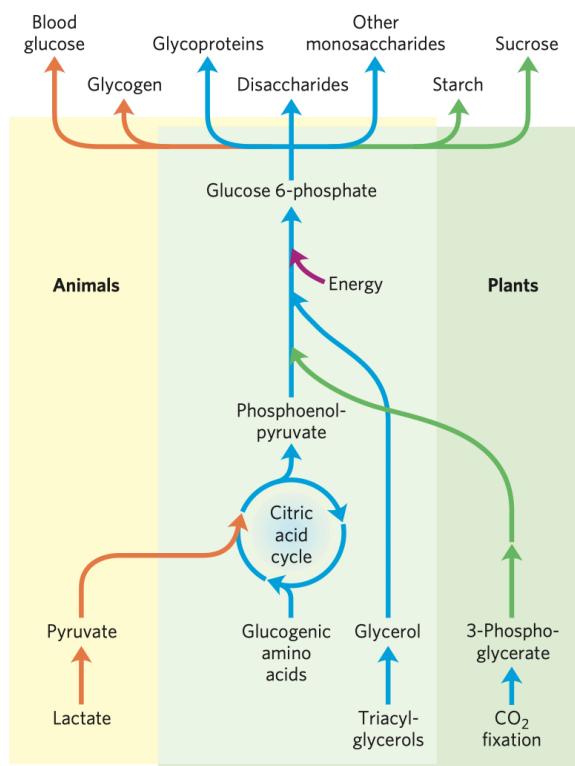


FIGURE 14-16 Carbohydrate synthesis from simple precursors. The pathway from phosphoenolpyruvate to glucose 6-phosphate is common to the biosynthetic conversion of many different precursors of carbohydrates in animals and plants. The path from pyruvate to phosphoenolpyruvate leads through oxaloacetate, an intermediate of the citric acid cycle, which we discuss in Chapter 16. Any compound that can be converted to either pyruvate or oxaloacetate can therefore serve as starting material for gluconeogenesis. This includes alanine and aspartate, which are convertible to pyruvate and oxaloacetate, respectively, and other amino acids that can also yield three- or four-carbon fragments, the so-called glucogenic amino acids (see Table 14-4; see also Fig. 18-15). Plants and photosynthetic bacteria are uniquely able to convert CO₂ to carbohydrates, using the Calvin cycle (see Section 20.1).

Obrázek 6.12: Schéma toho, z čeho mohou cukry vznikat (zvlášť pro rostliny a živočichy)

POPIS SCHÉMATU

- živočichové mohou tvořit cukry z kyseliny mléčné
- rostliny z CO₂, používají ho jako zdroj uhlíku a budují jej do kostry cukrů
- střed je společný oběma: dokážou cukry dělat z triacylglycerolu (ale jen z té alkoholové části) a z glukogenních AK
 - AK jsou ty, které na různých místech vstupují do KC: Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, hydroxyprolin, Met, Pro, Ser, Thr, Val
 - * nevstupují samozřejmě samotné AK, ale AK přetvořené buďto v nějaký z intermediátů KC, nebo přímo na acetyl-CoA

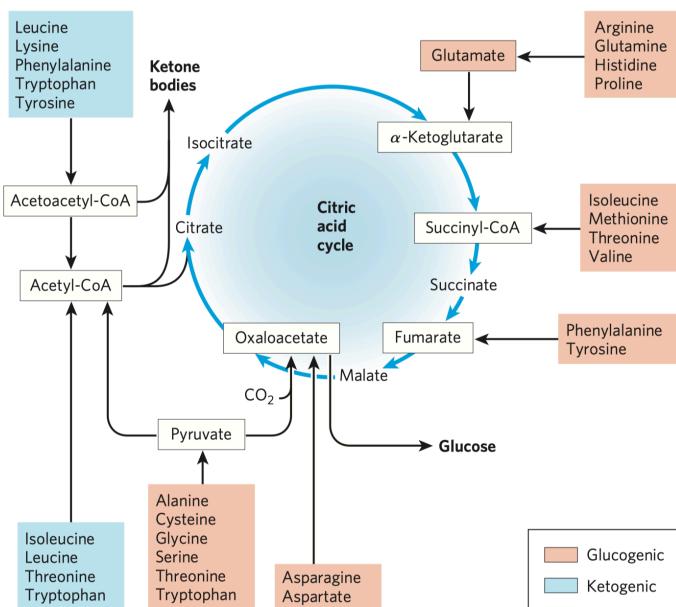


FIGURE 18-15 Summary of amino acid catabolism. Amino acids are grouped according to their major degradative end product. Some amino acids are listed more than once because different parts of their carbon skeletons are degraded to different end products. The figure shows the most important catabolic pathways in vertebrates, but there are minor variations among vertebrate species. Threonine, for instance, is degraded via at least two different pathways (see Figs 18-19, 18-27), and the

importance of a given pathway can vary with the organism and its metabolic conditions. The glucogenic and ketogenic amino acids are also delineated in the figure, by color shading. Notice that five of the amino acids are both glucogenic and ketogenic. The amino acids degraded to pyruvate are also potentially ketogenic. Only two amino acids, leucine and lysine, are exclusively ketogenic.

Obrázek 6.13: Obrázek glukogenních AK v souvislosti s KC

GLUKONEOGENEZE z AK

- gng se mohou účastnit ty AK, které do KC vstupují až po 1. nebo 2. dekarboxylaci
 - v opačném případě by přišly o dva uhlíky (a žádný by tedy nezbyl na gng)
- Lys a Leu vstupují do reakce jako acetyl-CoA (tedy před oběma dekarboxylacemi) a nemohou se tedy gng zúčastnit

[VÝROBA CUKRŮ Z TUKŮ]

- z MK sice cukry (víceméně) vznikat nemohou, ale z glycerolu (součást tuků) ano
- glycerol nám zbyde poté, co z něj lipázy odštěpí MK
- glycerol -> fosforylace na glycerol-3-fosfát -> dihydroxyacetonfosfát (viz obrázek níže, tam jsou i enzymy)
- dihydroxyacetonfosfát se pak může účastnit glykolýzy nebo gng
 - v glykolýze může být v páté reakci zaměňován s glyceraldehyd-3-fosfátem, který je (podobně jako dihydroxyacetonfosfát) produktem čtvrté reakce
- malá část molekuly tuku tedy do gng vstoupit může

Navíc, propionyl-CoA vzniklý z β-oxidace MK s lichým počtem uhlíků může vstoupit do KC, kde unikne oběma dekarboxylacím a jeho uhlíky tedy také mohou sloužit k syntéze cukru.

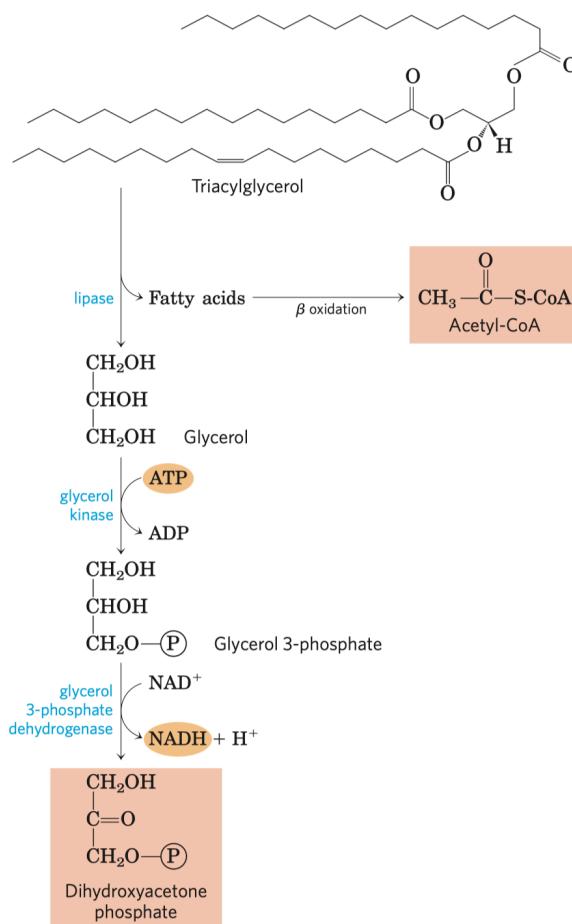


FIGURE 20-33 Conversion of the glycerol moiety of triacylglycerols to sucrose in germinating seeds. The glycerol of triacylglycerols is oxidized to dihydroxyacetone phosphate, which enters the gluconeogenic pathway at the triose phosphate isomerase reaction.

Obrázek 6.14: Vstup glycerolu do gng

VZTAH GLYKOLÝZY A GLUKONEOGENEZE

- reakce gng jsou často jen obrácené reakce glykolýzy
- musí se ošetřit, aby se reakce glykolýzy a gng netočily pořád dokola (tzv. *jalové cykly*)
- proto jsou v glykolýze tři ireversibilní reakce (na obrázku vyznačeny tučně)
 - (1) hexokinázová (glukokinázová) reakce je energeticky posunuta k produktu (je exergonická) a tím pádem prakticky nevratná
 - (2) při vzniku F16BP je také velká změna volné energie, opět hodně exergonická reakce
 - (3) pyruvát-kinázová reakce, fosfoenolpyruvát je makroergní sloučenina, opět silně exergonická (i když v normálních podmínkách více než in vivo)
- tyto nevratné reakce se tedy musí obejít

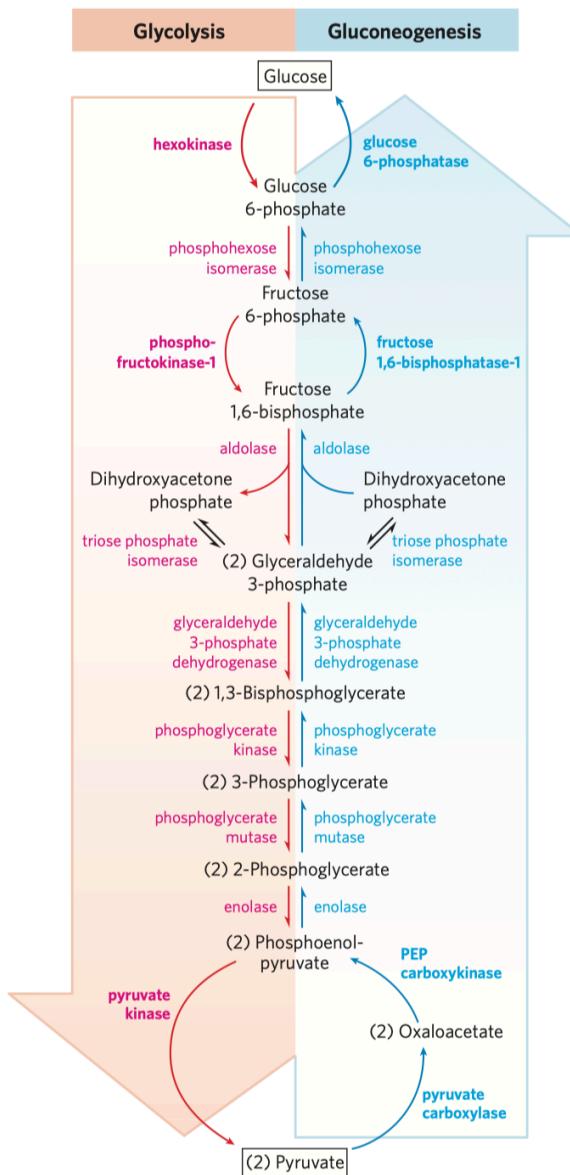


FIGURE 15-13 Glycolysis and gluconeogenesis. Opposing pathways of glycolysis (pink) and gluconeogenesis (blue) in rat liver. Three steps are catalyzed by different enzymes in gluconeogenesis (the “bypass reactions”) and glycolysis; seven steps are catalyzed by the same enzymes in the two pathways. Cofactors have been omitted for simplicity.

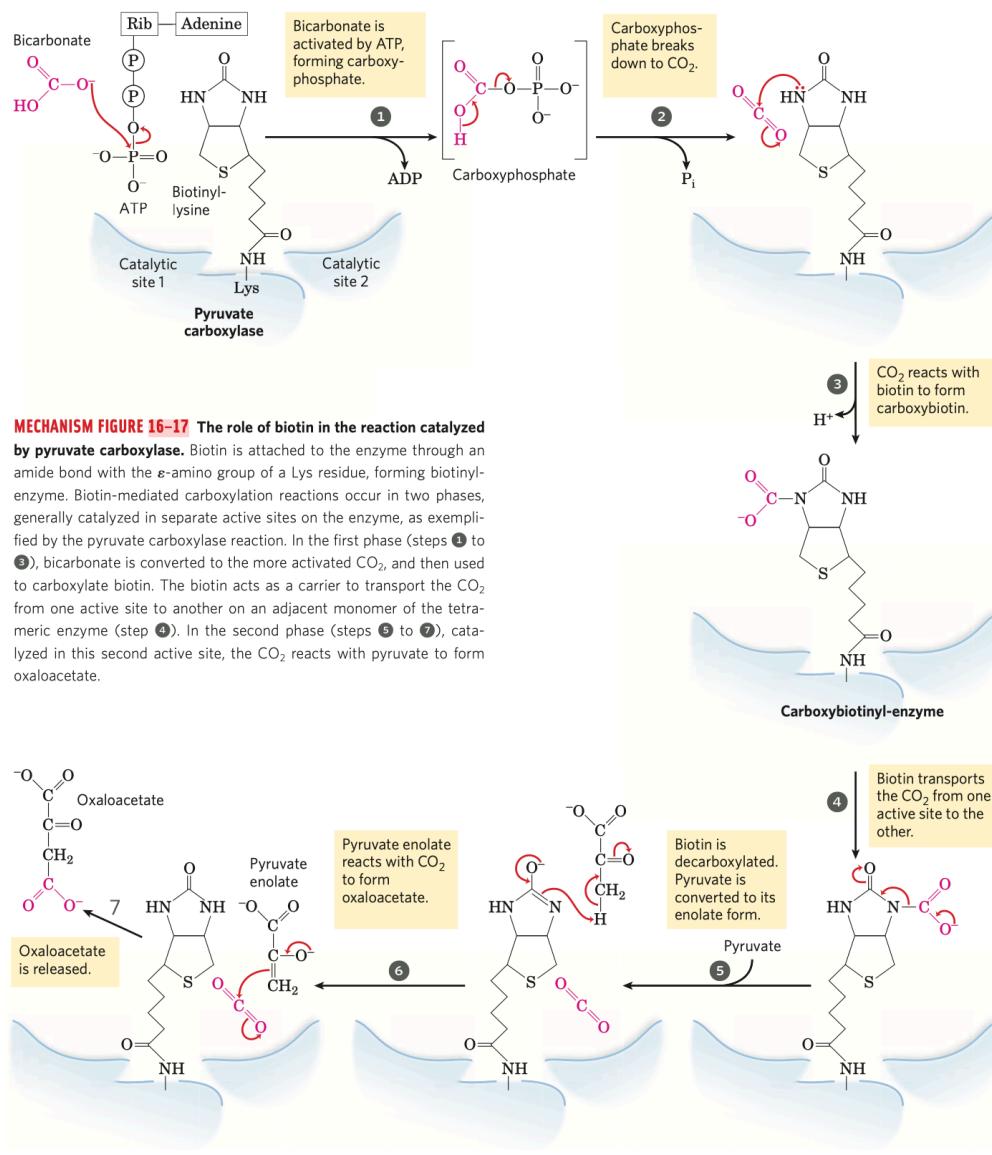
Obrázek 6.15: Glykolýza a gng

6.2.1 Obcházení pyruvát-kinázové reakce

Viz obrázek — skládá se ze dvou částí.

PYRUVÁT-KARBOXYLÁZOVÁ REAKCE

- pyruvát (tříuhlíkatá sloučenina) je karboxylován na oxaloacetát (čtyřuhlíkatá sloučenina)
- už jsme na ni narazili
 - je to anaplerotická reakce, dodává oxalacetát do KC
 - může ale sloužit i jako donor substrátu (oxalacetátu) pro gng

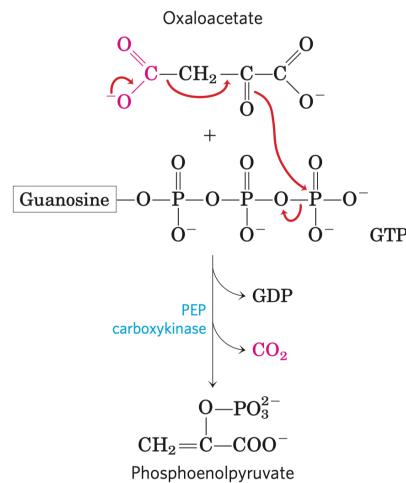


Obrázek 6.16: Detailní náhled do toho, jakou roli má biotin v pyruvát-karboxylázové reakci (není třeba se učit)

ROLE BIOTINU

- funguje jako koenzym přenášející karboxylovou skupinu
- mechanismus je podobný, jako jsme už jednou viděli
 - biotin se pohybuje na dlouhém raménku Lys

- hýbe se z jednoho reakčního místa, kde naváže karboxylovou skupinu (která tam přichází jako bikarbonát), na druhé aktivní místo enzymu, kde ji předá na pyruvát



Obrázek 6.17: Fosfoenolpyruvátkarboxykinázová reakce

PEP KARBOXYKINÁZOVÁ REAKCE

- oxaloacetát -> fosfoenolpyruvát (PEP)
- PEP je intermediátem glykolýzy, čili opět mohou pokračovat reverzibilní reakce

V pyruvát-kinázové reakci v glykolýze vznikne 1 ATP na jeden fosfoenolpyruvát, ale když reakci obracíme, potřebujeme hned dvě makroergní sloučeniny (pyruvát-karboxyláza potřebuje jednu ATP a fosfoenolpyruvátkarboxykináza zas jednu GTP).

6.2.2 Obcházení zbývajících dvou kinázových reakcí

- obě kinázové reakce jsou nahrazeny fosfatázovými reakcemi - F₁₆BP $\xrightarrow{\text{fruktoza-1,6-bisfosfataza}}$ fruktoza-6-fosfat + P_i - ireverzibilní kinázová reakce byla obejita hydrolázovou reakcí – na této úrovni organismu se nikdy nemůže syntetizovat ATP, pouze se zde spotřebovává, fosfát se zde hydrolyzuje
- to samé platí i pro hexokinázovou reakci, glukóza-6-fosfatázovou reakcí dojde k odštěpení fosfátu a z glukóza-6-fosfátu vznikne glukóza

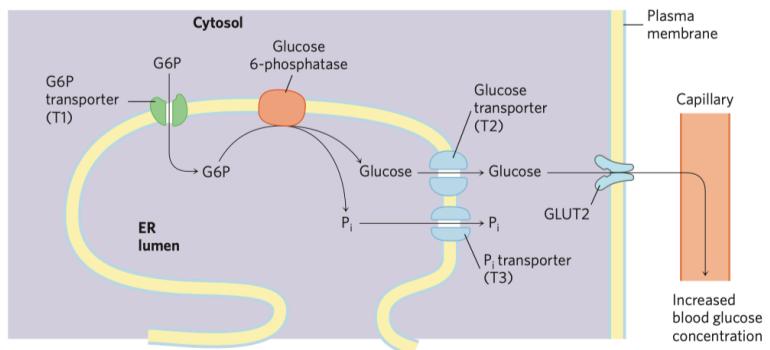


FIGURE 15-30 Hydrolysis of glucose 6-phosphate by glucose 6-phosphatase of the ER. The catalytic site of glucose 6-phosphatase faces the lumen of the ER. A glucose 6-phosphate (G6P) transporter (T1) carries the substrate from the cytosol to the lumen, and the products glucose and P_i pass to the cytosol on specific transporters (T2 and T3). Glucose leaves the cell via the GLUT2 transporter in the plasma membrane.

Obrázek 6.18: Umístění glukóza-6-fosfatázy

ČINNOST GLUKÓZA-6-FOSFATÁZY

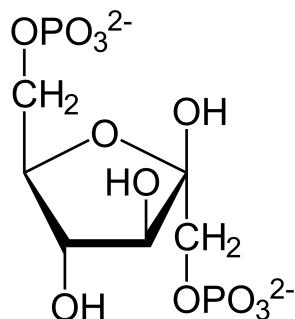
- je umístěna na membráně ER
- jde o relativně velký komplex, jeho součástí jsou jeden enzym a tři přenašeče
- průběh reakce
 - (1) glukóza-6-fosfát je transportována do lumen hladkého ER, kde je aktivní místo enzymu
 - (2) enzym odhydrolyzuje fosfát, vznikne glukóza
 - (3) tyto produkty jdou z ER přes přenašeče
- glukóza v cytoplazmě je totiž vystavena nebezpečí, že bude transportována z buňky
 - to je jedna z věcí, před kterou ji hexokináza fosforylací ochrání
 - tím, že je tvořena v ER se tento její osud oddaluje

6.2.3 Kompartmentalizace gng

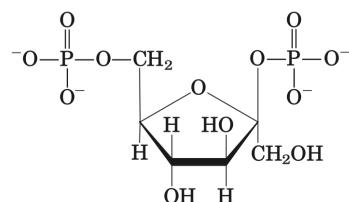
- první část je v mch => problém transportu přes vnitřní membránu
- začíná se vždy u pyruvátu
 - ten se ještě v mch přemění (pomocí pyruvát-karboxylázy) na oxalacetát
 - jak dostat oxalacetát z mch?
 - (1) zasáhne mch PEP karboxykináza, oxalacetát -> PEP za spotřeby GTP (PEP má přenašeč)
 - (2) zasáhne malát-dehydrogenáza, oxalacetát -> malát, a poté v cytoplazmě opět malát -> oxalacetát
 - * při tom se však oxiduje jedno NADH v mch a naopak redukuje se jedno NAD^+ v cytoplazmě
 - * to může sloužit k transdehydrogenázovým reakcím

6.2.4 Regulace

- pyruvát má spousto možností, kam jít
 - např. vstoupí do pyruvátdehydrogenázové reakce a vzniká z něj acetyl-CoA, ten jde do KC
 - nebo např. může jít do gng, do pyruvátkarboxylázové reakce (a vznikne z něj oxalacetát)
- čili pokud buňka vyrábí acetyl-CoA z tuků, inhibuje pyruvátdehydrogenázu a aktivuje pyruvátkarboxylázu
 - vzniklý oxalacetát může vstoupit jako produkt jako anaplerotické reakce do KC, nebo půjde do gng



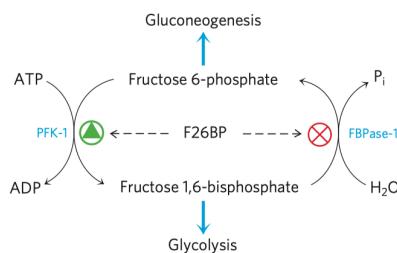
Obrázek 6.19: Fruktóza-1,6-bisfosfát



Obrázek 6.20: Fruktóza-2,6-bisfosfát

FRUKTÓZA-2,6-BISFOSFÁT

- dále jen *F26BP*
- je podobná F16BP, až na polohu fosforu (viz obrázek výše)
- regulační molekula, stimuluje fosfofruktokinázu-1 (PFK-1) a inhibuje fruktózu-1,6-bisfosfatázu (FBPáza-1), viz obrázek níže
 - tím inhibuje celou gng a aktivuje glykolýzu



Obrázek 6.21: Vliv F26BP na regulaci gng

A jak je regulováno množství F26BP?

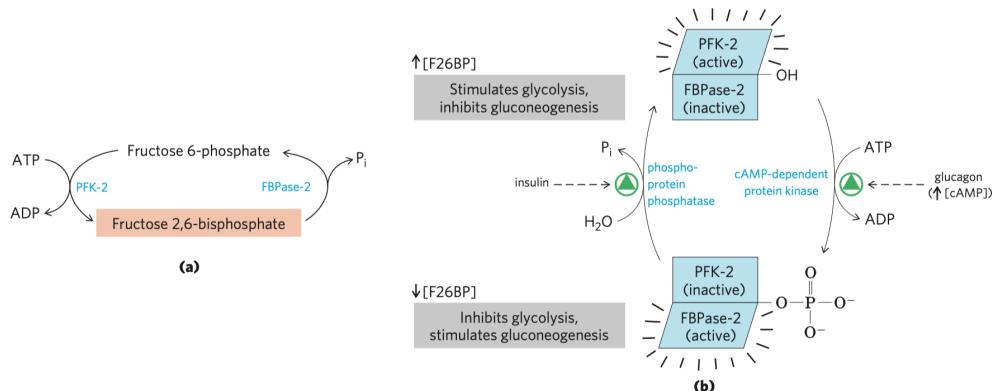


FIGURE 15-19 Regulation of fructose 2,6-bisphosphate level. (a) The cellular concentration of the regulator fructose 2,6-bisphosphate (F26BP) is determined by the rates of its synthesis by phosphofructokinase-2 (PFK-2) and its breakdown by fructose 2,6-bisphosphatase (FBPase-2). (b) Both enzyme activities are part of the same polypeptide chain, and they are reciprocally regulated by insulin and glucagon.

Obrázek 6.22: Regulace množství F26BP

PFK-2 A FBPÁZA-2

- jsou vlastně jedním proteinem se dvěma doménami
- PFK-2 -> F26BP, FBPáza-2 naopak
 - aktivace PFK-2 části => F26BP => podpoření glykolýzy
 - aktivace FBPázy-2 => podpoření gng
- FBPáza-2 část je nepřímo aktivována glukagonem
 - glukagon -> adenyly cykláza -> cAMP -> CDK -> fosforylace proteinu
 - glukagon => gng
- PFK-2 část je nepřímo aktivována inzulínem
 - inzulín -> fosfoprotein fosfatáza -> defosforylace proteinu
 - inzulín => glykolýza

6.3 Pentózofosfátová dráha

- rozklad glukózy-6-fosfátu (glukóza zpracovaná hexokinázou), avšak ne na triózy, ale na pentózy

- neobyčejně důležité – vzniká **ribóza** (součást NK, ATP, koenzymu NADH, NADPH atd.)
- je amfipatická

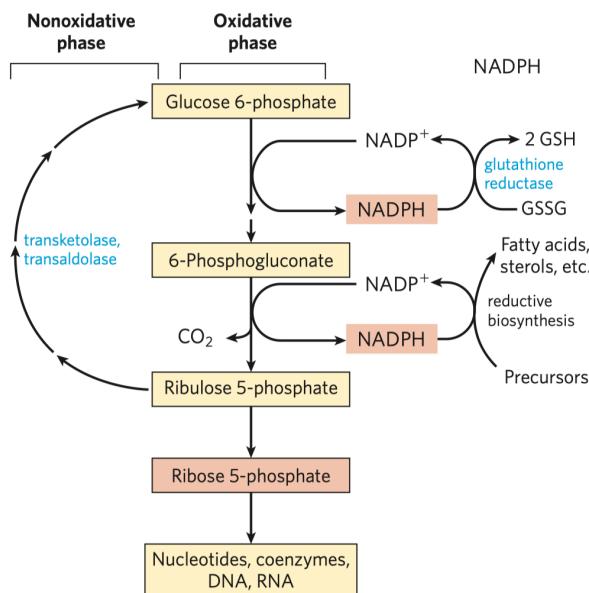


FIGURE 14-21 General scheme of the pentose phosphate pathway.

