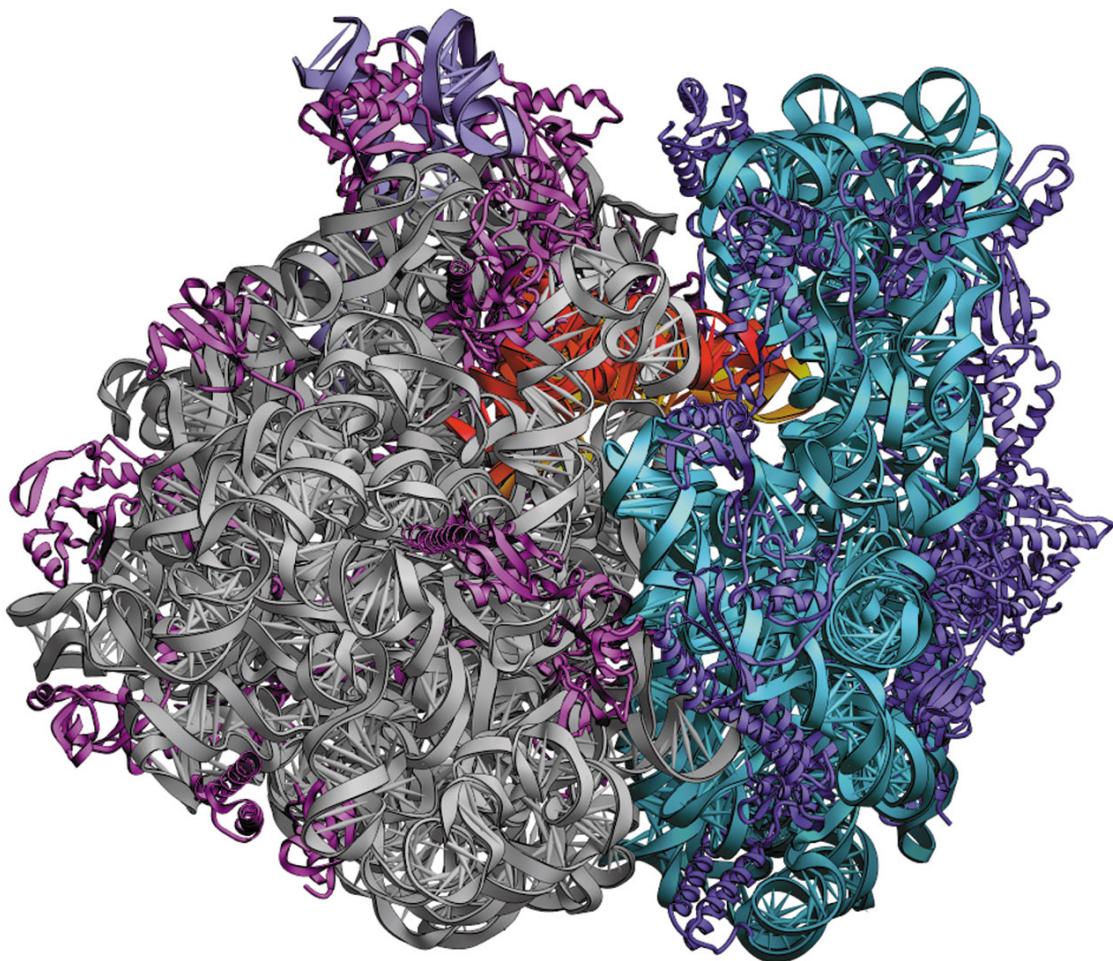


TBT4102 Biokjemi 1

Oppsummeringshefte



Ove Øyås
oyas@stud.ntnu.no

Sist endret: 29. oktober 2012

Innhold

I. Struktur og katalyse	7
1. Tredimensjonal struktur hos proteiner	8
1.1. Konformasjon	8
1.2. Stabilisering av proteinkonformasjon	8
1.2.1. Disulfidbindinger	9
1.2.2. Svake interaksjoner	9
1.3. Peptidbinding	10
1.4. Sekundær struktur	11
1.4.1. α -heliks	11
1.4.2. β -sheet	13
1.4.3. β -turn	14
1.5. Tertiær og kvaternær struktur	14
1.5.1. Fiberproteiner	15
1.5.2. Globulære proteiner	15
1.5.3. Tertiær struktur hos globulære proteiner	16
1.5.4. Kvaternær struktur hos globulære proteiner	18
1.6. Folding og denaturering av proteiner	18
1.7. Metoder for bestemmelse av tredimensjonal proteinstruktur	20
1.7.1. Røntgendiffraksjon	20
1.7.2. NMR	20
2. Enzymer	21
2.1. Kofaktorer og koenzymer	21
2.2. Virkemåte	21
2.2.1. Enzymer øker reaksjonshastigheten ved å senke aktiveringsenergien	22
2.2.2. Enzymer påvirker ikke likevekt	22
2.2.3. Kovalente og ikke-kovalente interaksjoner bidrar til å senke aktiveringsenergien	23
2.2.4. Bindingsenergi og katalyse	23
2.2.5. Bindingsenergi og spesifisitet	23
2.3. Funksjonelle katalytiske grupper bidrar ved katalyse	24
2.3.1. Generell syre-base-katalyse	24
2.3.2. Kovalent katalyse	24
2.3.3. Metallion-katalyse	24
2.4. Klassifisering og navngiving av enzymer	24

2.5. Enzymkinetikk	25
2.5.1. Effekt av substratkonsentrasjon på reaksjonshastighet ved enzymatiske reaksjoner	25
2.5.2. Steady-state	26
2.5.3. Michaelis-Menten-kinetikk	26
2.5.4. Lineweaver-Burk-plott	27
2.5.5. Enzymreaksjoner med mer enn ett substrat	28
2.6. Inhibering	28
2.6.1. Reversibel inhibering	28
2.6.2. Irreversibel inhibering	31
2.7. Enzymaktivitet avhenger av pH	33
3. Karbohydrater	34
3.1. Monosakkarider	34
3.1.1. Aldoser og ketoser	34
3.1.2. Kiralitet i monosakkarider	34
3.1.3. Syklisk struktur hos monosakkarider	36
3.1.4. Heksosederivater	39
3.2. Disakkirider	39
3.2.1. Glykosidbinding	39
3.2.2. Reduserende sukker	39
3.3. Polysakkirider	40
3.3.1. Polysakkirider som energilagre	40
3.3.2. Strukturelle polysakkirider	41
4. Nukleotider og nukleinsyrer	43
4.1. Nukleotider	43
4.1.1. Struktur hos nukleotider	43
4.1.2. Alternativ nukleotidstruktur i DNA og RNA	44
4.1.3. Struktur hos polynukleotider	44
4.1.4. Effekt av nukleotidstruktur på nukleinsyrenes tredimensjonale struktur	45
4.2. Struktur hos nukleinsyrer	46
4.2.1. Dobbel heliks	46
4.2.2. Alternative tredimensjonale strukturer hos DNA	47
4.2.3. Spesielle DNA-sekvenser	49
4.3. Nukleinsyrenes kjemiske egenskaper	50
4.3.1. Denaturering av dobbelttrådig DNA og RNA	50
4.3.2. Hybridisering	51
4.3.3. Metylering av baser i DNA	52
4.3.4. Sekvensering av DNA	52
4.3.5. DNA-syntese	53

II. Metabolisme	54
5. Glyklysen og glukoneogenesen	55
5.1. Glyklysen	55
5.1.1. Glyklysen er svært konservert	55
5.1.2. Oversikt: Glyklysens to faser	55
5.1.3. Pyruvats skjebner	57
5.1.4. Gjenværende energi i pyruvat	58
5.1.5. Termodynamisk oversikt over glyklysen	58
5.1.6. Viktigheten av fosforylerte intermediater	59
5.1.7. Reaksjoner i forberedende fase	60
5.1.8. Reaksjoner i gjenvinningsfasen	62
5.2. Veier inn i glyklysen	66
5.2.1. Hydrolyse av poly- og disakkarker til monosakkarker	66
5.2.2. Endogen glycogen og stivelse degraderes ved fosforolyse	66
5.2.3. Veier inn i glyklysen for andre monosakkarker enn glukose	67
5.3. Pyruvats skjebner under anaerobe forhold: Fermentering	68
5.3.1. Melkesyrefermentering	68
5.4. Glukoneogenesen	69
5.4.1. De irreversible reaksjonene i glyklysen omgås i glukoneogenesen	69
5.4.2. Konvertering av pyruvat til fosfoenolpyruvat	71
5.4.3. Konvertering av fruktose-1,6-bisfosfat til fruktose-6-fosfat	73
5.4.4. Konvertering av glukose-6-fosfat til glukose	73
5.4.5. Glukogeniske aminosyrer og intermediater i sitronsyresyklusen	74
5.4.6. Regulering av glyklysen og glukoneogenesen	74
6. Sitronsyresyklusen	75
6.1. Produksjon av acetyl-CoA (aktivert acetat)	75
6.1.1. Oksidasjon av pyruvat til acetyl-CoA og CO ₂	75
6.1.2. Pyruvat dehydrogenase-komplekset krever fem koenzymer	77
6.1.3. Pyruvat dehydrogenase-komplekset består av tre ulike enzymer	77
6.1.4. Reaksjoner i pyruvat dehydrogenase-komplekset	79
6.2. Sitronsyresyklusen	80
6.2.1. Reaksjoner i sitronsyresyklusen	82
6.2.2. Konservering av energi i sitronsyresyklusen	87
6.2.3. Hvorfor bruke åtte reaksjonstrinn på å oksidere acetat?	87
6.2.4. Intermediater går inn og ut av sitronsyresyklusen	88
7. Fettsyrekatabolisme	89
7.1. Opptak, mobilisering og transport av fett	89
7.1.1. Absorpsjon av fett i tynntarmen	89
7.1.2. Hormoner signaliserer mobilisering av lagrede triacylglyceroler	91
7.1.3. Aktivering av fettsyrer og transport inn i mitokondrier	92
7.2. Oksidasjon av fettsyrer	93
7.2.1. β -oksidasjon av fettsyrer	94

7.2.2. Energiutbytte fra β -oksidasjon	96
7.2.3. Oksidasjon av umettede fettsyrer	96
7.2.4. Fullstendig oksidasjon av fettsyrer med odde antall karbonatomer	97
8. Oksidativ fosforylering og fotofosforylering	99
8.1. Oksidativ fosforylering	99
8.1.1. Mitokondriens struktur og innhold	99
8.1.2. Universelle elektronakseptorer	101
8.1.3. Membranbundne elektronbærere	101
8.1.4. Elektronbærere fungerer i mulitenzymkomplekser	104
8.1.5. Energi fra elektronoverføringer konserveres i en protongradient	110
8.1.6. Dannelse av reaktive oksygenspesier under oksidativ fosforylering	111
8.1.7. Den kjemiosmotiske modellen	111
8.1.8. ATP syntase	111
8.1.9. Rotasjonell katalyse	114
8.1.10. Ikke-heltallig støkiometri som følge av kjemiosmotisk kobling	116
8.1.11. Den protonmotive kraften fasiliterer aktiv transport	116
8.1.12. NADH fraktes inn i mitokondrier for oksidasjon	117
8.2. Fotofosforylering	117
8.2.1. Generelle egenskaper ved fotofosforylering	118
8.2.2. Pigmenter absorberer lys	119
8.2.3. Energioverføring fra klorofyll til reaksjonsentre	120
8.2.4. Lysdrevet elektrontransport i bakterier	121
8.2.5. Lysdrevet elektrontransport i planter	124
8.2.6. ATP-syntese ved fotofosforylering	131
9. Biosyntese av karbohydrater i planter og bakterier	134
9.1. Fotosyntetisk karbohydratsyntese	134
9.1.1. Plastider	135
9.1.2. Reaksjoner i Calvin-syklusen	135
9.1.3. Energiforbruk ved syntese av triosefosfater fra CO ₂	140
9.1.4. Utveksling av triosefosfater og fosfat mellom cytosol og kloroplaster	140
9.1.5. Lysregulering av enzymer i Calvin-syklusen	142
9.2. Fotorespirasjon og C ₄ - og CAM-sporene	143
9.2.1. Fotorespirasjon	143
9.2.2. Separasjon av CO ₂ -fiksering og rubisco-aktivitet i C ₄ -planter	145
9.2.3. Separasjon av CO ₂ -fiksering og rubisco-aktivitet i CAM-planter	146
9.3. Biosyntese av stivelse og sukrose	146
9.3.1. Syntese av stivelse	146
9.3.2. Syntese av sukrose	147
10. Biosyntese av lipider	148
10.1. Biosyntese av fettsyrer	148
10.1.1. Dannelse av malonyl-CoA fra acetyl-CoA og bikarbonat	148
10.1.2. Fettsyre syntase (FAS)	148

10.1.3. Reaksjoner i fettsyresyntesen	150
10.1.4. Produktet ved fettsyresyntese er palmitat	151
10.1.5. Fettsyresyntese skjer i cytosolen eller i kloroplaster	153
10.2. Biosyntese av triacylglyseroler	154

Del I.

Struktur og katalyse

1. Tredimensjonal struktur hos proteiner

Fem viktige aspekter ved proteiners tredimensjonale struktur:

1. Den tredimensjonale strukturen til et protein avhenger av dets aminosyresekvens.
2. Et proteins funksjon avhenger av dets tredimensjonale struktur (og dermed av aminosyresekvensen).
3. Et isolert protein eksisterer som regel i én eller et lite antall stabile konformasjoner.
4. De viktigste kreftene som stabiliserer strukturen til et protein er ikke-kovalente interaksjoner.
5. Blant det enorme antallet unike proteinstrukturer finnes enkelte strukturelle mønstre som går igjen. Disse gjør det enklere å systematisere kunnskap om proteinstruktur.

1.1. Konformasjon

Det romlige arrangementet av atomer i et protein (eller et hvilket som helst annet molekyl) kalles dets **konformasjon**. De mulige konformasjonene til et protein inkluderer enhver strukturell tilstand det kan oppnå uten at kovalente bindinger brytes, altså enhver tilstand som kan oppnås ved rotasjon om bindinger. Av de mange hundre konformasjonene som er teoretisk mulige i et protein som inneholder hundrevis av enkeltbindinger, vil det som regel finnes noen få som dominerer under biologiske forhold. Det er ofte fordelaktig for et proteins biologiske funksjon at det kan eksistere i flere ulike stabile konformasjoner, da dette vil gi en avgjørende stabilisering ved binding til andre molekyler, primært ved katalyse. Konformasjonene som eksisterer under et gitt sett av betingelser er som regel de som er mest stabile termodynamisk sett (de som har lavest G). Et **native** protein er et protein som befinner seg i en av sine funksjonelle, foldede konformasjoner (native conformation).

1.2. Stabilisering av proteinkonformasjon

I forbindelse med proteinstruktur, kan **stabilitet** defineres som tendensen et protein har til å opprettholde sin native konformasjon. Et native protein er som regel bare marginalt mer stabilt enn det er i sin ufoldede konformasjon og en gitt polypeptidkjede kan

i tillegg anta et tilnærmet uendelig antall teoretiske konformasjoner. Dette sørger for at ufoldede proteiner får høy entropi, noe som i kombinasjon med hydrogenbinding mellom polypeptidkjeden og vann gjør det termodynamisk fordelaktig å opprettholde en ufoldet struktur. Blant de kjemiske interaksjonene som motvirker disse effektene og stabiliserer native konformasjon er kovalente disulfidbindinger og ikke-kovalente interaksjoner som hydrogenbindinger og hydrofobiske og ioniske interaksjoner. To enkle regler er:

1. Hydrofobiske residuer befinner seg for det meste i det indre av proteinet, skjermet for de vandige omgivelsene.
2. Antall interne hydrogenbindinger og ioniske interaksjoner i proteinet maksimeres slik at antall uparede hydrogenbindende og ioniske grupper minimaliseres.

1.2.1. Disulfidbindinger

Ikke alle proteiner har disulfidbindinger. Dette skyldes at miljøet i de fleste celler er reduserende og dermed favoriserer sulphydrylgrupper ($-SH$) framfor $-S-S-$ -bindinger. I eukaryoter finnes disulfidbindinger av denne grunn primært i proteiner som sekreteres til ekstracellulære medier, eksempelvis hormonet insulin. Slike bindinger er også uvanlige i prokaryoter, men mange termofile bakterier og arkebakterier har utviklet proteiner med stabiliseringe disulfidbindinger som en tilpasning til liv ved høye temperaturer.

1.2.2. Svake interaksjoner

For de fleste organismer er svake interaksjoner helt avgjørende for at intracellulære polypeptidkjeder skal foldes i sine korrekte sekundær og tertiar strukturer. Svake interaksjoner er også avgjørende når flere polypeptider går sammen i kvaternære strukturer. Disse ikke-kovalente interaksjonene er mye svakere enn kovalente, men fordi de er så tallrike dominerer de likevel som stabiliseringe effekt i proteinstrukturer. Generelt vil proteinkonformasjonen som maksimerer antall svake interaksjoner være den som har lavest G .

Hydrofobiske interaksjoner

Blant de svake interaksjonene er det generelt **hydrofobiske interaksjoner** som gir det største bidraget til et proteins stabilitet. Når vann omgir et hydrofobisk molekyl vil optimal arrangering av hydrogenbindinger resultere i et svært ordnet skall, eller **solvatiseringslag**, av vannmolekyler rundt det hydrofobiske molekylet. Dette medfører økning av vannmolekylenes orden med en tilhørende senkning av vannets entropi. Når ikke-polare grupper går sammen vil denne entropieffekten imidlertid motvirkes, da hver enkelt gruppe ikke lenger eksponerer hele sin overflate til omgivelsene. Dannelse av clustere av ikke-polare grupper vil med andre ord være termodynamisk fordelaktig og hydrofobiske R-grupper i aminosyrer i et protein vil derfor ofte gå sammen i proteinets indre for å minimalisere kontakten med vann.

Hydrogenbindinger

Dannelsen av hydrogenbindinger innad i et protein drives i stor grad av samme entropiske effekt som ved hydrofobiske interaksjoner. Når hydrogenbinding dannes mellom to polare grupper i et makromolekyl, motvirkes dette i stor grad av at hydrogenbindinger mellom disse gruppene og omkringliggende vannmolekyler brytes. Solventeringslaget rundt proteinet vil imidlertid bli mindre, noe som medfører entropiøkning i de vandige omgivelsene og gir en drivkraft for folding som mer enn kompenserer for den store økningen i polypeptidkjedens konformasjonelle orden.

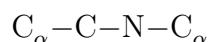
Ettersom det indre av et protein gjerne består av en tettpakket kjerne av hydrofobiske aminosyre-sidekjeder, må eventuelle polare eller ladde grupper være paret med en tilsvarende gruppe via hydrogenbinding eller ioniske interaksjoner. Tilstedeværelse av uparede hydrogenbindende grupper er svært destabilisering. Det kan bemerkes at hydrogenbindinger mellom grupper i et protein dannes kooperativt – én interaksjon gjør den neste mer sannsynlig – og gir opphav til strukturer som optimaliserer hydrogenbinding mellom aminosyrer over lengre sekvenser. Det følger at dannelsen av hydrogenbindinger er avgjørende for at foldingen av et protein skal forløpe korrekt.

Ioniske interaksjoner

Ioniske interaksjoner mellom ladde grupper kan virke både stabilisering og destabilisering. Som for hydrogenbindinger vil brytning av interaksjoner mellom de ladde gruppene og vann påvirke stabiliteten negativt, men dette kan motvirkes dersom saltbroen som dannes er sterkt nok. Styrken på interaksjonen øker med synkende dielektrisitetskonstant, ϵ , og saltbroer som befinner seg helt eller delvis inne i et proteins upolare kjerne vil derfor gjerne gi betydelig stabilisering. Ioniske interaksjoner begrenser strukturell fleksibilitet

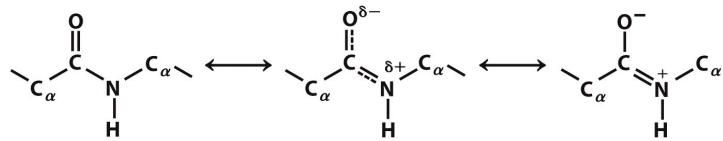
1.3. Peptidbinding

I en peptidbinding er α -karbonene hos naboaminosyrer separert av tre kovalente bindinger på følgende måte:

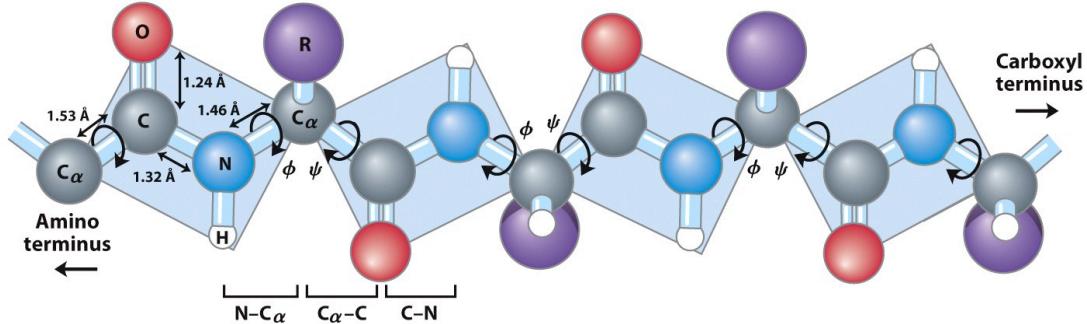


Disse danner sammen med oksygen og hydrogen en **peptidgruppe**. Alle de seks atomene i gruppen ligger i samme plan og karbonylgruppens oksygen står trans til nitrogenet i amingruppen. Ladningsforskjellen mellom det negative oksygenatomet og det positive nitrogenatomet resulterer i en liten elektrisk dipol. C–N-bindingen er noe kortere enn i et enkelt amin som følge av resonans mellom karbonyl-O og amid-N og bindingen kan derfor ikke roteres fritt. Resonansstrukturen er vist i Figur 1.1a.

Ryggraden i en polypeptidkjede kan dermed ses på som en serie av rigide plan med felles rotasjonspunkt i C_α hvor én ende er aminterminus og den andre karboksylterminus. Denne stive primærstrukturen begrenser antall konformasjoner som er mulig for en polypeptidkjede. Peptidkonformasjon kan også defineres ved de tre torsjonsvinklene ϕ , ψ og ω som reflekterer graden av rotasjon om hver av de tre bindingene i en peptidgruppe. Dette er illustrert i Figur 1.1b. Merk at ω angir rotasjon om C–N-bindingen og dermed er mer eller mindre låst til verdien $\omega = \pm 180^\circ$.



(a) Resonansstruktur for en peptidgruppe.



(b) Polypeptidkjede med planare peptidbindinger og angitte torsjonsvinkler.

Figur 1.1.: (a) C–N-bindingen i en peptidgruppe har noe dobbeltbindingskarakter som følge av resonans og kan ikke rotere. (b) En polypeptidkjede kan ses på som en serie av rigide plan med felles rotasjonspunkt i C_α og defineres av torsjonsvinklene ϕ og ψ (ω er ikke angitt).

1.4. Sekundær struktur

Betegnelsen **sekundær struktur** refererer til et hvilket som helst valgt segment av en polypeptidkjede og beskriver det lokale romlige arrangementet av atomene i hovedkjeden til dette segmentet. Sekundær struktur beskrives med andre ord lokale foldinger i et polypeptid. De vanligste typene sekundærstrukturer i proteiner er en høyrehendt spiral kalt α -heliks og en plateutforming kalt β -sheet. I tillegg kommer en tredje struktur kalt β -turn.

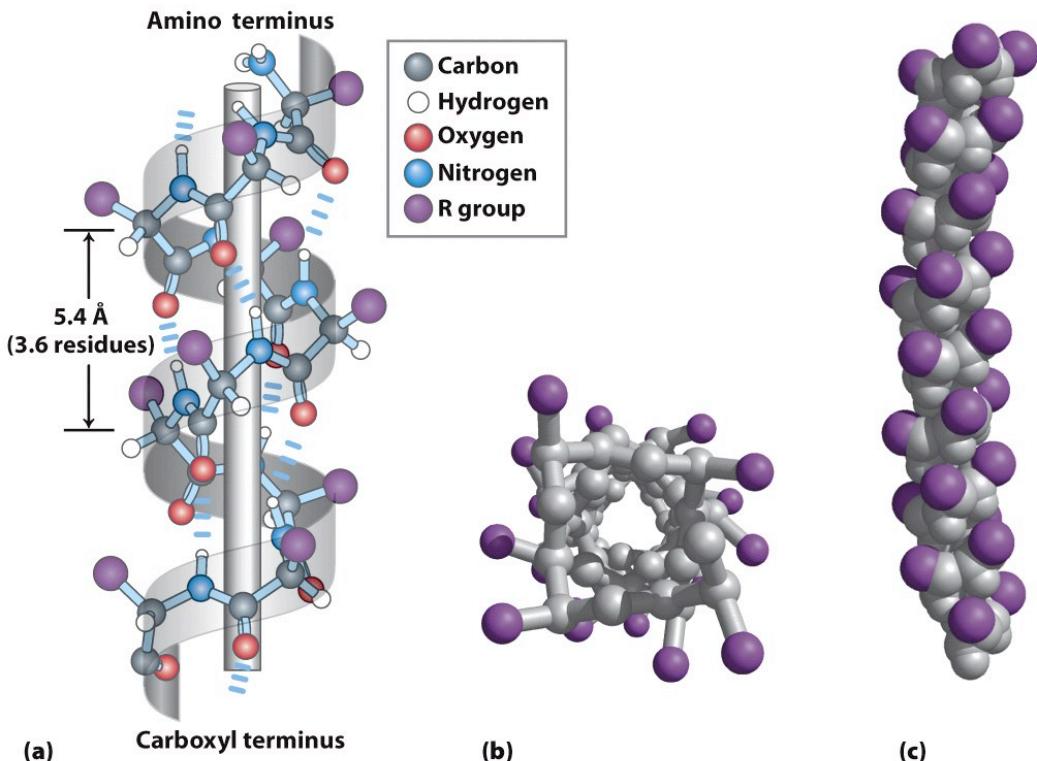
1.4.1. α -heliks

α -heliks er den enkleste og vanligste strukturen en polypeptidkjede kan anta, noe som følger av at den optimaliserer intern hydrogenbinding mellom samtlige peptidbindinger. I denne strukturen er polypeptidkjeden tett viklet rundt en imaginær akse på en slik måte at R-gruppene til aminosyreresiduene peker utover fra heliksen ryggrad. Heliksen er alltid høyrehend og har én enkelt sving, bestående av 3.6 aminosyrer og tilsvarende en lengde på omtrent 5.4 Å langs sentralaksen, som minste repeterende enhet.