NADPH formed in the oxidative phase is used to reduce glutathione, GSSG (see Box 14-4) and to support reductive biosynthesis. The other product of the oxidative phase is ribose 5-phosphate, which serves as a precursor for nucleotides, coenzymes, and nucleic acids. In cells that are not using ribose 5-phosphate for biosynthesis, the nonoxidative phase recycles six molecules of the pentose into five molecules of the hexose glucose 6-phosphate, allowing continued production of NADPH and converting glucose 6-phosphate (in six cycles) to CO₂.

Obrázek 6.23: Obecné schéma pentózofosfátové dráhy

NEOXIDATIVNÍ ČÁST DRÁHY

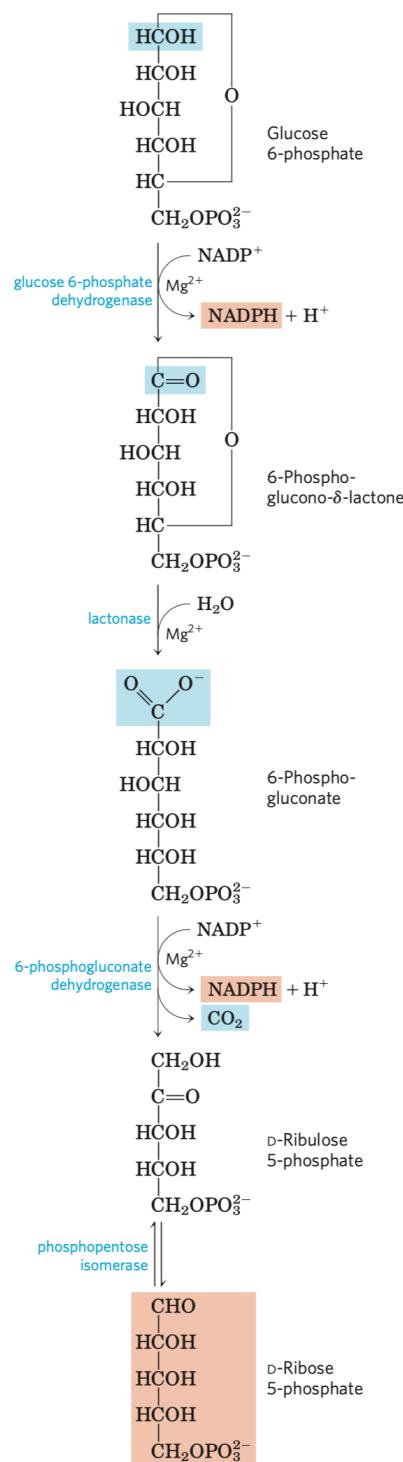
- ne vždy ribózu potřebujeme, dráha se někdy využívá pouze ke generování NADPH
 - např. při laktaci potřebujeme hodně MK (hodně NADPH), ale ribózy nějak moc ne
 - opačným příkladem by byla např. regenerace jater, při které místo MK potřebujeme hlavně NK (tedy hodně ribózy)
- glukózu je možné regenerovat (tedy pentózu vrátit zpět na hexózu), poté spustit celou oxidativní část znova, získat opět dvě NADPH a tak dokola
 - tato proměna (5->6) probíhá v **neoxidativní části** dráhy
 - pentóza se mění na hexózu pomocí **transketolázových** a **trans-aldolázových** reakcí

[POZNÁMKA]

NADH je součástí katabolických drah, zatímco NADPH je důležitý pro reduktivní syntézy, například syntézu MK.

6.3. PENTÓZOFOSFÁTOVÁ DRÁHA 6. DALŠÍ METABOLICKÉ DRÁHY CUKRŮ

6.3.1 Průběh oxidativní části



Obrázek 6.24: Detailní průběh oxidativní části dráhy

Reakce jsou zřetelné z obrázku, následují pouze drobné poznámky.

TŘETÍ REAKCE

- dekarboxylací se odrhne jeden uhlík, zbyde nám pentóza

Celkově vzniknou dvě molekuly NADPH a jedna molekula ribózy.

6.3.2 Průběh neoxidativní části

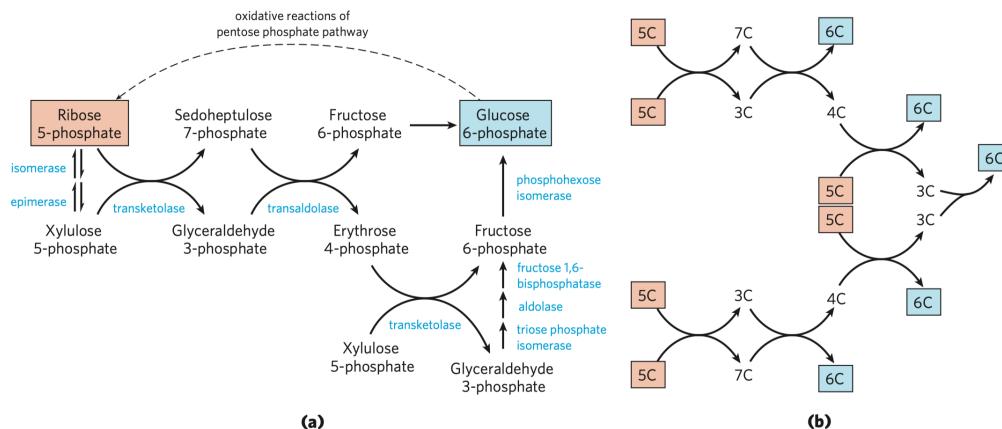


FIGURE 14–23 Nonoxidative reactions of the pentose phosphate pathway. (a) These reactions convert pentose phosphates to hexose phosphates, allowing the oxidative reactions (see Fig. 14–22) to continue. Transketolase and transaldolase are specific to this pathway; the other enzymes also serve in the glycolytic or gluconeogenic pathways. (b) A schematic diagram showing the pathway from six pentoses (5C) to five

hexoses (6C). Note that this involves two sets of the interconversions shown in (a). Every reaction shown here is reversible; unidirectional arrows are used only to make clear the direction of the reactions during continuous oxidation of glucose 6-phosphate. In the light-independent reactions of photosynthesis, the direction of these reactions is reversed (see Fig. 20–10).

Obrázek 6.25: Transketolázové a trans-aldolázové reakce. (a) popisuje změnu tří pentóz na dvě hexózy a jednu triózu, (b) pak ukazuje, jak se po dvou průběžích reakcích v (a) vytvoří z šesti pentóz pět hexóz.

TRANSKETOLÁZOVÉ A TRANS-ALDOLÁZOVÉ REAKCE

- probíhá v nich přehazování uhlíků, v konečném důsledku převádějí pentózy zpět na hexózy
- na začátku vstupuje ribóza-5-fosfát a xylulóza-5-fosfát, která vznikne izomerací z ribózy-5-fosfátu
- viz obrázek

— ČÁST 7 —

METABOLISMUS TUKŮ

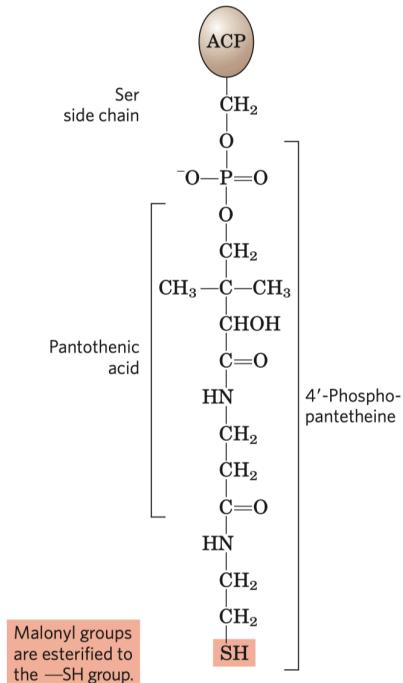
- když pro nějakou sloučeninu existuje katabolická i anabolická dráha, musejí tyto být odlišné
 - je to termodynamicky nutné a navíc to ulehčí nezávislou a jemnější regulaci

- proto se syntéza MK a β -oxidace musí lišit

SROVNÁNÍ BETA-OXIDACE A SYNTÉZY MK

- redoxnost
 - β -oxidace je oxidativní proces
 - syntéza MK je reduktivní proces
- lokalizace
 - β -oxidace běží v mch
 - syntéza MK běží v reduktivním prostředí v cytoplazmě
- přenašeče acylu
 - u β -oxidace je jím CoA
 - u syntézy MK je jím speciální protein ACP
- přenašeče elektronů
 - β -oxidace je oxidativní => potřebuje akceptor, je jím FAD
 - syntéza MK je reduktivní => potřebuje donor, je jím NADPH + H⁺
- přenášení dvojuhlíkatých jednotek
 - u β -oxidace se o to staral acetyl-CoA
 - u syntézy MK jsou přidávány pomocí malonylu-CoA

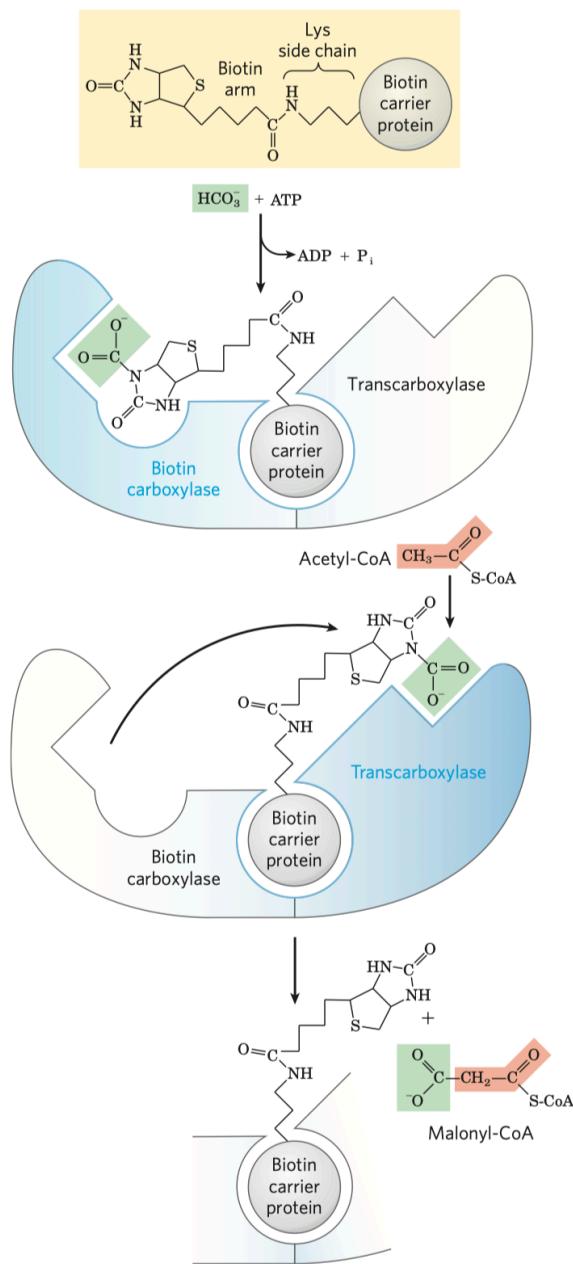
Přestože je přenašečem acylu ACP, skupina, na kterou je acyl připojen, je stále stejná: **fosfopanteteinová** skupina.



Obrázek 7.1: Fosfopanteteinová skupina

7.1 Příprava malonylu-CoA

O přeměnu z acetyl-CoA na malonyl-CoA se stará enzym ACK.



Obrázek 7.2: Reakce acetyl-CoA-karboxylázy

ACETYL-COA KARBOXYLÁZA

- potřebuje dodání energie v podobě ATP (katalyzuje endogenický proces)
- kofaktorem je biotin (vitamín A)
 - umí vázat karboxyl a pomocí pohyblivého raménka jej přenést jinam

- má dvě enzymatické aktivity
 - (1) biotin-karboxylázová aktivita (vazba COO^- na biotin)
 - (2) trans-karboxylázová aktivita (vazba COO^- z biotinu na acetyl-CoA)
- kromě svých dvou funkcí ještě plní funkci přenašeče biotinu

7.1.1 Regulace ack

- hlavní regulační enzym syntézy MK
- regulace fosforylací a alostericky, působením lokálních metabolitů
- v nativní konformaci je ve formě polymeru vytvářejícím dlouhé filamenty
 - při deaktivaci se polymer rozpadá na jednotlivé protomery

Regulace fosforylací

- ack je inhibována fosforylací (tedy kinázami) a aktivována fosfatázami

AMP-AKTIVOVANÁ KINÁZA

- funguje jako senzor nízké hladiny energie v buňce
 - koncentrace AMP je vysoká \Leftrightarrow koncentrace ATP je nízká
- když je aktivní, inhibuje ack, protože v době nízké hladiny energie nechceme provádět dložitou syntézu MK

CAMP-DEPENDENTNÍ PROTEINKINÁZA

- je aktivována v odpovědi na hormonální reakci glukagonu a adrenalinu
- funguje nepřímo jako senzor nízké hladiny cukru v krvi
- když je aktivní, inhibuje ack, protože chceme využít acetyl-CoA na syntézu ketolátek (energetických náhražek glukózy)

AKTIVACE ACK

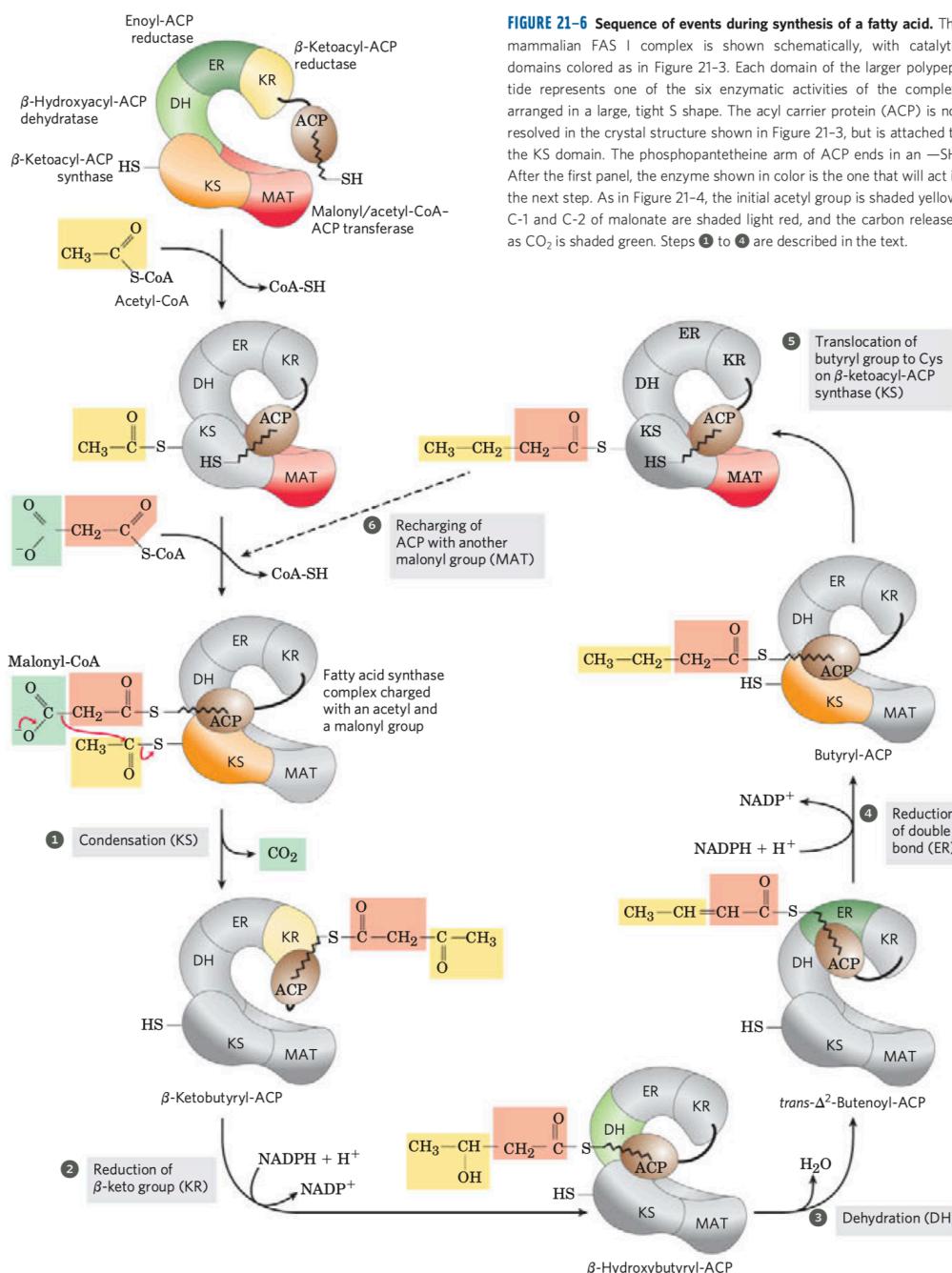
- inzulín aktivuje PKA, která ack defosforyluje a tím aktivuje

Regulace lokálními metabolismy

- zpětnovazební inhibice produktem, palmitoyl-CoA (nejběžnější produkt syntézy MK)
- aktivace citrátém
 - hodně citrátu \Rightarrow nejspíše i hodně acetyl-CoA \Rightarrow využijeme ho k syntéze MK

7.2 Syntéza MK

- u obratlovců běží na jednom z největších multienzymových komplexů v buňce, syntáze MK (dále jen *FAS*, fatty-acid-synthase)
 - dimer, každý monomer má sedm různých katalytických aktivit + přenašeč acylu
- donorem prvních dvou uhlíků je acetyl-CoA, všechny ostatní uhlíky jsou z malonylu
- nejdelší mastná kyselina, která se takto syntetizuje, je palmitát (C16)
- je velmi energeticky náročná
 - v sedmi kolech prodlužování nutných k výrobě C16 je investováno 7 ATP a 14 NADPH



Obrázek 7.3: Průběh syntézy MK na FAS

Viz obrázek, následují pouze drobné poznámky.

ÚVODNÍ REAKCE 1

- přenos acylu: acetyl-CoA → ACP
- katalyzována acetyl-CoA-ACP-transacyláza (na obrázku MAT)

ÚVODNÍ REAKCE 2

- přenos acylu: ACP -> kondenzační enzym (na obrázku KS)

Předchozí dvě reakce probíhají pouze v prvním cyklu, v druhém by byly nahrazeny přenesením malonylu z CoA na ACP.

PRVNÍ REAKCE

- acetyl + malonyl -> acetoacetyl-ACP (někdy také β -ketobutyryl-ACP)
- kondenzační reakce
- acetoacetyl je ketolátka, v dalších reakcích bude potřeba ji přeměnit na lineární řetězec budoucí MK (butyryl)

V β -oxidaci jsou dvě oxidace, tedy v rámci syntézy MK budou dvě redukce.

DRUHÁ REAKCE

- první z redukčních reakcí (došlo k redukci jedné ze skupin hydroxylu)
- acetoacetyl-ACP -> D- β -hydroxybutyryl-ACP

TŘETÍ REAKCE

- dehydratace (v β -oxidaci je naopak hydratace)
- už tam není ani alkoholová skupina, zbyla jen ketoskupina

ČTVRTÁ REAKCE

- druhá z redukční reakcí
- redukuje se hydrogenací, ruší se dvojná vazba
- vzniká butyryl-ACP

Butyryl má pouze 4 uhlíky, palmitát je C16, proto musí výše zmíněná reakce proběhnout ještě šestkrát (pokaždé se přidají dva uhlíky). Výsledným produktem (po celkem sedmi cyklech) je **palmitoyl-ACP**.

ZÁVĚREČNÁ REAKCE

- z palmitoyl-ACP je nutné odštěpit ACP
- to dělá palmitoyl-thioesteráza

META

Syntéza MK je velice důležitá, je prý i u státnic. Good luck to all of us.

FAS

- celá reakce je díky FAS velice efektivní
 - fosfopanteteinové rameno přenáší acylový zbytek mezi jednotlivými reakcemi, takže se jednotlivé reaktatny nemusí tolík hledat
 - FAS je dimer a obě podjednotky spolu spolupracují, vyrábějí dvě MK najednou
 - * kooperuje jeden ACP z jedné podjednotky a kondenzační enzym z druhé podjednotky
- v bakteriích a chloroplastech nejsou podjednotky v dimerech, ale volně v cytoplasmě

7.2.1 Přenos důležitých reaktantů na místo reakce

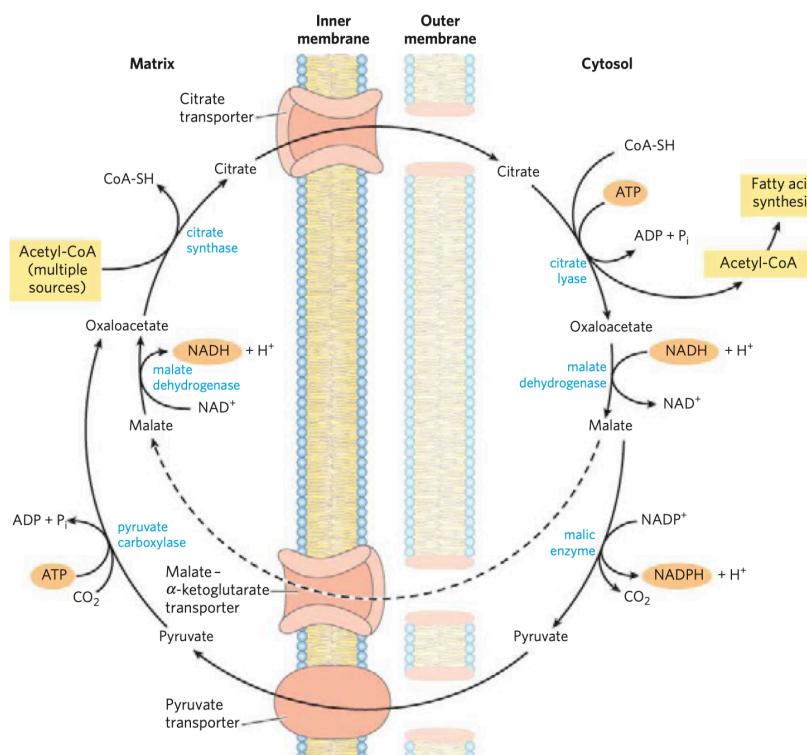


FIGURE 21–10 Shuttle for transfer of acetyl groups from mitochondria to the cytosol. The outer mitochondrial membrane is freely permeable to all these compounds. Pyruvate derived from amino acid catabolism in the mitochondrial matrix, or from glucose by glycolysis in the cytosol, is converted to acetyl-CoA in the matrix. Acetyl groups pass out of the mitochondrion as citrate; in the cytosol they are delivered as acetyl-CoA for fatty acid synthesis. Oxaloacetate is reduced to malate, which can return to the mitochondrial matrix and is converted to oxaloacetate. The major fate for cytosolic malate is oxidation by malic enzyme to generate cytosolic NADPH; the pyruvate produced returns to the mitochondrial matrix.

Obrázek 7.4: Transport acetyl-CoA z mch

ACETYL-CoA

- vyrábí se v mch, je nutné jej nějak dostat přes membránu
 - trikarboxylový transportní systém
- výměnou do mch je nesen malát nebo pyruvát

NADPH

- zdroje: penztózo-fosfátový cyklus a přeměna malátu na pyruvát

7.2.2 Elongace a desaturace MK

Buňka někdy potřebuje delší MK než je palmitát, nebo nenasycené MK.

ELONGACE

- běží hlavně v ER, ale zčásti i v mch
 - v ER je zdrojem dvouhlíkatých podjednotek pro prodlužování také malonyl
 - v mch je to acetyl-CoA
 - v ER je reakce závislá na syntéze MK, jednotlivé enzymatické aktivity jsou odděleny na různých enzymech
 - v mch elongace na syntéze závislá není a probíhá spíš jako obrácená β -oxidace
- přenašečem acylů je na rozdíl od syntézy MK CoA, nikoli ACP

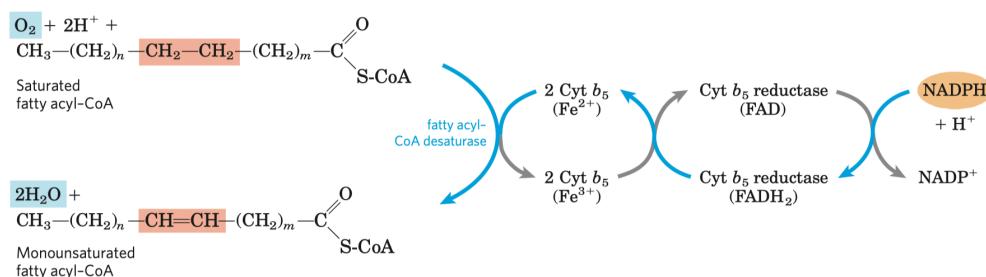


FIGURE 21-13 Electron transfer in the desaturation of fatty acids in vertebrates. Blue arrows show the path of electrons as two substrates—a fatty acyl-CoA and NADPH—undergo oxidation by molecular oxygen.

These reactions take place on the luminal face of the smooth ER. A similar pathway, but with different electron carriers, occurs in plants.

Obrázek 7.5: Desaturace MK (přesný mechanismus není třeba umět)

DESATURACE

- hrozí nebezpečí, že by při tvorbě dvojných vazeb mohly vznikat nebezpečné peroxidý
- vázané na membránu ER, spojeno s elektrotransportním řetězcem, který zabrání vzniku peroxidu
- provádí ji **desaturázy**

SAVČÍ DESATURÁZY

- savčí desaturázy neumí desaturovat dále než na $\Delta 9$, tj. maximálně 9 uhlíků od karboxylové skupiny
- všechny MK, které jsou desaturowané dále než na devátém uhlíku musíme přijímat v potravě, jsou tzv. **esenciální**
 - linoelová, linolenová

Elongace a desaturace jsou často kombinované, např. při tvorbě *arachidonátu*.

7.2.3 Syntéza triacylglycerolů

- poté, co máme nasynthetizovány MK a máme k dispozici glycerol, může začít syntéza živočiných tuků — triacylglycerolů
- glycerol je esterifikován třemi zbytky MK
- vychází z dihydroxyacetonfosfátu a z glycerolfosfátu
 - dihydroxyacetonfosfát vzniká v glykolýze, ve čtvrté (aldolázové) reakci
- při hladovění může docházet ke glycerogenezi
 - zkrácená dráha gng z oxaloacetátu, která končí dihydroxyacetonfosfátem a jeho redukcí na glycerolfosfát

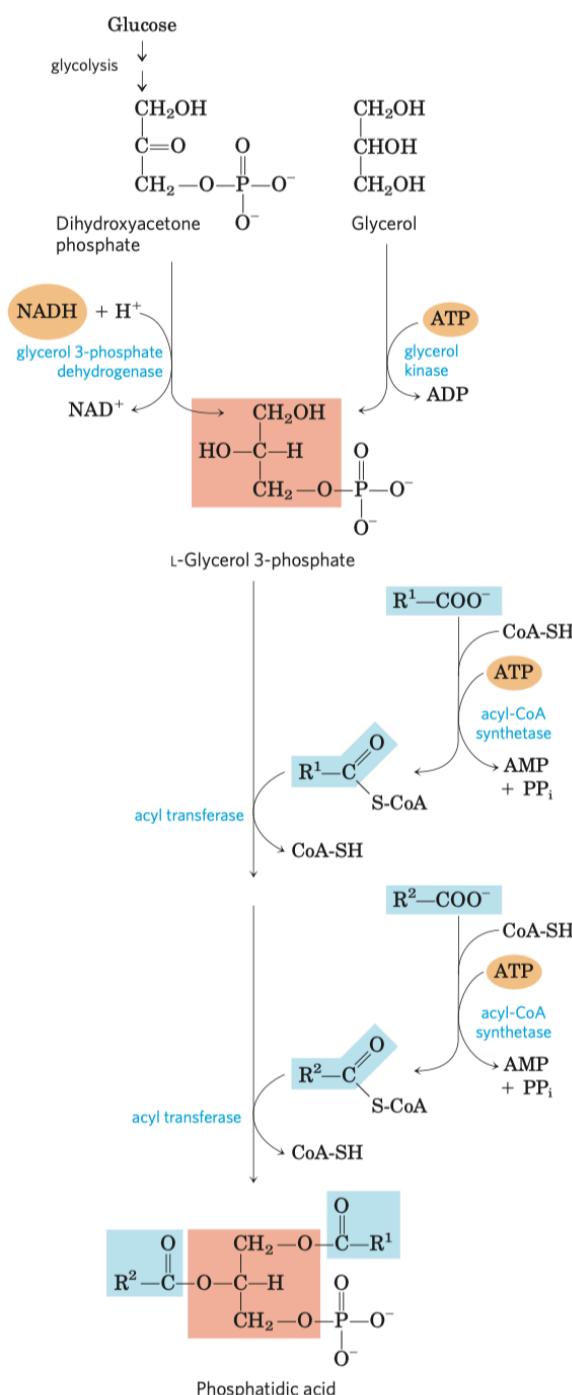
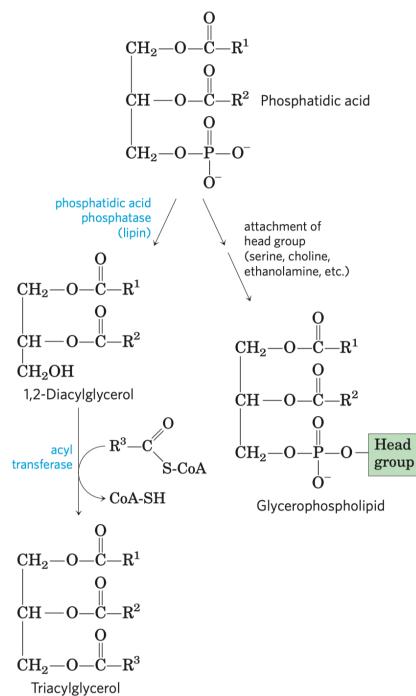


FIGURE 21-17 Biosynthesis of phosphatidic acid. A fatty acyl group is activated by formation of the fatty acyl-CoA, then transferred to ester linkage with L-glycerol 3-phosphate, formed in either of the two ways shown. Phosphatidic acid is shown here with the correct stereochemistry at C-2 of the glycerol molecule. (The intermediate product with only one esterified fatty acyl group is lysophosphatidic acid.) To conserve space in subsequent figures (and in Fig. 21-14), both fatty acyl groups of glycerophospholipids, and all three acyl groups of triacylglycerols, are shown projecting to the right.

Obrázek 7.6: Biosyntéza kyseliny fosfatidové (není třeba umět detaily)

MEZIPRODUKTY SYNTÉZY TRIACYLGLYCEROLŮ

- kyselina lyzofosfatidová a kyselina fosfatidová
 - z fosfatidové vychází syntéza živočišných tuků i fosfolipidů
 - lyzofosfatidová umí aktivovat malé GTPázy nebo kinázy z rodiny SAR



Obrázek 7.7: Přeměna kyseliny fosfatidové na triacylglyceroly a fosfolipidy

7.3 Regulace metabolismu tuků

- syntéza MK je regulována na transkripční úrovni
- při syntéze MK nechceme mít spuštěnou i β -oxidaci, protože by se obě reakce navzájem vyrušily
 - existence dvou stavů, buňka zájem bud na syntéze, nebo na odbourávání

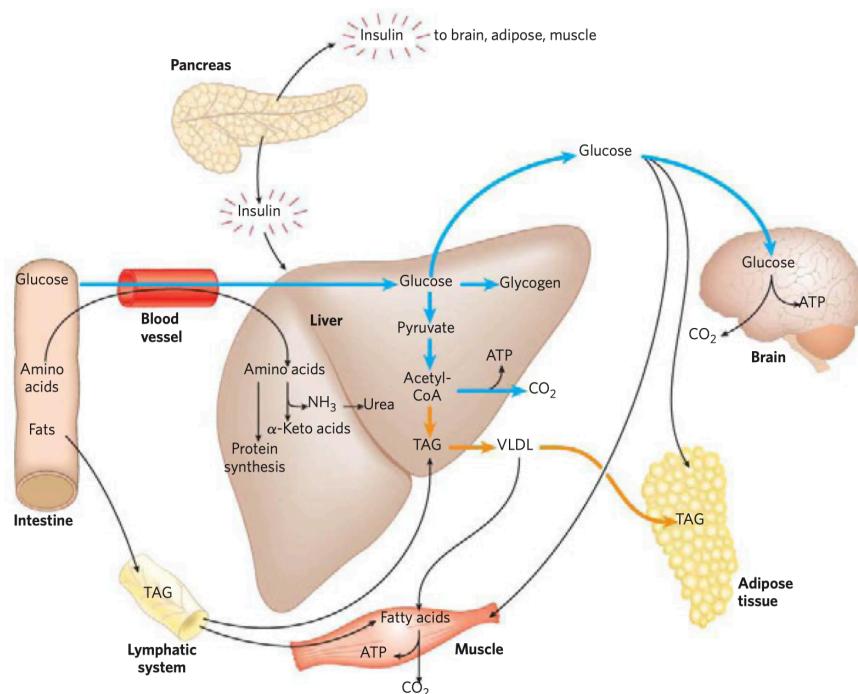


FIGURE 23-25 The well-fed state: the lipogenic liver. Immediately after a calorie-rich meal, glucose, fatty acids, and amino acids enter the liver. Blue arrows follow the path of glucose; orange arrows follow the path of lipids. Insulin released in response to the high blood glucose concentration stimulates glucose uptake by the tissues. Some glucose is exported to the brain for its energy needs and some to adipose and muscle tissue. In the liver, excess glucose is oxidized to acetyl-CoA, which is used to synthesize

fatty acids for export as triacylglycerols in VLDLs to adipose and muscle tissue. The NADPH necessary for lipid synthesis is obtained by oxidation of glucose in the pentose phosphate pathway. Excess amino acids are converted to pyruvate and acetyl-CoA, which are also used for lipid synthesis. Dietary fats move via the lymphatic system, as chylomicrons, from the intestine to the liver, muscle, and adipose tissues.

Obrázek 7.8: Játra ve stavu sytosti (lipogenní). TAG označují triacylglyceroly.

STAV SYTOSTI

- tento stav je v játrech stimulován inzulínem, buňka chce provádět syntézu
 - inzulín stimuluje i expresi FAS, naopak nenasycené MK tuto expresi inhibují
- když je aktivní ack, vzniká malonyl-CoA
 - ten je nejen prekurzorem pro reakci FAS, ale také inhibuje karnitin-palmitoyl-transferázu I, což je přenašeč MK v mch
 - β -oxidace neprobíhá, protože se do mch MK nedostanou

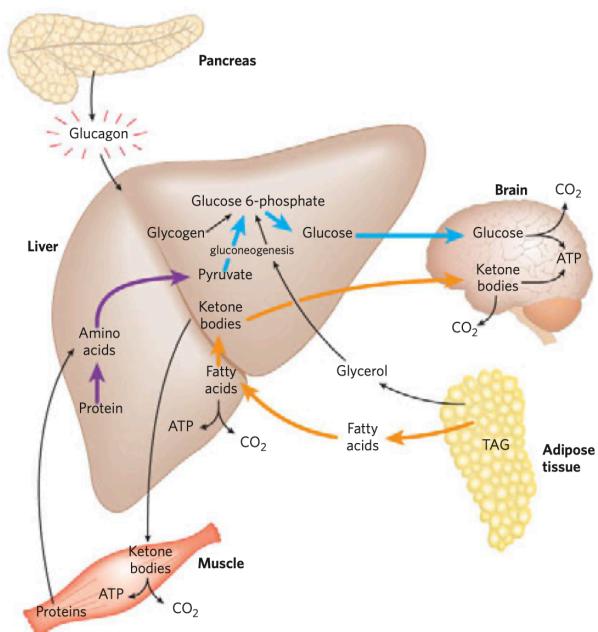


FIGURE 23-29 The fasting state: the glucogenic liver. After some hours without a meal, the liver becomes the principal source of glucose for the brain. Liver glycogen is broken down, and the glucose 1-phosphate produced is converted to glucose 6-phosphate, then to free glucose, which is released into the bloodstream. Amino acids from the degradation of proteins in liver and muscle, and glycerol from the breakdown of TAGs in adipose tissue, are used for gluconeogenesis. The liver uses fatty acids as its principal fuel, and excess acetyl-CoA is converted to ketone bodies for export to other tissues; the brain is especially dependent on this fuel when glucose is in short supply (see Fig. 23-21). (Blue arrows follow the path of glucose; orange arrows, the path of lipids; and purple arrows, the path of amino acids.)

Obrázek 7.9: Hladovějící játra (glukogenní)

STAV HLADU

- tento stav je v játrech stimulován glukagonem a adrenalinem, které aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu
- v tomto stavu je ACK, která svou činností nepřímo inhibuje β -oxidaci, sama inhibována pomocí AMP
 - pokles malonyl-CoA \rightarrow konec inhibice karnitin-palmitoyl-transferázy I \rightarrow přenos MK do MCH \rightarrow spuštění β -oxidace \rightarrow tvorba acetyl-CoA \rightarrow KC \rightarrow doplnění ATP

[VLIV INZULÍNU A GLUKAGONU]

Hlavním regulačním mechanismem, který řídí syntézu a degradaci MK, je tedy **poměr mezi inzulínem a glukagonem**.

TABLE 23–3 Effects of Insulin on Blood Glucose: Uptake of Glucose by Cells and Storage as Triacylglycerols and Glycogen

Metabolic effect	Target enzyme
↑ Glucose uptake (muscle, adipose)	↑ Glucose transporter (GLUT4)
↑ Glucose uptake (liver)	↑ Glucokinase (increased expression)
↑ Glycogen synthesis (liver, muscle)	↑ Glycogen synthase
↓ Glycogen breakdown (liver, muscle)	↓ Glycogen phosphorylase
↑ Glycolysis, acetyl-CoA production (liver, muscle)	↑ PFK-1 (by ↑ PFK-2) ↑ Pyruvate dehydrogenase complex
↑ Fatty acid synthesis (liver)	↑ Acetyl-CoA carboxylase
↑ Triacylglycerol synthesis (adipose tissue)	↑ Lipoprotein lipase

Obrázek 7.10: Vliv inzulínu na játra a tukové buňky

TABLE 23–4 Effects of Glucagon on Blood Glucose: Production and Release of Glucose by the Liver

Metabolic effect	Effect on glucose metabolism	Target enzyme
↑ Glycogen breakdown (liver)	Glycogen → glucose	↑ Glycogen phosphorylase
↓ Glycogen synthesis (liver)	Less glucose stored as glycogen	↓ Glycogen synthase
↓ Glycolysis (liver)	Less glucose used as fuel in liver	↓ PFK-1
↑ Gluconeogenesis (liver)	Amino acids Glycerol Oxaloacetate } → glucose	↑ FBPase-2 ↓ Pyruvate kinase ↑ PEP carboxykinase
↑ Fatty acid mobilization (adipose tissue)	Less glucose used as fuel by liver, muscle	↑ Hormone-sensitive lipase ↑ PKA (perilipin-②)
↑ Ketogenesis	Provides alternative to glucose as energy source for brain	↓ Acetyl-CoA carboxylase

Obrázek 7.11: Vliv glukagonu na játra a tukové buňky

REGULACE UKLÁDÁNÍ TUKŮ V TUKOVÝCH BUŇKÁCH

- mechanismus ukládání živočišných tuků
 - (1) partikule tuku se z jater dostanou do krve
 - (2) zachytí je **lipoproteinlipáza** na membráně tukových buněk
 - (3) odštěpí z partikulí volné MK
 - (4) přemění MK na živočišné tuky
- pokud je v tukových buňkách tímto způsobem ukládáno hodně tuků, začnou uvolňovat **leptin**
 - hlavní receptory pro leptin jsou v hypotalamu, který poté různými cestami signalizuje člověku, že je sytý
 - * patologie leptinu vedou často k obezitě
 - leptin také aktivuje AMP-aktivovanou proteinkinázu (dále jen *AMPK*), která poté v jaterních a svalových buňkách inhibuje FAS a podporuje β-oxidaci

LIPOPROTEINLIPÁZA

- je schopná v tukových buňkách odbourávat tuky
- reaguje na fosforylací PKA (čili vlastně nepřímo na hormonální signály)
 - snížená hladina glukózy => aktivace, MK poté slouží jako zdroj energie při nízké glykémii
 - při dlouhodobě zvýšené koncentraci glukózy je naopak rovnováha posunutá k tvorbě živočišných tuků

7.4 Cholesterol

- komplexní steroidní složka
- vzniká z acetátu (potažmo z acetyl-CoA), všechny uhlíky cholesterolu mají původ v acetyl-CoA
- při syntéze vzniká spousta biologicky aktivních látek
 - koenzym Q10, který je aktivní např. v OF
 - dolichol, přenáší cukerné zbytky při syntéze glykoproteinu
 - geranyl, izoprenodní látka, která posttranslačně modifikuje proteiny

UŽITEČNOST CHOLESTEROLU

- může ucpávat cévy, ale je pro organismus zásadně důležitý
- zvyšuje stabilitu biologických membrán
- při jeho syntéze vzniká spousta důležitých látek
- mnoho důležitých látek vzniká i přímo z něj
 - např. steroidní hormony
 - * kortikoidy, androgeny, mineralokortikoidy, estrogeny (progesteron, testosterone, estradiol, kortisol, aldosterol)
- také z něj vychází syntéza žlučových kyselin, které jsou nezbytné pro účinné trávení tuků
 - kyselina glykocholová, taurocholová, cholová
 - výhradně v této formě je cholesterol vylučován z těla (jinak se skoro nevylučuje)

7.4.1 Syntéza cholesterolu

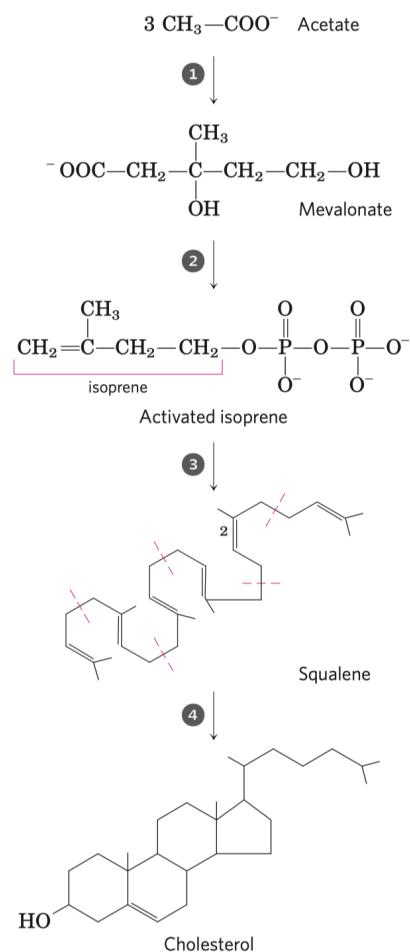
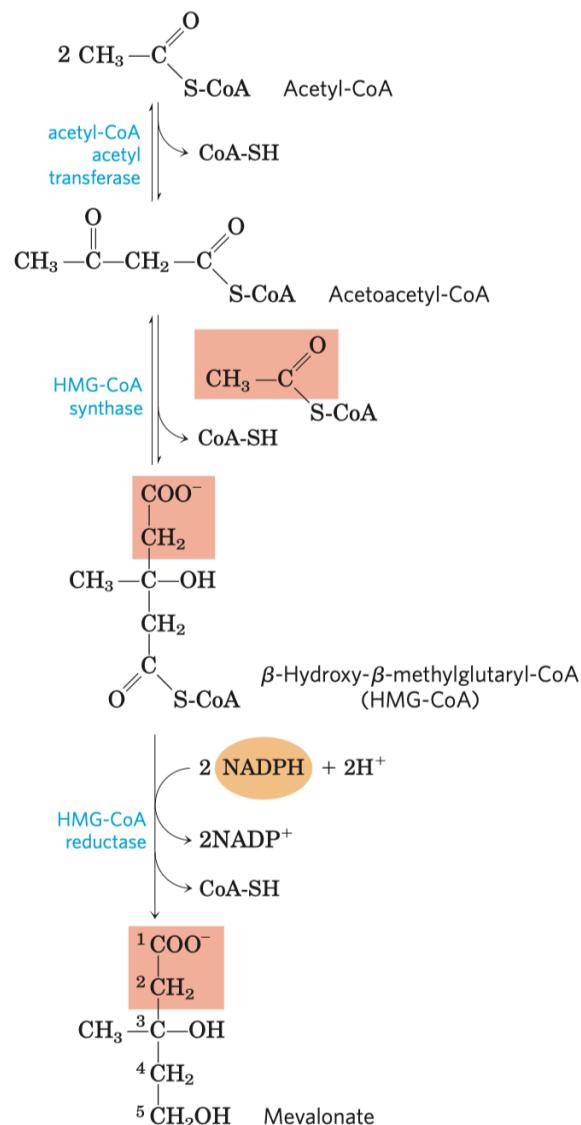


FIGURE 21–33 Summary of cholesterol biosynthesis. The four stages are discussed in the text. Isoprene units in squalene are set off by red dashed lines.

Obrázek 7.12: Syntéza cholesterolu v hrubých obrysech

První fáze



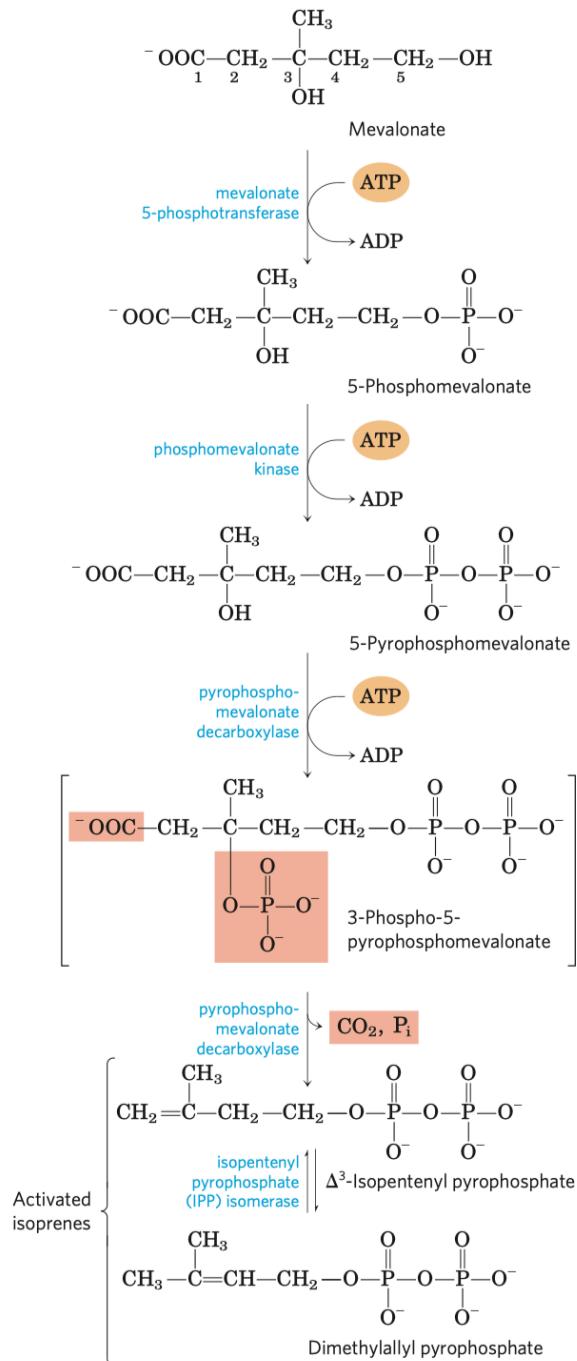
Obrázek 7.13: První fáze

PRVNÍ FÁZE

- acetyl-CoA \rightarrow ketolátka hydroxymethylglutaryl-CoA \rightarrow mevalonát
- v druhé polovině figuruje **HMG-CoA-reduktáza**
- přeměna HMG-CoA je hlavní redukční reakcí celé syntézy
- probíhá s pomocí dvou molekul NADPH

REGULACE HMG-CoA-REDUKTÁZY

- inhibováno fosforylací, a to buďto PKA nebo AMPK
- farmaka inhibující tvorbu cholesterolu v těle cílí právě na tuto reakci

Druhá fáze

Obrázek 7.14: Druhá fáze. Je třeba znát pouze konečné produkty.

DRUHÁ FÁZE

- mevalonát se pak mění na izopentenyl pyrofosfát a 5-pyrofosfomevalonát (též dimetylalyl pyrofosfát), což jsou obojí 5C látky s izoprenovou skupinou

Vzniknou tedy dvě 5C látky, my chceme však získat 30C cholesterol. Musíme je tedy nějak prodloužit.

Třetí fáze

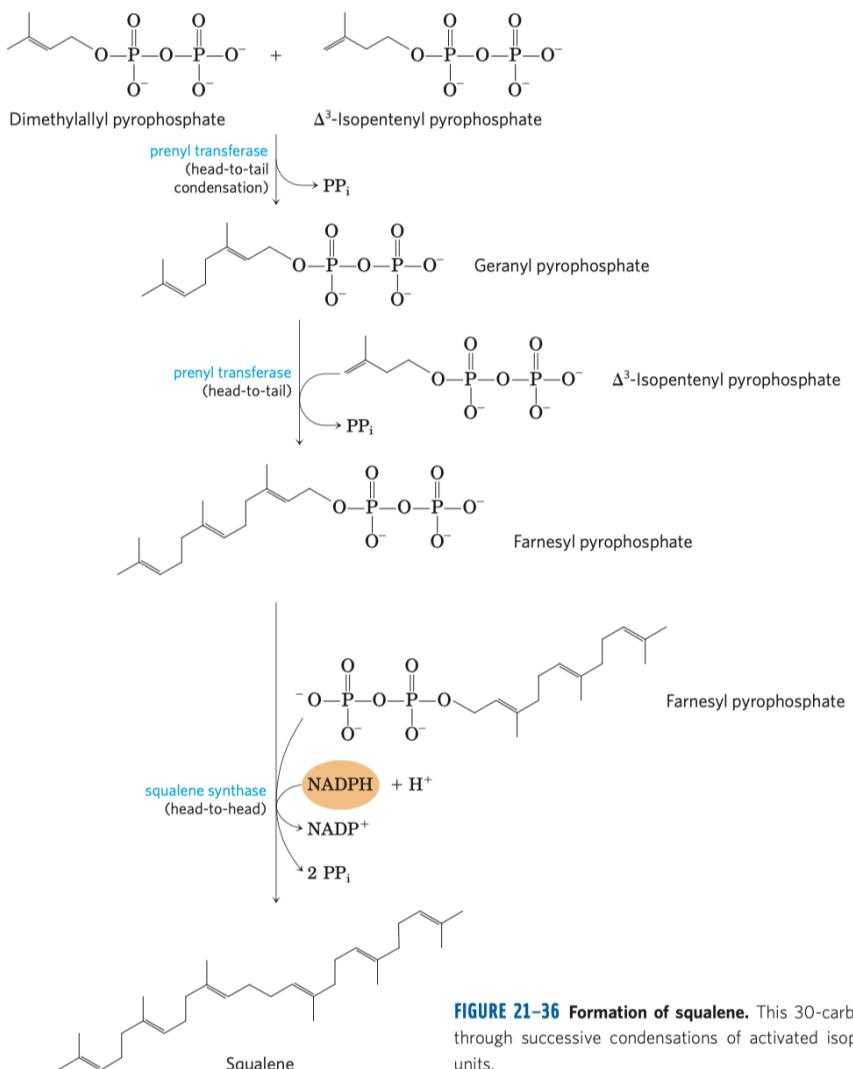


FIGURE 21-36 Formation of squalene. This 30-carbon structure arises through successive condensations of activated isoprene (five-carbon) units.