Hydrogenbindinger stabiliserer α -heliks

α -heliks stabiliseres av hydrogenbindinger mellom H festet til det negative N-atomet i en peptidbinding og det elektronegative O-atomet i fjerde aminosyre i aminterminal retning. Alle peptidbindinger i heliksen, med unntak av de som er nærmest de to endene,

deltar i hydrogenbinding på denne måten, noe som forklarer hvorfor omrent en fjerdedel av alle aminosyrer i proteiner finnes i segmenter som har denne strukturen. Tre ulike illustrasjoner av α -heliks er vist i Figur 1.2.



Figur 1.2.: Tre illustrasjoner av α -heliks. (a) Heliks med minste repeterende enhet, sentralakse, interne hydrogenbindinger og ender angitt. (b) Heliks sett fra den ene enden, langs sentralaksen. (c) Atomene i α -heliks er svært tett pakket.

Stabiliteten til α -heliks påvirkes av aminosyresekvens

Rekkefølgen av aminosyrene som inngår i α -heliks er avgjørende for strukturens stabilitet. Ikke alle aminosyrer kan danne en stabil α -heliks, noe som skyldes fem ulike effekter:

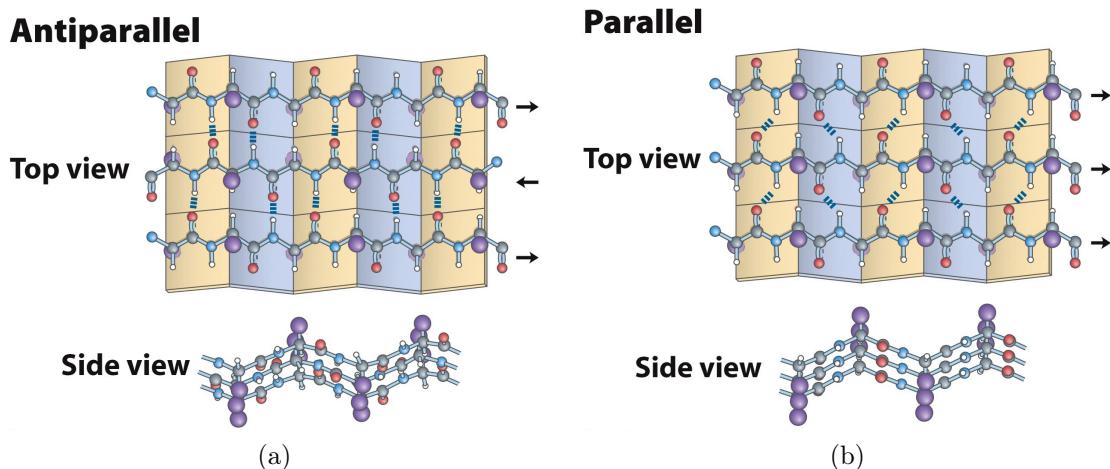
1. *Den intrinsiske tilbøyeligheten en aminosyre har til å danne α -heliks.* Denne tilbøyeligheten reflekterer egenskapene til R-gruppen og effekten den har på nabatomene i peptidkjeden og deres evne til å anta strukturens karakteristiske torsjonsvinkler. Eksperimentelt er det vist at Alanin (Ala) utviser størst tendens til å danne α -heliks.
2. *Interaksjoner mellom R-gruppene, særlig de som befinner seg tre (eller fire) resider unna hverandre.* Aminosyrer i heliksen interagerer i størst grad når det er tre resider mellom dem. Aminosyrer med positivt ladde R-grupper befinner seg derfor ofte i denne avstanden fra aminosyrer med negativt ladde R-grupper. Aromatiske

aminosyrer har også ofte denne avstanden mellom hverandre, da dette muliggjør hydrofobiske interaksjoner.

3. *Steriske interaksjoner mellom R-grupper i naboresiduer.* Store, klumpete R-grupper påvirker stabiliteten negativt.
4. *Tilstedeværelse av prolin (Pro) og glycin (Gly).* Disse aminosyreene vil i minst grad danne α -heliks, noe som skyldes at nitrogenatomet er del av en rigid ring i prolin og en tendens til å ta opp andre viklede strukturer hos glycin.
5. *Interaksjoner mellom aminosyrer ved heliksens ender.* Stabiliteten til α -heliks påvirkes i stor grad av identiteten til aminosyreresiduene ved de to endene. Ettersom hver peptidbinding er en liten dipol, vil α -heliks som helhet også få et dipolmoment langs sentralaksen som øker med lengden på heliksen. Denne dipolen er positivt ladd ved aminterminus og negativt ladd ved karboksylterminus. Dersom aminosyrer med ladning er plassert ved enden med motsatt ladningsfortegn, vil dette stabilisere strukturen, og dersom det motsatte er tilfelle vil effekten være destabilisering.

1.4.2. β -sheet

β -sheet består av parallelle eller antiparallele siksakk-polypeptidkjeder som er festet sammen ved hydrogenbindinger i en blikktakaktig platestruktur. En kjede i denne strukturen ligger enten parallelt eller antiparallelt i forhold til nabokjedene (med samme eller motsatt amin-karboksyl-retning), noe som kan ses illustret i Figur 1.3. De individuelle segmentene som utgjør et β -sheet ligger vanligvis nær hverandre i polypeptidkjeden, men avstanden kan også være større eller de kan komme fra flere ulike kjeder.



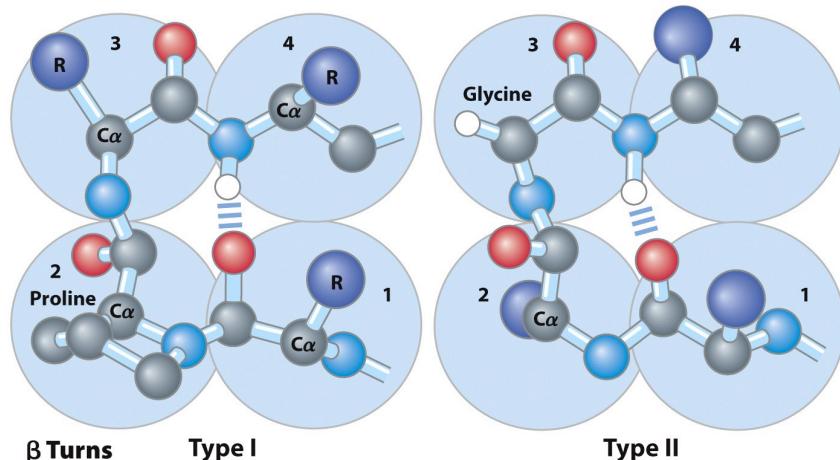
Figur 1.3.: (a) Antiparallelt og (b) parallelt β -sheet, begge vist ovenfra og fra siden.

Noen proteinstrukturer begrenser hvilke aminosyrer som kan inngå i β -sheet. Dette gjelder primært proteiner hvor to eller flere β -sheets er plassert tett inntil hverandre i

lag, noe som forutsetter relativt små R-grupper hos aminosyreresiduene som ligger ved kontaktflatene mellom lagene.

1.4.3. β -turn

I globulære proteiner befinner nesten en tredjedel av aminosyreresiduene seg i svinger eller looper der hvor polypeptidkjeden skifter retning. Det er disse segmentene som sørger for å koble sammen påfølgende α -helikser eller β -sheets. Spesielt vanlig er **β -turns**, segmenter som kobler sammen to nabosegmenter i antiparallele β -sheets. En β -turn er utformet som en sving på 180° og består av fire aminosyreresiduer hvor karbonyloksygenet i den første aminosyren danner en hydrogenbinding med hydrogenatomet på amingruppen til den fjerde. Av de mange typene β -turns, er to typer vanligere enn andre. Disse kalles Type I og Type II og er vist i Figur 1.4. I Type I er andre residue i svingen Pro og i Type II er Gly tredje residue. Pro og Gly opptrer ofte i β -turns, førstnevnte fordi peptidbindinger som involverer imido-nitrogenet i Pro lett antar cis-konfigurasjon, sistnevnte fordi den er liten og fleksibel.



Figur 1.4.: De to vanligste typene β -turns. (a) Type I. Pro er andre residue. (b) Type II. Gly er tredje residue.

1.5. Tertiær og kvaternær struktur

Tertiær struktur betegner den totale foldingen av et protein, altså det totale tredimensjonale arrangementet av alle atomer. Enkelte proteiner inneholder to eller flere polypeptidkjeder, eller underenheter, og det tredimensjonale arrangementet av alle underenheter kalles da **kvaternær struktur**. Det er på disse strukturnivået nyttig å klassifisere proteiner i to hovedgrupper:

1. *Fiberproteiner*. Polypeptidkjelder arrangert i lange tråder eller lag.
2. *Globulære proteiner*. Polypeptidkjelder foldet til en sfærisk eller globulær form.

1.5.1. Fiberproteiner

Fiberproteiner har hovedsaklig strukturelle funksjoner og er som regel bygd opp av repeterende, sekundære strukturelementer. Eksempler på fiberproteiner er α -keratin, collagen og fibroin. Disse tre proteintypene kan både belyse egenskaper hos fiberproteiner og fundamentale prinsipper ved proteiner generelt.

α -keratiner

α -keratiner er proteiner som har utviklet seg for å gi styrke. De finnes kun i pattedyr og utgjør nesten hele tørrvekten av hår, ull, negler klør og lignende. Proteinet består av høyrehendte α -helikser som er orientert parallelt og viklet rundt hverandre (supertwisting) i en venstrehendt heliks. Kontaktflaten mellom de to α -heliksene består av hydrofobiske aminosyreresiduer med sammenflettede R-grupper, noe som tillater tett pakking. Den gjentatte viklingen forsterker strukturen og er et vanlig strukturelt element i filamentære proteiner (proteiner som inneholder lange kjeder av underenheter). Den kvaternære strukturen til α -keratiner kan være relativt kompleks og involvere store supramolekylære komplekser av venstrehendte helikser.

Kollagen

Kollagen er et annet fiberprotein som har utviklet seg for å gi styrke og finnes i vev som sener, bein og hornhinnen i øyet. Kollagenheliksen er en unik sekundær struktur. Den er venstrehendt og har tre aminosyreresiduer per runde. I proteinets kvaternære struktur går tre kollagenhelikser, eller α -kjeder, sammen i en høyrehendt heliks. Aminosyresekvensen i kollagen er generelt en repeterende tripeptidenhet, Gly–X–Y, hvor X ofte er Pro og Y ofte er 4-Hyp. Bare Gly-residuer får plass ved kontaktflatene mellom α -kjedene og Pro og 4-Hyp tillater skarpe svinger i heliksen.

Flere kollagenhelikser kan bindes kovalent til hverandre og gå sammen i forskjellige supramolekylære strukturer kalt kollagenfibriler. Kovalent binding mellom polypeptidkjeder og mellom kjeder i supramolekylære strukturer er et vanlig styrkende element i fiberproteiner.

Fibroin

Fibroin er proteinet som finnes i silke. Det er rikt i Ala- og Gly-residuer, noe som tillater tett pakking av proteinets antiparallele β -sheets samt sammenfletting av R-gruppene. Totalstrukturen stabiliseres i stor grad av hydrogenbinding mellom samtlige peptidbindinger i hvert β -sheet og av optimalisering av van der Waals-interaksjonene lagene imellom.

1.5.2. Globulære proteiner

I globulære proteiner foldes ulike segmenter i én eller flere polypeptidkjelder om hverandre til en mer kompakt struktur enn det som finnes i fiberproteiner. Denne foldingen tillater det strukturelle mangfoldet som er nødvendig for proteiners tilnærmet uendelig mange

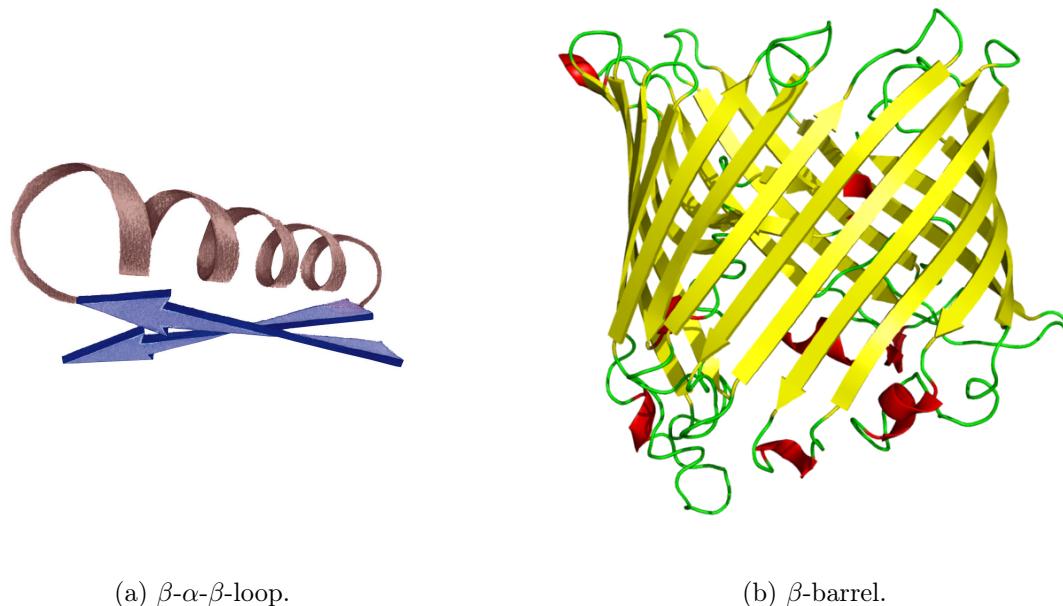
biologiske funksjoner. Eksempler på globulære proteiner er enzymer, transportproteiner, motorptoreiner, regulatoriske proteiner og immunoglobuliner.

1.5.3. Tertiær struktur hos globulære proteiner

Den tredimensjonale strukturen til et typisk globulært protein kan ses på som en saming av polypeptidsegmenter i α -helikser og β -sheets samt segmentene som kobler sammen disse. Strukturen kan deretter defineres ut fra hvordan disse segmentene er pakket sammen og arrangementet av de sammenkoblende segmentene.

Motiv

Et **motiv** er ganske enkelt et gjenkjennbart foldingsmønster som involverer to eller flere sekundære strukturelementer med sammenkoblende segmenter. Begrepene **supersekundær struktur** eller **folding** benyttes også. Et motiv kan være svært enkelt, for eksempel to elementer av sekundær struktur foldet mot hverandre, og trenger bare å utgjøre en liten del av et protein. Et eksempel er en **β - α - β -loop**. Motiver kan også være komplekse strukturer hvor mange proteinsegmenter er foldet sammen, slik som i en **β -barrel**. Begge de nevnte motivene er vist i Figur 1.5.



Figur 1.5.: (a) β - α - β -loop, et enkelt motiv. (b) β -barrel, et mer komplekst motiv, her vist i et sukrosespesifikt transmembranprotein.

Domene

Et domene er en del av en polypeptidkjede som er stabil uavhengig av resten av kjeden eller som kan bevege seg som en selvstendig enhet i forhold til proteinet som helhet.

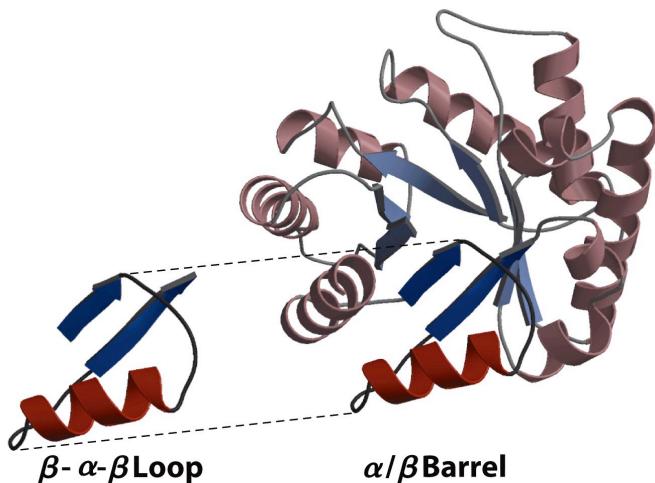
Polypeptider med noen hundre amiosyreresiduer eller flere foldes ofte i to eller flere domener; små polypeptider består som regel bare av ett domene. I mange tilfeller vil et domene opprettholde sin native konformasjon selv når det separeres fra resten av polypeptidkjeden. Ulike domener kan ha ulik funksjon, slik som binding av små molekyler eller interaksjon med andre proteiner.

Generelle regler for proteininfolding

Studier av vanlige foddingsmønstre har avdekket følgende fem regler for proteininfolding:

1. *Hydrofobiske interaksjoner bidrar i stor grad til proteinstrukturers stabilitet.*
2. *Når de opptrer sammen i et protein, finnes α -helikser og β -sheets som regel i ulike strukturelle lag.*
3. *Nabosegmenter i aminosyresekvensen er som regel pakket ved siden av hverandre i proteinets foldede struktur.*
4. *Koblinger mellom vanlige sekundære strukturelementer kan ikke krysse hverandre eller danne knuter.*
5. *β -konformasjonen er mest stabil når de individuelle segmentene er svakt vridd i høyrehåndsretningen.*

Ved å følge disse reglene, kan komplekse motiver bygges opp fra enkle. For eksempel vil en serie β - α - β -looper som er arrangert slik at β -trådene danner en tønne, gi et spesielt stabilt og vanlig motiv, **α - β -barrel**. I denne strukturen, som er vist i Figur 1.6, er hvert parallellt β -segment koblet høyrehendt til sin nabo via en α -heliks.



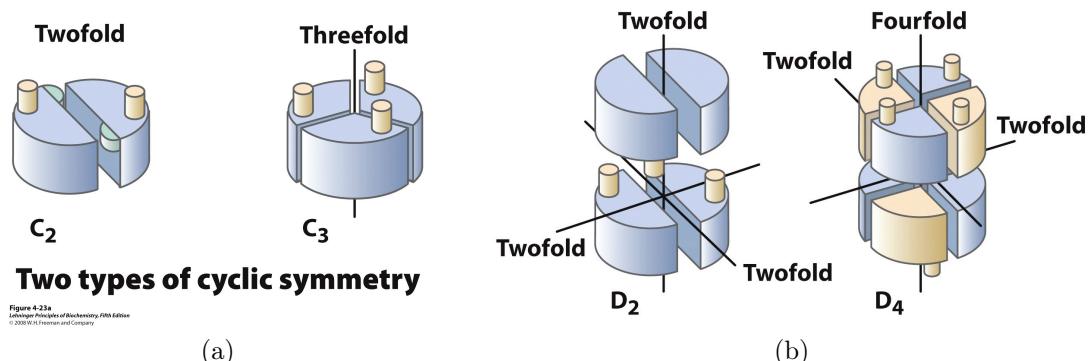
Figur 1.6.: α - β -barrel er et eksempel på hvordan komplekse motiver kan dannes fra enkle, i dette tilfellet en β - α - β -loop.

1.5.4. Kvaternær struktur hos globulære proteiner

Et protein med flere underenheter kalles også en **multimer**. Dersom proteinet har få underenheter kalles det en **oligomer**. Hvis en multimer har underenheter som ikke er identiske, kan proteinets totalstruktur være asymmetrisk og relativt komplisert. De fleste multimerer består imidlertid av identiske underenheter eller repeterende grupper av ikke-identiske underenheter, som regel i symmetriske arrangementer. Den repeterende strukturelle enheten i en multimer, enten det er én enkelt underenhet eller en gruppe, kalles en **protomer**.

Symmetri i multimerstrukturer

Multimerer med identiske underenheter er som regel arrangert i én eller et begrenset antall symmetriske mønstre. En oligomer kan enten ha **rotasjonssymmetri** eller **helikssymmetri**, hvor én underenhet kan plasseres over en annen ved henholdsvis rotasjon om en akse eller en heliksrotasjon. Det finnes flere typer rotasjonssymmetri, hvorav den enkleste er **syklisk symmetri**. Dette involverer rotasjon om én n -foldig akse, med symmetrien C_n . $\alpha\beta$ -protomerene i hemoglobin er eksempelvis relatert ved C_2 -symmetri. En noe mer komplisert form for rotasjonssymmetri er **dihedral symmetri**, hvor en tofoldig akse skjærer en n -folding akse i rett vinkel. Denne symmetrien defineres som D_n for et protein med $2n$ protomerer. Mer komplekse symmetrier finnes også, men bare noen få går igjen i proteiner. Et eksempel er ikosaedral symmetri.



Figur 1.7.: (a) To typer syklisk symmetri. (b) To typer dihedral symmetri.

1.6. Folding og denaturering av proteiner

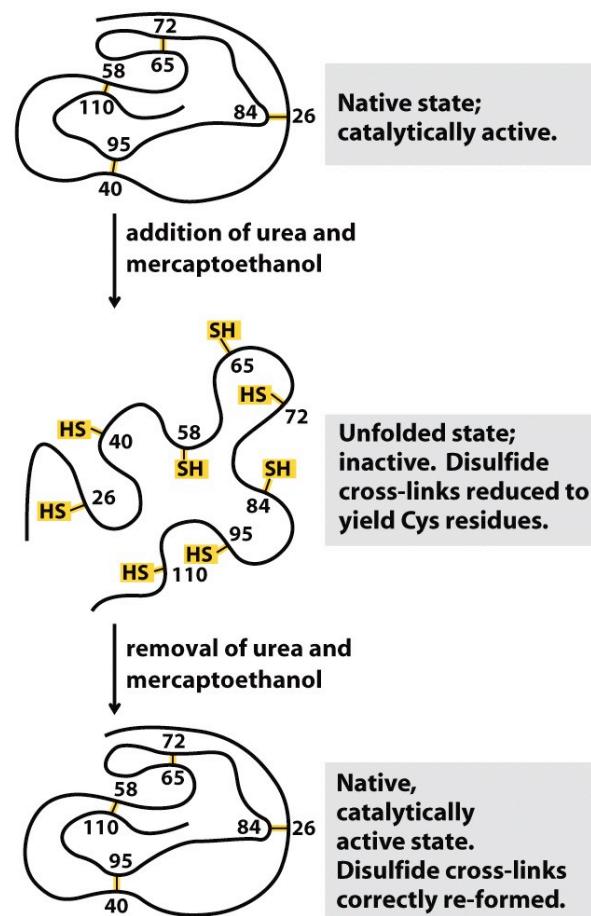
Protein folding er prosessen hvor en strukturløs aminosyrekjede foldes sammen til sin karakteristiske og funksjonelle tredimensjonale struktur. Foldingen skjer som følge av interaksjoner innad mellom aminosyrrene i kjeden samt mellom aminosyrrene og omgivelsene.

Når proteiner eller nukleinsyrer mister tilstrekkelig mye av sin tertiare og sekundære struktur til at det mister sin funksjon, kalles dette **denaturering**. Denaturerte proteiner

eksisterer i de fleste tilfeller i en lang rekke delvis foldede tilstander som bare delvis er kartlagt og forstått. De fleste proteiner kan denatureres av varme, som har komplekse effekter på de svake interaksjonene innad i proteinet, først og fremst hydrogenbindingene. Når et protein foldes ut er dette, i likhet med folding, den omvendte prosessen, en kooperativ prosess: tap av struktur i én del av proteinet destabiliserer andre deler og gjør det mer sannsynlig at også disse delene taper sin struktur.

Proteiner kan også denatureres av ekstreme pH-verdier, ulike organiske løsningsmidler med løselighet i vann, oppløste stoffer som urea eller detergenter. Alle disse denaturerende midlende er milde, da de ikke bryter kovalente bindinger i polypeptidkjeden.

Et viktig poeng er at denaturering som regel er irreversibelt; et denaturert protein vil sjeldent gå tilbake i sin native konformasjon dersom den denaturerende effekten reverseres. Det finnes imidlertid unntak, og noen globulære proteiner vil gjenvinne sin biologiske funksjon dersom de returneres til betingelser hvor native konformasjon er stabil. Denne prosessen kalles **renaturering**. Renaturering av en ufoldet, denaturert ribonuklease er illustrert i Figur 1.8.

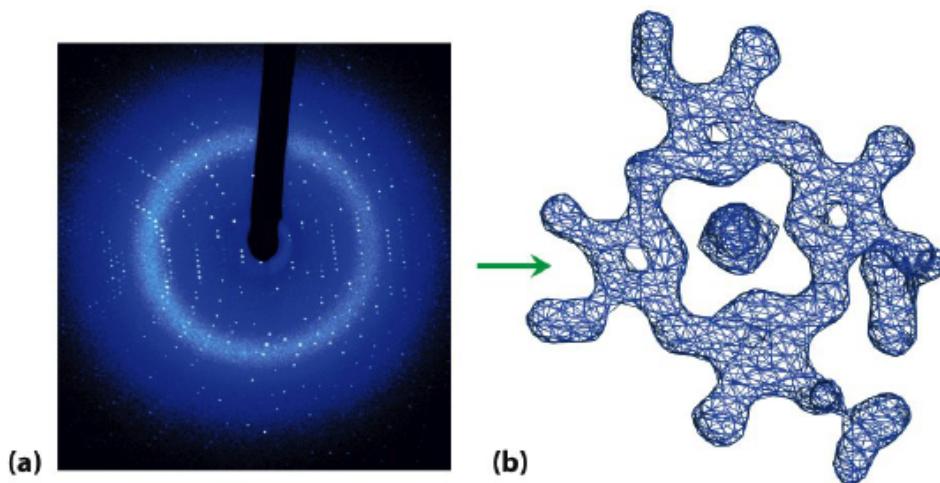


Figur 1.8.: En ribonuklease denatureres av urea og disulfidbindingene reduseres av mercaptoetanol. Ved renaturering gjendannes de korrekte disulfidbindingene assistert av svake interaksjoner mellom aminosyrereresiduene i kjeden.

1.7. Metoder for bestemmelse av tredimensjonal proteinstruktur

1.7.1. Røntgendiffraksjon

Ved røntgendiffraksjon bestråles molekyler i et krystallgitter med røntgenstråler og det resulterende diffraksjonsmønsteret gir informasjon om den romlige organiseringen av atomer i molekylene. Kompleksiteten til diffraksjonsmønsteret øker med antall atomer i molekylet, og data fra røntgendiffraksjon utført på proteiner må derfor analyseres på datamaskin. Et eksempel på et røntgendiffraksjonsmønster med tilhørende tredimensjonalt elektronitetthetskart er vist i Figur 1.9.