Obrázek 7.15: Třetí fáze

TŘETÍ FÁZE

- ve třetí fázi se spoují produkty druhé fáze, tak, abychom získali 30C skvalen
 - (1) izopentenyl pyrofosfát [5] + 5-pyrofosfomevalonát [5] = geranylpyrofosfát [10]
 - (2) geranylpyrofosfát [10] + izopentenyl pyrofosfát [5] = farnesyl pyrofosfát [15]
 - (3) 2 × farnesyl pyrofosfát [15] = skvalen [30]
- pyrofosfáty se odštěpují a energeticky pohánějí reakci

- při spojení dvou farnesylů se odštěpí 2PP_i , a při tom vždy vznikne reaktivní karbokationt

Čtvrtá fáze

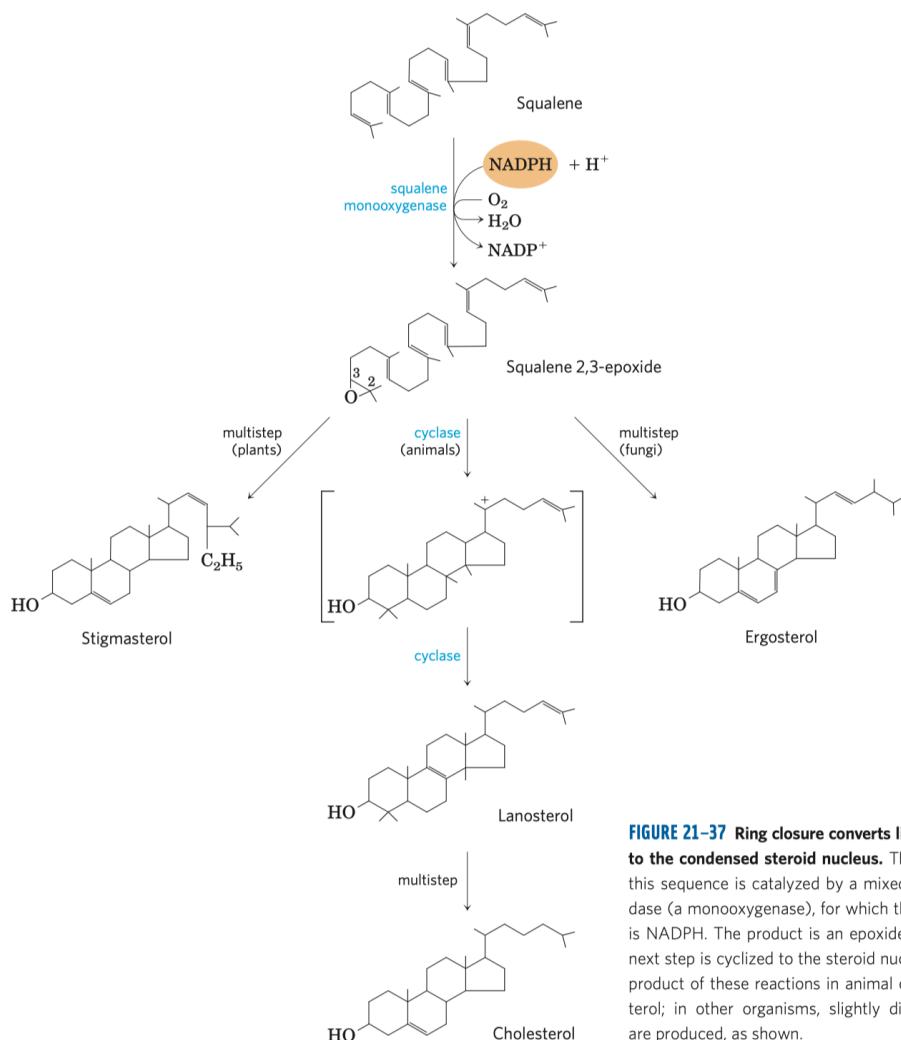


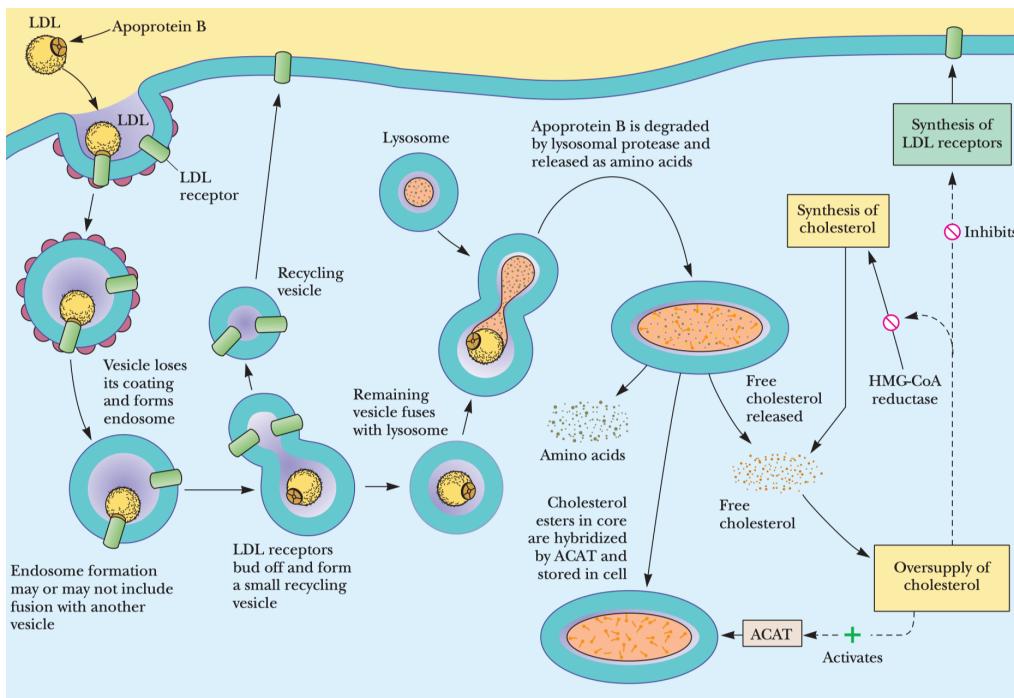
FIGURE 21-37 Ring closure converts linear squalene to the condensed steroid nucleus. The first step in this sequence is catalyzed by a mixed-function oxidase (a monooxygenase), for which the cosubstrate is NADPH. The product is an epoxide, which in the next step is cyclized to the steroid nucleus. The final product of these reactions in animal cells is cholesterol; in other organisms, slightly different sterols are produced, as shown.

Obrázek 7.16: Čtvrtá fáze. Detaily opět není třeba znát.

ČTVRTÁ FÁZE

- skvalen se zacyklí na lanosterol
- lanosterol se poté v průběhu další devatenácti reakcí přetvoří na cholesterol (*multistep* na obrázku)
 - účastní se toho enzymy asociované s membránou ER
 - reakce jsou často oxidacemi, katalýzy se účastní cytochromy z rodiny P450
- tato syntéza je velmi náročná na NADPH

7.4.2 Transport cholesterolu do buňky a jeho regulace



Obrázek 7.17: Transport cholesterolu do buňky (ACAT je acyl-CoA-cholesterol acyltransferáza)

TRANSPORT CHOLESTEROLU DO BUŇKY

- cholesterol se dovnitř dostává v podobě LDL (low-density lipoprotein) partikulí
- buňka tedy musí mít LDL receptory
 - vazba cholesterolu -> opláštěný váček -> endozom -> recyklace (viz obrázek)
- cholesterol v (jaterních) buňkách je zčásti esterifikován a uložen a zčásti se z něj tvoří cholesterolové kapénky
 - velké množství těchto kapének vede k snížení syntézy LDL receptoru a snížení syntézy HMG-CoA reduktázy

Asi 2/3 cholesterolu, který máme v těle, si syntetizujeme a 1/3 přijímáme v potravě. Z těla se dostává výhradně v podobě žluči, žlučových kyselin. Jeho vylučování může podnítit příjem rostlinných fytosterolů.

KOMUNIKACE MEZI JÁTERNÍ TKÁNÍ A PERIFÉRIÍ

(1) normální stav

- játra přijímají hodně LDL, pak je uvolňují do krve jako VLDL (very low-density lipoprotein) a ony se do nich vrací zase jako LDL

(2) familiární hypercholesterolémie

- defekt při syntéze LDL receptorů

- LDL receptory se špatně vstřebávají a zvyšuje se hladina těch ”špatných” cholesterolů v krvi
- (3) dieta s vysokým obsahem cholesterolu
- receptory jsou ze začátku v pořádku, ale pak dojde k adaptacím, sníží se syntéza HMG-CoA reduktázy
 - jaterní tkáň nestihá cholesterol vstřebávat a zpracovávat a opět to vede k poruchám
 - naopak fyzická aktivita vede ke snížení LDL v oběhu a zvýšení exprese HGM-CoA reduktázy

7.5 Ikosanoidy

- někdy také eikosanoidy
- mají dvacet uhlíků
- prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany, leukotrieny, hydro-peroxy-ikosatetraenové kyseliny
- jsou v mnohém podobné hormonům, ale jedná se o lokální mediátory
 - působí ve velmi nízkých koncentracích, nižších než hormony
 - signalizují přes G proteiny a druhé posly, jako je cAMP
 - stejně jako hormony ovlivňují řadu biologických dějů
 - * regulace krevního tlaku, bolest, reprodukční funkce, cyklus spánku a bdění, srážení krve a vlastně skoro jakýkoliv fyziologický proces
- jsou odvozeny od esenciálních mastných kyselin, většinu jsou při jejich příjmu syntetizovány, nebo mohou být přímo přijímány v potravě
 - přijmemme esenciální MK, ta se zabuduje do fosfolipidu a z toho je potom uvolňován ikosanoid

NÁZVOSLOVÍ

- jak už bylo zmíněno v kapitole o MK, MK se někdy značí dvěma čísly (tzv. **skóre**)
 - [<# uhlíků] : [# dvojných vazeb]
 - např. 18:2 je kyselina linoelová
- označení ωk
 - dvojná vazba nejvzdálenejší od karboxylu je k uhlíků od *konce* řetězce
 - podobně jako Δk , což značilo, že dvojná vazba nejvzdálenější od karboxylo je k uhlíků od *začátku* řetězce
- např. kyselina arachidonová $\omega 6$ (20:4), kyselina eikosapentaenolová $\omega 3$ (20:4)

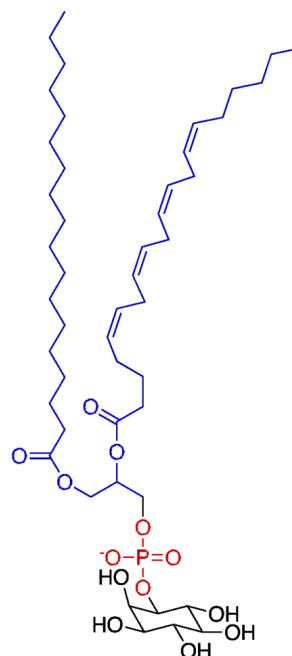
ÚČINKY

- mohou často způsobovat zánětlivé reakce

- na tomto stojí princip kortikoidů: aktivují syntézu lipokortinu -> inhibice A-2 -> inhibice syntézy ikosanoidů
 - * kortikoidy ale bohužel inhibují i ikosanoidy, které jsou pro tělo dobré

7.5.1 Tvorba a účinky ikosanoidů

- ikosanoidy se mohou uvolňovat z fosfolipidů
 - např. fosfatidylinositol
- fosfolipáza, která ikosanoidy uvolňuje, se jmenuje **A-2** (odštěpuje druhý acyl)
 - po její aktivaci se uvolní arachidonát a tím může být zahájena syntéza ikosanoidů
 - je třeba součástí hadích jedů — v odpovědi na uštknutí se masivně uvolňují ikosanoidy v organismu.
- vznikají v **cyklizující** (prostaglandiny, PG, a prostacykliny) a **linearizující** dráze (leukotrieny)



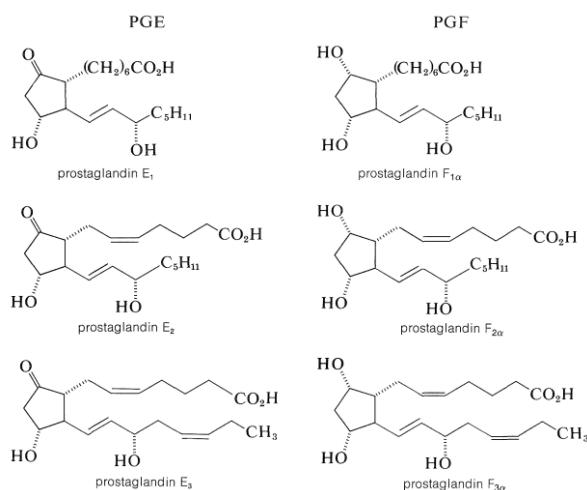
Obrázek 7.18: Fosfatidylinositol, s navázanou kyselinou arachidonovou a stearovou

Tvorba ikosanoidů je podobně jako u hormonů spřažena s druhými posly, mohou být aktivovány např. v odpovědi na adrenalin.

ÚČINKY LEUKTRIENŮ

- hrají roli v imunitní odpovědi
 - chemotaxe (přivolávání) leukocytů
- hrají roli také při alergických reakcích a anafylaktickém šoku

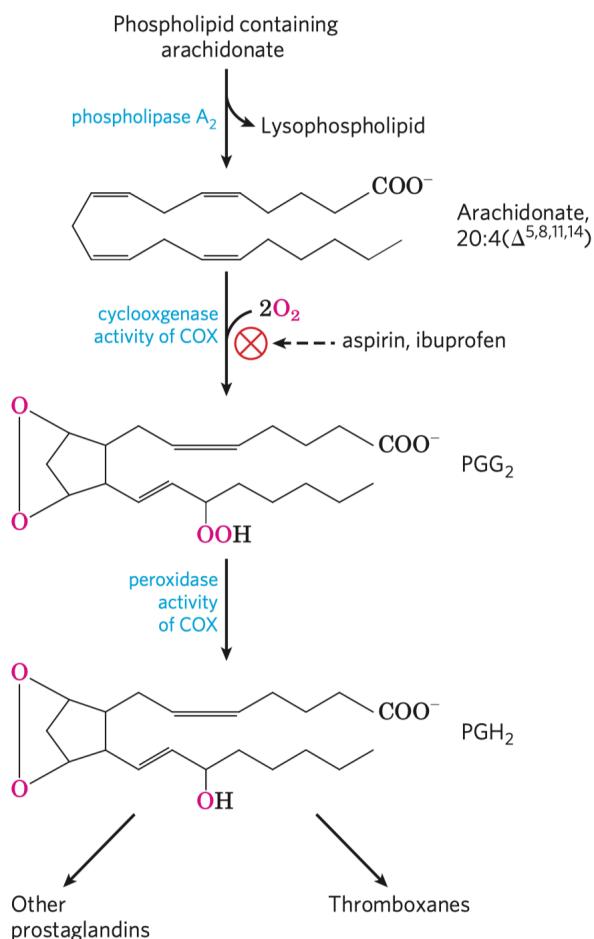
7.5.2 Cyklizující dráha



Obrázek 7.19: Příklady prostaglandinů

PROSTAGLANDINY

- odvozeny od teoretické kyseliny prostaglandinové
- označují se písmenem a číslem
 - písmeno: typ organického cyklu, který se vyskytuje na konci kyseliny
 - číslo: počet dvojných vazeb
- malé strukturní změny znamenají velmi odlišné biologické účinky



Obrázek 7.20: Cyklická dráha

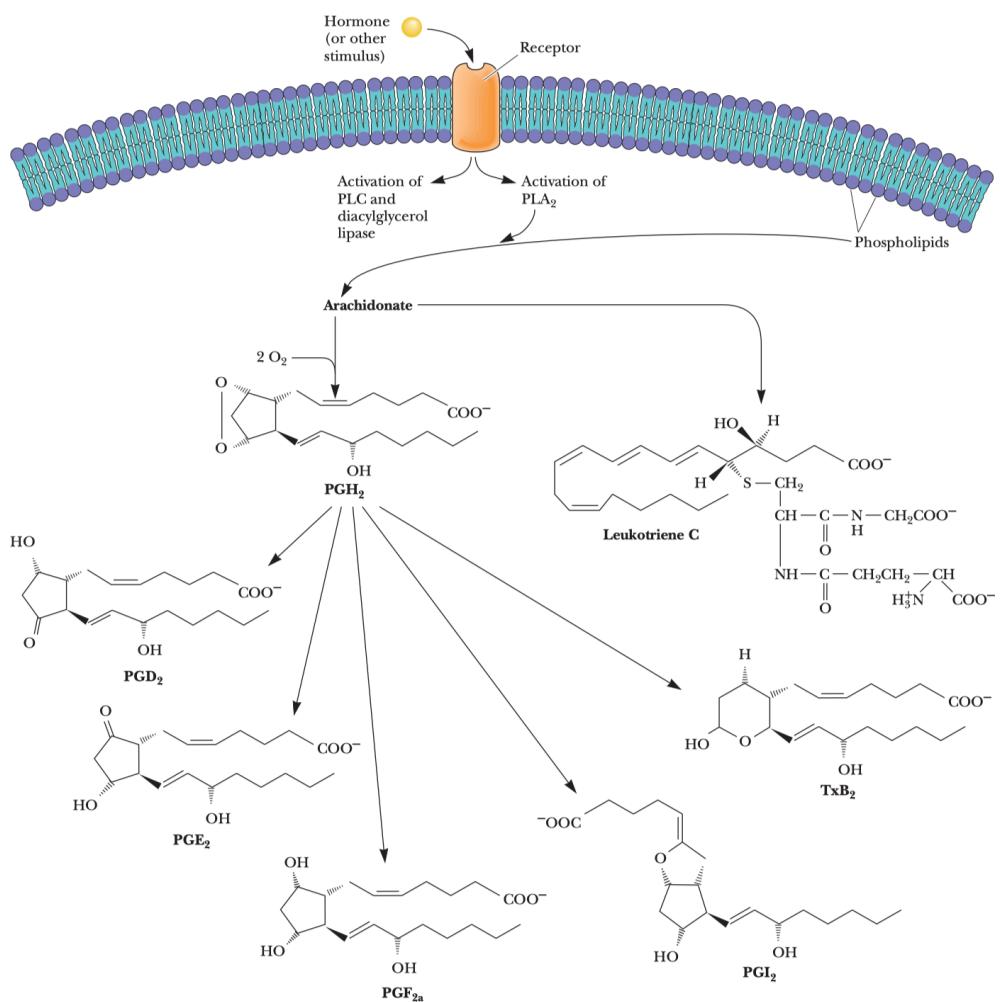
REAKCE PROSTAGLANDIN-H₂ SYNTÁZY

- z arachidonátu je přeměňován prostaglandin-H₂ syntázou na PGH₂
- z PGH₂ mohou vzniknout další prostaglandiny a prostacykliny"
- toto je klíčová reakce

PROSTAGLANDIN-ENDOPEROXID SYNTÁZA (PTGS)

- oficiální název enzymu z předchozí reakce
- má dvě aktivity, cyklooxygenážovou a endoperoxidázovou
 - zajímá nás hlavně ta první, cyklooxygenážová, proto se tomuto enzymu častěji říká **cyklooxygenáza (COX)**
- má dvě formy (izozymy)
 - COX-1, nebo též PGH syntáza 1
 - * konstitutivní, stabilně existuje v těle
 - COX-2, nebo též PGH syntáza 2
 - * inducibilní, tato forma se vyskytuje jen při patologických stavech, jako je např. revmatoidní artritida (chronické záněty)

- běžné protizánětlivé látky (např. aspirin) blokují COX-1, brání syntéze PGH₂



Obrázek 7.21: Příklady prostanoidů vznikajících z PGH₂

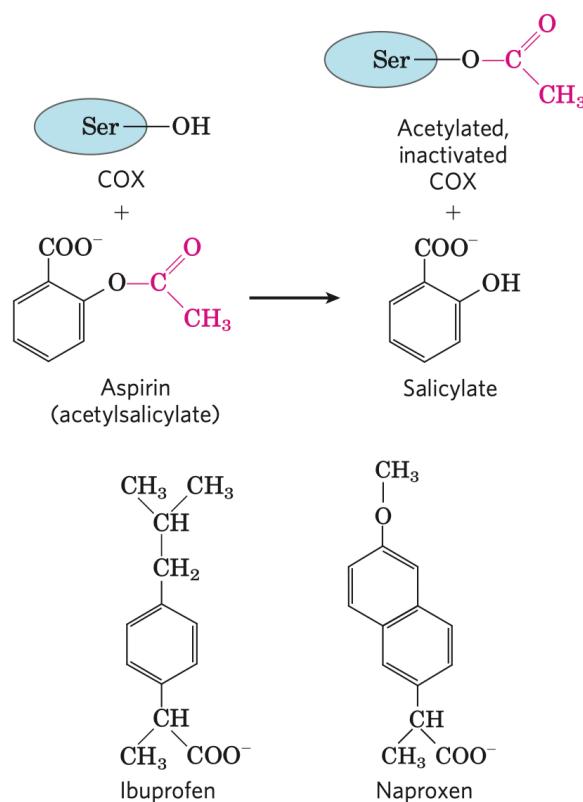
Prostanoidy

Podskupina ikosanoidů, která zahrnuje prostaglandiny, tromboxany a prostacykliny.

[ÚČINKY PROSTANOIDŮ]

- TXA₂
 - agregace trombocytů
 - konrakce hladkého svalstva cév
- PGI₂, PGI₃
 - antiagreganční účinek
 - stimulace relaxace hladkého svalstva
 - zvýšení intenzity a trvání bolesti

- PGE₂
 - inhibice kontrakce hladkého svalstva
 - vasodilatace cév a zvýšení permeability cév
 - inhibice sekrece HCl
 - stimulace sekrece mukinu
 - zvýšení teploty
 - zvýšení intenzity a trvání bolesti
- PGD₂
 - navození spánku
 - kontrakce bronchiálního svalstva
- PGF₂
 - kontrakce hladkého svalstva
 - zvýšení teploty



Obrázek 7.22: Aspirin, ibuprofen a naproxen

ASPIRIN

- acetylsalicylová kyselina
- inaktivuje COX-1 tím, že acyluje jeden serinový zbytek v katalytickém místě na syntáze

- doporučuje se brát u starších lidí kvůli prevenci mozkové příhody
 - brání tvorbě PGH₂ a tím i prostacyklinu

7.6 Glycerolipidy a sfingolipidy

Glycerolipidy

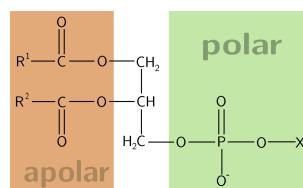
Lipidy odvozené od glycerolu.

Sfingolipidy

Lipidy odvozené od sfingosinu, 18C alkoholu, jehož první tři uhlíky hrají ve stavbě lipidů roli glycerolu.

Fosfolipidy

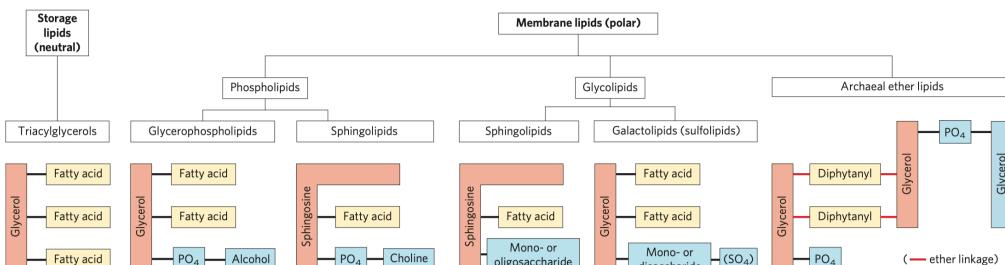
Podtřída glycerolipidů, mají na glycerolu navázán i fosfor.



Obrázek 7.23: Obecná struktura fosfolipidu

Glykolipidy

Mají v molekule cukernou složku.



Obrázek 7.24: Bežné typy zásobních a membránových lipidů

7.6.1 Fosfolipidy

FOSFOLIPIDY

- jsou syntetizovány na membráně ER, přenášeny na vnitřní stranu cytoplazmatické membrány a pomocí **flipáz** přenášeny na její vnější stranu
- funkce

- kotvení proteinů v membráně (GPI kotva)
- strukturní složka membrán, součást lipoproteinů
- prekurzory spousty věcí, např. inozytoltrifosfátů, triacylglycerolů a druhých poslů

ALKYLACYLGLYCEROLFOSFOLIPIDY A PLASMALOGENY

- z plasmalogenů vzniká faktor, který aktivuje krevní destičky
- jsou hodně v nervové a svalové tkáni, podílí se na zvýšené tekutosti membrán

Syntéza fosfolipidů

- vždycky musí docházet k energetickému nabítí jednoho z prekurzorů
- existují v zásadě tři způsoby vzniku
 - (1) fosfátový ester je nabítý pomocí CDP
 - vzniká fosfatidylethanolamin, neboli fosfatidylcholin
 - (2) záměna fosfátového esteru
 - fosfatidylethanolamin + serin -> fosfatidylserin
 - (3) nabítí esteru pomocí CDP-diacylglycerolu

[POZNÁMKA]

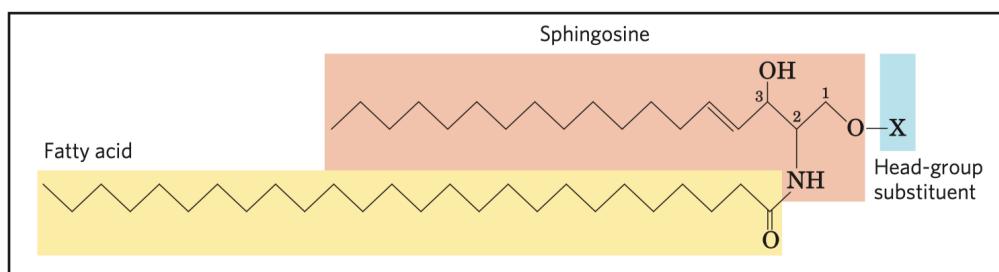
FOSFATIDYLCHOLIN

- je důležité přijímat v potravě, podílí se na vodivosti nervových buněk
 - může reagovat s ceramidem za vzniku sfingomyelinu, který je důležitý pro tvorbu myelinové pochvy
- alternativně může být syntetizován z fosfoetaloaminu pomocí trimethylace

FOSFATIDYLINOSITOL

- důležitá signální molekula
- může být štěpena na druhé posly (IP3 a DAG)
- může z něj vznikat difosfatidylglycerol neboli kardiolipin
 - je ve vnitřní membráně mitochondrií a je důležitý pro její správné fungování
 - je ho hodně v srdečním svalu
 - je nezbytný pro dýchací řetězec

7.6.2 Sfingolipidy



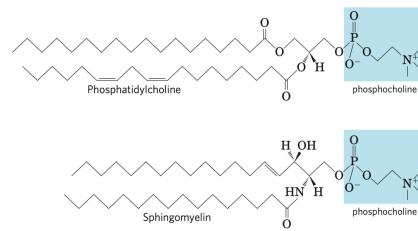
Name of sphingolipid	Name of X—O	Formula of X
Ceramide	—	—H
Sphingomyelin	Phosphocholine	$\text{P}(\text{O}^-)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$
Neutral glycolipids Glucosylcerobioside	Glucose	
Lactosylceramide (a globoside)	Di-, tri-, or tetrasaccharide	
Ganglioside GM2	Complex oligosaccharide	

Obrázek 7.25: Sfingolipidy

GLYKOSFINGOLIPIDY

- jsou odvozeny od ceramidu
 - ceramid je sfingolipid, který má přes esterovou vazbu připojen ke sfingosinu pouze vodík, viz obrázek
- jejich součástí jsou cukerné zbytky; podle toho, jaké konkrétně, se pak sfingolipidy dále dělí
 - cereprosydy, s jednoduchým cukrem (glukóza, galaktóza)
 - sulfatidy (cukr je sulfatován)
 - globosidy (mají více cukerných podjednotek)
 - gangliosidy (více cukerných podjednotek a ještě kyselina sialová)
- nacházejí se v nervové tkáni

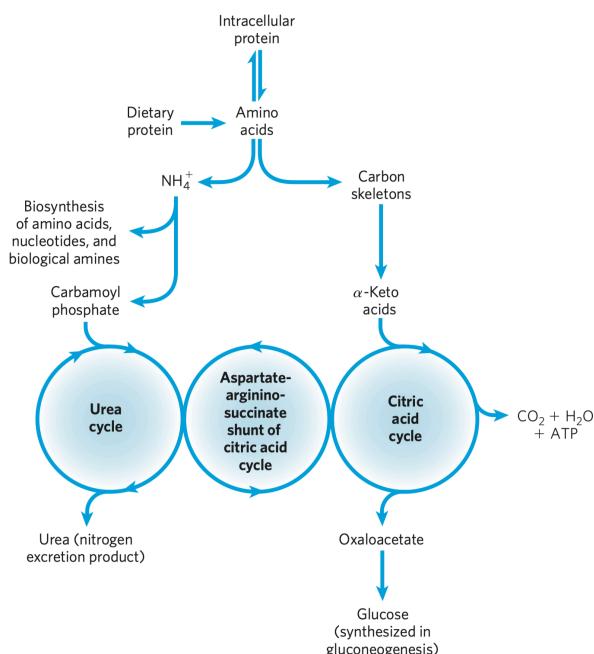
- nikdo nevěděl, co dělají, byli proto nazvány podle mytické sfingy
- glykosfingolipázy (poruchy v glykosfingolipidech) mají často za následek problémy s nervovým systémem, bývají letální



Obrázek 7.26: Srovnání struktury svou membránových lipidů, fosfatidilcholinu (glycerofosfolipidu) a sfingomyelinu (glykosfingolipidu). Jde vidět, že jejich struktura fyzikální parametry jsou velice podobné, přestože mají chemicky jiný původ.