Figur 1.9.: (a) Et røntgendiffraksjonsmønster brukes til å kalkulere (b) et tredimensjonalt elektronitetthetskart.

1.7.2. NMR

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) utnytter magnetiske egenskaper hos atomene i et molekyl som oppstår som følge av deres spinn. Spinn er en intrinsikk, kvantemekanisk egenskap hos elementærpartikler som gir opphav til magnetiske dipoler. Total spinn hos et atom eller molekyl kan være parallel eller antiparallel. Når én type proteiner (eller andre makromolekyler) i løsning utsettes for et sterkt, statisk magnetisk felt, vil de enkelte molekylene følgelig orienteres i én av to retninger, parallelt (lav energi) eller antiparallelt (høy energi). En kort elektromagnetisk puls ved en passende frekvens (resonansfrekvensen) påføres deretter molekylene. Noe av energien til denne pulsen vil absorberes av kjerner som går fra tilstanden med lav energi til den med høy energi, og resultatet blir et absorpsjonsspekter som inneholder informasjon om disse kjernene og deres kjemiske omgivelser. En fordel med NMR i forhold til røntgendiffraksjon er at metoden kan benyttes på proteiner i løsning og at den dermed ikke begrenses til proteiner som lar seg krystallisere. NMR kan dessuten belyse dynamiske egenskaper ved proteiners struktur, slik som konformasjonsendringer, proteinfolding og interaksjoner med andre molekyler.

2. Enzymer

Enzymer utgjør den største gruppen av proteiner og har i oppgave å katalysere kjemiske reaksjoner. Med unntak av en liten gruppe katalytiske RNA-molekyler, er alle enzymer proteiner. Enzymer utviser som regel den kjente sammenhengen mellom proteinstruktur og funksjon: katalytisk aktivitet opphører som oftest dersom et enzym denatureres eller disosieres til sine underenheter.

2.1. Kofaktorer og koenzymer

Enkelte enzymer trenger ingen komponenter uteover polypeptidkjedene for å utvise full aktivitet. Mange må imidlertid tilføyes andre kjemiske komponenter kalt **kofaktorer** for å kunne utføre katalyse. Kofaktorer kan bestå av et eller flere uorganiske ioner, for eksempel Fe_2^+ , Mg_2^+ , Mn_2^+ eller Zn_2^+ , eller mer komplekse organiske molekyler. En organisk kofaktor som er løst bundet til et enzym kalles gjerne et **koenzym**. Eksempler på koenzymer er koenzym A, NAD^+ , og FAD. Kofaktorer som er sterkt (til og med kovalent) bundet til enzymer kalles gjerne **prostetiske grupper**.

Et **holoenzym** er et katalytisk aktivt enzym med alle nødvendige underenheter, prostetiske grupper og kofaktorer. **Apoenzym** betegner proteindelen av et enzym, altså ikke inkludert eventuelle organiske, eller uorganiske kofaktorer eller prostetiske grupper som kan være nødvendige for enzymatisk aktivitet. Ofte er også tilføyelse av funksjonelle grupper eller strukturelle endringer i enzymet nødvendig for at det skal få riktig aktivitet. Eksempler på slik kovalent modifikasjon er fosforylering og glykosylering (tilføyelse av henholdsvis fosfat og glukose).

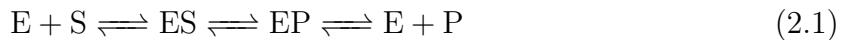
2.2. Virkemåte

Ikke-katalyserte reaksjoner er som regel langsomme under biologisk relevante betingelser; de fleste biologiske molekyler er stabile i vandige løsninger med nøytral pH og moderat temperatur. Enzymer sørger for å øke hastigheten på reaksjoner som er nødvendige for å opprettholde liv.

Mange reaksjoner som katalyseser går av seg selv i utgangspunktet, men er svært langsomme, og enzymer sørger da for å øke den spontane hastigheten. Den katalyserte reaksjonshastigheten kan være opptil 10^{12} ganger så stor som den ikke-katalyserte. Enzymer kan også katalysere reaksjoner som ikke går av seg selv, men det krever tilførsel av energi, for eksempel i form av kløyving av en fosfodiesterbinding i ATP. Enzymatisk katalyse skjer i **aktivt sete** på enzymet. Molekylet som bindes i det aktive setet og skal konverteres til produkt kalles **substrat**.

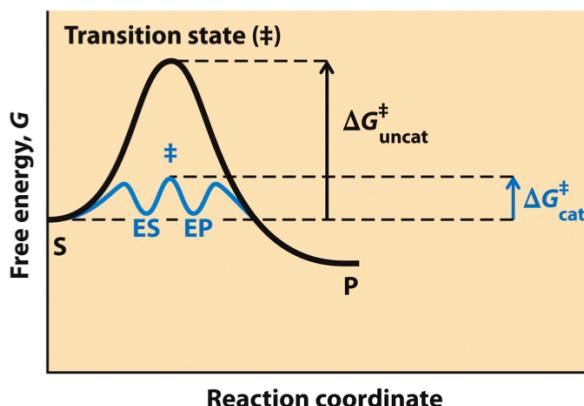
2.2.1. Enzymer øker reaksjonshastigheten ved å senke aktiveringsenergien

En enkel enzymatisk reaksjon kan skrives



der E, S og P representerer henholdsvis enzym, substrat og produkt. ES og EP er midlertidige komplekser som dannes mellom enzymet og henholdsvis substrat og produkt. Et reaksjonskoordinatdiagram for denne reaksjonene vist i Figur 2.1. Startpunktet for reaksjonen i en bestemt retning kalles **grunntilstand**, mens toppunktene på kurven, der hvor reaksjonen har like stor sannsynlighet for å gå i begge retninger, kalles **overgangstilstand**. Forskjellen mellom energien til grunntilstanden og energien til overgangstilstanden kalles **aktiveringsenergien**, ΔG^\ddagger . *Alle enzymer øker reaksjonshastigheten ved å senke aktiveringsenergien.*

Bunnpunktene som ligger mellom overgangstilstandene representerer **reaksjonsintermediater**, nærmere bestemt ES og EP, hvor henholdsvis substrat og produkt er stabilisert i komplekser med enzymet. Et intermediat er generelt en forbigående kjemisk forbindelse med en endelig levetid lengre enn en molekylær vibrasjon. Når flere trinn skjer i en reaksjon, vil den totale reaksjonshastigheten bestemmes av det langsomste trinnet. Dette kalles **hastighetsbestemmende trinn** og vil være trinnet med høyest aktiveringsenergi.



Figur 2.1.: Reaksjonskoordinatdiagram for reaksjonen $S \rightleftharpoons P$ med sammenligning av katalysert og ikke-katalysert aktiveringsenergi. Intermediatene ES og EP svarer til minimumsverdier på kurven for den katalyseerte reaksjonen.

2.2.2. Enzymer påvirker ikke likevekt

Termodynamisk er det viktig å bemerke følgende: *Enzymer påvirker ikke likevekt, bare hastigheten likevekt innstilles med.* Posisjonen eller retningen til en likevekt vil aldri påvirkes av noen katalysator. Det følger av dette at et ethvert enzym som katalyserer reaksjonen $S \rightarrow P$ også vil katalysere den motsatte reaksjonen $P \rightarrow S$. Enzymets rolle er

med andre ord å øke hastigheten likevekt innstilles med ved å øke reaksjonshastigheten i begge retninger.

2.2.3. Kovalente og ikke-kovalente interaksjoner bidrar til å senke aktiveringsenergien

2.2.4. Bindingsenergi og katalyse

For å katalysere reaksjoner må et enzym være komplementært til reaksjonens *overgangstilstand*, ikke til selve substratet. På denne måten fungerer komplementariteten som en betydelig drivkraft for enzymatisk katalyse; det blir energimessig langt mer gunstig for substratet å komme til overgangstilstanden og dermed enklere å få dannet produktet som følger. Noen svake interaksjoner dannes i ES-komplekset, men interaksjonene optimaliseres først i overgangstilstanden. Den nye *netto* aktiveringsenergien blir summen av den ikke-katalyserte aktiveringsenergien, ΔG^\ddagger , og bindingsenergien, ΔG_B som frigjøres på grunn av enzymets komplimentaritet med overgangstilstanden.

Viktige faktorer som bidrar til aktiveringsenergien og som kan overkommes ved hjelp av bindingsenergi er:

1. *Entropien (bevegelsesfriheten) til molekylene i løsningen.* Bindingsenergien bidrar til å holde fast substratet og gir dermed **entropireduksjon**. Dette gir et betydelig energibidrag, da sannsynligheten for gunstige kollisjoner i løsning, kan være svært liten.
2. *Solvateringslaget som omgir og stabiliserer de fleste biomolekyler i løsning.* Dannelsen av svake bindinger mellom substrat og enzym resulterer i **desolvatering** av substratet.
3. *Deformasjonen av substratet som må skje i de fleste reaksjoner.* Komplementariteten med overgangstilstanden bidrar til å kompensere termodynamisk for slike deformasjoner.
4. *Behovet for korrekt romlig plassering av funksjonelle grupper i enzymet.* Enzymet selv undergår som regel konformasjonelle endringer som følge av svake interaksjoner ved binding til substratet. Dette kalles **induced fit**.

2.2.5. Bindingsenergi og spesifisitet

Et enzym kan typisk binde ett spesifikt substrat. Dette kan være en liten organisk forbundelse (for eksempel glukose), et metallion (for eksempel Mg^{2+}), et annet protein eller DNA. Hva enzymet faktisk binder avhenger av tertiærstrukturen som igjen følger av aminosyresekvensen. Med andre ord: Enzymer er substratspesifikke og katalyserer bare én reaksjon. Substratspesifitet er ofte en nødvendighet, men i enkelte tilfeller er hensiktsmessig med mer generell aktivitet. Det ville for eksempel vært svært lite økonomisk å ha egne enzymer for å bryte ned hver enkelt type protein eller polysakkharid i en organisme.

Som tidligere nevnt, følger etenzymens spesifisitet i stor grad av bindingsenergien. Dersom de aktive setene i et enzym har funksjonelle grupper arrangert for å optimalisere svake interaksjoner i overgangstilstanden med et spesifikt substrat, vil ingen andre substrater være i stand til å interagere med enzymet i like stor grad som substratet.

2.3. Funksjonelle katalytiske grupper bidrar ved katalyse

I de fleste enzymer er bindingsenergien bare én av bidragsyterne til den totale katalytiske mekanismen. Når et substrat først er bundet til enzymet vil korrekt plasserte funksjonelle katalytiske grupper bidra til brytning og dannelse av bindinger ved ulike mekanismer. Disse skiller seg fra mekanismer basert på bindingsenergi, da de involverer midlertidige *kovalente* interaksjoner med et substrat eller gruppeoverføringer til eller fra et substrat. De fleste enzymer kombinerer flere ulike katalytiske strategier av denne typen.

2.3.1. Generell syre-base-katalyse

Ladde intermediater kan ofte stabiliseres ved protonoverføring til eller fra substrat eller intermediat med dannelse av et spesie som helst vil danne produkt. Dersom det kun benyttes H⁺- eller OH--ioner fra vann ved katalysen, brukes betegnelsen **spesifikk syre-base-katalyse**. Hvis protoner overføres mellom intermediatet og vann raskere enn intermediatet kan brytes ned til reaktanter, vil intermediatet stabiliseres hver gang det dannes. Protonoverføringer til eller fra andre molekyler enn vann kalles **generell syre-base-katalyse**.

2.3.2. Kovalent katalyse

Ved kovalent katalyse dannes en midlertidig kovalent binding mellom enzym og substrat. En lang rekke sidekjeder i aminosyrer samt de funksjonelle gruppene til enkelte kofaktorer kan fungere som nukleofil og danne kovalente bindinger med et substrat. Det er viktig å bemerke at alle kovalente komplekser som dannes ved katalyse vil brytes opp under eller etter katalysen med frigjørelse av enzymet.

2.3.3. Metallion-katalyse

Ioniske interaksjoner mellom et enzymbundet metallion og substratet kan bidra til å orientere substratet for reaksjon eller stabilisere ladde overgangstilstander. Metallioner kan også bidra ved redoks-reaksjoner ved å reversibelt endre sin oksidasjonstilstand.

2.4. Klassifisering og navngiving av enzymer

Enzymer kan deles inn etter spesifikk aktivitet i seks kategorier. Disse er oppsummert i Tabell 2.1. Enzymer betegnes som regel ved kallenavn som sier noe om aktiviteten og har

suffikset -ase. I henhold til International Union of Biochemistry (IUB) skal alle enzymer ges et kodenummer bestående av fire sifre separert av punktum med betydningen (klasse.gruppe.undergruppe.serienummer). Navnet på enzymet skal baseres på forbindelsen som inngår i enzymreaksjonen og navnet på den dominerende enzymklassen.

Tabell 2.1.: Enzymklasser.

Klasse #	Klassenavn	Aktivitet
1	Oksidoreduktaser	Oksidasjon og reduksjon (overføring av hydridioner eller H-atomer).
2	Transferaser	Overføring av funksjonelle grupper.
3	Hydrolaser	Hydrolyse (overføring av funksjonelle grupper til vann).
4	Lyaser	Addisjon av grupper til dobbeltbindinger eller dannelses av dobbeltbindinger ved fjerning av grupper.
5	Isomeraser	Overføring av grupper innad i et molekyl (isomerering).
6	Ligaser	Dannelsel av C–C, C–S, C–O og C–N ved kondensasjonsreaksjoner koblet til kløyving av ATP eller en lignende kofaktor..

2.5. Enzymkinetikk

Enzymkinetikk handler om å bestemme *hastigheten* til en enzymatisk reaksjon og se hvordan denne forandrer seg som følge av endringer i eksperimentelle parametere.

2.5.1. Effekt av substratkonsentrasjon på reaksjonshastighet ved enzymatiske reaksjoner

En nøkkelfaktor som påvirker hastigheten til en reaksjon katalysert av et enzym er substratkonsentrasjonen, $[S]$. Ettersom $[S]$ hele tiden vil forandre seg etter hvert som substrat konverteres til produkt, forenkles beregninger ved å måle **initiell reaksjonshastighet**, V_0 . Ved bare å måle reaksjonshastigheten helt i begynnelsen av reaksjonen, kan $[S]$ regnes som konstant og V_0 betraktes som en funksjon av $[S]$.

Ved lave substratkonsentrasjoner vil V_0 øke tilnærmet lineært med økende $[S]$. Videre vil V_0 øke asymptotisk med økende $[S]$ og gå mot **maksimal reaksjonshastighet**, V_{max} , når $[S]$ går mot uendelig:

$$V_0 \xrightarrow{[S] \rightarrow \infty} V_{max} \quad (2.2)$$

Resultatet er en hyperbolsk kurve som vist i Figur 2.2.

Enzymatiske reaksjoner kan betraktes i to trinn. Først går det katalyserende enzymet

reversibelt sammen med substratet og danner et enzym-substrat-kompleks:



Etter at enzymet har katalysert reaksjonen fra substrat til produkt, brytes komplekset opp med fritt enzym og produkt som resultat:



Reaksjon (2.4) er langsomst og derfor hastighetsbestemende, slik at den totale reaksjonshastigheten blir proporsjonal med $[ES]$.

På et hvilket som helst tidspunkt i reaksjonsforløpet eksisterer enzymet i to former: E og ES. Ved lav $[S]$ finnes mesteparten av enzymet i fri form, E, og reaksjonshastigheten blir dermed proporsjonal med $[S]$ ettersom likevekten i (2.3) vil forskyves mot høyre ved økning av $[S]$. V_{max} oppnås når så godt som alt enzym finnes i ES-komplekset og $[E]$ er forsvinnende liten. Under disse betingelsene er enzymet "mettet" på sitt substrat slik at videre økning av $[S]$ ikke vil ha noen effekt.

2.5.2. Steady-state

Når enzym og overskudd substrat først blandes, vil konsentrasjonen av ES først bygge seg opp i løpet av en kort initiell periode kalt **pre-steady state**. Denne er som regel for kort til å kunne observeres. Reaksjonen når raskt **steady state**, hvor $[ES]$ holder seg så godt som konstant over tid. V_0 vil som regel reflektere steady state.

2.5.3. Michaelis-Menten-kinetikk

De fleste enzymkatalyserte reaksjoner kan beskrives ved Michaelis-Menten-kinetikk. Det tas også her utgangspunkt i de grunnleggende trinnene i en enzymatisk reaksjon som er vist i ligningene (2.3) og (2.4) med antagelse om at det hastighetsbestemende trinnet er nedbrytningen av ES-komplekset til fritt enzym og produkt. Tidlig i reaksjonen vil $[P]$ være neglisjerbar og det kan antas at reaksjonen $P \rightarrow S$ er neglisjerbar. Totalreaksjonen reduseres dermed til



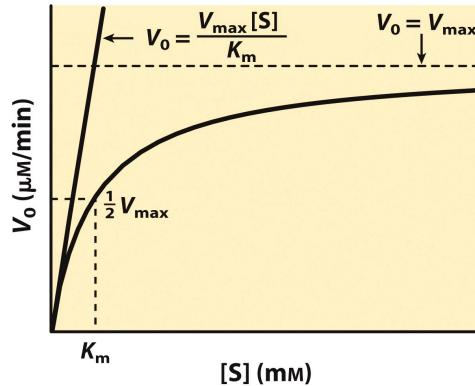
Ved videre å anta steady state, altså at ES-komplekset dannes like fort som det brytes ned, gjør det mulig å utlede **Michaelis-Menten-ligningen**, et matematisk uttrykk for reaksjonshastigheten som funksjon av substratkonsentrasjon:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.6)$$

der K_m er Michaelis-konstanten definert ved

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.7)$$

K_m har tolkning som en substratkonsentrasjon og ved innsetting i ligning (2.6) kan det ses at dette er konsentrasjonen når, $V_0 = \frac{1}{2}V_{max}$, altså når reaksjonen går ved halvparten av maksimal hastighet. K_m kan i mange tilfeller ses på som et mål på substratets affinitet for enzymet: en liten K_m indikerer da høy affinitet ettersom reaksjonshastigheten vil gå mot V_{max} raskere enn for en høyere K_m . Et plott av V_0 mot $[S]$ gir en Michalis-Menten-kurve som vist i Figur 2.2.



Figur 2.2.: Plott av starthastighet, V_0 , mot substratkonsentrasjon, $[S]$. V_{max} , K_m og kurve som viser det lineære forholdet mellom V_0 og $[S]$ når $K_m >> [S]$ er angitt.

2.5.4. Lineweaver-Burk-plott

Michaelis-Menten-ligningen er gitt i ligning (2.6). Ved å ta den inverse av begge sider, kan denne omformes til

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} \quad (2.8)$$

Dette kan videre skrives som

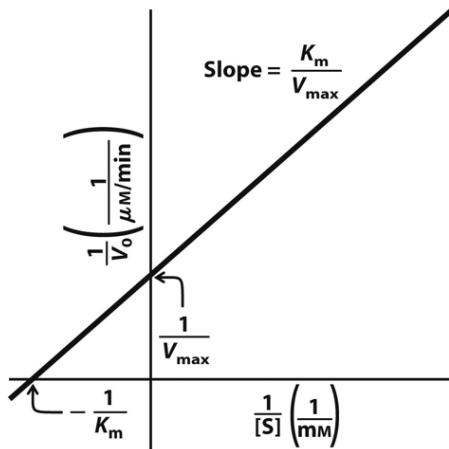
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad (2.9)$$

Forenkling gir **Lineweaver-Burk-ligningen**:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.10)$$

For enzymer som følger Michaelis-Menten-kinetikk, vil et plott av $1/V_0$ mot $1/[S]$ gi en rett linje med stigningstall K_m/V_{max} , skjæringspunkt $1/V_{max}$ med $1/V_0$ -aksen og skjæringspunkt $-1/K_m$ med $1/[S]$ -aksen. Dette er illustrert i Figur 2.3. Den store fordelen med et Lineweaver-Burk-plott er at det tillater bestemmelse av V_{max} med høy presisjon, noe som kun er approksimativt mulig dersom man benytter et enkelt plott av V_0 mot $[S]$.

En enkel enzymatisk reaksjon kan skrives og P representerer henholdsvis enzym, substrat og produkt. ES og EP er midlertidige komplekser som dannes mellom enzymet og



Figur 2.3.: Lineweaver-Burk-plott

henholdsvis substrat og produkt. Effekten av enzymkatalyse på aktiveringsenergien for en slik reaksjon er illustrert i Figur 2.1.

I ES-komplekset holdes enzym og substrat sammen av svake krefter som hydrogenbindinger samt hydrofobiske og ioniske interaksjoner. Disse ikke-kovalente interaksjonene stabiliserer komplekset og frigjør samtidig en betydelig mengde energi. Denne energien kalles bindingsenergi og står for en stor del av det totale energibidraget som kreves for senking av aktiveringsenergien til en reaksjon.

2.5.5. Enzymreaksjoner med mer enn ett substrat

I de fleste enzymatiske reaksjoner vil to eller flere ulike substratmolekyler bindes til enzymet og delta i den katalyserte reaksjonen. I noen tilfeller er begge substrater bundet til enzymet samtidig på et eller annet tidspunkt i løpet av reaksjonen og da danner et ikke-kovalent ternært kompleks. Enzymene bindes enten tilfeldig eller i en spesifikk rekkefølge. I andre tilfeller konverteres det første substratet til produkt og disosierer før det andre substratet bindes. I slike tilfeller vil det ikke dannes et ternært kompleks. Vanlige mekanismer for enzymatiske bisubstratreaksjoner med og uten dannelse av ternært kompleks er illustrert i Figur 2.4.

2.6. Inhibering

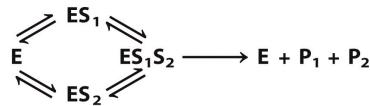
Enzyminhibitorer er molekyler som sinker eller hindrer enzymatisk katalyse. Det finnes to store klasser av inhibitorer: reversible og irreversible.

2.6.1. Reversibel inhibering

Tre vanlige typer reversibel inhibering er vist i Figurene 2.5-2.9. Disse inhiberingstypene kan lett skilles fra hverandre ved hjelp av et Lineweaver-Burk-plott som vist i Figur 2.8.

(a) Enzyme reaction involving a ternary complex

Random order



Ordered



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



Figur 2.4.: Vanlige mekanismer for enzymatiske bisubstratreaksjoner. (a) Enzym og begge substrater går sammen med dannelse av ternært kompleks. Ved ordnet binding må sustrat 1 bindes før substrat 2. (b) Enzymatisk bisubstratreaksjon uten dannelse av ternært kompleks.

Kompetitiv inhibering

En **kompetitiv inhibitor** konkurrerer med substratet om enzymets aktive sete. Når inhibitoren (I) er bundet til enzmet, hindres binding av substratet. Mange kompetitive inhibitorer ligner enzymets substrat strukturelt og går sammen med enzymet i et EI-kompleks uten at dette leder videre til katalyse. Selv midlertidige kombinasjoner av denne typen vil senke enzymets effektivitet. Dersom en kompetitiv inhibitor er til stede, skrives Michaelis-Menten-ligningen om til

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (2.11)$$

der

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{og} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Ligning (2.11) beskriver de viktige egenskapene ved kompetitiv inhibering. Faktoren α påvirker K_m , men ikke V_{max} . Den eksperimentelt bestemte verdien av αK_m kalles gjerne "apparent" (tilsynelatende) K_m (tilsvarende for V_{max}).

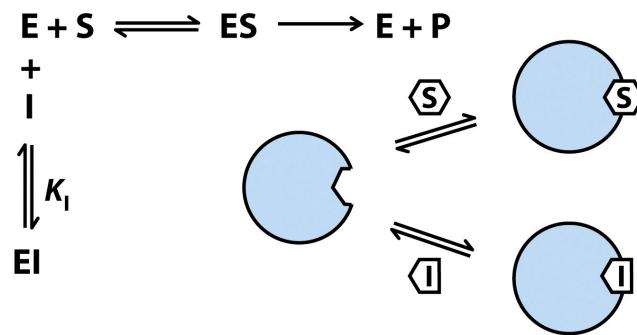
Ikke-kompetitiv inhibering

En **ikke-kompetitiv inhibitor** bindes til et annet sete på enzymet enn substratet og vil, i motsetning til en kompetitiv inhibitor, kun bindes til ES-komplekset. Dersom en ikke-kompetitiv inhibitor er til stede, skrives Michaelis-Menten-ligningen om til

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (2.12)$$

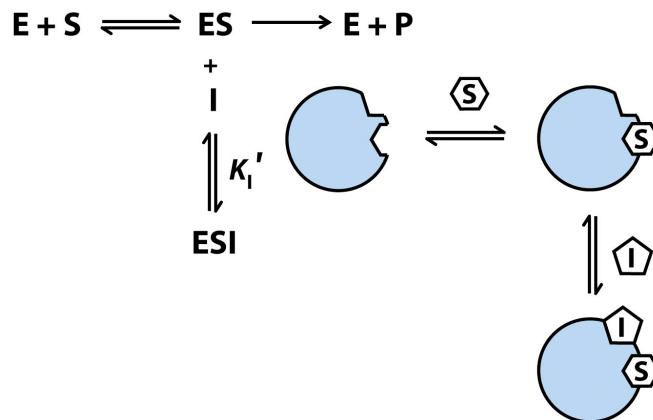
der

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \quad \text{og} \quad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$



Figur 2.5.: Kompetitiv inhibering.

Av ligning (2.12) kan det ses at V_0 går mot V_{max}/α' ved høye substratkonsentrasjoner. En ikke-kompetitiv inhibitor senker dermed den tilsynelatende verdien av både V_{max} og K_m ettersom $[S]$ som kreves for å nå $\frac{1}{2}V_{max}$ synker med en faktor α' .



Figur 2.6.: Ikke-kompetitiv inhibering.

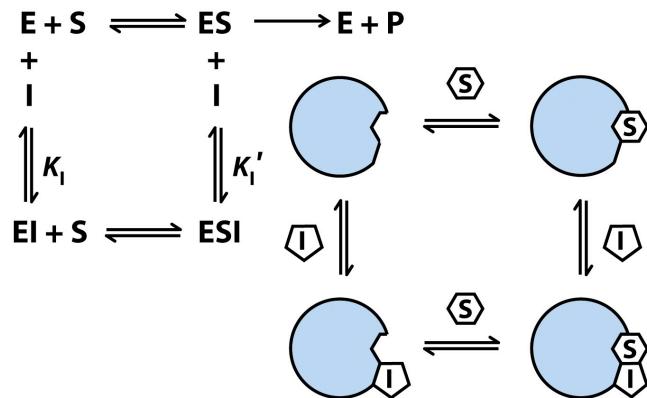
Blandet inhibering

En **blandet inhibitor** bindes også til et annet sete på enzymet enn substratet, men kan bindes både til E og til ES. Hastighetsligningen for blandet inhibering påvirkes med andre ord både av α og α' og må dermed skrives som

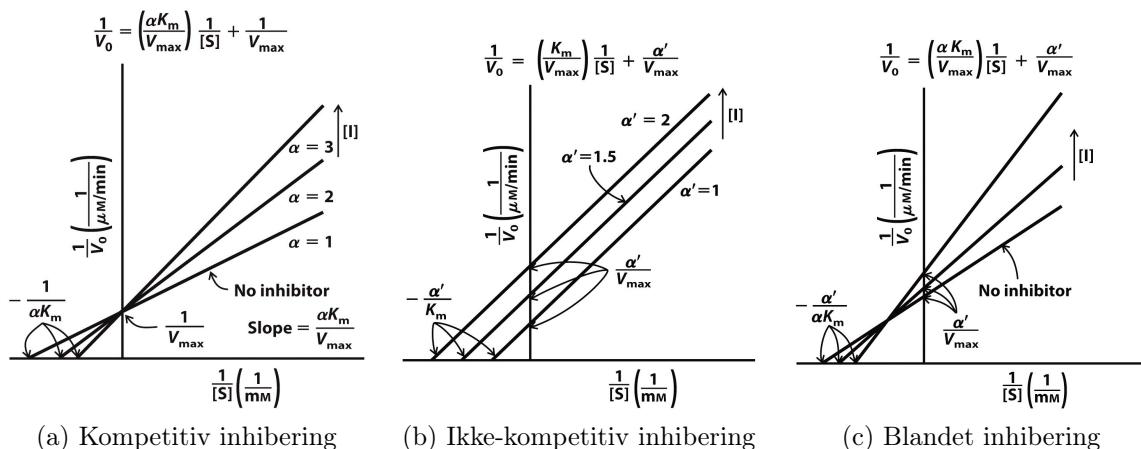
$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \quad (2.13)$$

En blandet inhibitor vil som regel påvirke både K_m og V_{max} . Merk at ligning (2.13) er et generelt uttrykk for reversible inhibitorer som reduseres til uttrykkene for henholdsvis kompetitiv inhibering når $\alpha = 1$ og ikke-kompetitiv inhibering når $\alpha' = 1$. For alle reversible inhibitorer gjelder det at

$$\text{tilsynelatende } V_{max} = \frac{V_{max}}{\alpha'} \quad \text{og} \quad \text{tilsynelatende } K_m = \frac{\alpha K_m}{\alpha'}$$



Figur 2.7.: Blandet inhibering.



Figur 2.8.: Lineweaver-Burk-plott for tre typer reversibel inhibering. (a) Ved kompetitiv inhibering øker tilsynelatende K_m mens V_{max} forblir den samme. (b) En ikke-kompetitiv inhibitor senker den tilsynelatende verdien av både V_{max} og K_m . (c) Ved blandet inhibering synker tilsynelatende V_{max} mens tilsynelatende K_m øker.

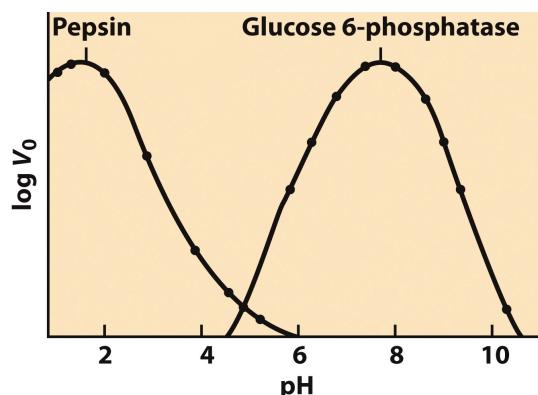
2.6.2. Irreversibel inhibering

En **irreversibel inhibitor** bindes kovalent til et enzym, ødelegger en funksjonell gruppe som er avgjørende for dets aktivitet eller danner en spesielt stabil ikke-kovalent interaksjon med enzymet. En spesiell klasse irreversible inhibitorer er **suicide inactivators**. En inhibitor av denne typen undergår de første kjemiske stegene i den normale enzymatiske

reaksjonen, men konverteres deretter til en svært reaktiv forbindelse som går irreversibelt sammen med enzymet. En forbindelse som inhiberer katalyse irreversibelt på denne måten kalles også en **mekanismebasert inhibitor**.

2.7. Enzymaktivitet avhenger av pH

Enzymer har en optimal pH-verdi hvor de utviser maksimal aktivitet. Ved høyere eller lavere pH vil aktivitet avta. pH-intervallet hvor enzymet undergår endringer i aktivitet kan gi en pekepinn på hvilke aminosyreresiduer som inngår i enzymet. Det må imidlertid tas hensyn til at aminosyresidekjedenes pK_a kan påvirkes betydelig i det tettpakkede indre av et protein. pH som svarer til maksimal aktivitet ligger generelt nært pH i miljøet enzymet som regel befinner seg i.



Figur 2.9.: pH-aktivitetsprofil for to enzymer, pepsin og glukose 6-fosfatase. Toppunktet på kurven representerer maksimal initiell hastighet, V_0 , og dermed optimal aktivitet.

3. Karbohydrater

Karbohydrater er polyhydroksyaldehyder eller -ketoner eller andre substanser som gir slike forbindelser ved hydrolyse. De varierer i størrelse og kompleksitet fra enkeltmolekyler til lange polymerkjeder og har ofte empirisk formel $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Noen karbohydrater inneholder også nitrogen, fosfor eller svovel. Karbohydrater brukes både som umiddelbar energikilde og som energilager i nesten alt liv, samtidig som de spiller viktige strukturelle roller i mange organismer. Karbohydrater finnes også på overflaten av celler, der de både kan gi beskyttelse og fungere som gjenkjennelsesmolekyler.

3.1. Monosakkarkerider

Monosakkarkerider er karbohydrater som består av ett enkelt polyhydroksyaldehyd eller -keton. De er fargeløse, krystallinske stoffer som er løselige i vann, men ikke i ikke-polare løsningsmidler. Det mest utbredte monosakkardet i naturen er D-glukose, ofte referert til som dekstrose. Monosakkarkerider med fire karbon eller flere har som regel syklisk struktur.

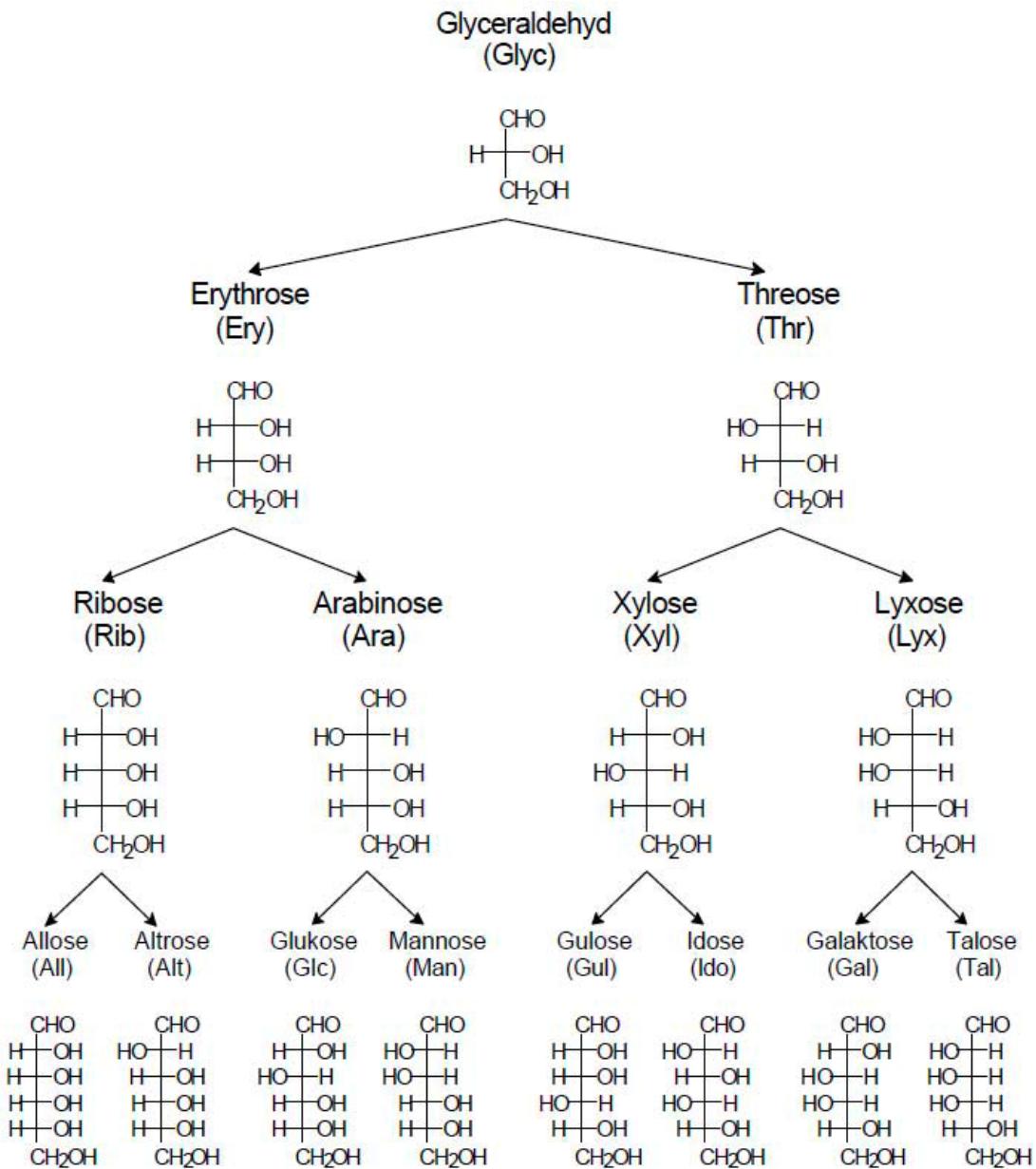
3.1.1. Aldoser og ketoser

Monosakkarkerider er altså enten aldehyder eller ketoner med to eller flere OH-grupper. De er fargeløse, krystallinske stoffer som er løselige i vann, men ikke i ikke-polare løsningsmidler. Ryggraden til vanlige monosakkarkerider er en ugrenet karbonkjede hvor alle karbonatomer er koblet sammen med enkeltbindinger, og, dersom sukkeret er i åpen kjede-form, ett karbon er dobbebundet til et oksygenatom i en karbonylgruppe. Hvis karbonylgruppen sitter på enden av karbonkjeden, kalles monosakkardet en **aldose**; hvis den sitter i en hvilken som helst annen posisjon kalles det en **ketose**. De enkleste monosakkardene er de to triosene glyeraldehyd, en aldotriose, og dihydroksyaceton, en ketose. De vanligste monosakkardene i naturen er heksosene, inkludert aldoheksosen D-glukose og ketoheksosen D-fruktose.

Mange heksosene kan dannes fra D-glyeraldehyd ved addisjon av HCOH-grupper som vist i Figur 3.1.

3.1.2. Kiralitet i monosakkarkerider

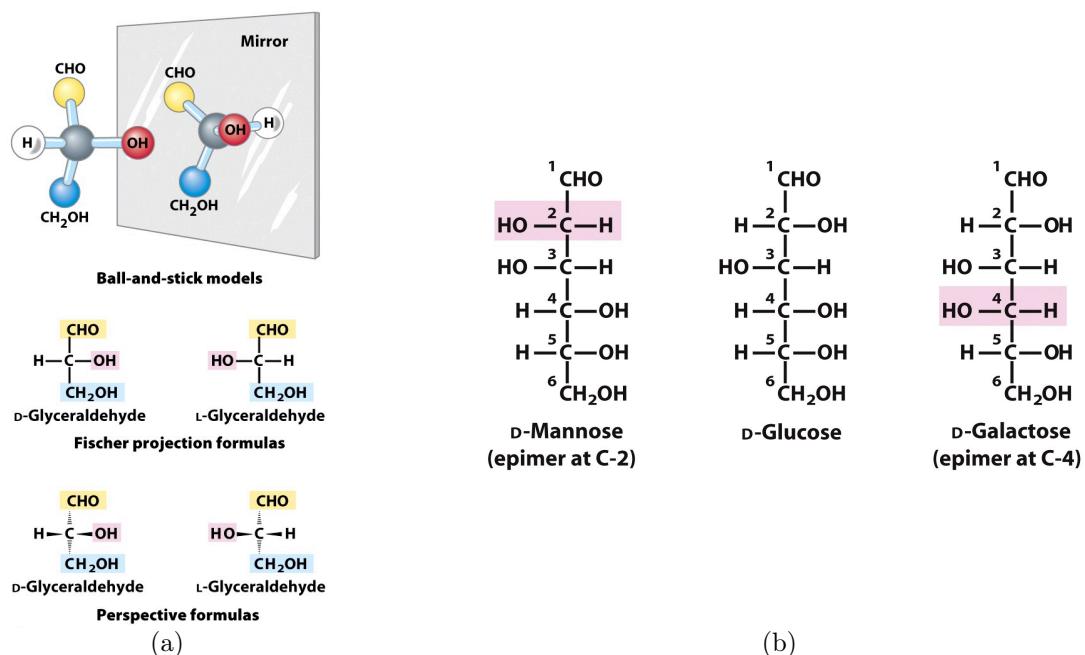
Alle monosakkarkerider unntatt dihydroksyaceton har ett eller flere asymmetriske (kirale) karbonatomer, og opptrer derfor i optisk aktive isomeriske former. Den enkleste aldosen, glyeraldehyd, har ett kiralt senter og har derfor to ulike optiske isomere, eller **enantiomerer**. Tre ulike representasjoner av enantiomerer er vist i Figur 3.2a. Et molekyl med n kirale sentre har generelt 2^n stereoisomerer.



Figur 3.1.: Dannelse av heksoser fra D-glyseraldehyd ved addisjon av HCOH-grupper.

Stereoisomerene til monosakkardider med en spesifikk karbonkjedelengde kan deles inn i to grupper som skiller fra hverandre ved konfigurasjonen omkring det kirale senteret som ligger lengst unna karbonylkarbonet. Avhengig av om konfigurasjonen er den samme som D- eller L-glyceraldehyd vil monosakkardidet henholdsvis være en D- eller L-isomer. D-isomerer dominerer blant heksosene i levende organismer. Oversikt over henholdsvis D-aldoser og D-ketoser finnes i Figur 3.3 og Figur 3.4.

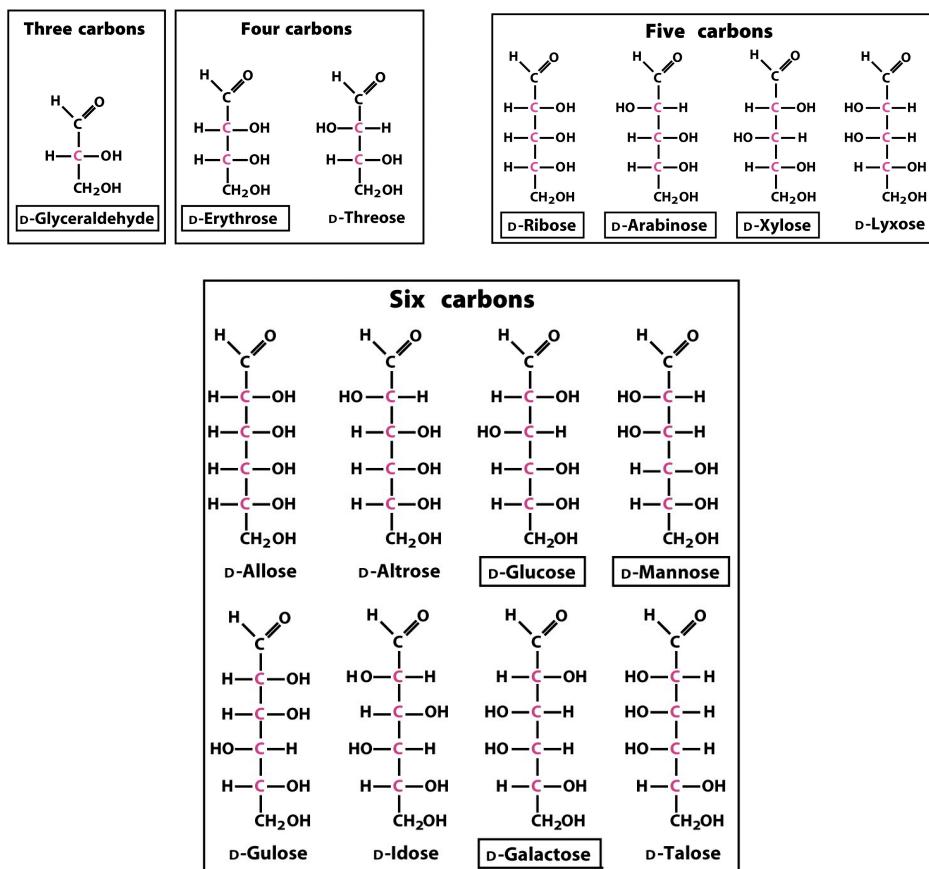
To sukker som bare er ulike på grunn av konfigurasjonen omkring ett karbonatom kalles **epimerer**. D-glukose er vist sammen med to av sine epimerer i Figur 3.2b



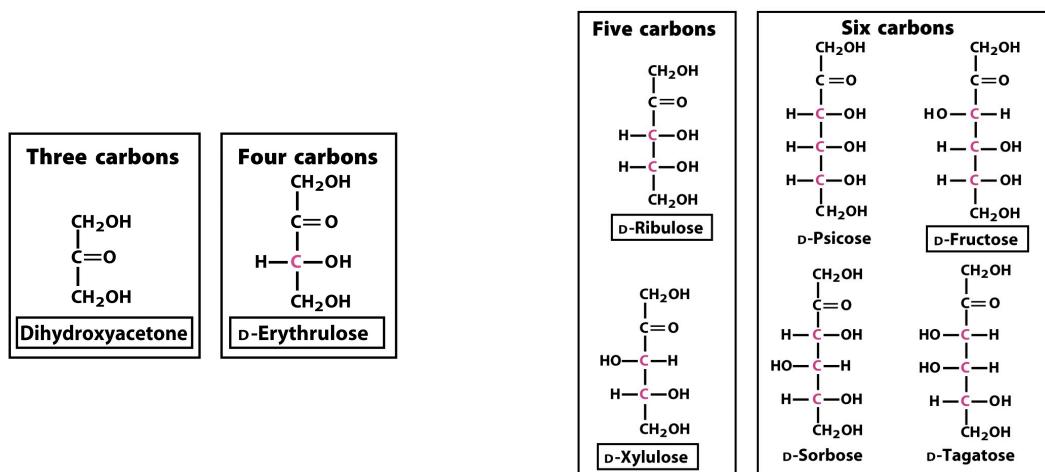
Figur 3.2.: (a) Tre ulike representasjoner av enantiomerer. (b) D-glukose sammen med to av sine epimerer. Hver epimer avviker fra D-glukose ved konfigurasjonen i ett kiralt senter som markert.

3.1.3. Syklisk struktur hos monosakkardider

I vandig løsning opptrer aldotetrosor og alle monosakkardider med fem eller flere karbonatomer i hovedkjeden i hovedsak som sykliske strukturer. Disse dannes ved at karbonylgruppen i det rettkjedete molekylet bindes kovalent til oksygenatomet i en OH-gruppe langs hovedkjeden. Reaksjonen følger en generell mekanisme hvor alkoholer reagerer med aldehyder eller ketoner og gir produkter kalt **hemiacetaler** eller **hemiketaler**. Disse forbindelsene inneholder et ekstra asymmetrisk karbon og kan følgelig eksistere i to stereoisomere former. Dersom OH-gruppen ved det anomeriske senteret er på samme side som OH-gruppen som er festet på det kirale senteret som er lengst unna i en Fischer-projeksjon, får isomeren prefikset α . I det omvendte tilfellet brukes β . Dannelsen av de sykliske isomerene α -D-glukopyranose og β -D-glukopyranose fra D-glukose er vist i Figur

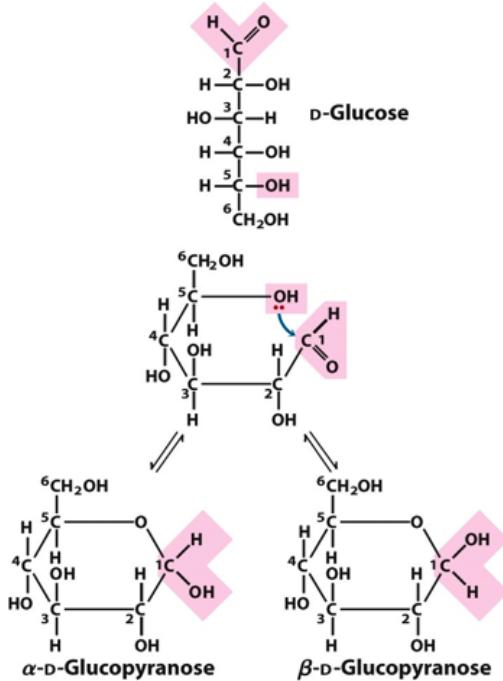


Figur 3.3.: D-aldoser.



Figur 3.4.: D-ketoser.

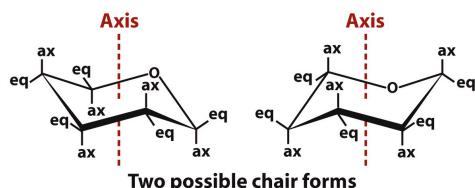
3.5. Sykliske monosakkirider kalles **pyranoser** dersom de har seks karbonatomer i ringen og **furanoser** dersom de har fem.



Figur 3.5.: Dannelse av de sykliske isomerene α -D-glukopyranose og β -D-glukopyranose fra D-glukose.

Isomeriske former av monosakkirider som kun avviker fra hverandre ved konfigurasjonen omkring hemiacetal-karbonet kalles **anomerer**. Hemiacetal-karbonet kalles derfor **anomert karbon**. α og β -anomerene til D-glukose kan interkonverteres i vandig løsning ved en prosess kalt **mutarotasjon**. Vandige løsninger av α - og β -D-glukose vil begge resultere i identiske likevektsblandingar over tid med omtrent 1/3 av α -isomeren og 2/3 av β -isomeren.

Haworth-perspektivformler, som vist i Figur 3.6 bruker ofte for å vise stereokjemien til ringformede monosakkirider. Av disse kan det ses at den sekskantede pyranoseringen ikke er planar, men finnes i én av to "stol"-konformasjoner.



Figur 3.6.: Haworth-formler for pyranoser. Ekvatorielle grupper blir aksielle og omvendt ved konformasjonsendring.

3.1.4. Heksosederivater

I tillegg til de enkle heksosene finnes det en lang rekke sukkerderivater hvor en hydroksylgruppe er erstattet av en annen substituent eller et karbonatom er oksidert til en carboksylgruppe. Amingrupper er vanlige substituenter, som regel med en acetylgruppe som følge av kondensasjon med eddiksyre. Fosforylering og metylering forekommer også ofte. Ved oksidasjon av karbonylkarbonet i en aldose dannes **aldonsyrer**. Oksidasjon a C-6 gir korresponderende **uronsyre**. Både aldon- og uronsyrer danner stabile intramolekylære estere kalt laktoner.

Fosforylerte sukekrderivater forekommer ofte som intermediater ved karbohydratmetabolisme. Disse fosfaterene dannes ved kondensasjon mellom fosforsyre og en OH-gruppe i et karbohydrat. Sukkerfosfater er relativt stabile under biologiske betingelser og vil i de fleste tilfeller ikke kunne transporteres ut av celler. Dette skyldes at få celler har de nødvendige transportproteinene i plasmamembranen. Fosforylering fungerer også aktiverende for videre reaksjoner.

3.2. Disakkilder

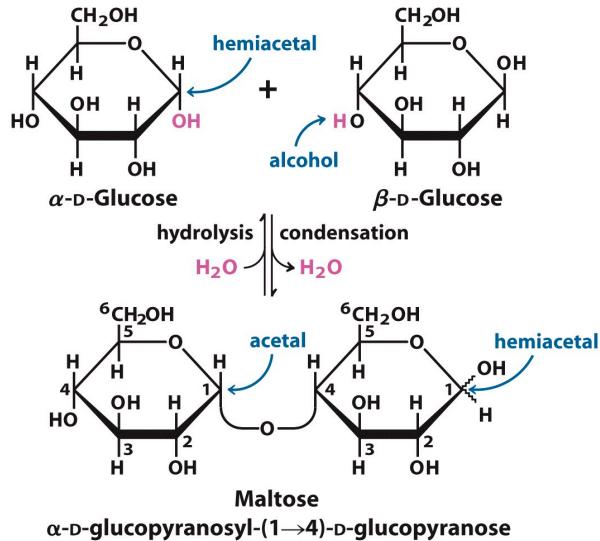
Oligosakkilder består av korte monosakkardkjeder festet sammen av karakteristiske glykosidbindinger. **Disakkilder** er oligosakkilder som inneholder to monosakkardenheter. Et typisk eksempel på en disakkrid er sukrose som er bygd opp av D-glukose og D-fruktose.

3.2.1. Glykosidbinding

De to monosakkardene i et disakkrid er koblet sammen via en **O-glykodisidbinding** som dannes ved kondensasjonsreaksjon mellom hydroksylgruppen til det ene sukkeret og anomerisk karbon hos det andre. Reaksjonen involverer dannelsen av en acetal fra en hemiacetal og en alkohol med et **glykosid** som produkt og er reversibel med hydrolyse av glykosidbindingen som motsatt reaksjon. Den reversible dannelsen av maltose er vist i Figur 3.7. Det kan bemerkles at glykosidbindinger hydrolyses lett av syrer men tåler behandling med baser.

3.2.2. Reduserende sukker

Glukose og andre sukker som er i stand til å redusere Cu^{2+} -ioner kalles **reduserende sukker**. Reaksjonen involverer oksidasjon av karbonylgruppen i et lineært sukkermolekyl, og krever derfor at det eksistere en likevekt mellom lineær og syklistisk form. Dette forutsetter anomerisk karbon, noe som for di- og polysakkilder kun kan finnes ved enden av en kjede. Enden med anomerisk karbon kalles av denne grunn **reduserende ende**. Laktose har anomerisk karbon tilgjengelig for oksidasjon og er derfor et reduserende sukker. Sukrose er et ikke-reduserende sukker, da det ikke innehar anomerisk karbon.