ČÁST 8

METABOLISMUS AMINOKYSELIN



Obrázek 8.1: Odbourávání aminokyselin v savcích

METABOLISMUS AMINOKYSELIN

- amino skupiny se zpracovávají odděleně od uhlíkatých koster AK, viz obrázek
 - v katabolických drahách vzniká amoniak, který je pro organismus silně toxický (např. interferuje s buněčnými drahami)

- metabolické produkty k exkreci dusíku se liší podle potřeb daného organismu

ODBOURÁVÁNÍ AMONIAKU

- (1) mořští bezobratlí a larvy obojživelníků prostě nechávají volný amoniak difundovat z těla
- (2) pokud má organismus dostatek vody, je možné vylučovat dusík v podobě **močoviny**
 - složitější než prostý amoniak, není ale tak toxická, nepotřebuje tolik vody k vyloučení
 - když není k dispozici voda, je možné ji vylučovat v mikrokristalech nebo v pastě
- (3) další možností je **kyselina močová** (derivát purinové báze, hypoxanthinu, xanthinu)
 - náročná sytéza, viz níže, samotné její vyloučení spotřebuje velice málo vody
- (4) pavouci a škorpióni používají **guanin**

PRŮBĚH

- (1) transaminace: přenos aminoskupiny z obourávané AK na nějakou jinou ketokyselinu
- (2) deaminace: samotné uvolnění amoniaku
- (3) zpracování amoniaku a jeho vyloučení (u lidí: cyklus močoviny)

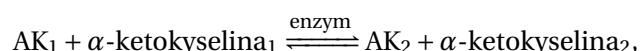
8.1 Transaminace

- obecně se při této reakci přenáší aminová skupina z AK na oxokyselinu, čímž se tato oxokyselina mění na nějakou jinou AK
- v rámci metabolismu AK se uplatňuje tak, že se většina AK přemění na Glu nebo Asp, které se pak dále zpracovávají
 - lepší, než kdyby měla každá AK svou vlastní katabolickou cestu
 - výjimku tvoří Lys, Thr a Pro, které jsou někdy zpracovány svými příslušnými dehydrogenázami
- transaminace jako taková se skládá ze dvou fází, které obě katalyzuje nějaká transamináza

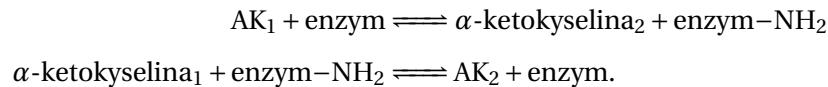
META

Oxo-něco v rámci této kapitoly odpovídá keto-něčemu na obrázcích.

Obecný sumární popis transaminace je tedy



a pokud bychom ji chtěli rozdělit na fáze, vypadalo by průběh takto



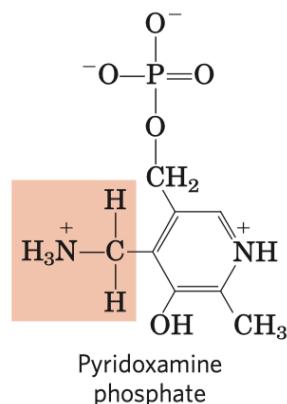
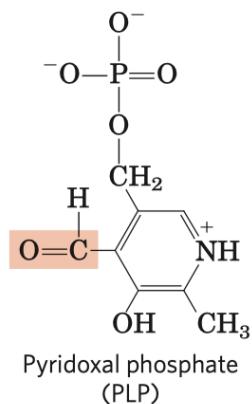
OBECNÝ POPIS FÁZÍ

- obě fáze jsou si vlastně opačné
- obě navíc musí proběhnout přesně v tomto pořadí, jde tedy o **uspořádáné reakce**
- akceptorem aminoskupiny (tedy α -ketokyselina₂) je nejčastěji α -oxoglutarát, viz příklad A níže, ale mohou to být i jiné látky

8.1.1 Obecný průběh reakce

TRANSAMINÁZY

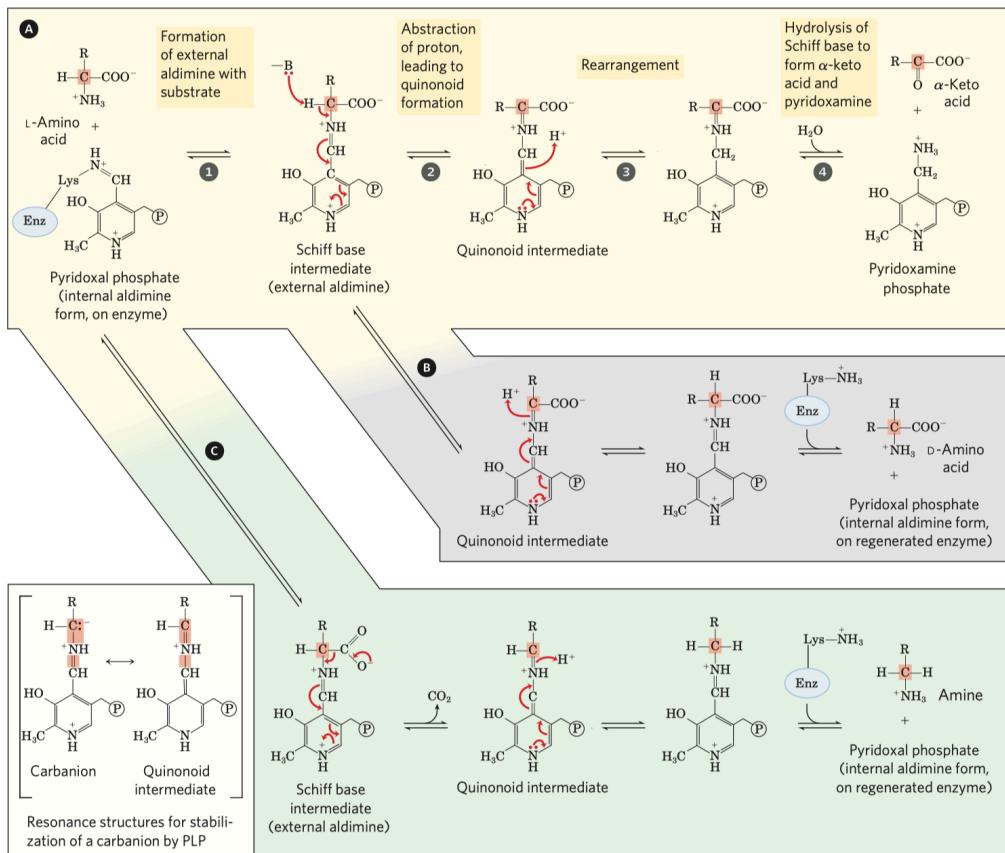
- někdy též aminotransferázy (v jiných zápisích byl ještě pojem "aminoenzym", ale nikde jinde jsem jej nenašel)
- enzymy pohánějící celou transaminaci
- pracují oligospecificky: existují specifické transaminázy pro konkrétní kombinaci AK a oxokyseliny
- všechny ale mají společný koenzym, PLP



Obrázek 8.2: PLP a PMP

PLP

- odvozený od pyridoxaminu (vitamín B6)
 - heterocyklická sloučenina s aromatickým charakterem
 - je v ní mnoho delokalizovaných π -elektronů, které jsou v rovinách nad i pod rovinou kruhu
- v průběhu první fáze reakce se mění na pyridoxamin-5-fosfát (PMP)
 - v průběhu druhé fáze se pak PMP mění stejným způsobem zpět na PLP
- účastní se nejen transaminací, ale také racemací (prohození L-formy za D-formu a naopak) a dekarboxylací, viz obrázek



MECHANISM FIGURE 18-6 Some amino acid transformations at the α carbon that are facilitated by pyridoxal phosphate. Pyridoxal phosphate is generally bonded to the enzyme through a Schiff base, also called an internal aldimine. This activated form of PLP readily undergoes transamination to form a new Schiff base (external aldimine) with the α -amino group of the substrate amino acid (see Fig. 18-5b, d). Three alternative fates for the external aldimine are shown: **A** transamination, **B** racemization, and **C** decarboxylation. The PLP-amino acid Schiff base is in conjugation with the pyridine ring, an electron sink that permits delocalization of an electron pair to avoid formation of an unstable carbanion

on the α carbon (inset). A quinonoid intermediate is involved in all three types of reactions. The transamination route **A** is especially important in the pathways described in this chapter. The pathway highlighted in yellow (shown left to right) represents only part of the overall reaction catalyzed by aminotransferases. To complete the process, a second α -keto acid replaces the one that is released, and this is converted to an amino acid in a reversal of the reaction steps (right to left). Pyridoxal phosphate is also involved in certain reactions at the β and γ carbons of some amino acids (not shown). **Pyridoxal Phosphate Reaction Mechanisms**

Obrázek 8.3: Různé reakce s PLP a AK. Nejdůležitější je pro nás ta žlutá nahoře (transaminace), pro ilustraci jsou ale uvedeny i další dvě: racemace (B) a dekarboxylace (C). Na obrázku není celý průběh transaminace, pouze její první fáze; druhá fáze probíhá stejně, jen zprava doleva a s jinou α -ketokyselinou. Úplné detaily není třeba umět.

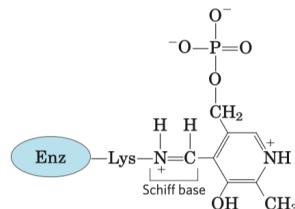
Konkrétní průběh reakce viz obrázek a následující popis.

PRŮBĚH PRVNÍ FÁZE REAKCE

- (1) PLP je na enzym připojen Shiffovou bází přes ϵ -aminoskupinu lysinu na aktivním cetu enzymu (viz obrázek níže)
 - kromě Lys se vazby účastní i řada nekovalentních vazeb
- (2) dochází k výměně Shiffovy báze mezi enzymem a substrátem
 - máme samotný enzym a poté PLP přes Shiffovu bázi kovalentně navázané na substrát

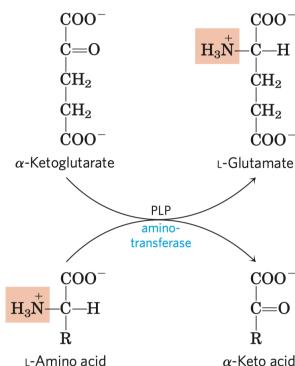
- (3) delokalizované elektrony koenzymu destabilizují vazby na C α AK, které jsou mimo rovinu kruhu
- je to taková elektronová jímka, která umožňuje štěpení vazeb kolmých na heterocyklus
- (4) vazba C–NH se štěpí, vzniká PLP a z AK se stane jen α -oxokyselina

Druhá fáze probíhá analogicky, ale od konce; PMP se v jejím průběhu mění opět na PLP.



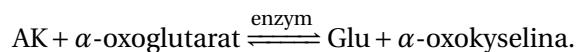
Obrázek 8.4: Spojení enzymu a PLP

8.1.2 Příklady transaminačních reakcí



Obrázek 8.5: Reakce AK -> Glu

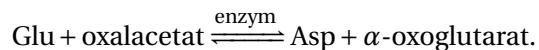
První příklad transaminace:



REAKCE AK -> GLU

- většina AK je tímto způsobem přeměněna na Glu
 - Lys, Pro a Thr se někdy transaminaci přímo vyhnou
 - Asp může být zpracován přímo v močovinovém cyklu, i bez transaminace
 - Glu se nemění na Glu (ofc), ale právě na Asp (v reakci níže)

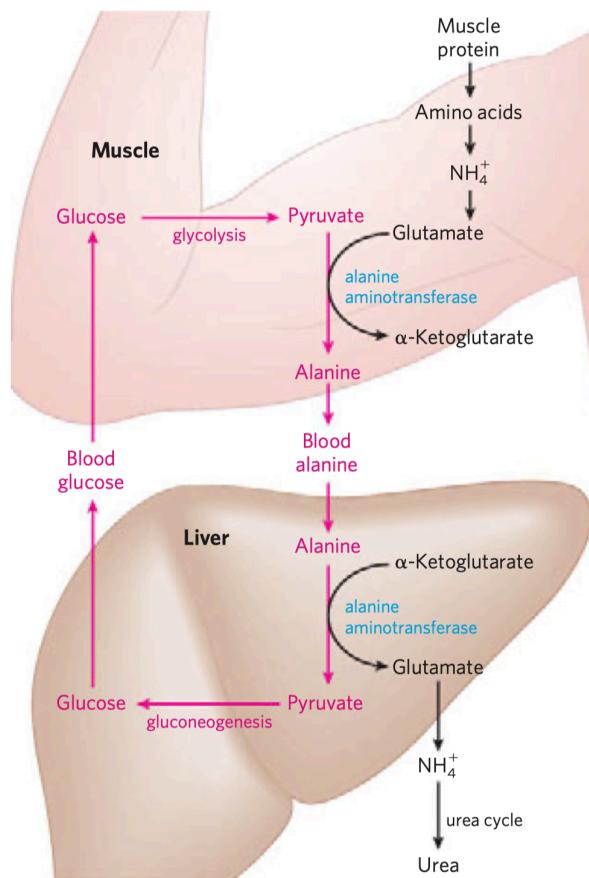
Určité množství Glu se tedy mění na Asp, a to v následující reakci (druhý příklad transaminace):



GLU A ASP V METABOLISMU

- hlavní intermediáty metabolismu AK
- všechny AK (s výjimkami) jsou převedeny na Glu nebo Asp a v této podobě dále zpracovány
 - výjimku tvoří Lys, Pro a Thr, které někdy místo transaminace projdou reakcí se svou příslušnou dehydrogenázou

Třetím příkladem transaminace je tzv. glukózo-alaninový cyklus.



Obrázek 8.6: Glukózo-alaninový cyklus

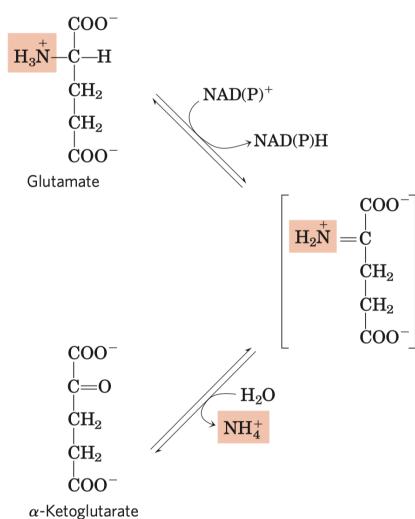
GLUKÓZO-ALANINOVÝ CYKLUS

- existují svalově specifické aminotransferázy, které pomáhají netoxicky odstranit dusík z buňky

- pyruvát (jako ketokyselina) + AK -> jiná ketokyselina + Ala
 - transaminační reakce (Ala je AK odvozená právě od pyruvátu)
- Ala pokračuje do jater, kde může být v reakci výše (za vzniknu pyruvátu) přeměněn na Glu
 - pyruvát se poté může v játrech uplatnit např. v gng, vzniklá glukóza poté může přes krev opět do svalů => cyklus

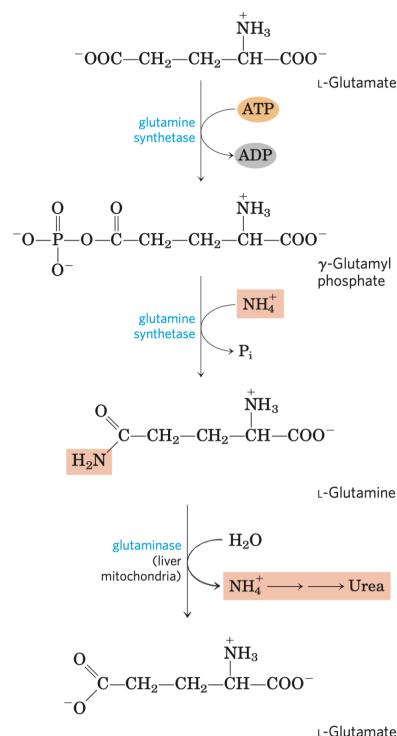
8.2 Oxidativní deaminace glutamátu

- reakce, kde se uvolní amoniak
- enzym **glutamatdehydrogenáza**
- oxidoreduktivní reakce, savčí verze enzymu umí pracovat s NAD^+ i NADP^+ (což je neobvyklé)
 - NAD^+ se většinou účastní oxidativního metabolismu v mch
 - NADP^+ naopak bývá účasten cytosolických reduktivních syntéz
- (především) v hepatocytech tak vzniknou amonné ionty
- vzniklé redukované NAD(P)H se využije dále v metabolismu (reduktivní syntézy atp.)



Obrázek 8.7: Deaminace glutarátu glutamatdehydrogenázou

K transportu dusíku se někdy používá také **glutamin**.



Obrázek 8.8: Vznik a zpracování glutaminu (detaile reakcí není třeba umět)

8.3 Cyklus močoviny

- objeven Krebsem
- kompartmentalizován mezi mitochondrii a cytoplasmu
- pokud bychom svévolně přidávali nebo odebírali nějaký meziprodukt, změnili bychom tím koncentrace a cyklus by se zastavil

SUBSTRÁTY

- (1) amoniak z glutamát-dehydrogenázové reakce
 - prostřednictvím karbamoyl-fosfátu, dodá první dusík
- (2) kyselina uhličitá (přesněji hydrogenuhličitan)
- (3) kyselina asparagová
 - vzniklá transaminací Glu -> Asp, dodá druhý dusík

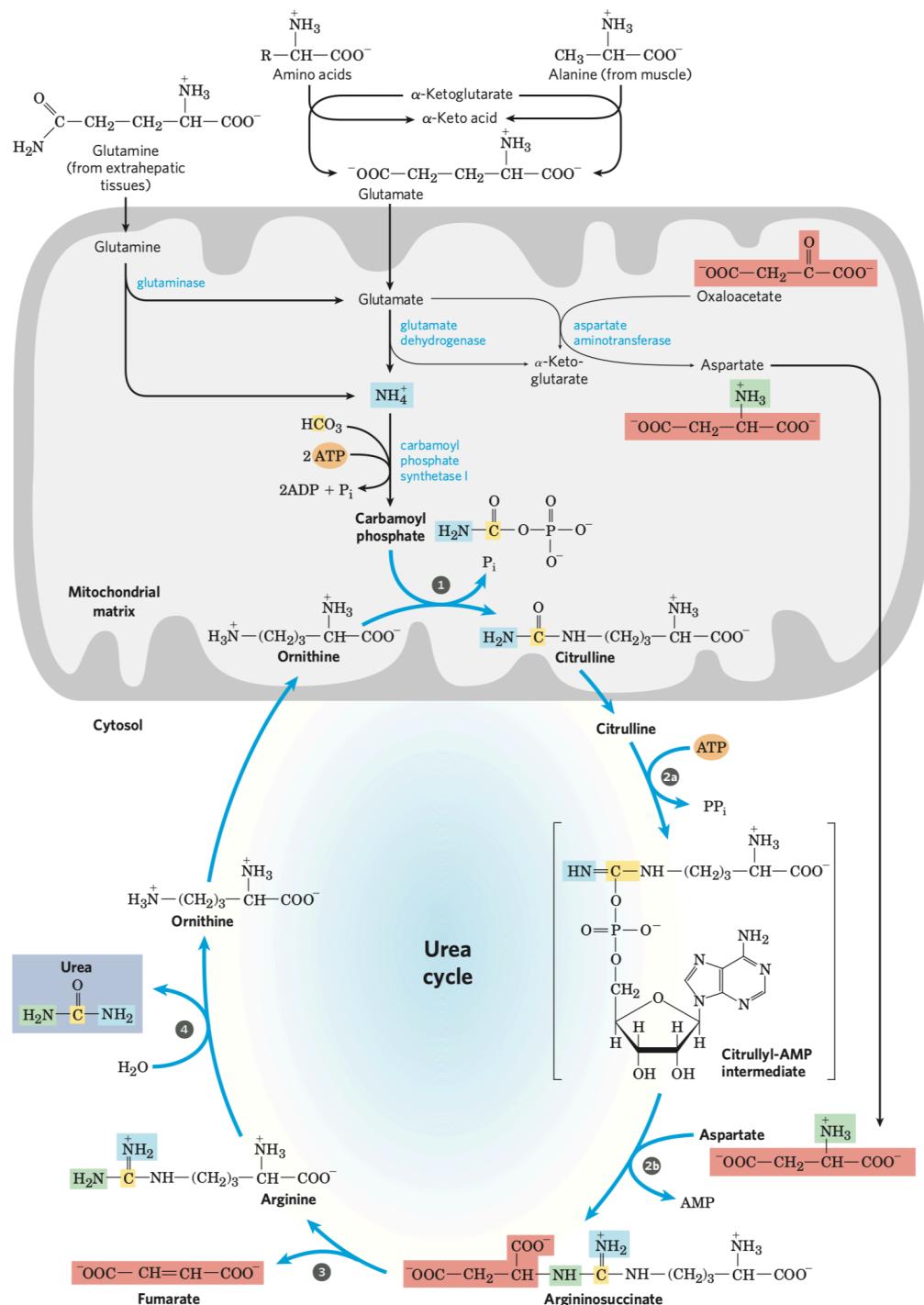
Poté je potřeba ještě 3 ATP (energeticky 4, viz popis druhé reakce).

PRODUKTY

- (1) močovina (karbamid, urea, diamid kyseliny uhličité)
- (2) fumarát
 - ten odnáší tu uhlíkovou kostru, kterou tam přinesl Asp

- pokračuje do KC, nebo do transaminázové reakce, kde se mění na Asp

8.3.1 Průběh



Obrázek 8.9: Cyklus močoviny

PŘÍPRAVNÁ REAKCE

- tvorba carbamoyl-fosfátu v mch
 - toho jsou obecně schopny carbamoyl-P syntetáza I a II
- cyklu močoviny se účastní **karbamoyl-P syntetáza I**
 - carbamoyl-P syntetáza II je cytosolická a katalyzuje syntézu purinových nukleotidů
- spotřeba 2 ATP

PRVNÍ REAKCE

- katalyzována **2-ornitin-transkarbamoylázou**
- ornitin (který v cyklu zbyl z předchozí iterace) + karamoyl-fosfát -> citrulin
- ortinin je podobný Lys, citrulin je podobný Arg
 - ani jeden ale není inkorporován v proteinech
- ornitin a citrulin přechází z mch do cytosolu a zpět

DRUHÁ REAKCE

- katalyzována **3-argininosukcinát-syntetázou**
- citrulin + *příchozivší Asp* -> arginino-sukcinát
- spotřeba 1 ATP (reakce prochází přes intermediát citrulin-AMP)
 - reálně se vlastně dá počítat jako 2 ATP, protože ji poté někdy musíme resyntetizovat

TŘETÍ REAKCE

- katalyzována **4-argininosukcinát-lyázou**
- štěpení arginino-sukcinátu -> Arg + *fumarát*, který z cyklu vystupuje
 - fumarát -> malát -> oxaloacetát -> vstup do mch -> KC (nebo transaminázová reakce -> Asp)

ČTVRTÁ REAKCE

- katalyzována **5-arginázou**
- štěpení argininu -> uvolnění karbamidu (ureová skupina) + ornitin

8.4 Metabolismus C-kostry AK

Nyní se zabýváme tím, co se stane s uhlíkovou kostrou AK, která nám zůstala po deaminaci.

META

Pro účely zkoušky budeme muset vědět, kde jednotlivé dráhy končí a na co jsou jaké aminokyseliny odbourávány (viz obrázek). Není nutné do detailu znát, jak konkrétně každá dráha probíhá, pouze rámcově chápát, jaké typy reakcí probíhají.

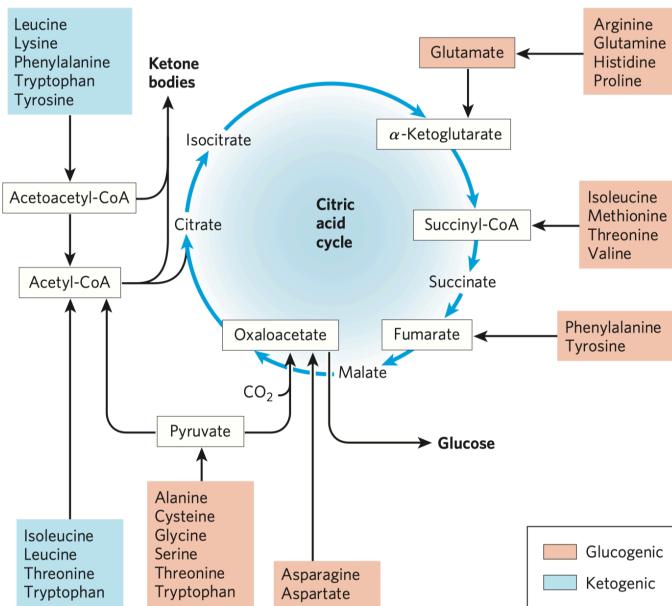


FIGURE 18-15 Summary of amino acid catabolism. Amino acids are grouped according to their major degradative end product. Some amino acids are listed more than once because different parts of their carbon skeletons are degraded to different end products. The figure shows the most important catabolic pathways in vertebrates, but there are minor variations among vertebrate species. Threonine, for instance, is degraded via at least two different pathways (see Figs 18-19, 18-27), and the

importance of a given pathway can vary with the organism and its metabolic conditions. The glucogenic and ketogenic amino acids are also delineated in the figure, by color shading. Notice that five of the amino acids are both glucogenic and ketogenic. The amino acids degraded to pyruvate are also potentially ketogenic. Only two amino acids, leucine and lysine, are exclusively ketogenic.