Figur 3.7.: Dannelse av disakkariden maltose ved kondensasjonsreaksjon mellom α -D-glukose (hemicetal) og β -D-glukose (alkohol).

3.3. Polysakkarider

Polysakkarider, også kalt **glykaner** er polymerer av monosakkarider. De består som regel av 20 eller flere monosakkarid-monomerer; noen har hundre- eller tusenvis av enheter. Ulike polysakkarider skiller fra hverandre ved identiteten til monosakkardene de er bygd opp av, kjedelengde, bindingstype i kjeden og i graden av forgrening. **Homopolysakkarider** inneholder bare én enkelt monomer, mens **heteropolysakkarider** inneholder to eller flere ulike typer. Noen homopolysakkarider, slik som stivelse og glykogen, fungerer som energilagre av monosakkarden de er bygd opp av. Andre, som cellulose og kitin, har strukturelle funksjoner i cellevegger hos planter og eksoskjelett hos dyr. Heteropolysakkarider gir ekstracellular støtte til alle typer organismer.

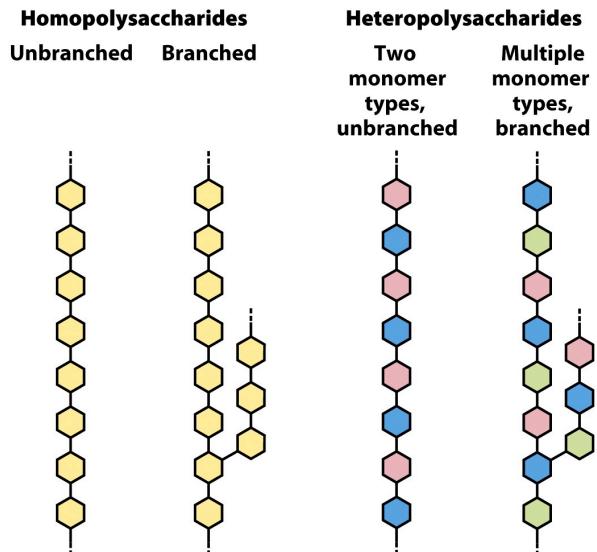
I motsetning til proteiner, har polysakkarider ingen fast størrelse og dermed ingen definerte molekylvekt. Dette følger av at syntese av polysakkarider ikke følger en mal, slik som ved proteinsyntese, og at prosessen dermed heller ikke har noe forhåndsbestemt slutt punkt.

3.3.1. Polysakkarider som energilagre

De viktigste energilagrende polysakkardene er stivelse i planteceller og glykogen i dyreceller. Begge opptrer intracellulært som store granuler og er ofte svært hydrerte som følge av at de har mange OH-grupper eksponert mot vann.

Stivelse inneholder to ulike glukose-polymerer, amylose og amylopektin. Førstnevnte eksisterer som lange, ugrenede kjeder av D-glukose-residuer sammenkoblet av $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ -bindinger, mens sistnevnte er et svært grenet polysakkarid med $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ -bindinger mellom glukose-enheter i en kjede og $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ -bindinger ved forgreningspunktene.

Det viktigste energilagrende polysakkaridet i dyreceller er **glykogen**. Glykogen er en



Figur 3.8.: Homo- og heteropolysakkarider.

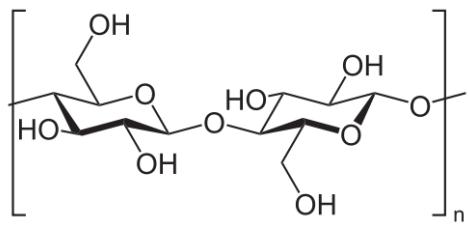
polymer av ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-koblede glukose-enheter med ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-koblede grener. Glykogen er noe mer forgrenet og kompakt enn stivelse. Hver gren i glykogen ender med en ikke-reduserende sukkerenehet og et glykogenmolekyl med n grener har derfor $n + 1$ reduserende ender og én reduserende ende. Når glykogen brukes som energikilde, fjernes glukoseenhettene én etter én fra de ikke-reduserende endene.

Dekstraner finnes i bakterier og gjær og består av ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-koblet poly-D-glukose. Alle dekstraner har ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-grener, noen har også ($\alpha 1 \rightarrow 2$)- eller ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-grener.

3.3.2. Strukturelle polysakkarider

Cellulose er et slitesterkt, fibrøst polysakkaride som ikke er løselig i vann. Cellulosemolekylet består av 10,000 til 15,000 repeterete ($\beta 1 \rightarrow 4$)-koblede D-glukose-enheter som vist i Figur 3.10. Molekylet er ugrenet. Amylose, ett av de to polysakkardene som inngår i stivelse, ligner strukturmessig svært mye på cellulose, men har ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-glykosidbindinger mellom D-glukose-enhetene. Denne forskjellen gir amylose og cellulose svært ulike strukturelle og fysikalske egenskaper. De fleste dyr mangler enzymer som kan bryte ($\beta 1 \rightarrow 4$)-bindinger og kan derfor ikke utnytte cellulose som energikilde uten assistanse fra symbiotiske mikroorganismer. ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-bindingene i amylose brytes imidlertid lett ned.

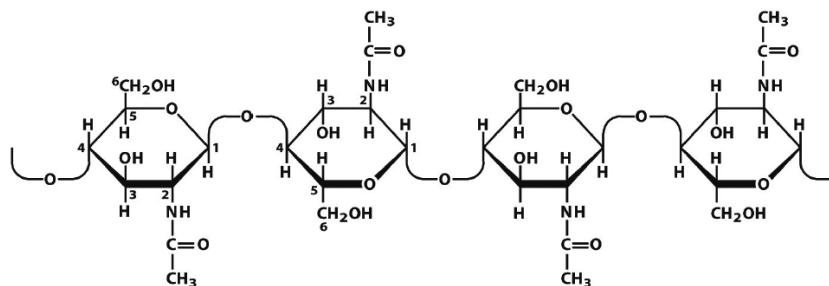
I sin mest stabile konformasjon står alle D-glukose-enhetene i cellulose 180° på sine naboyer, noe som resulterer i en rett kjede hvor alle $-OH$ -grupper er tilgjengelige for hydrogenbinding med omgivelsene. Flere kjeder som ligger side om side vil danne et stabilisert polymernettverk ved hjelp av hydrogenbindinger innad i og mellom kjedene; resultatet er rette og stabile supramolekulære fibre med høy bestandighet for mekanisk stress. Ettersom $-OH$ -gruppene i all hovedsak opptas innad i polymernettverket på denne måten, har cellulose i liten grad mulighet til å danne hydrogenbindinger med omgivende vannmolekyler. Cellulose er følgelig uløselig i vann, noe som enkelt kan rasjonaliseres:



Figur 3.9.: ($\beta 1 \rightarrow 4$)-koblede D-glukose-enheter utgjør den minste repeterende enheten i cellulose.

det ville vært upraktisk for planter dersom deres viktigste byggemateriale hadde vært vannløselig.

Kitin er et lineært homopolysakkharid som består av *N*-acetylglukosamin-residuer koblet sammen av ($\beta 1 \rightarrow 4$)-bindinger. Den eneste kjemiske forskjellen mellom kitin og cellulose er at OH-gruppen på C-2 er erstattet av en acetyltetrahydrofuranamingruppe i kitin. Kitin danner ekstensive fibre som ligner på cellulosefibre og kan ikke fordøyes av de fleste dyr. Polysakkharidet utgjør den viktigste strukturelle komponenten i eksoskjelettene til et enormt antall leddyr som insekter og skalldyr.



Figur 3.10.: Et kort kitinsegment med *N*-acetylglukosaminer koblet sammen ved ($\beta 1 \rightarrow 4$)-bindinger.

4. Nukleotider og nukleinsyrer

Nukleotider har en lang rekke roller i cellulær metabolisme. De tilfører energi til metabolske reaksjoner, er avgjørende for cellers respons på hormoner og andre ekstracellulære stimuli, de er strukturelle komponenter i svært mange kofaktorer og metabolske intermediate og viktigst av alt: de er byggesteiner i nukleinsyrene DNA (deoksyribonukleinsyre) og RNA (ribonukleinsyre).

Aminosyresekvensene til alle proteiner og nukleotidsekvensen i alle RNA-molekyler bestemmes av rekkefølgen til nukleotidene i DNA. Et segment av et DNA-molekyl som inneholder informasjonen som er nødvendig for syntese av et funksjonelt biologisk produkt, enten et protein eller et RNA-molekyl, kalles et **gen**. Lagring og overføring av biologisk informasjon er de eneste kjente funksjonene til DNA.

Det finnes flere klasser RNA. **Ribosomalt RNA (rRNA)** er komponenter i ribosomer. **Messenger RNA (mRNA)** frakter genetisk informasjon fra gener til ribosomer og er således intermediater på veien fra DNA til protein. **Transfer RNA (tRNA)** gjenkjenner spesifikke sekvenser i mRNA og frakter aminosyrer til ribosomer ved translasjon.

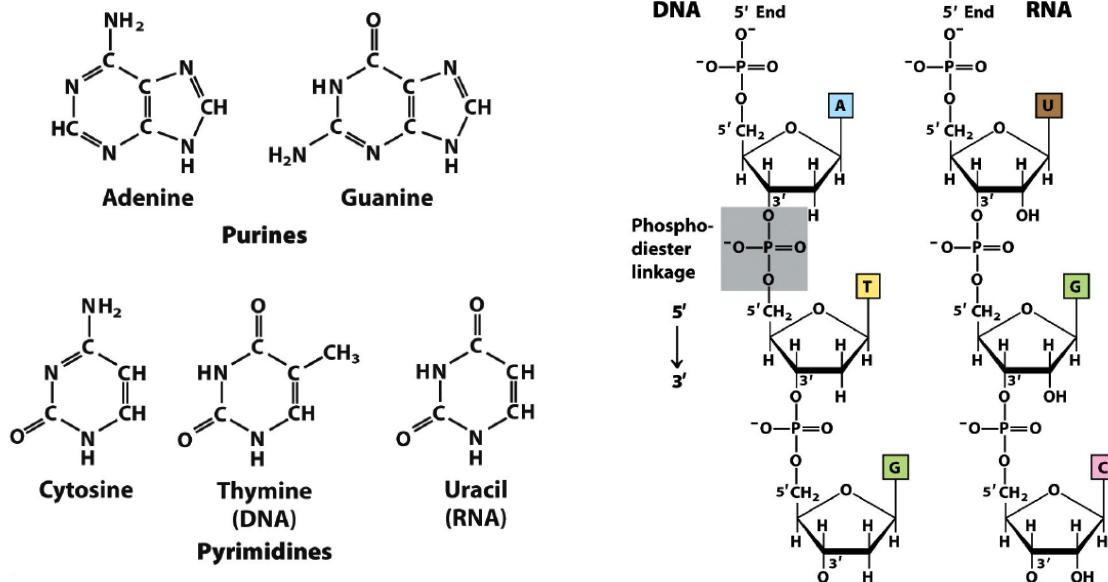
4.1. Nukleotider

4.1.1. Struktur hos nukleotider

Nukleotider er molekulære komplekser bestående av et fosfat, en pentose og en nitrogenholdig base. Uten fosfatgruppen kalles molekylet en **nukleosid**. Både nitrogenbasen og pentosen er heterosykliske forbindelser og alle nitrogenbaser som inngår i nukleotider er derivater av **pyrimidin** eller **purin**. Basene er kovalent bundet (på N-1 i pyrimidiner og N-9 i puriner) ved *N*- β -glykosylbinding til 1'-karbonet i pentosen og fosfatet er esterifisert til 5'-karbonet. *N*- β -glykosylbindingen dannes på samme måte som *O*-glykosylbindinger, altså ved kondensasjonsreaksjon med avgivelse av H₂O.

De viktigste basene i nukleinsyrer er **adenin** (A), **guanin** (G), **cytosin** (C), **tymin** (T) og **uracil**. Adenin og guanin er puriner, cytosin, tymin og uracil er pyrimidiner. Adenin, guanin og cytosin finnes både i DNA og RNA. Tymin finnes så godt som bare i DNA og erstattes av uracil i RNA. Strukturen til de fem hovedbasene er vist i Figur 4.1.

Nukleotidene i DNA og RNA inneholder ulike strukturelle sukkerenheter, 2'-deoksyD-ribose i DNA og D-ribose i RNA, som skiller ved at 2'-karbonet i førstnevnte ikke er bundet til oksygen. Det er fra disse strukturelle sukkerenhettene DNA og RNA henter sine navn. I nukleotider forekommer begge typene pentose i β -furanose-form med pentoseringen i "puckered" konformasjon. De strukturelle enhetene i DNA og RNA kalles henholdsvis **deoksyribonuleotider** og **ribonukleotider**. Struktur og navn på disse er vist i Figur 4.1.



(a) Purin- og pyrimidinbasene som inngår i DNA og RNA.

(b) Nukleotidkjeder i DNA og RNA.

Figur 4.1.: Nitrogenbasene og oppbygning av nukleotidkjeder i DNA og RNA.

4.1.2. Alternativ nukleotidstruktur i DNA og RNA

I tillegg til de fem hovedtypene, inneholder både DNA og RNA enkelte mindre vanlige basetyper. Vanligst i DNA er metylerte utgaver av hovedbasene; enkelte baser kan også forekomme hydroksymetylert eller glukosylert i viralt DNA. Modifiserte eller uvanlige baser i DNA har ofte regulatoriske eller beskyttende roller. Mindre vanlige baser forekommer også i RNA, særlig i tRNA.

Nukleotider med fosfatgrupper plassert andre steder enn på 5'-karbonet forekommer også. **Ribonukleosid-2'-3'-sykliske monofosfater** er intermedier som kan isoleres og **ribonukleosid-3'-monofosfater** er sluttprodukter ved hyrdolyse av RNA av enkelte ribonukleaser. Andre viktige variasjoner er syklistisk adenosinmonofosfat (cAMP) og syklistisk guanosinmonofosfat (cGMP).

4.1.3. Struktur hos polynukleotider

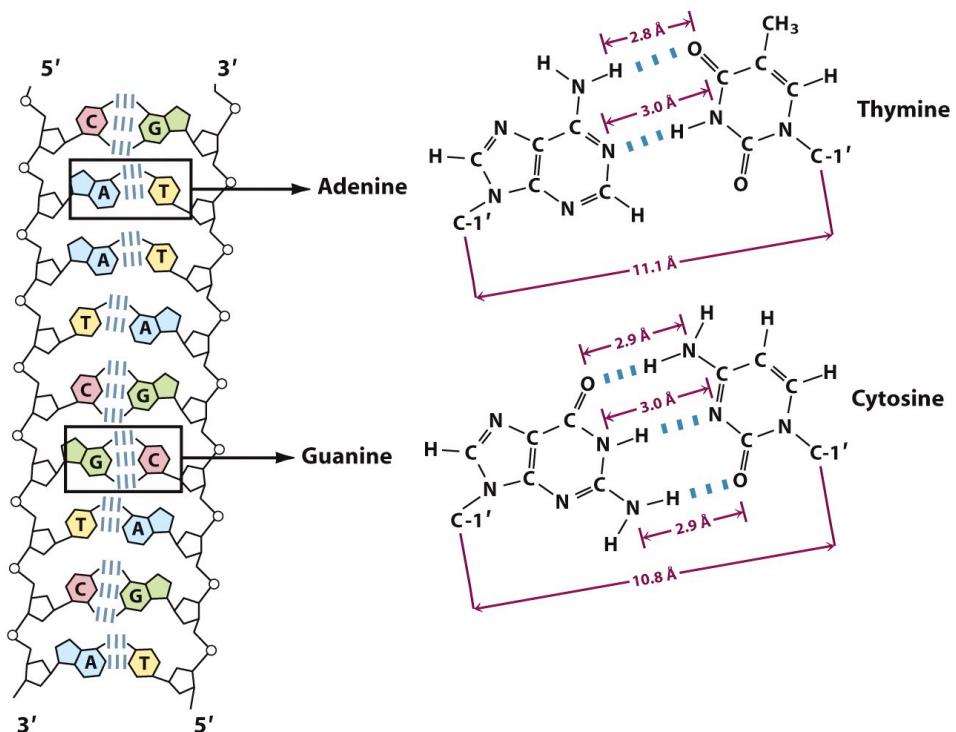
Nukleotider i DNA og RNA er kovalent bundet via **fosfodiesterbindinger**, hvor 5'-fosfatgruppen i én nukleotid bindes til 3'-OH-gruppen i den neste. Nukleinsyrene får således en ryggrad bestående av fosfat- og pentose-residuer hvor nitrogenbasene kan betraktes som sidegrupper koblet til ryggraden ved regulære intervaller. Denne ryggraden er hydrofil som følge av hydrogenbinding mellom vann og hydroksylgruppene i pentosen og

den negative ladningen til fosfatet ved pH 7. Fosfodiesterbindingene er utsatt for langsom nedbrytning ved hydrolyse.

En kort nukleinsyre kalles en **oligonukleotid**, mens lengre polymerer av nukleotider kalles **polynukleotider**. Strukturen til nukleotidkjedene i DNA og RNA er vist i Figur 4.1.

4.1.4. Effekt av nukleotidstruktur på nukleinsyrenes tredimensjonale struktur

Både pyrimidiner og puriner er svakt basiske i fri form, noe som forklarer bruken av betegelsen nitrogenbaser. De er også aromatiske forbindelser, en egenskap med avgjørende konsekvenser for egenskaper som struktur, elektronfordeling og lysabsorpsjon hos nukleinsyrer. Elektronene i molekylene aromatiske ringer er delokalisert, noe som gir de fleste bindingene partiell dobbeltbindingskarakter og sørger for at pyrimidiner har plan struktur mens puriner er tilnærmet plane med en svak knekk. Dette er av stor betydning for nukleinsyrestruktur. Merk at frie pyrimidiner og puriner eksisterer i to eller flere tautomere former, med strukturene vist i Figur 4.1 som dominerende strukturer ved pH 7.



Figur 4.2.: Komplementær baseparering i DNA med hydrogenbindinger mellom basene.

Videre er både puriner og pyrimidiner hydrofobiske og relativt uløselige i vann ved tilnærmet nøytral pH. Løseligheten øker med økende pH. Hydrofobiske interaksjoner mellom stablede baser, altså interaksjoner mellom baser plassert i parallele plan i forhold til

hverandre, er én av to svært viktige interaksjoner mellom baser i nukleinsyrer. Stablingen involverer også en kombinasjon av van der Waals- og dipol-dipol-interaksjoner mellom basene. Basestabling minimaliserer kontakt mellem basene og vann og virker stabilisering på nukleinsyrenes tredimensjonale struktur.

De funksjonelle gruppene i pyrimidiner og puriner er ringnitrogener, karbonylgrupper og eksosyklike aminogrupper. Hydrogenbindinger som involverer amino- og karbonylgruppene står for de viktigste interaksjonene baser imellom og mellom to komplementære nukleinsyretråder. Disse hydrogenbindingene sørger for **komplementær baseparering**, det vanligste bindingsmønsteret mellom to tråder nukleinsyre, hvor A bindes spesifikt til T (eller U) via tre hydrogenbindinger og G til C via to hydrogenbindinger. Denne spesifikke paringen holder to nukleinsyretråder sammen, samtidig som den tillater kopiering, og dermed bevaring, av genetisk informasjon. Hydrogenbindingsmønstre ved komplementær baseparering er vist i Figur 4.2

4.2. Stuktur hos nukleinsyrer

På samme måte som for proteinstruktur, kan nukleinsyrerstruktur betraktes på ulike nivåer med økende kompleksitet. Disse nivåene er generelt definert som følger:

1. *Primær struktur.* Kovalent struktur og nukleotidsekvens.
2. *Sekundær struktur.* Hvilken som helst vanlig, stabil struktur som kan antas av hele eller deler av nukleotidsekvensen. Dette inkluderer for eksempel den kjente doble heliksen.
3. *Tertiær struktur.* Kompleks folding av store kromosomer i eukaryot kromatin og bakterielle nukleotider.

4.2.1. Dobbel heliks

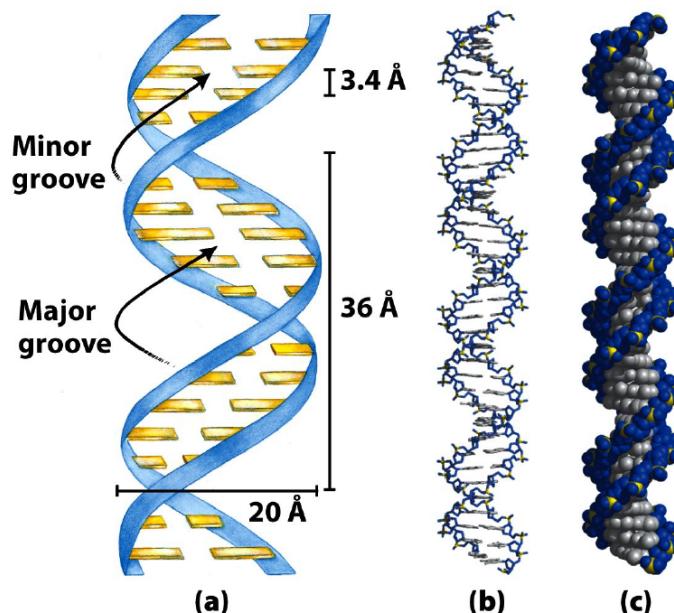
James D. Watson og Francis Cricks postulerte i 1953 en tredimensjonal modell av DNA-struktur som redegjorde for alle tilgjengelige eksperimentelle data. De konkluderte med at DNA i levende celler er et dobbelttrådig molekyl hvor begge tråder er kvelet rundt samme akse i en høyrehendt dobbel heliks. Den hydrofile ryggraden med alternerende deoksyribose og fosfat befinner seg på utsiden av heliksen, ut mot det omgivende vannet. Furanoseringen i hver deoksyribose er i C-2'-endokonformasjon. Purin- og pyrimidinbasene i begge tråder er stablet på innsiden av heliksen med de hydrofobiske og tilnærmet planare ringstrukturene tett pakket og vinkelrett på aksen i lengderetningen.

Paringen mellom basene gir opphav til to repeterende enheter på utsiden av heliksen, **major groove** og **minor groove**, med samlet lengde på omtrent 36 Å (3,6 nm). Heliksen diameter er anslått til 10 Å og én nukleotid er omtrent 3,4 Å lang. Alt dette kan ses i illustrasjonen av dobbel heliks i Figur 4.3. Hver nukleotidbase i den ene tråden er paret med en base fra den andre tråden i samme plan. Det er viktig å huske at tre hydrogenbindinger kan dannes mellom G og C, mens bare to kan dannes mellom A og T. Dette er én av grunnene til at separasjon av parede DNA-tråder blir vanskeligere jo

høyere andelen $G \equiv C$ blir i forhold til $A = C$. Andre paringer enn de nevnte vil som regel destabilisere heliksstrukturen.

Som tidligere nevnt, holdes den doble heliksen sammen av to typer krefter: hydrogenbindinger mellom baseparene og hydrofobiske interaksjoner mellom stablede baser. Komplementariteten til basene følger av hydrogenbindingsmønsteret mellom basene, mens stabiliteten til heliksstrukturen i størst grad skyldes interaksjonene mellom de stablede basene.

Trådene i dobbel heliks er antiparallele og har følgelig en 3'-ende og en 5'-ende, avhengig av hvilket karbonatom i deoksyribosen tråden begynner og avslutter med. Pentosene i de to trådene er med andre ord rettet i motsatte retninger. Dette medfører, i kombinasjon med komplementær baseparering, at den genetiske informasjonen i DNA er den samme uansett hvilken tråd som leses av.



Figur 4.3.: Tre ulike modeller av DNA-molekylets doble heliks.

4.2.2. Alternative tredimensjonale strukturer hos DNA

DNA er et svært fleksibelt molekyl. Rotasjon er mulig rundt flere ulike typer bindinger i ryggraden til molekylet og termisk variasjon kan bøye, strekke og skille de to trådene. Mange betydelige avvik fra dobbel heliks-struktur finnes i cellulært DNA og disse kan være viktige for DNA-metabolisme.

Strukturell variasjon i DNA reflekterer tre egenskaper:

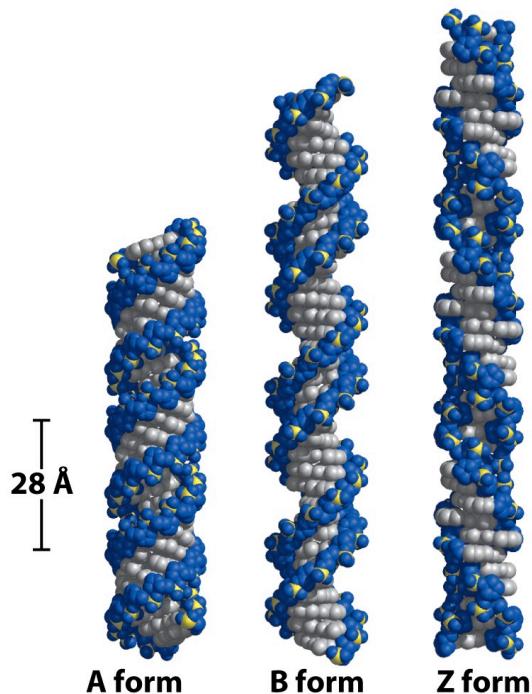
1. *De forskjellige mulige konformasjonene til deoksyribosen.*
2. *Rotasjon om bindingene i fosfodeoksyribose-ryggraden.*

3. Fri rotasjon om C-1'-N-glykosylbindingen (bindingen mellom pentosen og basen).

På grun av steriske hindringer, er puriner som inngår i nukleotider begrenset til to stabile konformasjoner i forhold til deoksrybose, kalt syn og anti. Pyrimidiner er generelt begrenset til anti-konformasjonen på grunn av steriske interaksjoner mellom sukkeret og karbonyloksygen på pyrimidinets C-2.

Dobbel heliks kalles også **B-form-DNA**, eller B-DNA. Denne er den mest stabile for et DNA-molekyl med tilfeldig sekvens under biologiske betingelser. To andre strukturelle varianter som begge er godt eksperimentell karakterisert er **A-form** og **Z-form**. A-form er en høyrehendt dobbelheliks som favoriseres i mange løsninger hvor det er relativt lite vann til stede. Heliksen er bredere enn i B-form og antall basepar per rund er 11, ikke 10.5 som i B-form. Baseparenes plan har dessuten en helning på omtrent 20° i forhold til heliksaksen.

Z-form skiller seg mer radikalt fra B-form, først og fremst på grunn av at heliksen er venstrehendt. Strukturen har 12 basepar per runde og er generelt tynnere og mer elongert enn B-formen. Enkelte nukleotidsekvenser folder seg i Z-form enklere enn andre; et eksempel er sekvenser hvor pyrimidiner alternerer med puriner, særlig C og G eller 5-metyl-C og G. Ved dannelsen av Z-DNA får purinene syn-konformasjon og alternerer med pyrimidiner i anti-konformasjon. Korte Z-DNA-sekvenser er påvist både i bakterier og eukaryoter, og det antas at strukturen har regulatorisk funksjon. A-, B- og Z-DNA er vist i Figur 4.4.

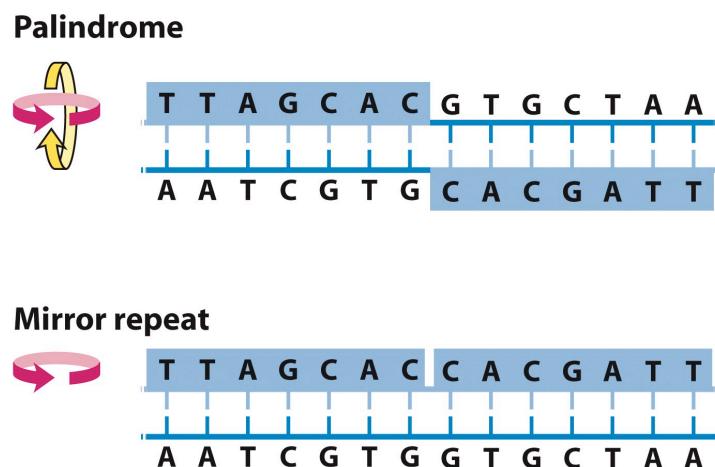


Figur 4.4.: A-DNA, B-DNA og Z-DNA.

4.2.3. Spesielle DNA-sekvenser

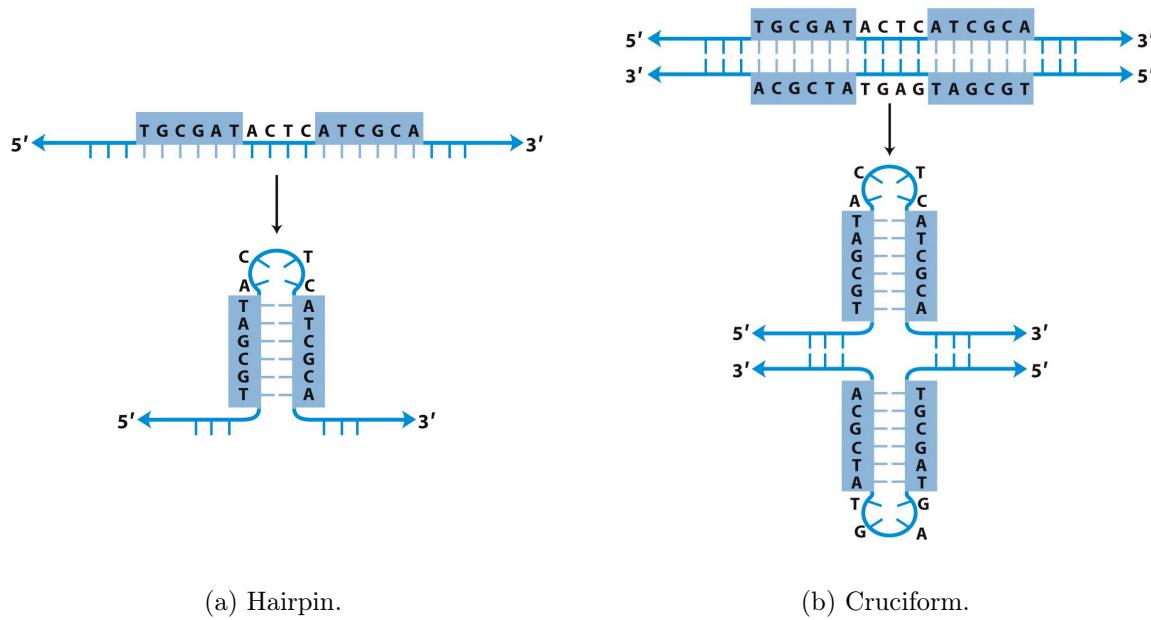
Enkelte sekvensavhengige strukturelle variasjoner påvirker funksjon og metabolisme kun i de nærmeste omgivelsene. Dersom fire eller flere A-residuer er plassert etter hverandre, vil det for eksempel oppstå en bøy på omtrent 18° i molekylet som kan være viktig ved binding av enkelte proteiner.

En vanlig sekvenstype er **palindromer**, DNA-sekvenser som er like uansett hvilken tråd som avleses. Dette gjelder sekvenser som har tofoldig symmetri over to DNA-tråder, slik at de er komplementære med seg selv og kan danne strukturer kalt **hairpin** eller **cruciform**. I levende celler utgjør palindromer bindingsster for mange sekvensspesifikke DNA-bindende proteiner. Dersom en sekvens er invertert innad i hver DNA-tråd, kalles den en **mirror repeat**. Slike sekvenser er ikke i stand til å basepare med en sekvens i samme tråd og kan derfor ikke gi opphav til hairpins eller cruciforms. Palindromer og mirror repeats er illustrert i Figur 4.5



Figur 4.5.: Palindrom og mirror repeat, to repetitive DNA-sekvenser.

Mange uvanlige DNA-strukturer involverer tre eller til og med fire DNA-tråder. Nukleotider som inngår i Watson-Crick-baseparing kan danne flere hydrogenbindinger, særlig med funkjsonelle grupper som er plassert i major groove. En protonert C-residue kan for eksempel pares med G i et G≡C-par eller en T-residue kan pares med A i et A=T-par. N-7, O⁶ og N⁶ i puriner, atomene som kan delta ved hydrogenbinding i tripleks-DNA, kalles ofte **Hoogsteen-aposisjoner** og baseparing som ikke følger Watson og Cricks modell kalles tilsvarende **Hoogsteen-paring**. **Tripleks-DNA** er DNA-strukturer som inneholder tre DNA-tråder. Fire tråder kan også kombineres til et **tetrapleks**. Tetraplekser av guanin, **G-tetraplekser**, er forholdsvis stabile under en lang rekke betingelser.



Figur 4.6.: Palindromer kan gi opphav til hairpins og cruciforms.

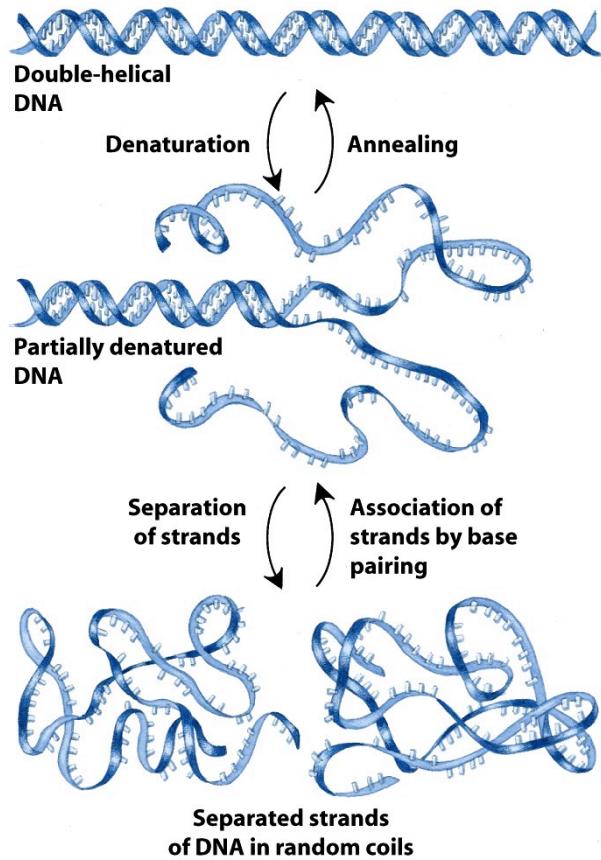
4.3. Nukleinsyrenes kjemiske egenskaper

Rollen til DNA som lagringsmedium for genetiske informasjon avhenger i stor grad av molekylets iboende stabilitet. Dersom kjemiske reaksjoner forekommer, er de som regel svært langsomme uten enzymatisk katalyse. Bevaring av informasjonen i DNA over tid er imidlertid så viktig for en celle at selv svært langsomme endringer i DNA-struktur kan være av betydning. Prosesser som karsinogenese og aldring kan være tett koblet til langsomt akkumulerte, irreversible endringer i DNA.

4.3.1. Denaturering av dobbelttrådig DNA og RNA

På samme måte som varme og ekstreme pH-verdier kan denaturere globulære proteiner, vil slike betingelser forårsake denaturering, eller smelting, i dobbelttrådig DNA. Brytning av hydrogenbindingene mellom basene og forstyrring av basestabilisering medfører åpning av den doble heliksen og dannelse av to separate tråder langs hele eller deler av molekylet.

Dersom de to DNA-trådene fortsatt henger sammen med ca. 12 residuer etter denaturering, er renaturering en rask ettrinnsprosess. Når temperatur eller pH returneres til området som er normalt i organismer, vil de åpnede segmentene gå spontant sammen igjen til det opprinnelige duplekset. Dersom de to trådene er fullstendig separert, skjer renaturering i to trinn, hvorav det første er relativt langsomt. De to trådene "finner" hverandre ved tilfeldige kollisioner og danner et kort dobbel heliks-segment, før de øvrige basene i molekylet raskt basepares slik at strukturen lukkes til dobbel heliks. Denaturering og renaturering av DNA er illustrert i Figur 4.7



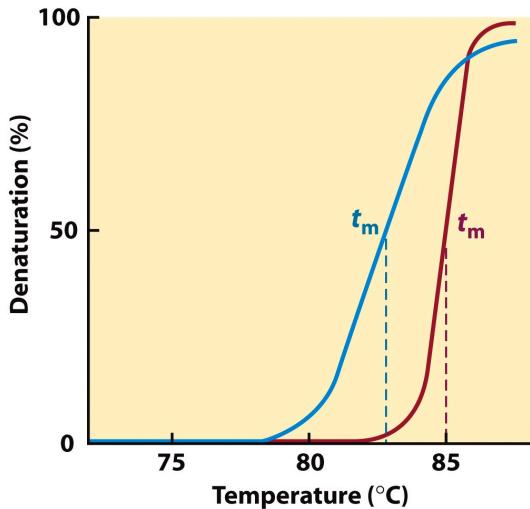
Figur 4.7.: Fullstendig og delvis denaturering og renaturering av DNA.

Hvert DNA-molekyl har en karakteristisk denatureringstemperatur, eller smeltepunkt (t_m), som er definert som temperaturen hvor halvparten av molekylet forekommer som enkle tråder. Dette er illustrert i Figur 4.8. Jo høyere innholdet av G≡C er, jo høyere er molekylets smeltepunkt. Dersom de denaturerende betingelsene kontrolleres nøyne, vil regioner som er rike på A=T denatureres spesifikt. Dette reflekteres også i åpningen av heliksen ved replikasjon og transkripsjon; initiering skjer ofte i regioner som er rike på A- og T.

Duplekser av RNA kan også denatureres, men slike strukturer er generelt mer stabile enn DNA-duplekser.

4.3.2. Hybridisering

To komplementære DNA-tråders evne til å pares med hverandre kan utnyttes til å detektere lignende DNA-sekvenser i to ulike arter eller innad i én enkelt art. Når lignende sekvenser i to ulike tråder går sammen kalles de resulterende strukturene **hybridduplekser**. Hybridisering er den vanligste sekvensbaserte prosessen for lokalisering av et spesifikt gen eller andre DNA-fragmenter.



Figur 4.8.: DNA denatureres av varme og har en karakteristisk smeltetemperatur, t_m , hvor halvparten av molekylet forekommer som enkle tråder.

4.3.3. Metylering av baser i DNA

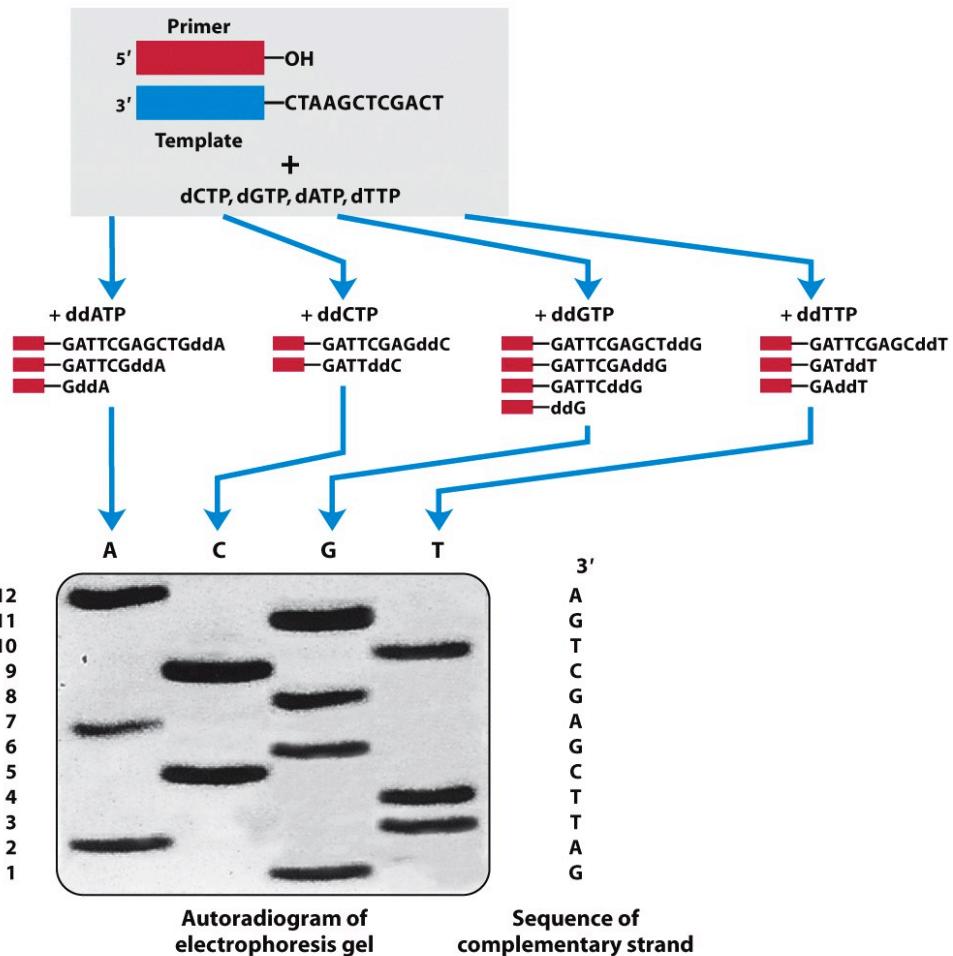
Noen nukleotidbaser i DNA metyleres enzymatisk. Adenin og cytosin metyleres oftere enn guanin og tymin. Metylering er som regel begrenset til enkelte sekvenser eller regioner i et DNA-molekyl. I enkelte tilfeller er metyleringens funksjon forstått, men det er også ofte uklart hvorfor prosessen skjer. Alle kjente DNA methylaser bruker *S*-adenosylmetionin som metylgruppdonor. I eukaryote celler er omtrent 5 % av cytidin-residuene i DNA metylert til 5-methylcytidin.

4.3.4. Sekvensering av DNA

DNA-sekvensering er bestemmelse av et DNA-molekyls viktigste egenskap: rekkefølgen til nukleotidene. Frem til slutten av 1970-tallet var sekvensering, selv av svært korte sekvenser, en svært arbeids- og tidkrevende oppgave. Dette ble forandret i 1977, da to nye teknikker, Sanger- og Maxam-Gilbert-sekvensering, som gjorde det mulig å sekvensere større DNA-molekyler raskere og mer effektivt enn man tidligere kunne drømme om. Nye metoder for syntese av DNA kom på samme tid.

Både Sanger- og Maxam-Gilbert-sekvensering baserer seg på det samme generelle prinsippet om å redusere DNA-informasjonen til fire sett av markerte fragmenter. Hvert sett produseres av en basespesifikk reaksjon, slik at lengden på fragmentene som dannes svarer til posisjoner i DNA-sekvensen hvor denne basen forekommer. For en oligonukleotid med sekvensen 5'-pAATCGACT-3', markert på 5'-enden, vil en reaksjon som bryter sekvensen ved hver C generere to ulike markerte fragmenter: ett på fire nukleotider og ett på syv. Bare fragmenter med markering vil visualiseres og størrelsen på disse fragmentene vil svare til de relative posisjonene til C i sekvensen. Når elektroforese utføres side om side på fire sett av fragmenter, ett for hver av de fire nukleotidene, oppstår et båndmønster hvor baserekkefølgen kan leses av direkte.

Sanger-metoden er teknisk enklere å utføre enn Maxam-Gilbert-metoden og er følgelig mer utbredt. I dag utføres DNA-sekvensering hovedsaklig ved en variasjon av Sangers metode, hvor ulike dideoksynukleotider med fluorescente markeringer brukes for hver reaksjon. Med denne teknologien kan DNA-molekyler på flere tusen nukleotider sekvenseres på få timer. Et eksempel på Sanger-sekvensering av DNA er vist i Figur 4.9.



Figur 4.9.: Eksempel på Sanger-sekvensering av DNA.

4.3.5. DNA-syntese

Den vanligste metoden for DNA-syntese er fosforamiditt-metoden. Metoden lar seg lett automatisere og er konseptuelt lik metodene som brukes ved proteinsyntese. DNA-tråden syntetiseres med den ene enden festet i et fast holdepunkt (eksempelvis silisium) og hver nukleotid tilføres med en beskyttende DMT-gruppe på 5'-hydroksylgruppen slik at rekkefølgen kan styres. Den beskyttende gruppen fjernes ved syrevask mellom hver tilførsel av nukleotider. Nukleotidene binder seg til hverandre ved hjelp av et reaktivt fosforamiditt festet til 3'-hydroksylgruppen.

Del II.

Metabolisme

5. Glyklysen og glukoneogenesen

5.1. Glyklysen

Glyklysen (av gresk *glykys*, "søtt" eller "sukker", og *lysis*, "splittelse") er en nærmest universell metabolsk prosess, hvor et glukose-molekyl brytes ned til to pyruvat-molekyler i en serie enzymkatalyserte reaksjoner. Den finner sted i cellens cytosol hos både prokaryoter og eukaryoter og står i de fleste celler for det største bidraget til den totale karbonfluksen.

5.1.1. Glyklysen er svært konservert

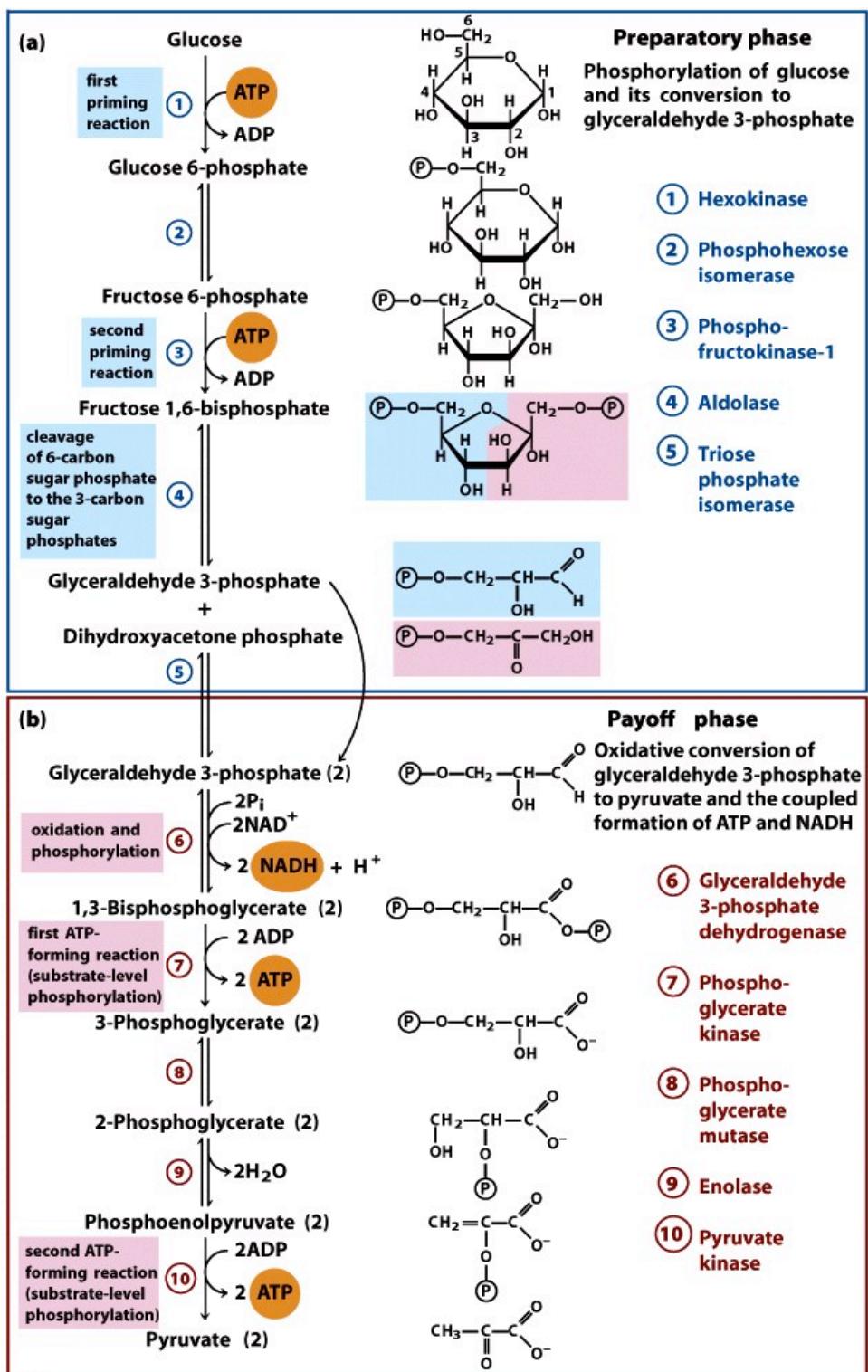
Fermentering er en generell betegnelse på *anaerob* degradering av glukose eller andre organiske næringsstoffer for utvinning av energi i form av ATP. Ettersom levende organismer først oppsto i en atmosfære uten oksygen, antas det at anaerob nedbrytning av glukose er den eldste biologiske mekanismen for utvinning av energi fra organiske molekyler. Antagelsen styrkes av at kjemien i reaksjonssekvensen er fullstendig konservert; de glykolytiske enzymene i virveldyr er for eksempel svært like de tilsvarende enzymene i spinat, både i aminosyresekvens og tredimensjonal struktur. Der det finnes ulikheter i glyklysen mellom arter, går disse på detaljer i reguleringen av prosessen eller skjebnen til pyruvat-molekylene som dannes.

5.1.2. Oversikt: Glyklysens to faser

Oversikt over gyklysen finnes i Figur 5.1. Av figuren kan det ses at prosessen kan deles inn i to faser, én som forbruker energi og én som gir energiutbytte i form av ATP, med fem reaksjonstrinn hver:

1. *Forberedende fase* (trinn ① - ⑤). Energien i ATP investeres med økning av den frie energien til de dannede intermediatene som resultat. Karbonkjedene til alle metaboliserte heksoser konverteres til et felles produkt, glyeraldehyd-3-fosfat.
2. *Gjenvinningsfase* (trinn ⑥ - ⑩). Et netto energiutbytte på to ATP-molekyler per glukosemolekyl hentes ut av prosessen. Energi konserveres også i form av to molekyler av elektronbæreren NADH.

Merk i det følgende at D-symbolet ofte vil utelates ved beskrivelse av sukker og sukkerderivater, da alle forbindelser av denne typen som inngår i glyklysen er D-isomerer.



Figur 5.1.: Oversikt over glykolyesen. (a) Forberende fase. (b) Gjenvinningsfase.

Oppsummering av forberedende fase

I den forberedende fasen fosforyleres glukosemolekylet på C-1 og C-6 og kløyves deretter til to glyeraldehyd-3-fosfat-molekyler. Fasen begynner med fosforyleringen av glukose ved hydroksylgruppen på C-6 (trinn ①). Deretter konverteres D-glukose-6-fosfat til D-fruktose-6-fosfat (trinn ②) som videre fosforyleres på C-1 til D-fruktose-1,6-bisfosfat (trinn ③). ATP er fosfatgruppdonor ved begge fosforyleringer. Videre splittes D-fruktose-1,6-bisfosfat til to trekarbonmolekyler, dihydroksyacetonfosfat og glyeraldehyd-3-fosfat (trinn ④). Det er denne splittelsen ("lysis") som har gitt prosessen navnet glykolyse. Hydroksyacetonfosfat isomeriseres til glyeraldehyd-3-fosfat i trinn 5, slik at to molekyler av denne forbindelsen er resultatet ved slutten av forberedende fase. Fra et kjemisk perspektiv er isomeriseringen i trinn ② en kritisk forberedelse til fosforylering og kløyving av C-C-bindinger i trinn ③ og ④.

Oppsummering av Gjenvinningsfase

Hvert glyeraldehyd-3-fosfat-molekyl oksideres og fosforyleres av uorganisk fosfat (ikke ATP) slik at 1,3-bisfosfoglyserat dannes (trinn ⑥). Energi frigjøres ved konvertering av hvert av de to 1,3-bisfosfoglyseratmolekylene til pyruvat i trinn ⑦ - ⑩. Mye av denne energien konserveres ved koblet fosforylering av ADP til ATP.

5.1.3. Pyruvats skjebner

Pyruvat dannet i glyklysen kataboliseres videre via én av tre mulige katabolske ruter. Merk at pyruvat også kan ha anabolske skjebner, for eksempel som karbonskjelett ved syntese av aminosyren alanin eller fettsyresyntese. De katabolske skjebnene til pyruvat er vist i Figur 5.2

Oksidasjon til CO_2

I aerobe organismer eller vev, under aerobe betingelser, er glyklysen bare første trinn i den fullstendige degraderingen av glukose. Pyruvat oksideres videre, med tap av karboksylgruppen som CO_2 , til acetyl-koenzym-A (Acetyl-CoA). Acetylgruppen fra Acetyl-CoA går deretter inn i sitronsyresyklusen og oksideres der fullstendig til CO_2 . Elektronene fra reaksjonen går via en serie elektronbærere i mitokondriene til O_2 med resulterende dannelse av H_2O . Energien fra de elektronoverførende reaksjonene driver syntesen av ATP.