Obrázek 8.10: Glukogenní a ketogenní AK

GLUKOGENNÍ A KETOGENNÍ AK

- základní rozlišení intermediátů, na kterých končí dráhy odbourávání AK
- oxokyseliny vzniklé z různých AK se ubírají různými metabolickými drahami a nakonec konvergují do jedné z pěti látek jejímž prostřednictvím se dostanou do KC — tyto "konečné" látky se dále dělí
 - ketogenní látky**
 - * 2C látky, které se nemohou se účastnit gng, protože o oba uhlíky přijdou v dekarboxylacích
 - * účastní se tedy pouze syntézy ketolátek
 - * konečnými látkami jsou acetyl-CoA nebo acetoacetyl-CoA
 - glukogenní látky**
 - * >2C látky, které vstupují do cyklu až po dekarboxylaci a jejich uhlík tedy může být využit v rámci gng
 - * pyruvát, oxoglutarát/ketoglutarát, sukcinyl-CoA, fumarát, oxaloacetát

ROZDĚLENÍ AK

- AK, které se rozkládají *výhradně* na *ketogenní* látky
 - pomůcka: všechny, které začínají na L
 - **Lys, Leu**

- AK, které se někdy rozkládají na *ketogenní* i na *glukogenní* látky
 - pomůcka: PITTT
 - **Phe, Ile, Tyr, Trp, Thr**
- AK, které se rozkládají *výhradně* na *glukogenní* látky
 - to je ten zbytek

META

Je to stejně hezky vymyšlené, že se dá všechno hezky nakonec hodit do KC a jednoduše zpracovat, když už to není potřeba.

Následuje výčet sedmi skupin, do kterých se AK podle svých koncových produktů (a jiných okolností) rozřazují. **Modrá** značí ketogenní látky (potažmo AK na ně se rozkládající), **zelená** glukogenní a **červená** látky, které mohou být oboje.

[PYRUVÁT [A, C, G, S, T]]

- Ala -> pyruvát
- Cys -> pyruvát
- Gly -> Ser
- Ser -> pyruvát
- Thr -> Gly + acetyl-CoA

Důležitým koenzymem je zde PLP, opět dochází ke vzniku komplexu mezi ním a AK, prodobně jako v transaminaci.

[oxoG]

- Glu -> 2-oxo-glutarát
- Arg -> Glu
- Gln -> Glu
- His -> Glu
- Pro -> Glu

Gln je konvertován **konvertázou** na Glu.

[oxoisov [L, I, V]]

- Leu -> text + acetyl-CoA
- Ile -> sukcinyl-CoA + acetyl-CoA
- Val -> sukcinyl-CoA

Klíčovou dráhu metabolismu katalyzuje **oxo-izovalerátdehydrogenázový komplex**.

OXO-IZOVALERÁTDEHYDROGENÁZOVÝ KOMPLEX

- podobný pyruvát-dehydrogenázovému komplexu a také oxoglutarát-dehydrogenázovému komplexu (z KC)
- katalyzuje oxidativní dekarboxylaci pyruvátu
 - dochází k přenosu dvouhlíkatého zbytku na CoA
- multienzymový komplex, tři hlavní enzymové aktivity

Nejenže zde najdeme enzym podobný enzymům z KC, ale některé rozkladné reakce této skupiny jsou analogické odbourávání alifatických řetězců v MK.

To byly tři největší skupiny. Následuje výčet těch zbývajících.

[oxoA]

- Lys -> acetoacetát
- Trp -> Ala + acetyl-CoA

oxoA

- nejdelší a nejsložitější reakce
 - **oxoadipátdehydrogenázový komplex** je další ze skupiny dehydrogenázových komplexů (již čtvrtý)
 - typickým produktem je acetoacetát
-

[OXALACETÁT]

- Asp -> oxalacetát
- Asn -> oxalacetát

Transaminacemi a deaminacemi jsou převoditelné přímo na oxalacetát, již intermediát KC.

[SAM]

- Met -> sukcinyl-CoA

SAM

- je v ní pouze Met, *sám*
 - v rámci jeho metabolismu vzniká sloučenina SAM
 - prekurzor pro biologické methylace
-

[NIH]

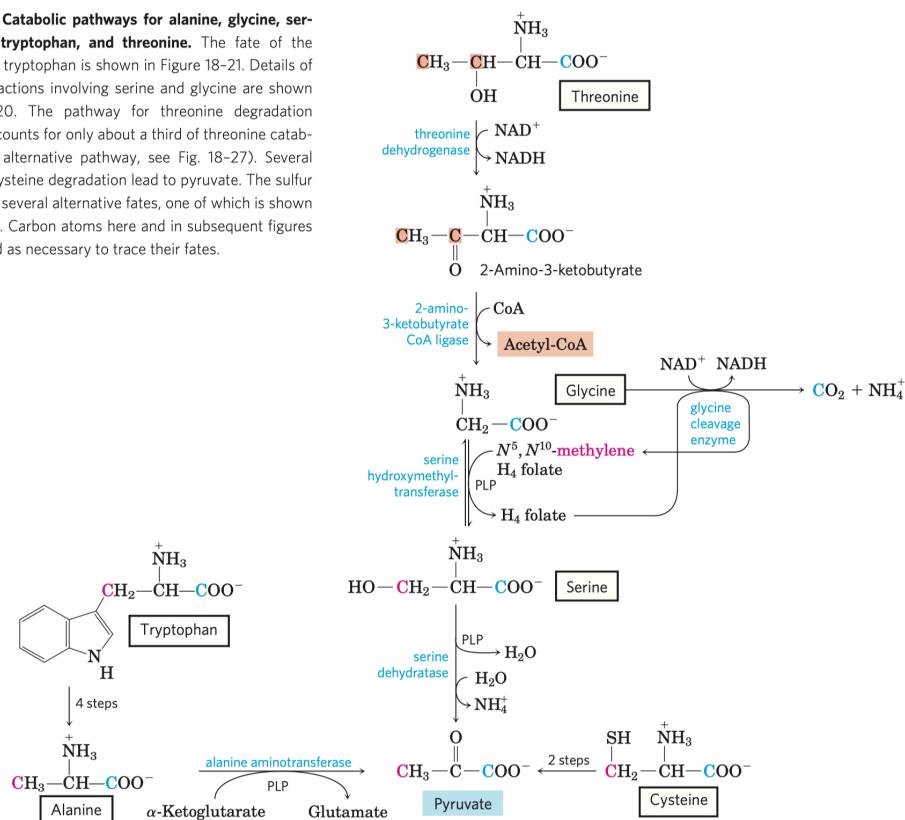
- Phe -> fumarát + acetoacetát
- Tyr -> fumarát + acetoacetát

NIH

- průběh katabolismu zahrnuje oxygenázové reakce (s kyslíkem)
 - uplatňuje se unikátní mechanismus, tzv. *NIH přesmyk*
-

8.4.1 Skupina [A, C, G, S, T]

FIGURE 18-19 Catabolic pathways for alanine, glycine, serine, cysteine, tryptophan, and threonine. The fate of the indole group of tryptophan is shown in Figure 18-21. Details of most of the reactions involving serine and glycine are shown in Figure 18-20. The pathway for threonine degradation shown here accounts for only about a third of threonine catabolism (for the alternative pathway, see Fig. 18-27). Several pathways for cysteine degradation lead to pyruvate. The sulfur of cysteine has several alternative fates, one of which is shown in Figure 22-17. Carbon atoms here and in subsequent figures are color-coded as necessary to trace their fates.



Obrázek 8.11: Katabolické cesty skupiny [A, C, G, S, T]

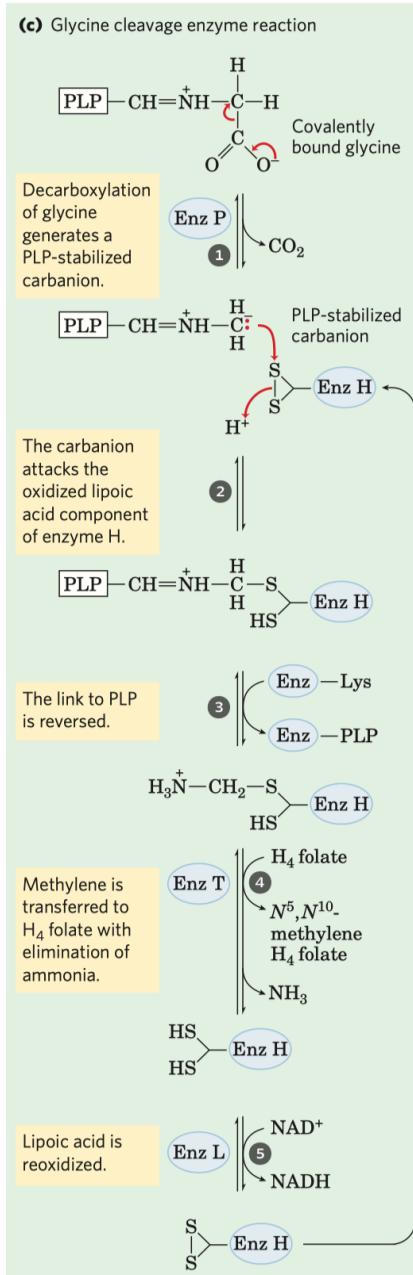
SEZNAM DRAH

- Cys -> pyruvát
 - existuje více drah, řídí se ale podobnými strategiemi
- Ala -> pyruvát
 - prostá deaminace
- Ser -> pyruvát
 - reakce **serin-hydroxymethyltransferázy**, která spolupracuje s PLP
 - i Ser je relativně jednoduše převoditelný na ketokyselinu
- Thr -> Gly (+ acetyl-CoA)
 - složitější
 - katalyzováno **serin-hydroxymethyltransferázou** a PLP
- Gly -> Ser (potažmo -> pyruvát)
 - opět katalyzováno **serin-hydroxymethyltransferázou**

THF systém

REAKCE GLY + THF

- tato reakce přesahuje metabolismus AK
- pomocí rozložení Gly a tetrahydrofolátu (dále jen THF) zásobuje organismus jednouhlíkatými zbytky
- molekula Gly se rozebere na prvočinitele, amonný iont, oxid uhličitý, zbylý uhlík se ve formě methylenové skupiny ocitá jako součást THF
- reakci katalzuje **vícepodjednotkový systém**, ne však přímo komplex



Obrázek 8.12: Detaily štěpení Gly (není třeba vše umět). Enzym H je jedna podjednotka enzymu (další jsou P, T, L).

PRŮBĚH REAKCE

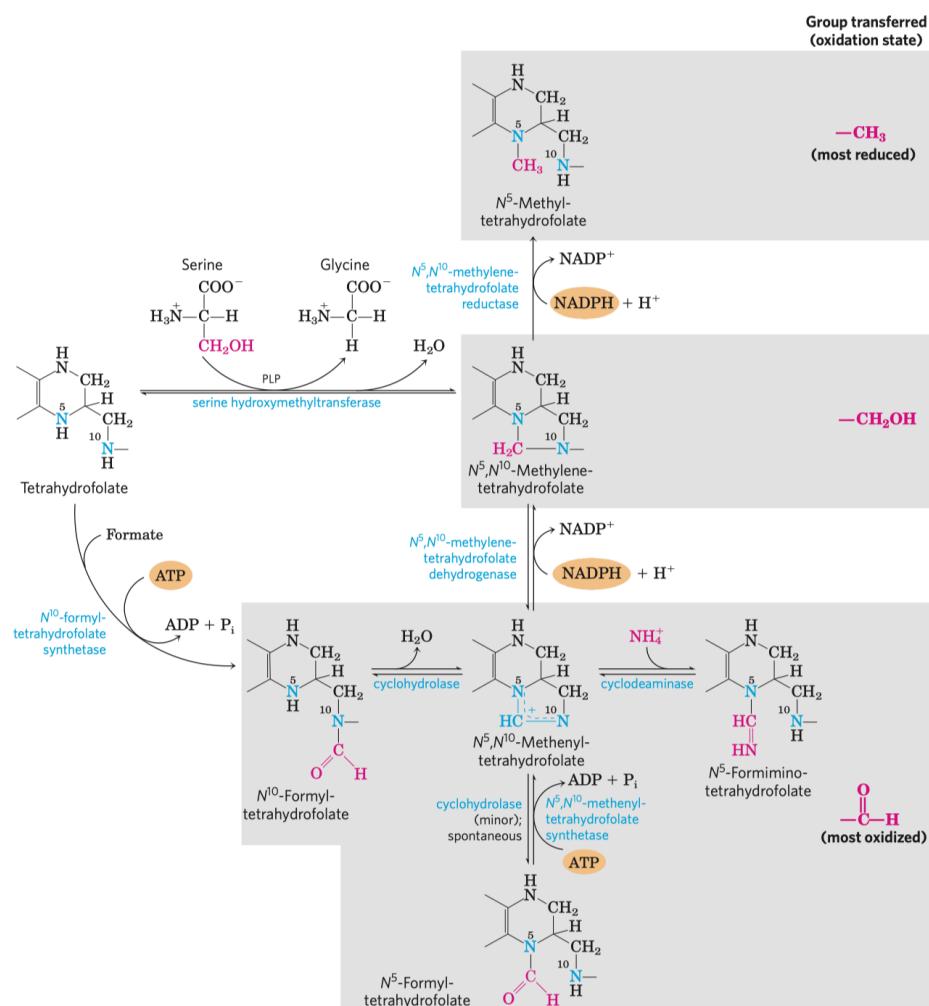
- (1) THF vytváří Shiffovu bázi s PLP
- (2) Gly je za pomoci PLP štěpen, uvolňuje se CO_2
- (3) amino-methylová skupina, která zbyde po štěpení Gly, je přenášena na rameno
- (4) uvolňuje se amoniak, zatímco methylen je přenesen na THF



Obrázek 8.13: THF

THF SYSTÉM

- THF je koenzym, který je pro nás esenciální (v podobě kyseliny listové)
- derivát pteridinu, který ještě obsahuje kyselinu p-aminobenzovou a nějaké zbytky z Glu vázané izopeptidovou vazbou
- metylace kofaktoru bude kromě štěpení Gly probíhat i během reakce Ser -> Gly, který katalyzuje **hydroxymethyltransferáza**
- z methylu-THF může být vyroben methylen-THF a z něj methenyl-THF
 - methylen-THF -> methyl-THF nás stojí jedno NADH, je to redukční reakce
 - methylen-THF -> methenyl-THF je naopak oxidace, dostáváme se tím do metabolismu purinu

**FIGURE 18-17** Conversions of one-carbon units on tetrahydrofolate.

The different molecular species are grouped according to oxidation state, with the most reduced at the top and most oxidized at the bottom. All species within a single shaded box are at the same oxidation state. The conversion of N^5,N^{10} -methylene-THF to N^5 -methyl-THF is effectively irreversible. The enzymatic transfer of formyl groups, as in purine synthesis (see Fig. 22-35) and in the formation of formylmethionine in bacteria (Chapter 27), generally uses

N^{10} -formyl-THF rather than N^5 -formyl-THF. The latter species is significantly more stable and therefore a weaker donor of formyl groups. N^5 -Formyl-THF is a minor byproduct of the cyclohydrolase reaction, and can also form spontaneously. Conversion of N^5 -formyl-THF to N^5,N^{10} -methylene-THF requires ATP, because of an otherwise unfavorable equilibrium. Note that N^5 -Formimino-THF is derived from histidine in a pathway shown in Figure 18-26.

Obrázek 8.14: Konverze jednouhlíkové skupiny na THF (reakce není třeba umět)

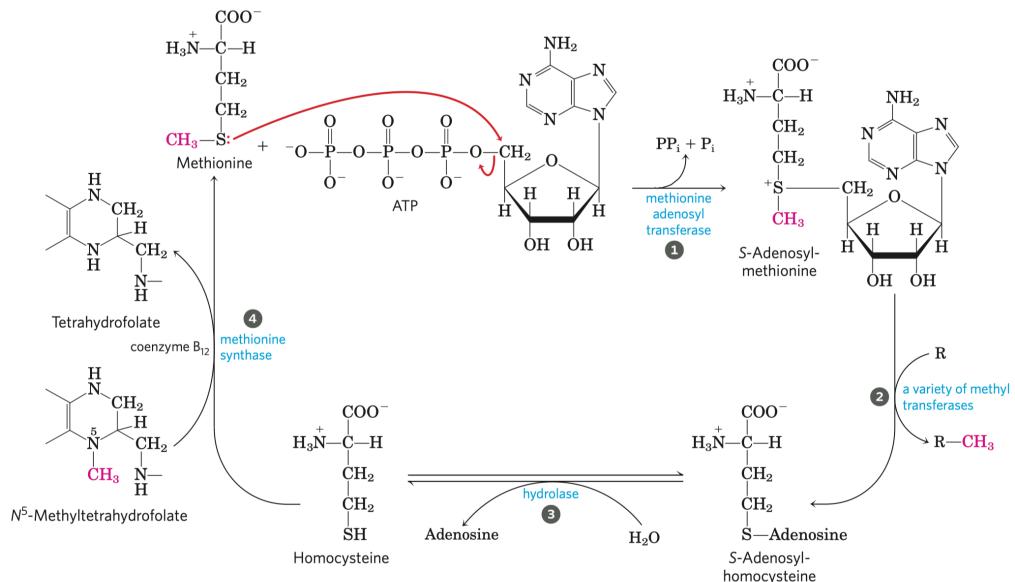
A proč potřebujeme nějaký přenašeč jednouhlíkové skupiny?

UŽITEČNOST THF

- nezbytný pro biologické methylace
- syntéza RNA a DNA (puriny)
- buněčné dělení
- funguje jako soustava rezervoárů, které nesou uhlíkaté zbytky různého oxidačního stupně interkonvertovatene mezi sebou navzájem

8.4.2 Skupina SAM

- k syntéze Met budeme potřebovat methyl-THF a homocystein
 - homocystein je také AK, není však běžně v proteinech
- probíhá tzv. cyklus aktivovaného methylu
 - slouží k regulaci biologických methylací
 - mimo to slouží jeden jeho intermediát (homocystein) k syntéze cysteinu



Obrázek 8.15: Syntéza Met a S-anedosylmethioninu

PRVNÍ REAKCE

- Met se váže na ATP za vzniku PP_i + P a SAM
 - je zajímavé, že se z ATP uvolní *všechny tři* fosfáty, to se děje už jen v jedné další reakci

SAM je substrátem pro biologické aminy (adrenalin → noradrenalin), fosfolipidy (phosphatidylethanolamine → fosfatidylcholin), a účastní se i methylací týkajících se chromatinu, histonů (H₃K₄ → H₃K₄me₃) a nukleotidů.

DRUHÁ REAKCE

- SAM něco methyloval → vznikl S-adenozylyhomocystein

TŘETÍ REAKCE

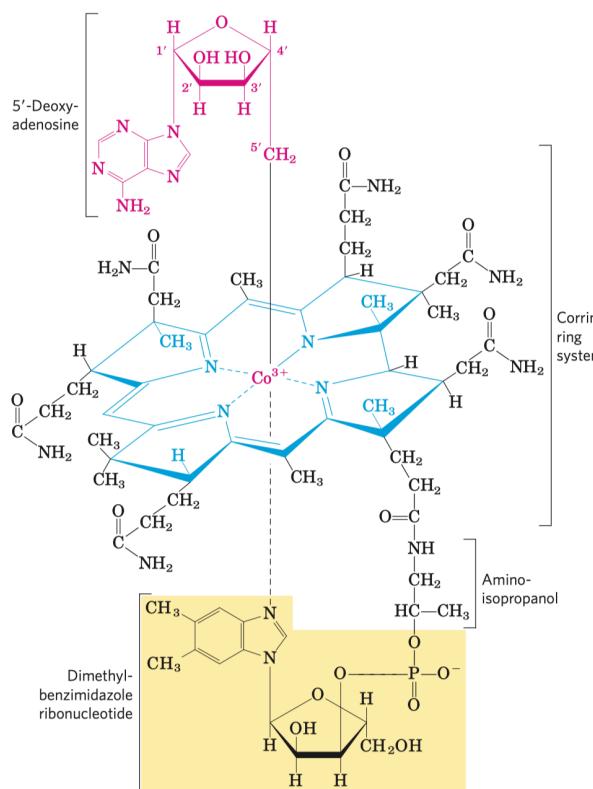
- hydrolýzou se uvolňuje homocystein

ČTVRTÁ REAKCE

- pomocí THF opět vznikne Met

[VITAMÍNY B6 A B12]

- B6 (biotin), B12: vitamíny, koenzymy, které jsou důležité pro průběh reakcí
 - B12 je nezbytný pro zajištění průběhu reakcí zajišťujících homocystein -> Met
 - kromě této reakce byl (derivát) B12 důležitý i ve štěpení MK s lichým počtem uhlíků, kde jsme potřebovali nějak zpracovat sukcinyl-CoA
- B12 je nejsložitější malá molekula, kterou přijímáme



Obrázek 8.16: Vitamín B12

STRUKTURA B12

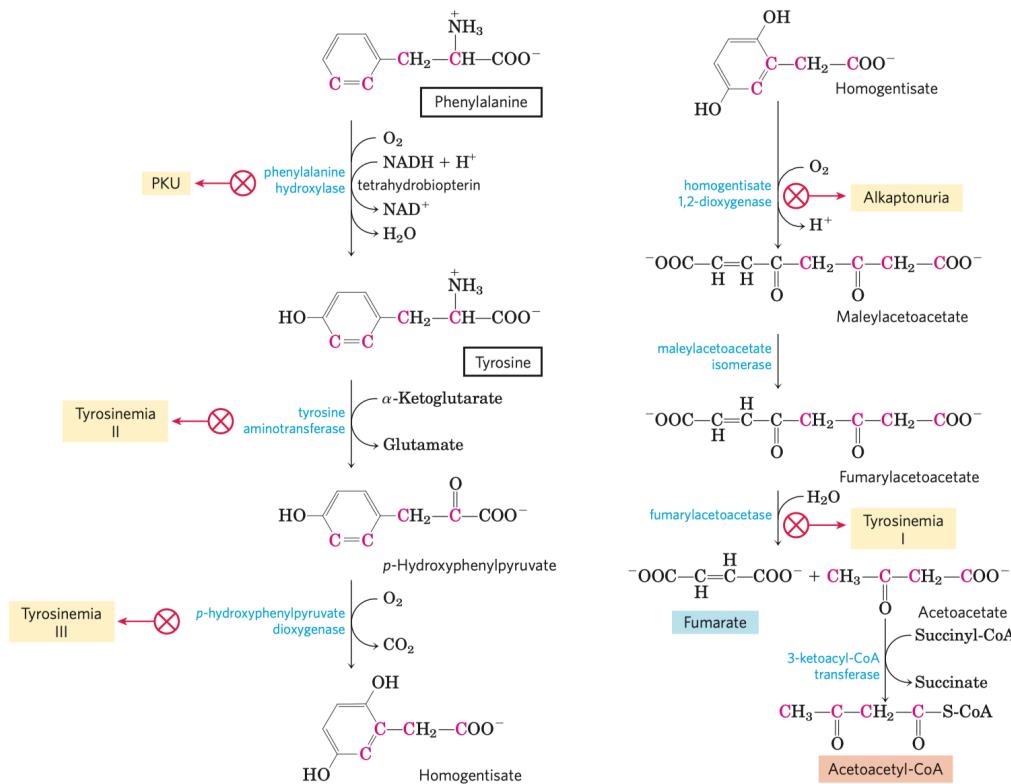
- vazba kobalt-uhlík je pro jeho funkci velice důležitá (a je v přírodě velice neobvyklá)
- vazba je štěpena homolyticky => vznikají radikály => využití v reakci (B12 se chová jako generátor radikálů)

Pokud máme málo B6/B12 a nějakou špatnou alelu, může se nám v těle hromadit homocystein. To může souviseť s Alzheimerem nebo s kardiovaskulárními problémy. Obecně je mnoho různých

patologických stavů způsobeno hromaděním produktu (ať už je toxický, nebo ne) nad nějakou jeho únosnou mez.

8.4.3 Skupina NIH

- Tyr, Phe -> fumarát + acetoacetát
- reakční mechanismy jsou složité, ale metabolismus Tyr a Phe spolu souvisí (Phe hydroxylujeme na Tyr)

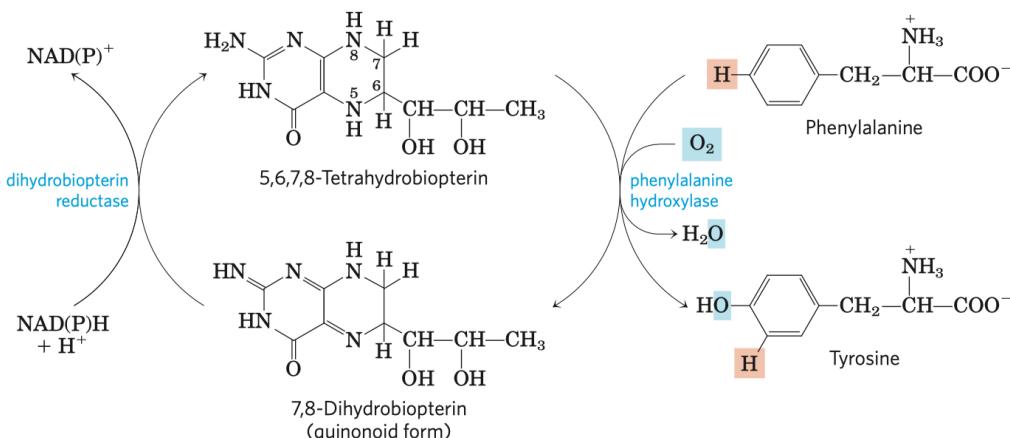


Obrázek 8.17: Metabolická dráha Tyr a Phe. Detaily není třeba umět. Žlutě jsou vyznačeny lidské choroby způsobené genetickými mutacemi ovlivňujícími dané reakce.