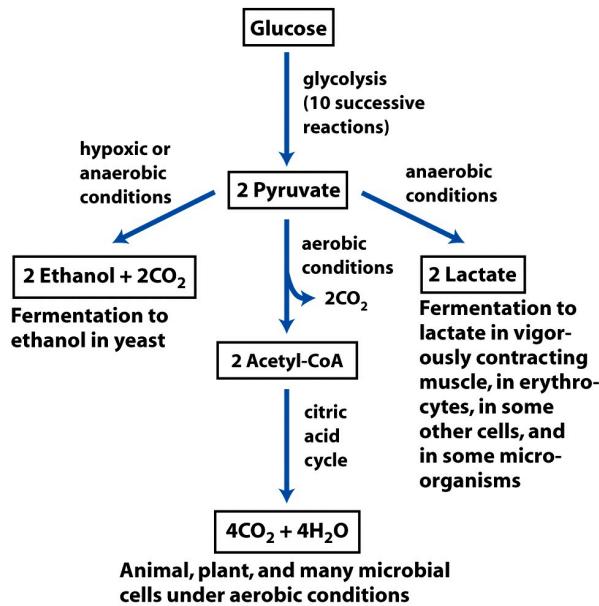
Melkesyrefermentering

Under betingelser hvor lite oksygen er tilgjengelig, eksempelvis i arbeidende muskelvev, er det ikke mulig å reaksidere NADH til NAD^+ . Dette skaper problemer for cellen, ettersom NAD^+ er en nødvendig elektronakseptør både i glyklysen og i sitronsyresyklusen. Under slike betingelser aksepterer pyruvat elektroner fra NADH og undergår reduksjon til laktat via **melkesyrefermentering**. Dette regenererer NAD^+ slik at glyklysen kan fortsette. Enkelte vev og celletyper konverterer glukose til laktat også under aerobe forhold, og

laktat er også et produkt fra glykolyesen under anaerobe forhold hos anaerobe forhold i mange mikroorganismer.

Etanolfermentering

Den tredje mulige ruten ved pyruvat-katabolisme leder til etanol. I enkelte plantevev, virveldyr, protister og mikroorganismer konverteres pyruvat til etanol og CO_2 under hypokiske (lite oksygen) eller anaerobe (ikke noe oksygen) forhold. Denne prosessen kalles **etanolfermentering**.



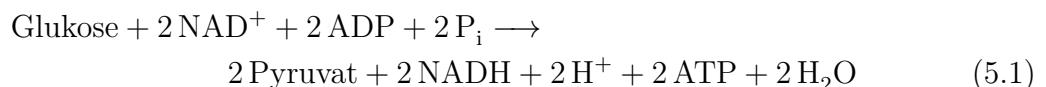
Figur 5.2.: Tre mulige katabolske skjebner for pyruvat.

5.1.4. Gjenværende energi i pyruvat

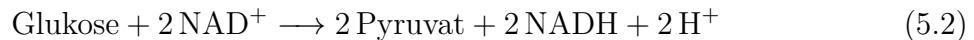
GlykolySEN frigjør bare en liten del av energien som finnes i glukosemolekylet; mesteparten av energien i glukose finnes fortsatt i pyruvatmolekylene som går ut av glykolySEN. Denne energien kan hentes ut via oksidative reaksjoner i sitronsyresyklusen og oksidativ fosforylering.

5.1.5. Termodynamisk oversikt over glykolySEN

Totalreaksjonen for glykolySEN er



Denne kan deles opp i to prosesser. Den eksergoniske konverteringen av glukose til pyruvat:



med $\Delta G_1' = -146 \text{ kJ/mol}$ og den endergoniske dannelsen av ATP fra ADP og P_i:



med $\Delta G_2' = 61 \text{ kJ/mol}$. Endringen i G for reaksjon (5.1) blir dermed summen av endringene ved reaksjon (5.2) og reaksjon (5.3), altså $\Delta G_s' = \Delta G_1' + \Delta G_2' = -85 \text{ kJ/mol}$. Konklusjonen er at glyklysen, under betingelsene som gjelder i en celle, er en tilnærmet irreversibel prosess, drevet til fullførelse av en stor netto senking av den frie energien.

5.1.6. Viktigheten av fosforylerte intermediater

Alle de ni intermediatene i glyklysen er fosforylerte forbindelser. Fosfatgruppen ser ut til å ha tre funksjoner:

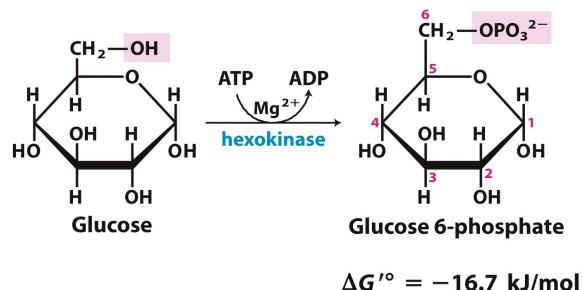
1. *Fosforylering hindrer intermediatene i å forlate cellen.* Plasmamembranen inneholder generelt ikke proteiner med evne til å transportere fosforylerte sukkerforbindelser, noe som sørger for at ingen energi kreves tilført for å holde intermediatene i cellen etter den første fosforyleringen. Dette til tross for store ulikheter mellom de intracellulære og ekstracellulære konsentrasjonene.
2. *Fosforylgrupper er essensielle komponenter i den enzymatiske konserveringen av metabolsk energi.* Energien som frigjøres når fosfoanhydridbindinger brytes, for eksempel ved kløyving av ATP til ADP, konserveres delvis ved dannelse av fosfatestere som glukose-6-fosfat. Høyenergi-fosfatforbindelsene som dannes i glyklysen (1,3-bisfosfoglyserat og fosfoenolpyruvat) donerer fosforylgrupper til ADP for dannelse av ATP.
3. *Bindingsenergien som følger av binding av fosfatgrupper til enzymenes aktive seter senker aktiveringsenergien og øker spesifiteten i de enzymatiske reaksjonene.* Fosfatgruppene i ADP, ATP og de glykolytiske intermediatene danner komplekser med Mg²⁺ og substratbindingssetene i mange av de glykolytiske enzymene er spesifikke for disse kompleksene. De fleste glykolytiske enzymer krever Mg²⁺ for aktivitet.

Enda viktigere er det kanskje at fosfatgruppen er avgjørende for bevaringen av den kjemiske energien som frigjøres i glyklysen; mye av energien som frigjøres når ADP dannes fra ATP ved bryting av en fosfoanhydridbinding i sistnevnte forbindelse konserveres ved dannelse av fosfatestere. Den motsatte reaksjonen, dannelse av ATP fra ADP skjer også i to av glyklysens ti trinn, da ved donasjon av fosfatgrupper fra fosforylerte intermediater med høy energi.

5.1.7. Reaksjoner i forberedende fase

1 Fosforylering av glukose

I glykolsens første trinn aktiveres glukose for følgende reaksjoner ved fosforylering på C-6 med dannelse av **glukose-6-fosfat** med ATP som fosforyldonor:



Denne reaksjonen er irversibel under intracellulære forhold og er katalysert av **heksokinase**. Kinaser er en undergruppe av transferaser og er generelt enzymer som katalyserer overføringen av den terminale fosforylgruppen fra ATP til en nukleofil akseptor. I dette tilfellet er akseptoren glukose. I likhet med de andre enzymene i glykolySEN, er heksokinase et vannløselig, cytosolisk enzym.

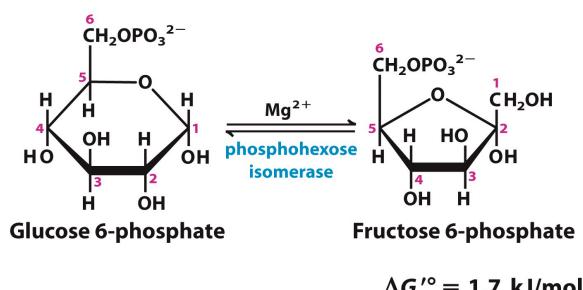
Heksokinase krever, i likhet med mange andre kinaser, Mg^{2+} for å utvise aktivitet, noe som skyldes at enzymets virkelige substrat ikke er ATP^4- men komplekset $MgATP^{2-}$. Mg^{2+} skjerner de negative ladningene til ATP-molekylets fosforylgrupper slik at det terminale fosforatomet blir et enklere mål for nukleofilt angrep fra glukosens –OH.

Ved binding til glukose undergår heksokinase drastiske konformasjonelle endringer (induced fit). To domener i proteinet beveger seg omrent 8 Å mot hverandre. Dette sørger for at bundet glukose og bundet ATP kommer nærmere hverandre og samtidig skjermes fra de vandige omgivelsene slik at hydrolyse av fosfoanhydridbindingene i ATP hindres.

Heksokinase finnes i nesten alle organismer; i det menneskelige genomet finnes gener for fire ulike heksokinaser (I til IV) som alle katalyserer samme reaksjon. To eller flere enzymer som katalyserer samme reaksjon men kodes av ulike gener kalles **isozymer**.

2 Fosforylering av fruktose-6-fosfat til fruktose-1,6-bisfosfat

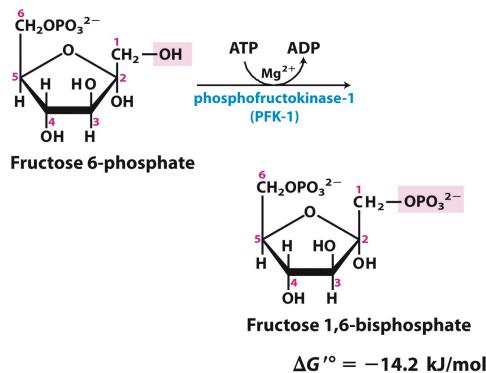
Enzymet **fosfoheksose isomerase (fosfoglukose isomerase)** katalyserer den reversible isomeriseringen av glukose-6-fosfat, en aldose, til **fruktose-6-fosfat**, en heksose:



Mekanismen for denne reaksjonen involverer et enediol-intermediat. Reaksjonen går i begge retninger, noe som er ventet med tanke på at endringen i fri endringen er liten. Denne isomeriseringen spiller en avgjørende rolle i glyklyses overordnede kjemi, da karbonylgruppen på C-1 og hydroksylgruppen på C-2 er avgjørende i de to trinnene som følger. Fosforyleringen i trinn ③ krever en OH-gruppe på C-1 og kløyvingen av bindingen mellom C-3 og C-4 i trinn ④ krever en karbonylgruppe på C-2.

③ Konvertering av glukose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat

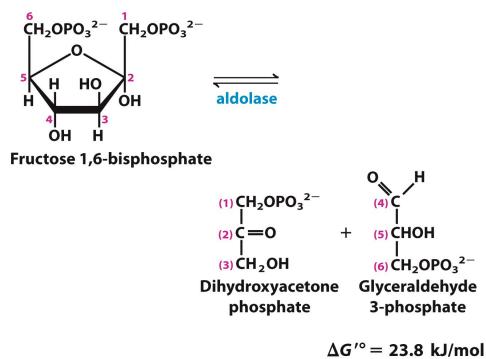
Dette er den andre av de to ATP-forbrukende reaksjonene i glyklyse. **Fosfofruktokinase-1 (PFK-1)** katalyserer overføringen av en fosforylgruppe fra ATP til fruktose-6-fosfat med dannelse av **fruktose-1,6-bisfosfat**:



Enzymet kalles PFK-1 for å skille det fra et annet enzym som katalyserer dannelsen av fruktose-2,6-bisfosfat i en annen prosess. Reaksjonen vist ovenfor er i praksis irreversibel under cellulære forhold og utgjør det første "forpliktende" trinnet i glyklysen; de to første intermediatene hadde andre mulige metabolske skjebner, men fruktose-1,6-bisfosfat må gå videre i glyklysen.

④ Kløyving av fruktose-1,6-bisfosfat

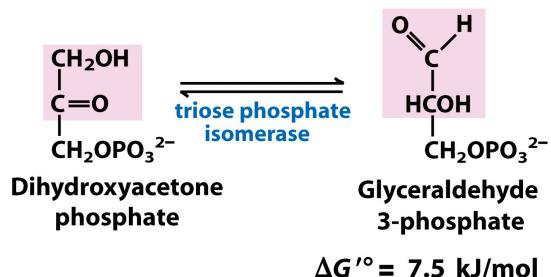
Enzymet **fruktose-1,6-bisfosfat aldolase**, ofte ganske enkelt kalt **aldolase** katalyserer en reversibel aldolkondensasjon. Fruktose-1,6-bisfosfat kløyves til to ulike triosefosfater, **glyseraldehyd-3-fosfat**, en aldose, og **dihydroksyacetonfosfat**, en ketose:



Selv om denne reaksjonen har en stor positiv endring i standard fri energi i retningen for kløyving av fruktose-1,6-bisfosfat, vil lave reaktantkonsentrasjoner i cellen sørge for at den reelle ΔG er liten og reaksjonen reversibel.

5) Interkonvertering av triosefosfatene

Bare én av de to triosefosfatene som dannes aldolase, glyeraldehyd-3-fosfat, kan degraderes direkte i de følgende stegene i glyklysen. Det andre produktet, dihydroksyacetofosfat, konverteres raskt og reversibelt til glyeraldehyd-3-fosfat av enzymet **triosefosfat isomerase**:

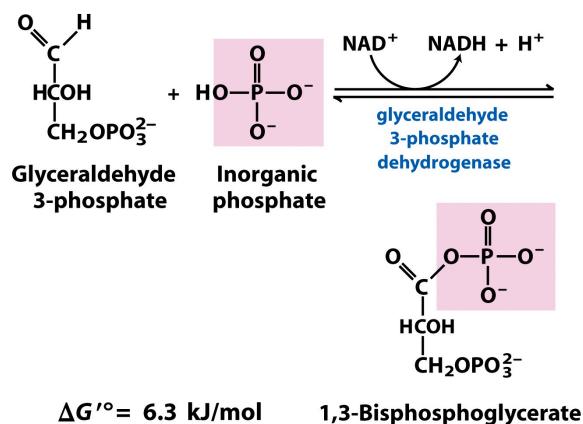


Mekanismen for reaksjonen minner om reaksjonen i trinn ②. Etter reaksjonen med triosefosfat isomerase kan ikke lenger karbonatomene som kommer fra C-1, C-2 og C-3 i glukosen skiller fra henholdsvis C-6, C-5 og C-4; de to "halvpartene" av glukose har begge gitt glyeraldehyd-3-fosfat. Denne reaksjonen er den siste i den forberedende fasen.

5.1.8. Reaksjoner i gjenvinningsfasen

6) Oksidasjon av glyeraldehyd-3-fosfat til 1,3-bisfosfoglyserat

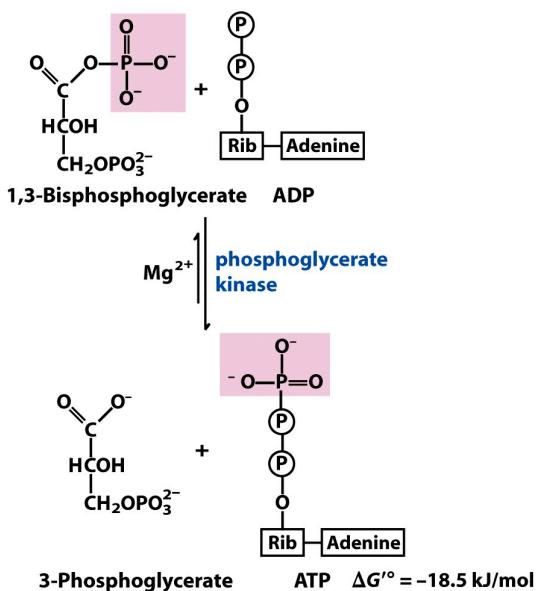
Første steg i gjenvinningsfasen er oksidasjonen av glyeraldehyd-3-fosfat til **1,3-bisfosfoglyserat**, katalysert av **glyeraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase**:



Reaksjonen gir dannelse av NADH fra NAD^+ og er således den første energikonservoende reaksjonen i glykolsen. NADH som dannes kan gi ATP ved donasjon av elektroner til elektrontransportkjeden i mitokondriene. Aldehydgruppen i glyeraldehyd-3-fosfat oksideres, ikke til en fri karboksylgruppe men til en karboksylsyreanhydrid med fosforsyre. Denne typen anhydrid kalles en **acylfosfat** og har en svært høy ΔG for hydrolyse. Mye av energien som frigjøres ved oksidasjonen av aldehydgruppen i glyeraldehyd-3-fosfat bevares på den måten i acylfosfatgruppen på C-1 i 1,3-bisfosfoglyserat.

⑦ Fosforyloverføring fra 1,3-bisfosfoglyserat til ADP

Enzymet fosfoglyserat kinase overfører den høyenergiske fosforylgruppen fra karboksylgruppen i 1,3-bisfosfoglyserat til ADP med dannelse av ATP og **3-fosfoglyserat**:

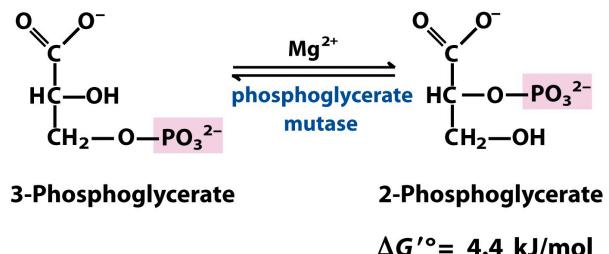


Trinnene ⑥ og ⑦ utgjør sammen en energikoblende prosess hvor 1,3-bisfosfoglyserat er intermediat; det dannes i den første reaksjonen og overfører sin acylfosfatgruppe til ADP i den andre. Summen av de to reaksjonene er eksuronisk. Trinn ⑦ sørger for at koncentrasjonen av produktet fra trinn ⑥, 1,3-bisfosfoglyserat, holdes relativt lav ved steady state, noe som favoriserer reaksjon mot høyre i trinn ⑥.

Resultatet av trinnene ⑥ og ⑦ er konservering av energien som frigjøres ved oksidasjon av en aldehyd til en karboksylatgruppe i form av ATP dannet fra ADP og P_i . Reaksjonen hvor ATP dannes ved fosforylgruppeoverføring fra et substrat som 1,3-bisfosfoglyserat kalles **substratnivåfosforylering** for å skille den fra **respirasjonskoblet fosforylering**.

⑧ Konvertering av 3-fosfoglyserat til 2-fosfoglyserat

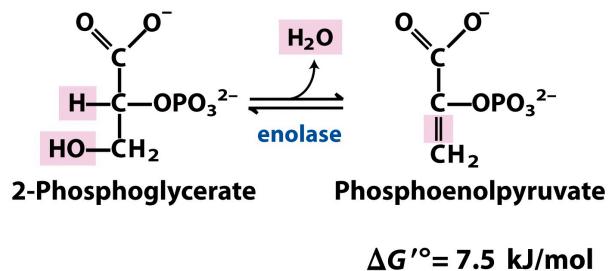
Enzymet **fosfoglyserat mutase** katalyserer reversibel overføring av fosforylgruppen mellom C-2 og C-3 i glyserat:



Mg^{2+} er avgjørende for denne reaksjonen som skjer i to trinn. En fosforylgruppe overføres først fra en His-residue i mutasen til hydroksylgruppen på C-2 i 3-fosfoglyserat slik at 2,3-fosfoglyserat dannes. Fosforylgruppen på C-3 overføres i dette intermediate overføres deretter til samme His-residue med 2-fosfoglyserat og regenerert enzym som resultat.

⑨ Dehydrering av 2-fosfoglyserat til fosfoenolpyruvat

Dette trinnet i glykolysen gir, i likhet med trinn ⑥, dannelsel av en forbindelse med høyt fosforylgruppe-overføringspotensial. **Enolase** katalyserer den reversible fjerningen av et vannmolekyl fra 2-fosfoglyserat med **fosfoenolpyruvat (PEP)** som resultat:

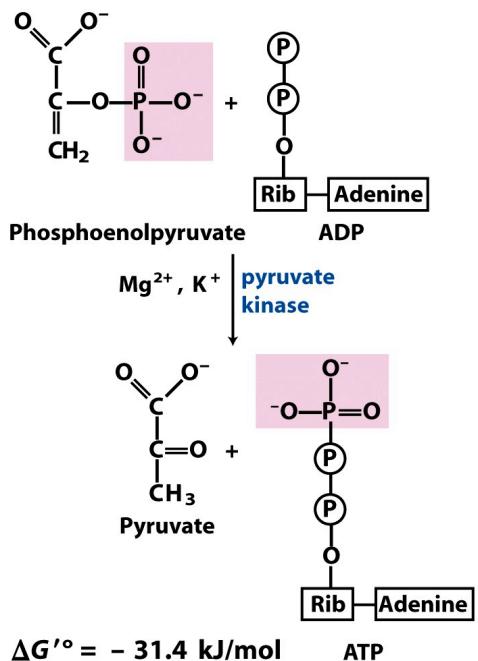


Reaksjonen involverer et enolintermediat stabilisert av Mg^{2+} . En forbindelse med relativt lavt overføringspotensial knyttet til fosforylgruppen konverteres til en med et høyt overføringspotensial.

⑩ Overføring av fosforylgruppen fra fosfoenolpyruvat til ADP

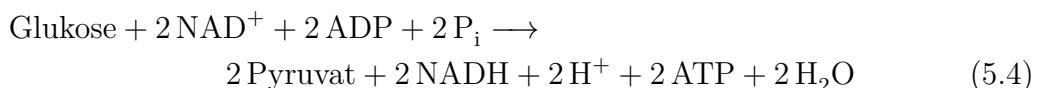
Det siste steget i glykolysen er overføringen av fosforylgruppen fra fosfoenolpyruvat til ADP, katalysert av **pyruvat kinase** (se reaksjonsligning på side 65).

Pyruvat kinase krever K^+ , Mg^{2+} eller Mn^{2+} . Dette er en substratnivåfosforylering med **pyruvat** som produkt. Pyruvat opptrer først i sin enolform, men tautomeriserer raskt til keto-formen som dominerer ved pH 7. Reaksjonen som helhet har en stor negativ ΔG , i stor grad som følge av den spontane overgangen fra enol- til keto-form. Omrent halvparten av energien som frigjøres ved hydrolysen av PEP konserveres ved dannelsel av en fosfoanhydridbinding i ATP mens resten bidrar til å drive reaksjonen mot ATP-syntese.



Nettobalanse for glyklysen

Totalreaksjonen for glyklysen under aerobe forhold er, som gitt i reaksjon (5.1):



De to NADH-molekylene som dannes i cytosolen under glyklysen vil, under aerobe forhold, oksideres tilbake til NAD^+ ved overføring av elektroner til elektrontransportkjeden i mitokondriene hos eukaryoter. Elektronene overføres der til sin endelige mottaker, O_2 :



Energien som frigjøres ved denne elektronoverføringen gir energien som er nødvendig for ATP-syntese ved respirasjonskoblet fosforylering.

Et glukosemolekyl som går inn i glyklysen konverteres til to molekyler pyruvat (sporet for karbon), to ADP-molekyler og to P_i konverteres til to ATP-molekyler (sporet for fosforylgrupper) og fire elektroner overføres i form av hydridioner fra to glyeraldehyd-3-fosfat-molekyler til to NAD^+ -molekyler (sporet for elektroner).

ATP-utbyttet fra glyklysen under anaerobe forhold (2 ATP-molekyler per glukose) er langt lavere enn utbyttet ved fullstendig oksidasjon av glukose til CO_2 under aerobe forhold. Omtrent 15 ganger så mye glukose må konsumeres anaerobt for å gi samme mengde som ved aerob oksidasjon (30-32 ATP-molekyler per glukose). Fluksen av glukose gjennom glyklysen reguleres slik at ATP-nivåene holdes tilnærmet konstante. Det samme gjelder nivåene av glykolytiske intermediater som spiller biosyntetiske roller.

5.2. Veier inn i glykolysen

Mange andre karbohydrater enn glukose møter sin katabolske skjebne i glykolysen ved transformasjon til et av de glykolytiske intermediatene. De viktigste er de energilagrende polysakkardene glykogen og stivelse; disakkardene maltose, laktose, trehalose og sukrose; og monosakkardene fruktose, mannose og galaktose.

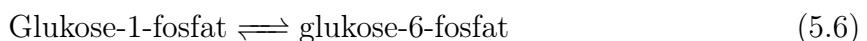
5.2.1. Hydrolyse av poly- og disakkilder til monosakkilder

Fordøyelsen av stivelse begynner i munnen, hvor α -amylase i spytten hydrolyserer de interne ($\alpha \rightarrow 4$)-glykosidbindingene i stivelse. Dette gir korte polysakkridfragmenter, eller oligosakkilder. I magen deaktivertes denne α -amylasen av lav pH, men en annen type α -amylase, sekret fra bukspyttkjertelen til tynntarmen, fortsetter nedbrytningsprosessen. Resultatet er hovedsaklig maltose og maltotriose samt oligosakkilder kalt dekstriner¹, fragmenter av amylopektiner med ($\alpha \rightarrow 6$)-forgreninger. Maltose og dekstriner degrades deretter videre til glukose av andre enzymer. Glykogen og stivelse har i all hovedsak samme struktur, og fordøyelsen av de to forløper på samme måte.

5.2.2. Endogen glykogen og stivelse degraderes ved fosforolyse

Glykogen lagret i dyr, mikroorganismer eller planter kan mobiliseres for bruk i samme celle via en fosforlytisk reaksjon katalysert av **glykogen fosforylase** (stivelse fosforylase i planter). Disse enzymene katalyserer angrep fra P_i på ($\alpha \rightarrow 4$)-glykosidbindingene som binder sammen de to siste glukoseresiduene ved en ikke-reduserende ende. Én glukoseenhet fjernes fra polymeren slik at glukose-1-fosfat dannes. Fosforolysen bevarer noe av energien i glykosidbindingen i den dannede fosfatesteren. Glykogen fosforylase (eller stivelse fosforylase) repeterer fosforolyseringen inntil den nærmer seg et ($\alpha \rightarrow 6$)-forgreningspunkt. Aktiviteten til enzymet opphører da, og grenene fjernes heller av et **debranching enzyme**. Nedbrytningen av intracellulært glykogen av glykogen fosforylase er illustrert i Figur 5.3.