HYDROXYLACE PHE -> TYR

- pracují s molekulovým kyslíkem
- jako kofaktor mají biopterin, resp. jiný derivát pteridinu
- průběh
 - (1) použití kyslíku a nehemového železa k tvorbě oxyfenylového aniontu
 - součástí je hydroxylace kofaktoru

- (2) oxyfenolový anion je použit ke torbě epoxidu, který se tvoří na původně aromatickém jádře
- (3) oxyfenolový anion se štěpí a výsledkem je tyrosin
 - důležitá je odlišná pozice substituentu — došlo k migraci vodíku (viz barvy na obrázku níže)
- průběh byl objeven v americkém NIH pomocí izotopového značení a nazván **NIH přesmykem**



Obrázek 8.18: NIH klička v reakci Phe -> Tyr (byla objevena v National Institute of Health)

8.5 AK jako prekurzory syntézy

- AK jsou prekurzory biologicky aktivních aminů, Gly je prekurzorem hemu
- glutathiol je důležitý pro udržování redukčních rovnováh a transport AK, zejména těch se sírou

BIOLOGICKÉ AMINY

- např. dopamin, adrenalin, epinefrin, melanin
- jsou odvoditelné z Tyr a Phe prostřednictvím hydroxylačních a dekarboxylačních reakcí
 - hydroxylační jsou závislé na pyridoxalfosfátu
 - ty s kyslíkem používají NIH přesmyk

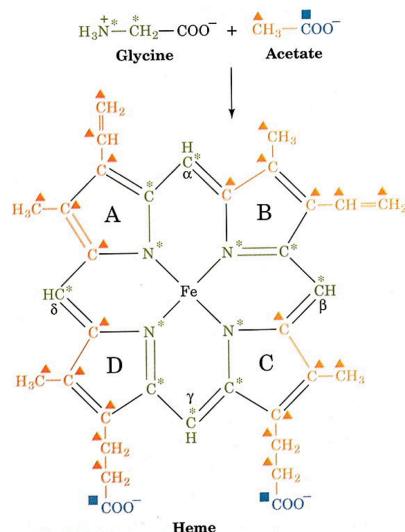
[POZNÁMKA]

ZBRARVENÍ SIAMSKÉ KOČKY

- způsobeno termosenzitivní mutací jednoho z enzymů syntézy melaninu
- deriváty pokožky blíže k tělnímu jádru jej netvoří, jen na čumáčku a tlapkách už se tvoří, protože je tam víc zima

DOPAMIN

- klíčový přenašeč v CNS
- je blízce příbuzný fenylethylaminu, což je podobně odvoditelná látka a vlastně nehydroxylovaná varianta dopaminu
- slavný mediátor, který doprovází stavy zamilovanosti



Obrázek 8.19: Heme, a původ atomů v něm

HEM

- jeho prekurzor je Gly
- všechny čtyři dusíky pyrolových jader jsou z Gly, kromě toho už tam jsou jen acetylóvé skupiny a dvě karboxylové skupiny
- složitá struktura je vytvořena šesti reakcemi
 - i zde platí, že intermediáty jsou nebezpečné — změny jejich koncentrací se projevují patologicky

META

Máme prý ke zkoušce vědět, odkud se vzala jaká část hemu.

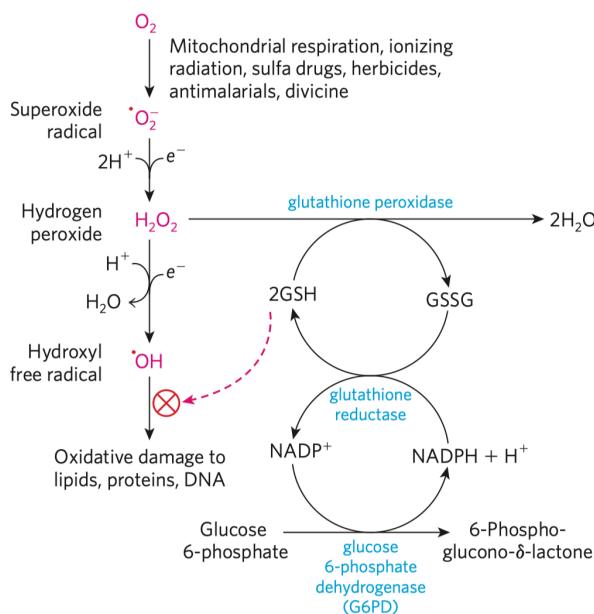
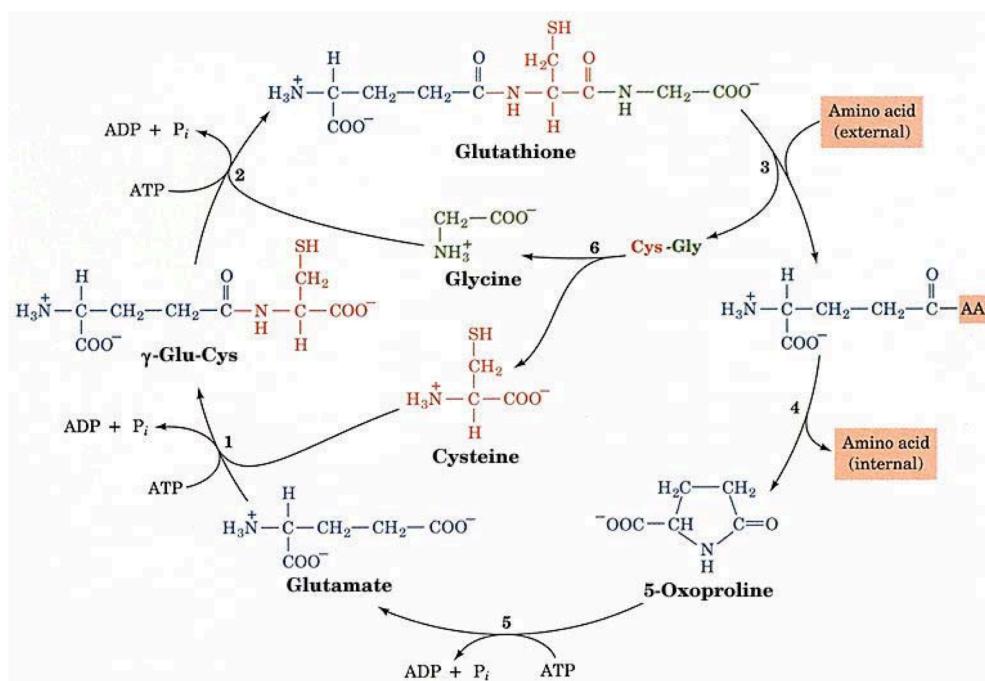


FIGURE 1 Role of NADPH and glutathione in protecting cells against highly reactive oxygen derivatives. Reduced glutathione (GSH) protects the cell by destroying hydrogen peroxide and hydroxyl free radicals. Regeneration of GSH from its oxidized form (GSSG) requires the NADPH produced in the glucose 6-phosphate dehydrogenase reaction.

Obrázek 8.20: Zpracování ROS pomocí NADPH a glutathiolperoxidázy

GLUTATHIOL

- γ -glutamyl-cysteinyl-glycin
- vytvořen izopeptidovou vazbou mezi Glu (karboxylová skupina) a Cys (aminoskupina)
- účastní se jednoho cyklu, u nějž je třetí reakce lokalizovaná na cytoplazmatické membráně (viz obrázek níže)
 - (1) aktivní centrum glutathiolu naváže AK se sírou z extrabuněčného prostoru
 - (2) přenese svůj náklad na Glu
 - (3) AK se uvolní do buňky, s ní se uvolní i cysteinoglycin
 - (4) glutathiol je resyntetizován
- vzhledem ke své $-SH$ skupině a schopnosti tvořit dimer je kofaktorem enzymů, které se starají o inaktivaci ROS
 - viz obrázek výše
 - **glutathiolperoxidáza** + redukovaná forma glutathiolu \rightarrow oxidovaný dimer glutathiolu, zároveň ROS \rightarrow alkohol
 - **glutathiolreduktáza** se stará o jeho redukci
- důležitý je i pro reakce thioltransferáz, které regulují počet S–S můstků v proteinech
- v neposlední řadě se **glutathion-S-transferáza** účastní syntézy leukotrienů



Obrázek 8.21: Import AK pomocí glutathionu

8.6 Syntéza AK

α-Ketoglutarate	Pyruvate
Glutamate	Alanine
Glutamine	Valine*
Proline	Leucine*
Arginine	Isoleucine*
3-Phosphoglycerate	Phosphoenolpyruvate and erythrose 4-phosphate
Serine	Tryptophan*
Glycine	Phenylalanine*
Cysteine	Tyrosine†
Oxaloacetate	Ribose 5-phosphate
Aspartate	Histidine*
Asparagine	
Methionine*	
Threonine*	
Lysine*	

*Essential amino acids in mammals.

†Derived from phenylalanine in mammals.

Obrázek 8.22: AK podle jejich prekurzoru, esenciální AK jsou označeny *. Arg, Cys a Tyr jsou sice odvoditelné z jiné AK, ale ta už je esenciální (Phe, HCys). His má jako prekurzor v přednáškách uveden 5-fosforibosyl-α-pyrofosfát + ATP.

ESECIÁLNÍ AK

- vlastně všechny ty složitější
- očividně se vyplatí spoléhat na potravu a ušetřit na dlouhých a složitých metabolických drahách
- aminoskupina v AK je esenciální živina, **neumíme ji syntetizovat**
 - AK se nikdy nesyntetizuje z nějaké ketokyseliny

[KOLIBŘÍCI]

V trusu malých kolibříků bylo nalezeno mnoho amoniaku, chvíli se myslelo, že si s ním malí ptáčci někdy vystačí jako s odpadním materiélem místo kyseliny močové. Ukázalo se ale, že má tento druh kolibříků speciální mikrobiom, který z kyseliny močové zpětně resorbuje materiál, který poté kolibřík zpracovává, a vylučuje amoniak.

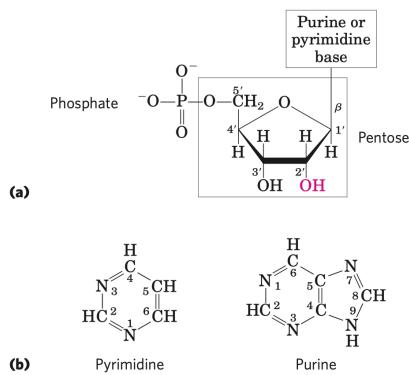


Obrázek 8.23: Kolibřík skvostný, *Eugenes fulgens*. Kamarádi mu říkají zkráceně skvostný Eugenes.

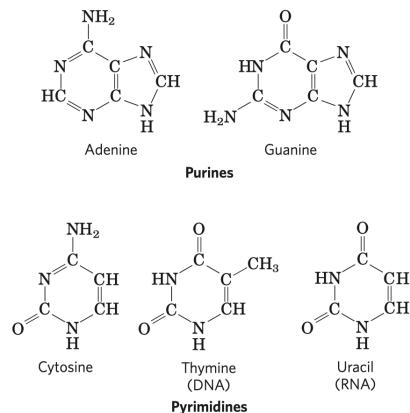
ČÁST 9

METABOLISMUS NUKLEOTIDŮ

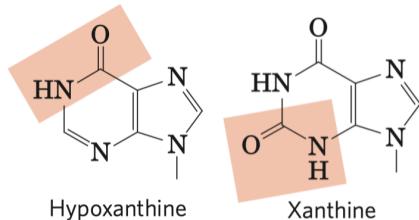
- všechny buňky nukleotidy syntetizují (s výjimkou speciálních případů buněčných typů)
- mají evolučně konzervované, společné dráhy



Obrázek 9.1: Obecné struktury nukleotidu (a), purinu (B) a pyrimidinu (C)



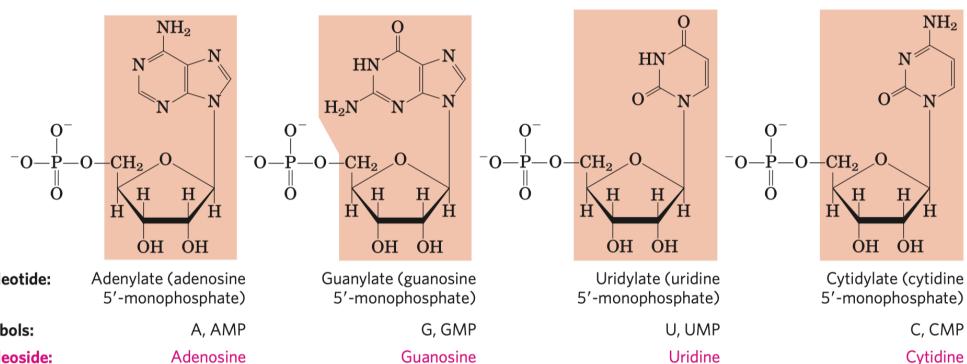
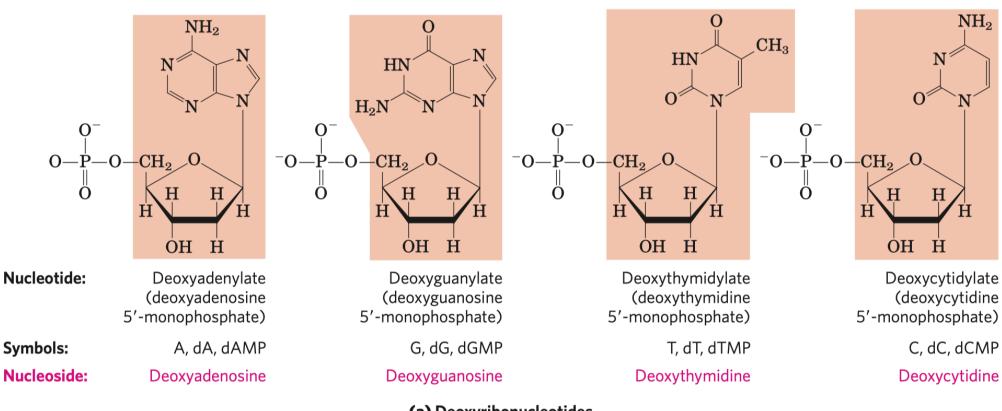
Obrázek 9.2: Základní nukleotidové báze



Obrázek 9.3: Xanthin a hypoxanthin, nestandardní purinové báze, které jsou odvozené z G a A, respektive. Nukleosidům se říká xanthosin a inosin, respektive.

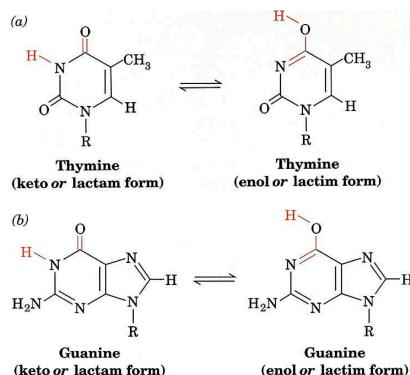
STRUKTURA NUKLEOTIDŮ

- báze jsou na (deoxy)ribózu vázány C1-glykosidickou vazbou
- nukleotidy se vážou 5'-3' fosfodiesterovou vazbou, takto tvoří kostru DNA i RNA
- v případě DNA vzniká dvoušroubovice, kde báze v komplementárních patrech interagují vodíkovými vazbami
- jak je vidět, odlišují se puriny substituenty na C2 a C6 (oxo, amino) a pyrimidiny na C2 a C4 (oxo, amino) popř. methylací na C5
- báze + cukr = nukleosid, fosforylovaný nukleosid = nukleotid (viz obrázek níže)



Obrázek 9.4: Nukleotidy a nukleosidy (vyznačeny barevně) nalézající se běžně v DNA (a) a RNA (b)

Nukleotidy se mohou vyskytovat v *keto* a *enol* tautomerické formě.

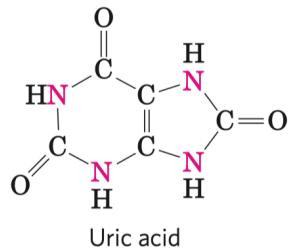


Obrázek 9.5: Keto a enol formy T a G

KYSELINA MOČOVÁ

- 8-oxo derivát xanthinu, celkově tedy 2,6,8-trioxo derivát purinu
- produkt metabolismu purinových bazí, zejména využívána ptáky a plazy
- může být degradována až na močovinu a amoniak, různí živočichové ji využívají v různých fázích této přeměny
 - (1) kyselina močová

- (2) alantoin
 - zde končíme hlavně u některých druhů savců
- (3) kyselina alantolová
- (4) glyoxylová kyselina
- (5) močovina
 - zde končíme u chrupavčitých ryb či obojživelníků
- (6) degradace močoviny na volný amoniak
 - typicky jen bezobratlí, amoniak je jinak problematický
- dále může být tento dusíkatý odpad dále zpracován mikrobiem



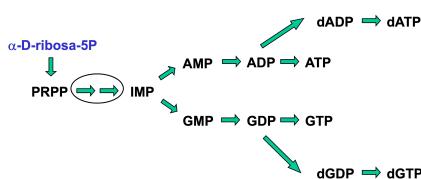
Obrázek 9.6: Kyselina močová

Derivátem xanthinu je i kofein (1,3,7-trimethylxanthin).

9.1 Syntéza nukleotidů

Prekurzorem pro pyrimidiny i puriny je ribóza-5-fosfát, kterou získáme v pentózofosfátové dráze.

9.1.1 Syntéza purinů



Obrázek 9.7: Schéma metabolických drah u syntézy purinů

HRUBÝ POHLED NA CELOU DRÁHU

- potřebuje syntetizovat ATP, GTP, dATP, dGTP
- do dráhy vstupuje α anomer, PRPP

PRPP -> IMP

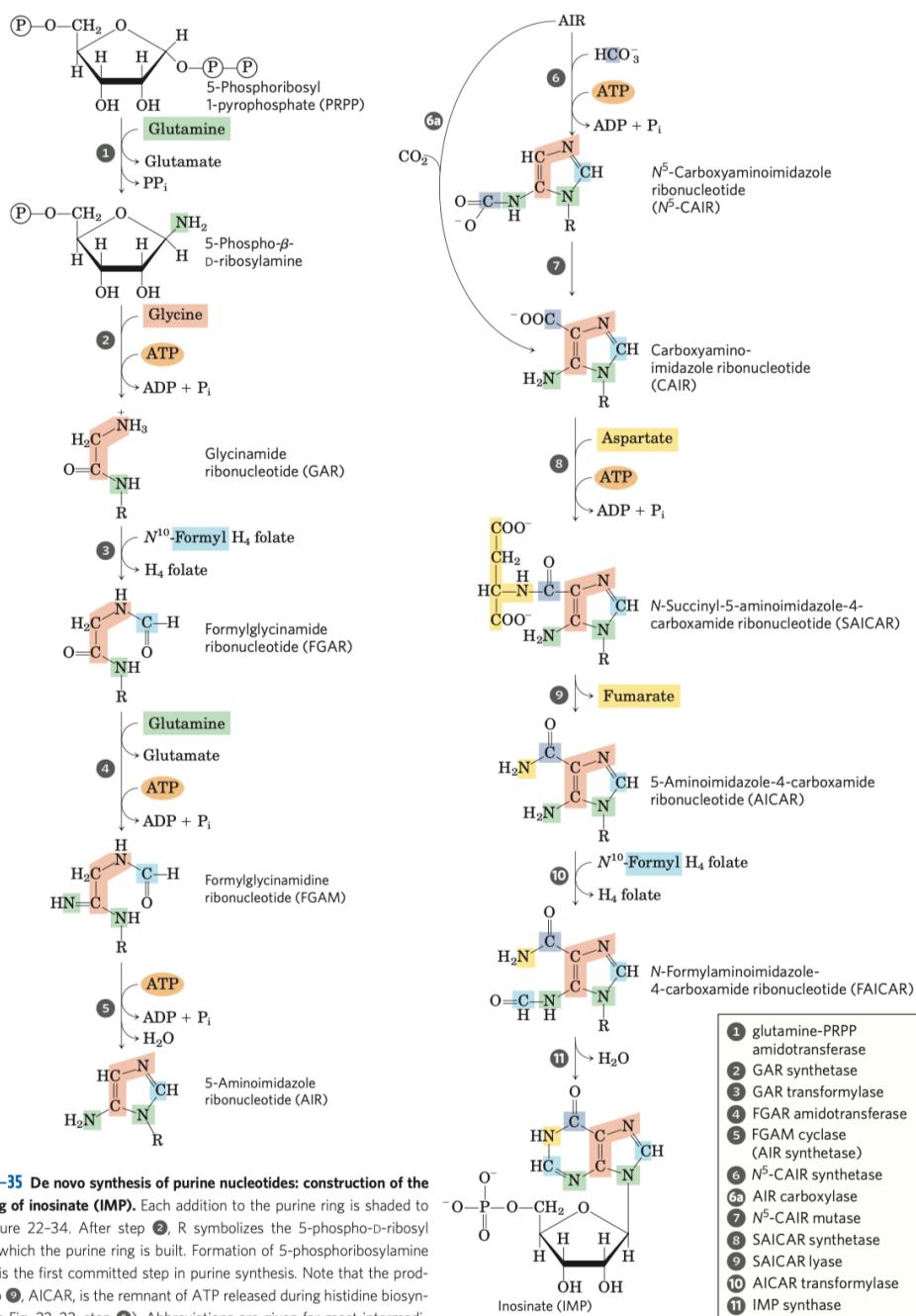
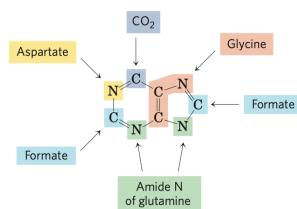


FIGURE 22-35 De novo synthesis of purine nucleotides: construction of the purine ring of inosinate (IMP). Each addition to the purine ring is shaded to match Figure 22-34. After step ②, R symbolizes the 5-phospho-D-ribosyl group on which the purine ring is built. Formation of 5-phosphoribosylamine (step ①) is the first committed step in purine synthesis. Note that the product of step ⑨, AICAR, is the remnant of ATP released during histidine biosynthesis (see Fig. 22-22, step ⑤). Abbreviations are given for most intermediates to simplify the naming of the enzymes. Step ⑩ is the alternative path from AIR to CAIR occurring in higher eukaryotes.

Obrázek 9.8: První fáze syntézy, PRPP -> IMP. Reakce není třeba umět (jen prekurzory ano), jsou zde znázorněny pouze jako ilustrace legovitosti celé syntézy — purin se skládá prakticky atom po atomu na kostře PRPP. Barvy znázorňují původ jednotlivých atomů.

PRVNÍ FÁZE

- má charakter lega (viz obrázek výše a níže)
- hypoxantin je stavěn postupně na N9, atom po atomu
- zásadní rozdíl s pyrimidiny, kde nejdřív vznikne nějaká báze a pak se připojí na cukr
- reakce jsou poháněny ATP
- prekurzory (i.e. z čeho se skládá finální hypoxanthin)
 - Gln, které dodává dusíky, N9 a poté i N3
 - Gly, z něho máme uhlíky
 - THF, ten přinese formylovou skupinu (další uhlíky)
 - Asp, které se rozloží na fumarát a jeho aminoskupina se stane součástí hypoxanthinu



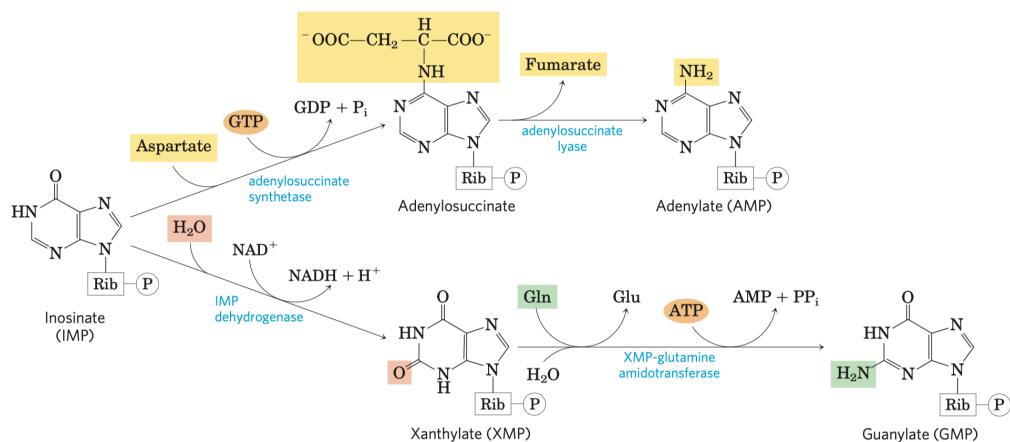
Obrázek 9.9: Původ atomů na pyrimidinu

STABILITA INTERMEDIÁTŮ

- intermediáty jsou často nestabilní, mohly by se rozložit než by stihly zreagovat
 - např. 5-fosforibozylamin je nestabilní
- dvě možnosti řešení
 - **chanelling**, aktivní centrum enzymu, kde nestabilní intermediát vzniká, je kanálem spojeno s aktivním centrem následujícího enzymu
 - nebo se enzymové aktivity stávají součástí jednoho peptidového řetězce
 - * podobně jako u syntézy MK
 - * zde (u živočichů): reakce [3, 4, 6], reakce [7, 8] a reakce [10, 11]
 - v obou případech spolu komunikují a bezprostředně si produkty předávají a ty se do cytoplazmy ani nedostanou

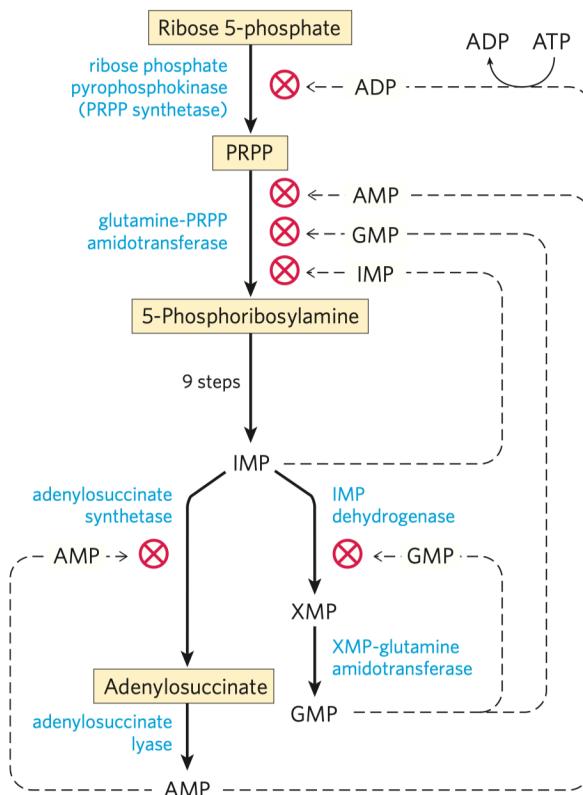
IMP → AMP/GMP

- reakce používají Asp k nahradě oxoskupiny aminoskupinou
- syntézu AMP pohání GTP, syntézu GMP pohání ATP
 - je to přesně do kříže, význam pro regulaci
 - obě reakce se tím pádem vzájemně podporují



Obrázek 9.10: IMP → GMP a AMP

AMP a GMP poté slouží jako inhibitory přechozích reakcí.



Obrázek 9.11: Regulace prvních dvou fází

AMP/GMP → ADP/GDP

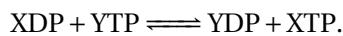
- katalyzováno nukleosid-monofosfátkinázami
 - jsou specifické pro danou bázi

- dané kináze ale bude jedno, zda pracuje s normální, nebo deoxy bazí
- syntéza probíhá de novo (z jednoduchých částí, nejedná se o recyklaci), stojí tedy energii
 - energii dodává ATP, které tedy není jen prekurzorem, ale také energetickým plati-dlem
- dojde k reakci AMP -> ADP, a zároveň ATP -> ADP
 - skončíme tedy se dvěma ADP

ADP/GDP -> ATP/GTP

- katalyzováno **nukleosid-difosfátkinázami**
 - jsou **oligospecifické**, fosforylují více věcí
 - dané kináze bude jedno, zda pracuje s normální, nebo deoxy bazí

Obecná rovnice vypadá následovně:

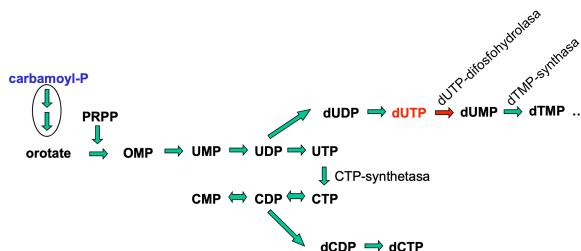


ATP pochází z egergetického metabolismu (z OF).

[POZNÁMKA]

Dinukleotidy (u purinů i pyrimidinů) jsou prekurzorem vzniku deoxynukleotidů, minimálně u vyšších eukaryot.

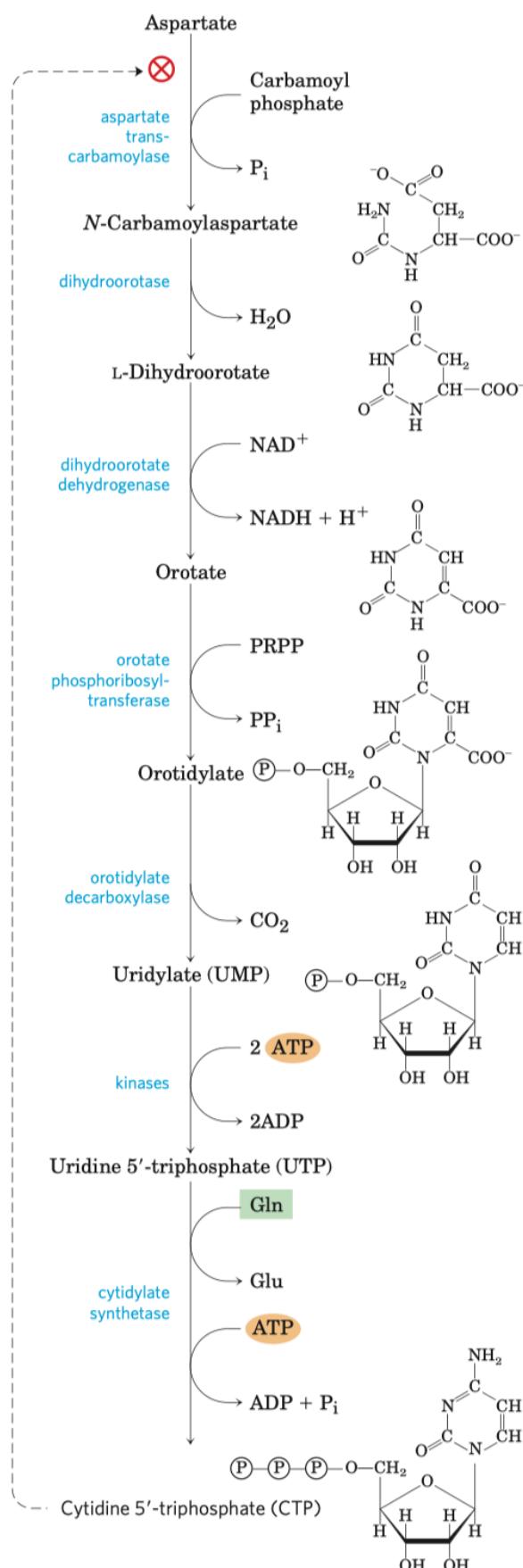
9.1.2 Syntéza pyrimidinů



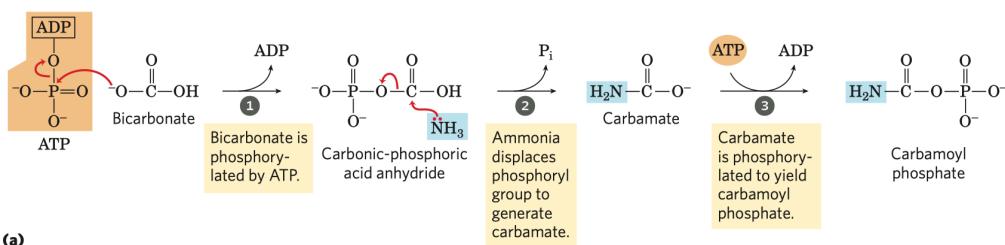
Obrázek 9.12: Schéma metabolických drah u syntézy pyrimidinů

HRUBÝ POHLED NA DRÁHU

- potřebuje syntetizovat UTP, CTP, dTMP, dCTP
- na rozdíl od purinů je nutné postavit celou dusíkatou strukturu a pak ji přenést na ribózu
 - prekurzory jsou tedy jen tři: kostra Asp, Glu a HCO_3^-



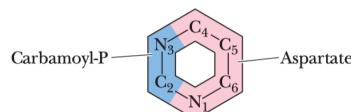
Obrázek 9.13: Průběh syntézy pyrimidinů

prekurzory -> karbamoyl-P

Obrázek 9.14: Syntéza karbamoylu-P. Amoniak se v cytosolu nevyskytuje ve volné formě, ale je do reakce dodán přes Gln. Není třeba znát detaily.

DETALY REAKCE

- katalyzováno **karbamoyl-P-syntetázou II**
- reakce probíhala už v mch v játrech, tam ji katalyzovala karbamoyl-P-syntetáza I



Obrázek 9.15: Původ atomů v pyrimidinovém cyklu. V českých skriptech je uveden původ N₃ jako Glu a C₂ jako HCO₃⁻

karbamoyl-P -> orotát

- karbamoyl-P reaguje s Asp -> vzniká konjugovaná sloučenina -> cyklizace a dehydrogenace
- probíhá na membráně mch
 - potřebuje ubichinon z dýchacího řetězce v mch
 - využívá systém dýchacího řetězce k ekvilibraci, reoxidaci ubichinonu

orotát -> UMP

- orotát je přenesen na ribózu
- jako bázi můžeme ribóze nabídnout třeba i uracil, podle toho vznikne odpovídající nukleotid
 - tedy nemusíme syntetizovat vše de novo, ale buňka umí využít něco, co už má (tzv. **salvage**)

DEKARBOYLAČNÍ REAKCE OROTIDYLÁTU

- u dekarboxylací AK jsme potřebovali B6 (elektronovou jímku), zde je však něco jiného, unikátního
- využívá se těsné vazby mezi enzymem a celou molekulou substrátu přesně do aktivního místa
- tím, jak se na sebe molekuly natlačí, destabilizuje se vazba (protože se přiblíží k jiné záporné skupině) -> jde lehce štěpit

REGULACE

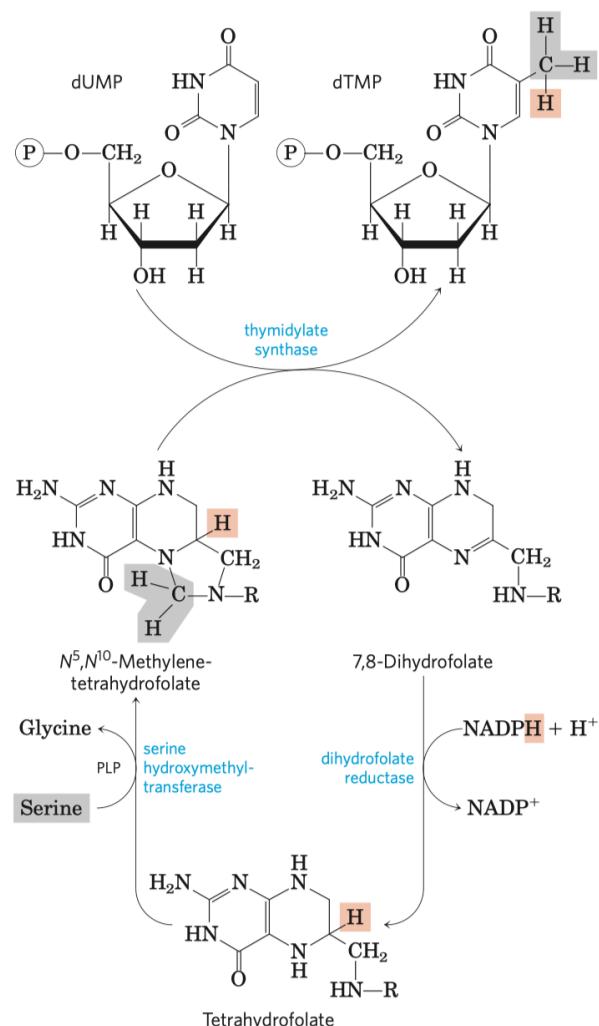
- produkty UTP a CTP inhibují první reakci syntézy, naopak ATP ji reguluje pozitivně
- u prokaryot UTP/CTP inhibují spíše tu transferázovou reakci, ale výsledek je podobný
 - prokaryotická Asp-transkarbamoyláza je principem typické alosterické regulace

UMP → CTP

- vnesení amidové skupiny z Gln
- potřebujeme aktivaci pomocí ATP

dUDP → dTMP

Pro vznik dUDP (a obecně dcehokoli) viz oddíl syntéza deoxyribonukleotidů.



Obrázek 9.16: Cyklus syntézy dTMP

PŘÍPAVNÁ FÁZE

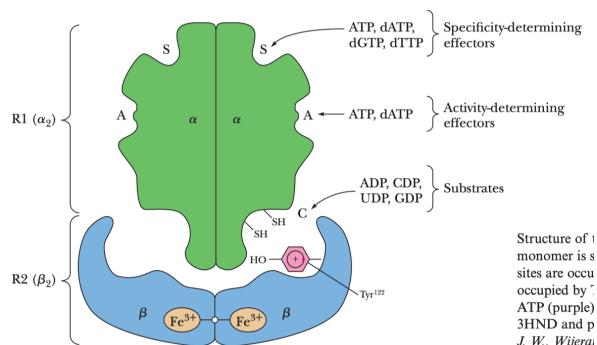
- dUDP -> dUTP -> dUMP + PP_i
- dUTP je přítomno velice málo, rychle se štěpí, jinak by se inkorpovalo do DNA a to nechceme

PRŮBĚH REAKCE

- (1) v reakci dUMP -> dTMP je převeden CH₂ z methylenu-THF, vzniká DHF
- (2) DHF je redukován NADPH + H⁺ na THF
 - zde jsou mříena různá cytostatika a antibiotika
 - když dokážeme dráhu zablokovat, buňka se nemůže dělit (protože nemůže syntetizovat vitální část DNA)

9.1.3 Syntéza deoxyribonukleotidů

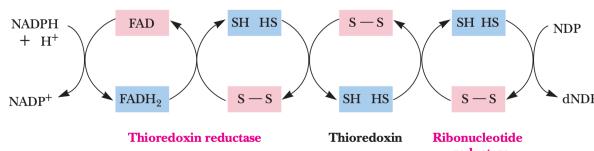
- aplikovatelná na puriny i pyrimidiny
- dochází k výměně redukčních ekvivalentů
- katalyzuje ji **ribonukleotid-reduktáza třídy I**



Obrázek 9.17: Struktura ribonukleotid-reduktázy. Podjednotky R1 a R2, obojí dimery. **S** místo ovlivňuje specificitu, **A** místo aktivitu a **C** místo je samotným aktivním místem enzymu, na které vstupují substráty.

[TŘÍDY RIBONUKLEOTID-REDUKTÁZY]

- třída III je typická pro anaerobní prokaryota
- třída II je typická pro fakultativní anaeroby
- třídu I mají všichni ostatní
- jsou nejspíše stejněho původy, nejprve byly čistě anaerobní (III) -> schopnost fungovat i aerobně (II) -> čistě aerobní (I)

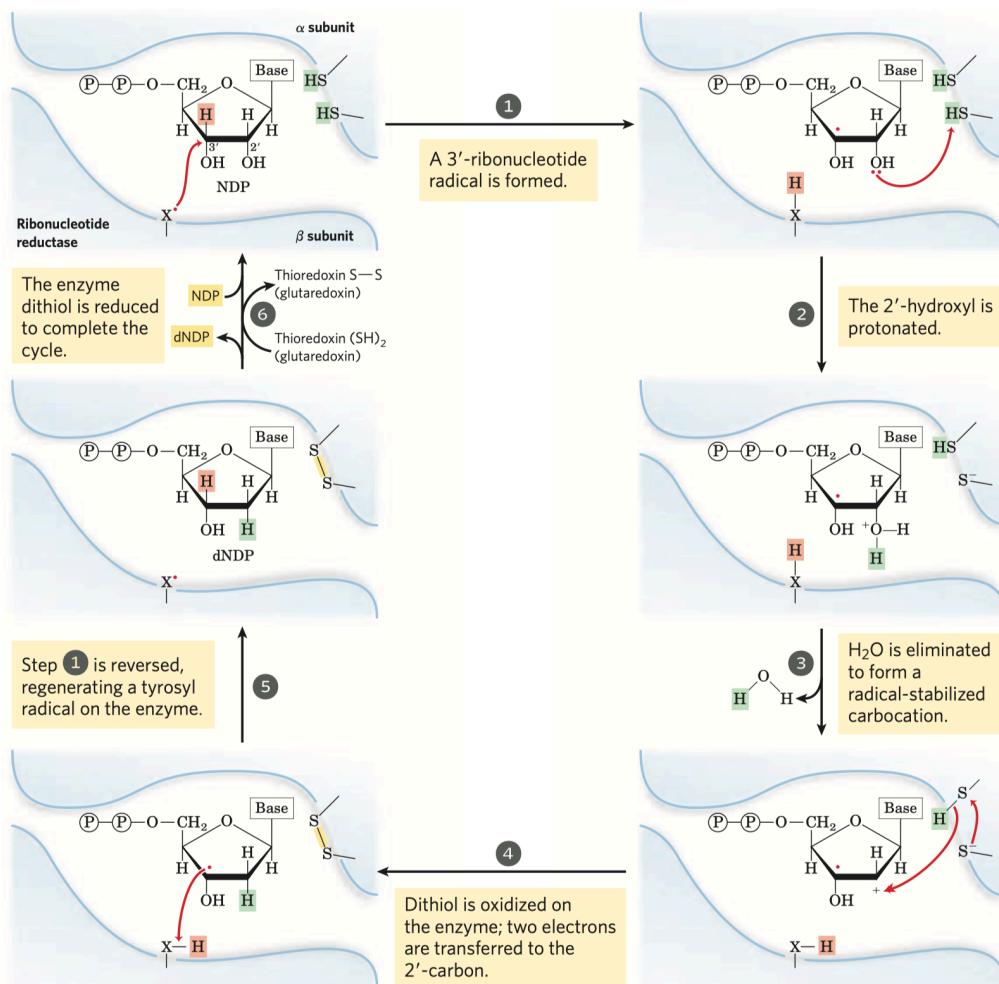


Obrázek 9.18: Cykly účastnící se redukce NDP, kterých se účastní NADP, thioredoxin-reduktáza, thioredoxin, ribonukleotid-reduktáza a konečně samotný NDP.

RIBONUKLEOTID-REDUKTÁZA

- redukuje NDP na dNDP
 - je poté potřeba enzym samotný (resp. jeho oxidovanou část, thioredoxin) zpět redukovat, o to se stará NADPH
- má centrum s železem ve III. oxidačním stupni – umí provést redukci kyslíku za vzniku Tyr radikálu

- Tyr radikál vzniká v jedné z podjednotek enzymu a pak se to využívá dál v reakci
- radikál vzniká na R2, R1 zprostředkovává regulace
 - radikál může být generován homolytickým štěpením; zatím se přesně neví, ja kdo třída I dělá
 - * kandidátem je např. vazba Co-C na derivátu vitamínu B12
- radikál je stabilní, protože vzniká uvnitř, chráněn proti okolí
- radikál je vyměňován s dalšími skupinami



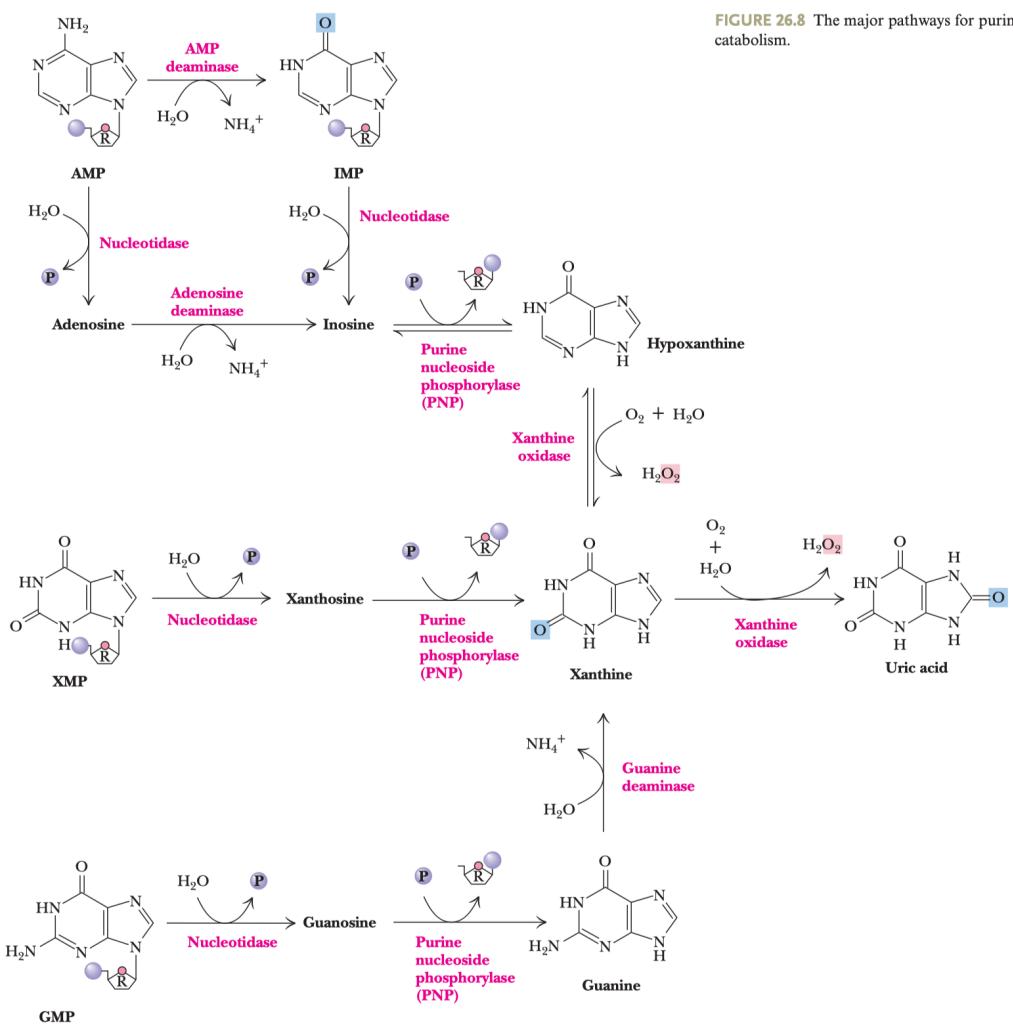
Obrázek 9.19: Navržený mechanismus reakce ribonukleotid-reduktázy třídy I. Detaily není třeba umět, přidávám jej zde pouze pro ilustraci funkce radikálu při redukovaní NDP.

9.2 Degradace nukleotidů

Zajímá nás především katabolismus purinů.

KATABOLISMUS PURINŮ

- (1) NTP -> NMP
 - (2) NMP hydrolyzovány na nukleosidy
 - (3) štěpeny v reakci fosforyláz
- báze se uvolňuje a pokračuje dál katabolickou dráhou
 - ribóza je recyklována jako ribóza-1-fosfát, z toho můžeme ve fosfomutázové reakci získat ribóza-5-fosfát

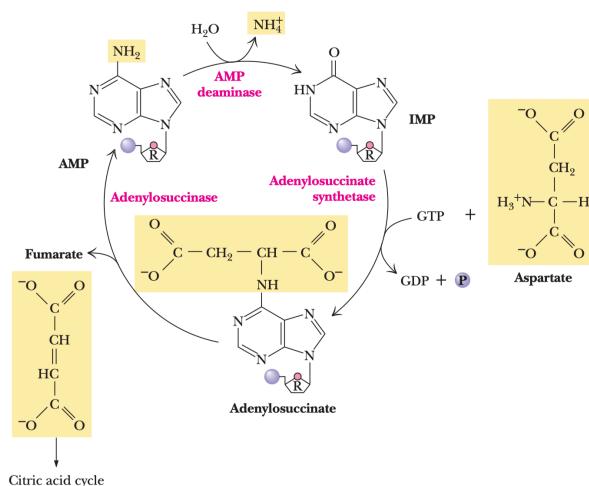


Obrázek 9.20: Katabolismus purinových bazí

Fosforylázové reakce (ty s PNP) jsou zajímavé, protože pokud v nich nějaký enzym nefunguje, výsledky mohou být fatální. PNP je avšak také cílem chemoterapeutických zásahů při léčbě autoimunitních či leukemických onemocnění.

[CYKLUS AMP]

AMP někdy vybočuje z mechanismu uvedeného výše, místo toho se účastní cyklu, který doplňuje intermediát KC.



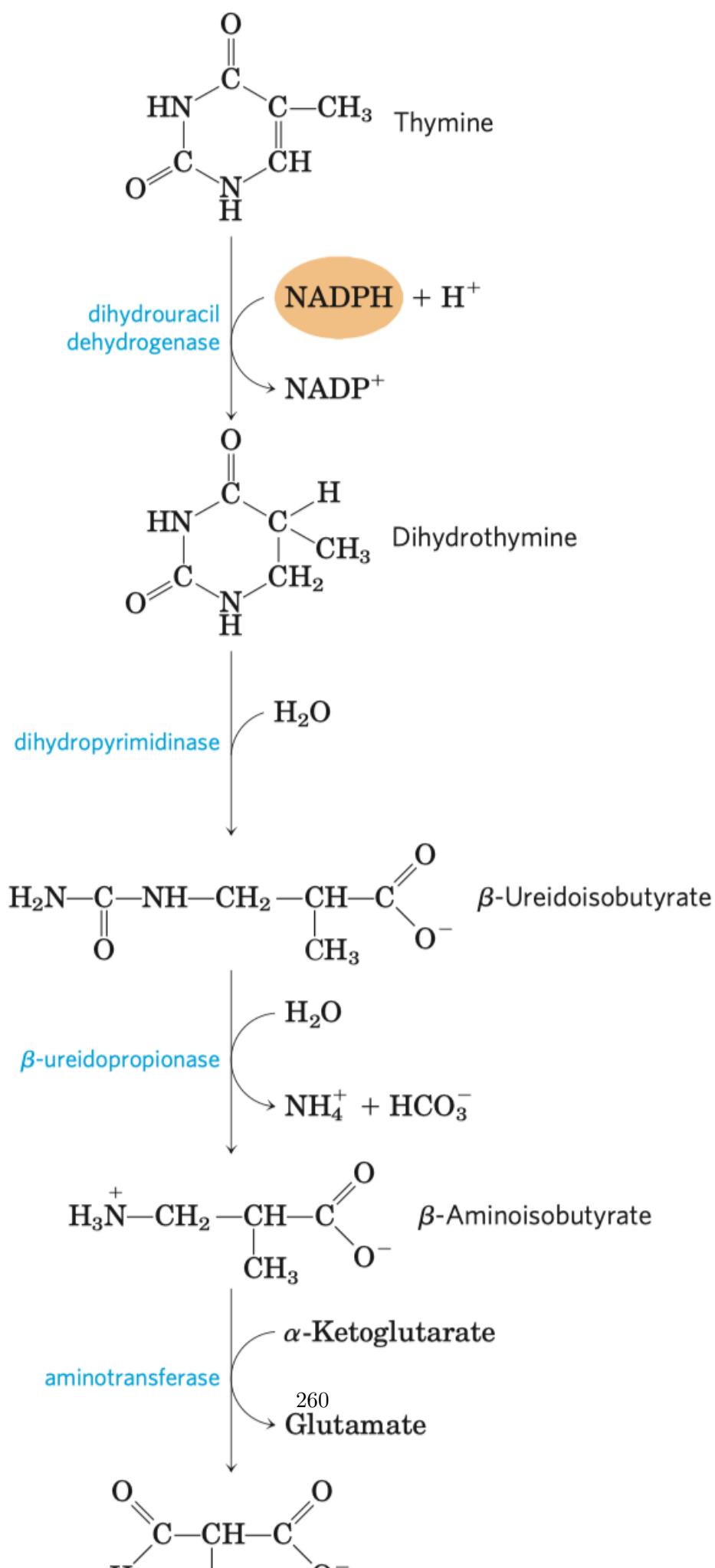
Obrázek 9.21: Cyklus AMP

[PROBLÉMY S ADENOSIN-DEAMINÁZOU]

- katalyzuje pouze oxidativní deaminaci adenosinu
- pokud nefunguje, adenosin se hromadí
 - (1) hromadění adenosinu
 - (2) zpětnovazebně dochází k dalším změnám koncentrací nukleotidů v metabolismu, např. dATP
 - (3) dochází mimo jiné k inhibici ribonukleotid-reduktázy
 - (4) dělící se buňky mají problém, což se projeví kombinovanou imunodeficiencí
- léčba: genetická terapie nebo dodávání funkční adenosin-deaminázy

Mutace AMP-deaminázy vede k deficienci svalové myoadenylátdeaminázy.

Výsledkem tohoto oxidativního metabolismu je kyselina močová (kyselina, protože odpovídající enolový tautomer slabě disociuje).



KATABOLISMUS PYRIMIDINŮ

- (1) nukleosid je defosforylován na nukleosid-monofosát
- (2) štěpení, uvolnění ribózy-1-fosfátu a báze
- (3) následuje metabolismus U nebo T na malonyl-CoA
 - viz obrázek výše
- (4) nikoliv oxidativní, ale reduktivní krok umožní pak linearizovat molekulu
 - je zde potřeba vitamín B12 (druhé z těch dvou použití, o kterých jsme hovořili)
- (5) báze je odbourávána, u pyrimidinových je to reduktivní odbourávání na dvouhulíkaté zbytky