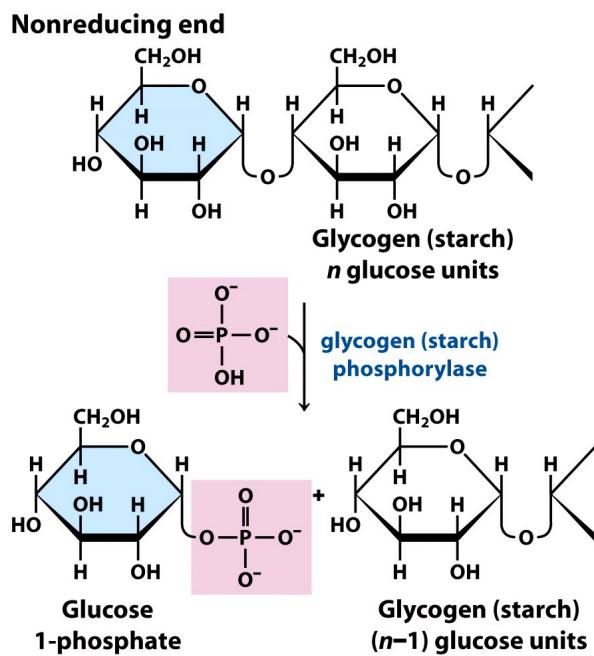
Glukose-1-fosfat konverteres videre til glukose-6-fosfat av enzymet **fosfoglukomutase** som katalyserer den reversible reaksjonen



Fosfoglukomutase benytter omtrent samme mekanisme som fosfoglyserat mutase: begge inkluderer et bifosfat-intermediat og enzymet fosforyleres midlertidig i hver katalytiske syklus. Den generelle betegnelsen **mutase** gis til enzymer som katalyserer overføringen av en funksjonell gruppe fra én posisjon til en annen i samme molekyl. Mutaser er dermed en underklasse av **isomeraser**, enzymer som interkonverterer stereoisomerer eller strukturelle eller posisjonelle isomerer.

Glukose-6-fosfat dannet ved fosfoglukomutase-reaksjonen kan gå inn i glykolysens trinn ② eller i et annet spor, eksempelvis pentosefosfatsporet.

Dersom polysakkilder som glykogen og stivelse hadde blitt brutt ned i fordøyelsessystemet ved fosforolyse, ville det vært umulig for de fosforyerte produktene å komme inn i



Figur 5.3.: Nedbrytning av intracellulært glykogen av glykogen fosforylase.

celler. Sukkerfosfater må defosforyleres til frie sukker før de kan transporteres inn i celle-ne i tarmen. Disakkarker må dessuten hydrolyses til monosakkarker før de kan gå inn i celler, noe som i tarmen skjer ved enzymatisk katalysert hydrolyse. Monosakkardene som dannes fraktes aktivt inn i celler og fraktes gjennom blodet til andre vev hvor de fosforyleres og går inn i glykolsen.

5.2.3. Veier inn i glykolsen for andre monosakkarker enn glukose

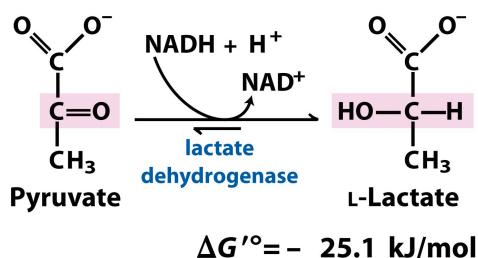
I de fleste organismer kan andre heksoser enn glukose undergå glykolyse etter konvertering til et fosforylt derivat. D-glukose fosforyleres av heksokinase til fruktose-6-fosfat og går deretter inn i glykolsens trinn ③. D-Fruktose kan også fosforyleres på C-1 til fruktose-1-fosfat av **fruktokinase** etterfulgt av kløyving til glyeraldehyd og dihydroksyacetonsulfat ved hjelp av **fruktose-1-fosfat aldolase**. Både glyeraldehyd og dihydrooksylacetone konverteres deretter til glyeraldehyd-3-fosfat; førstnevnte ved fosforylering fra ATP og **triose kinase**, sistnevnte av det glykolytiske enzymet triosefosphat isomerasen. Begge produkter fra hydrolysen av fruktose-1-fosfat går dermed inn i glykolsens trinn ⑥ som glyeraldehyd-3-fosfat.

5.3. Pyruvats skjebner under anaerobe forhold: Fermentering

Under aerobe betingelser oksideres pyruvat som går ut av glykolysen til acetat (acetyl-CoA) som videre går inn i sitronsyresyklusen og oksideres til CO_2 og H_2O . NADH dannet ved dehydrogeneringen av glyeraldehyd-3-fosfat reoksideres før eller siden til NAD^+ ved elektronoverføring til O_2 i mitokondriene. Under hypoksiske betingelser vil reoksidasjon av NADH imidlertid ikke være mulig, noe som kan ha store konsekvenser for cellen. Uten NAD^+ vil cellen mangle elektronakseptor ved oksidasjon av glyeraldehyd-3-fosfat, noe som vil medføre stans i de energigivende reaksjonene i glykolysen. Regenerering av NAD^+ er følgelig nødvendig.

5.3.1. Melkesyrefermentering

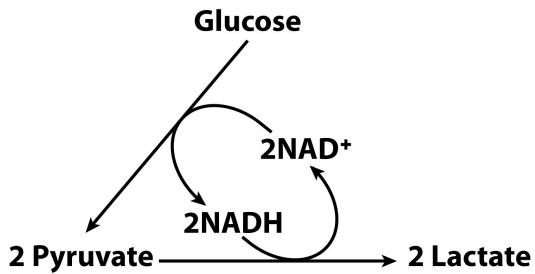
Når vev i dyr ikke får tilstrekkelig oksygen til at den aerobe oksidasjonen av pyruvat og NADH kan opprettholdes, regenereres NAD^+ ved reduksjon av pyruvat til **laktat**. Reduksjonen av pyruvat katalyses i dette tilfellet av **laktat dehydrogenase**, med dannelse av L-laktat som resultat ved pH 7:



Denne likevekten favoriserer dannelsen av laktat sterkt, noe som kan ses av den store negative endringen i fri energi ved reaksjonen.

I glykolysen medfører dehydrogenering av to glyeraldehyd-3-fosfat-molekyler dannelse av to NADH-molekyler ved reduksjon av NAD^+ . Ettersom reduksjon av to pyruvatmolekyler til laktat regenererer to NAD^+ -molekyler, forekommer ingen netto endring i $[\text{NAD}^+]$ og $[\text{NADH}]$ ved glykolyse etterfulgt av melkesyrefermentering. Dette er illustrert i Figur 5.4. Laktat som dannes i aktive muskler kan gjenvinnes; det fraktes til leveren via blodstrømmen og konverteres der til glukose.

Selv om konverteringen av glukose til laktat involverer to oksidasjonstrinn, endres ikke oksidasjonstilstanden til karbon i prosessen; H:C-forholdet i glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) og laktat ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) er det samme. Noe av den opprinnelige energien i glukosemolekylet er imidlertid ekstrahert på veien til laktat med dannelse av to ATP-molekyler som resultat. **Fermentering** er den generelle betegnelsen på prosesser som ekstraherer energi i form av ATP uten å konsumere oksygen eller endre $[\text{NAD}^+]$ og $[\text{NADH}]$.



Figur 5.4.: Netto endring i $[NAD^+]$ og $[NADH]$ er null ved glykolyse etterfulgt av melkesyrefermentering.

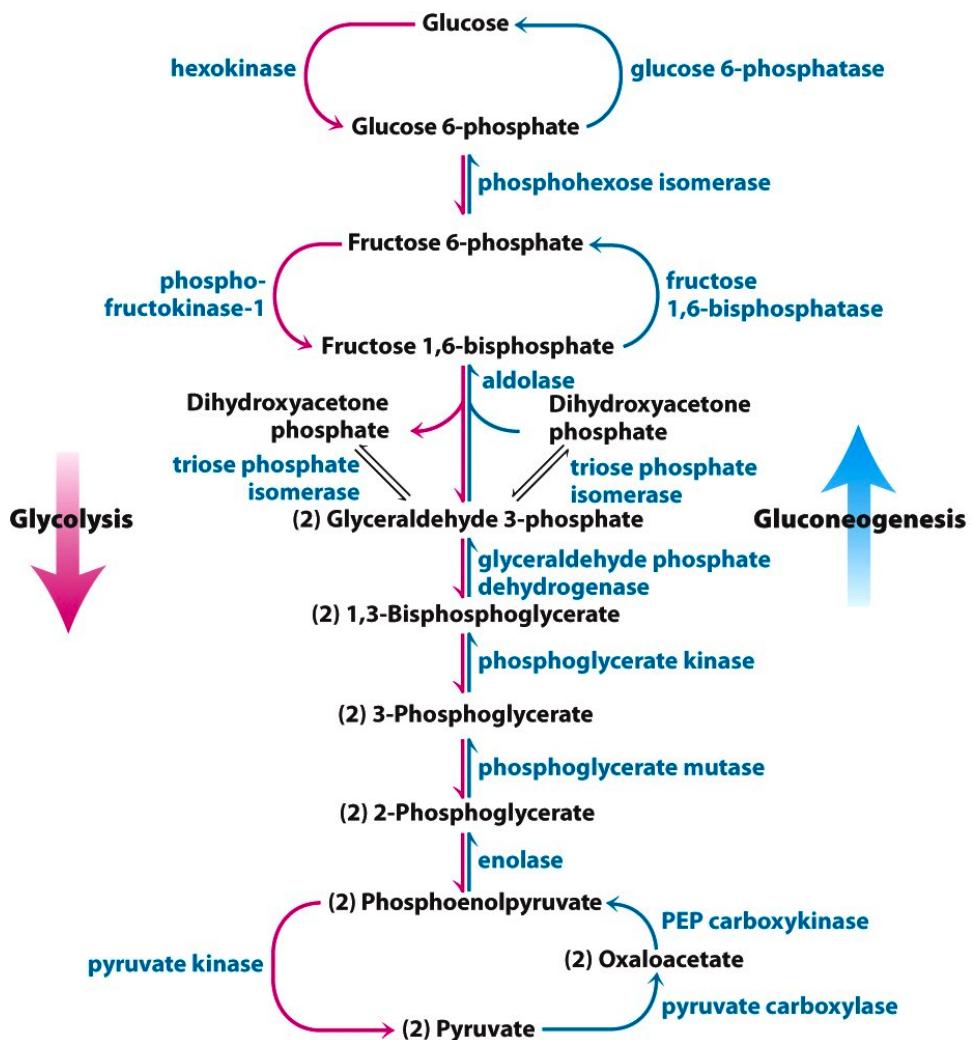
5.4. Glukoneogenesen

Organismer er avhengige av å kunne syntetisere glukose fra forløpere som ikke er karbohydrater. Dette oppnås via **glukoneogenesen** ("nydannelse av sukker"), hvor pyruvat og besliktede tre- og firekarbon-forbindelser konverteres til glukose. Glukoneogenesen forekommer i alle dyr, planter, sopp og mikroorganismer, med svært få forskjeller ulike arter og vev imellom. Selv om reaksjonene essensielt er de samme i alle organismer, vil den metabolske konteksten varierer fra art til art og fra vev til vev. Det fokuseres i det følgende på glukoneogenesen slik den foregår i leveren hos pattedyr.

5.4.1. De irreversible reaksjonene i glyklysen omgås i glukoneogenesen

Glukoneogenesen er ikke ganske enkelt glyklysen i revers, selv om de to prosessene har mange felles trinn. 7 av de 10 enzymatiske reaksjonene i glukoneogenesen er de omvendte av glyklytiske reaksjoner. Dette kan ses av illustrasjonen av prosessen i Figur 5.5. Tre reaksjoner i glyklysen er imidlertid så godt som irreversible in vivo og derfor ubrukelige i glukoneogenesen. Dette gjelder trinn ①, trinn ③ og trinn ⑩ i glyklysen, henholdsvis konverteringen av glukose til glukose-6-fosfat, fosforyleringen av fruktose-6-fosfat til fruktose-1,6-bisfosfat og konverteringen av fosfoenolpyruvat til pyruvat.

I celler karakteriseres disse reaksjonene av en stor negativ ΔG i glyklyse-retningen, mens de øvrige reaksjonene i glyklysen har ΔG nærmere null. De tre irreversible trinnene omgås i glukoneogenesen ved bruk av et separat sett av enzymer som katalyserer reaksjoner som er tilstrekkelig eksergoniske til at de i praksis blir irreversible i retning glukosesyntese. Disse reaksjonene kalles gjerne "bypass"-reaksjoner. Det følger av dette at både glyklysen og glukoneogenesen er irreversible prosesser i celler. Hos dyr skjer begge prosesser for det meste i cytosolen, noe som nødvendiggjør koordinert regulering. Separat regulering skjer via kontroll av de enzymatiske trinnene som er unike for hver prosess.



Figur 5.5.: 7 av 10 reaksjoner i glyklysen reverseres i glukoneogenesen. De resterende 3 er irreversible og omgås av et separat sett av enzymer.

5.4.2. Konvertering av pyruvat til fosfoenolpyruvat

Den første bypass-reaksjonen i glukoneogenesen er konverteringen av pyruvat til fosfoenolpyruvat (PEP). Denne reaksjonen kan ikke forløpe ved enkel reversering av pyruvat kinase-reaksjonen i glykolsens trinn 10, og oppnås i glukoneogenesen ved en serie av reaksjoner som i eukaryoter krever enzymer både i cytosolen og mitokondriene. Dette er én av de to mulige rutene fra pyruvat til PEP og den som dominerer når pyruvat eller alanin er forløper. Den andre ruten dominerer når laktat er forløper. De to rutene er illustrert i Figur 5.7

Rute når pyruvat eller alanin er forløper

Den førstnevnte ruten begynner enten med transport av pyruvat fra cytosolen til mitokondriene eller ved at pyruvat genereres fra alanin ved transaminering i mitokondriene. I transamineringen overføres α -amingruppen i alanin overføres til en α -keto-karboksylsyre med pyruvat som resultat. **Pyruvat karboksylase**, et mitokondrielt enzym som krever **biotin** for aktivitet, konverterer deretter pyruvat til oksaloacetat:



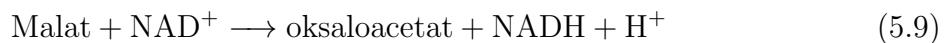
Denne karboksylseringsreaksjonen involverer biotin som bærer av aktivert bikarbonat, HCO_3^- , som i reaksjonen fosforyleres til et karboksyfosfat av ATP. Biotin overtar deretter fosfatets plass i karboksyfosfatet med karboksybiotin som resultat. Pyruvat karboksylase krever acetyl-CoA som aktivator og er dermed det første regulatoriske enzymet i glukoneogenesen.

Den mitokondrielle membranen har ikke noe transportprotein for oksaloacetat, og på grunn av dette må oksaloacetat som dannes fra pyruvat reduseres til malat av det mitokondrielle enzymet **malat dehydrogenase** for å kunne transporterdes til cytosolen:



Reduksjonsmiddel i reaksjonen er NADH i 1:1-forhold med konvertert oksaloacetat. Standard endring i fri energi ved denne reaksjonen er egentlig forholdsvis høy, men under fysiologiske forhold er $\Delta G \approx 0$ slik at reaksjonen blir reversibel.

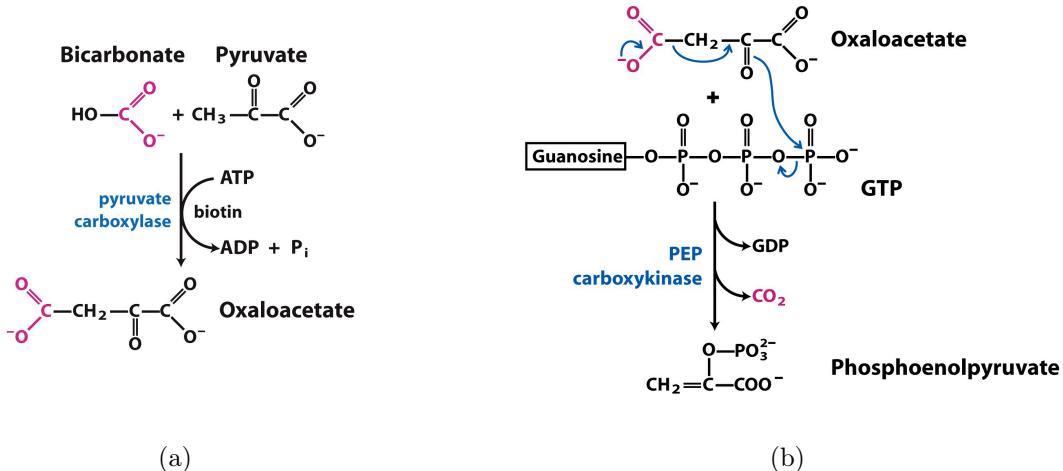
Malat forlater mitokondriene via et spesifikk transportprotein i den indre mitokondrielle membranen og oksideres i cytosolen tilbake til oksaloacetat med tilhørende dannelse av NADH:



Oksaloacetat konverteres deretter til PEP av **fosfoenolpyruvat karboksykinase** med GTP som fosforylgruppdonor:

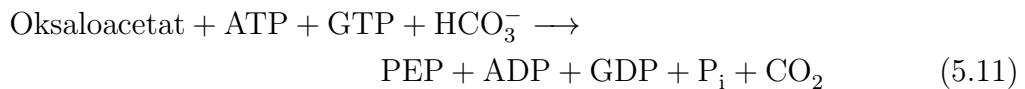


Dannelsen av høyenergifosfatgruppen i PEP balanseres på denne måten av hydrolysen av GTP slik at reaksjonen blir reversibel under intracellulære forhold.



Figur 5.6.: Syntese av fosfoenolpyruvat fra pyruvat. (a) Pyruvat konverteres til oksaloacetat i mitokondriene. (b) Oksaloacetat konverteres til fosfoenolpyruvat av PEP karboksykinase i cytosolen.

Summen av reaksjonene (5.7)-(5.10) gir følgende totalreaksjon:

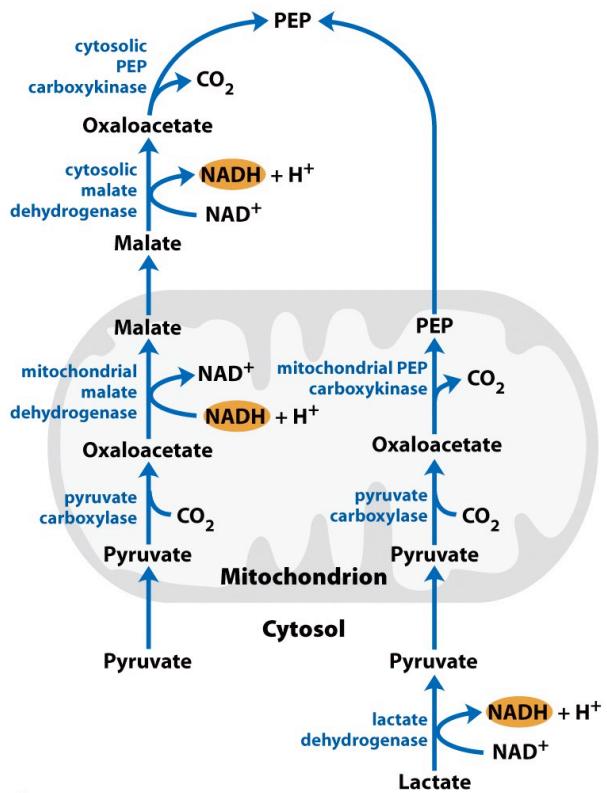


To høyenergiske fosfatekvivalenter (én fra ATP og én fra GTP) forbrukes altså ved fosforyleringen av ett pyruvat-molekyl til PEP. Konvertering av PEP til pyruvat i glykolysen frigjør til sammenligning bare ett ATP-molekyl. Reaksjon (5.11) er i praksis irreversibel under cellulære forhold, da PEP raskt forbrukes i andre reaksjoner slik at $[PEP]$ holdes forholdsvis lav. Merk at CO_2 som adderes til pyruvat i pyruvat karboksylase-trinnet er samme molekyl som går ut av PEP karboksykinase-reaksjonen og at karboksyleringen av pyruvat således fungerer aktiverende i den forstand at den fasiliterer dannelsen av PEP.

Reaksjonene ovenfor følger en logisk rute gjennom mitokondriene. Konsentrationsforholdet $[NADH]/[NAD^+]$ er omrent 10^5 ganger lavere i cytosolen enn i mitokondriene, og transporten av malat til cytosolen med påfølgende rekonvertering til oksaloacetat sørger på den måten for effektiv forflytning av NADH fra mitokondriene til cytosolen.

Rute når laktat er forløper

Når laktat er forløper følger bypass-reaksjonen pyruvat → PEP en alternativ rute. Denne er særlig viktig i store virveldyr etter store anstrengelser. Konvertering av laktat til pyruvat i cytosolen gir NADH og eksport av reduserende ekvivalenter (som malat) fra mitokondriene er derfor ikke nødvendig. Etter produksjon i den nevnte dehydrogenase-reaksjonen, transporteres pyruvat til mitokondriene for konvertering til oksaloacetat av pyruvat karboksylase som beskrevet ovenfor. Oksaloacetat som dannes ved denne reaksjonen konverteres direkte til PEP ved hjelp av et mitokondrielt isozym av PEP karboksykinase, og PEP transporteres deretter ut av mitokondriene for fortsettelse av gluconeogenesen.



Figur 5.7.: To alternative ruter fra pyruvat til fosfoenolpyruvat. Ruten til venstre følges når pyruvat eller alanin som konverteres til pyruvat er forløper, ruten til høyre når laktat er forløper.

5.4.3. Konvertering av fruktose-1,6-bisfosfat til fruktose-6-fosfat

Den andre glykolytiske reaksjonen som ikke kan reverseres i glukoneogenesen er fosforyleringen av fruktose-6-fosfat av PFK-1 i trinn ③. ettersom denne reaksjonen er svært eksuronisk og derfor irreversibel i celler, katalyseres dannelsen av fruktose-6-fosfat fra fruktose-1,6-bisfosfat av et annet enzym, nærmere bestemt **fruktose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1)**. Dette enzymet krever Mg^{2+} for aktivitet og promoterer den i praksis irreversible hydrolysen av C-1-fosfatet i fruktose-1,6-bisfosfatase (altså ikke fosforylgruppeoverføring til ADP):



5.4.4. Konvertering av glukose-6-fosfat til glukose

Den tredje bypass-reaksjonen i glukoneogenesen er defosforyleringen av glukose-6-fosfat til glukose. Reversering av heksokinase reaksjonen i glyklysens trinn ① ville krevd fosforylgruppeoverføring fra glukose-6-fosfat til ADP med dannelse av ATP, en reaksjon som åpenbart ikke er energimessig gunstig. Glukoneogenese-reaksjonen katalyseres av

glukose-6-fosfatase og innebærer enkel hydrolyse av en fosfatester, altså ingen ATP-syntese:



Mg^{2+} er nødvendig for aktivering av enzymet.

5.4.5. Glukogeniske aminosyrer og intermediater i sitronsyresyklusen

Den biosyntetiske ruten beskrevet ovenfor tillater syntese av glukose ikke bare fra pyruvat, men også fra fire-, fem- og sekskarbon-intermediatene i sitronsyresyklusen. Sitrat, isositrat, α -ketoglutarat, succinyl-CoA, succinat, fumarat og malat – nærmere bestemt alle intermediater i sitronsyklusen – kan undergå oksidasjon til oksaloacetat. Enkelte eller alle karbonatomer i de fleste aminosyrer som finnes i proteiner kataboliseres før eller siden pyruvat eller intermediater i sitronsyresyklusen. Forbindelser som kan undergå netto konvertering til glukose kalles **glukogeniske**.

5.4.6. Regulering av glykolyisen og glukoneogenesen

Hvis glykolyisen og glukoneogenesen begge ble tillatt å gå med høy hastighet samtidig, ville resultatet blitt forbruk av ATP med generering av varme. Mange av reaksjonene i de to prosessene reguleres derfor allosterisk eller ved kovalent modifikasjon (fosforylering). Reguleringen sørger kort fortalt for at fluksen av glukose gjennom glykolyisen går opp når fluksen av pyruvat gjennom glukoneogenesen går ned og omvendt.

6. Sitronsyresyklusen

For de fleste eukaryote organismer og mange bakterier som lever under aerobe betingelser og oksiderer organiske næringsstoffer til H_2O og CO_2 er glykolySEN bare første trinn i den fullstendige oksideringen av glukose. I stedet for å reduseres til laktat, etanol eller et annet fermenteringsprodukt, oksideres pyruvat fra glykolySEN videre til H_2O og CO_2 ved aerob katabolisme. Slike prosesser, hvor O_2 forbrukes og CO_2 produseres, kalles **respirasjon**. De molekylære prosessene hvor *celler* forbruker O_2 og produserer CO_2 kan mer presist betegnes som **cellulær respirasjon**. Respirasjon er en langt mer kompleks prosess en glykolySEN og antas å ha blitt utviklet langt senere, etter utviklingen av cyanobakterier.

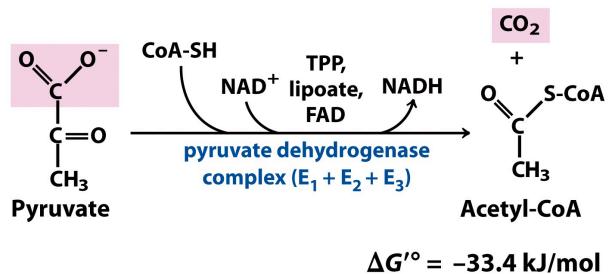
Cellulær respirasjon skjer via tre hovedtrinn. Først oksideres organiske næringsstoffer – for eksempel glukose, fettsyrer og enkelte aminosyrer – til tokarbonfragmenter i form av acetylgruppen i acetyl-CoA. Deretter går disse acetylgruppene inn i sitronsyresyklusen hvor de oksideres enzymatisk til CO_2 . Energien som frigjøres bevares i de reduserte elektronbærerne NADH og $FADH_2$. I respirasjonens tredje og siste trinn oksideres disse elektronbærerne ved avgivelse av protoner og elektroner. Elektronene overføres til O_2 – den endelige elektronakseptoren i prosessen – via en kjede av elektronbærende molekyler i elektrontransportkjeden. Den store mengden energi som frigjøres ved denne elektronoverføringen konserveres i form av ATP via oksidativ fosforylering. En skjematiske oversikt over katabolisme av proteiner, fett og karbohydrater via de tre trinnene i cellulær respirasjon er vist i Figur 6.1.

6.1. Produksjon av acetyl-CoA (aktivert acetat)

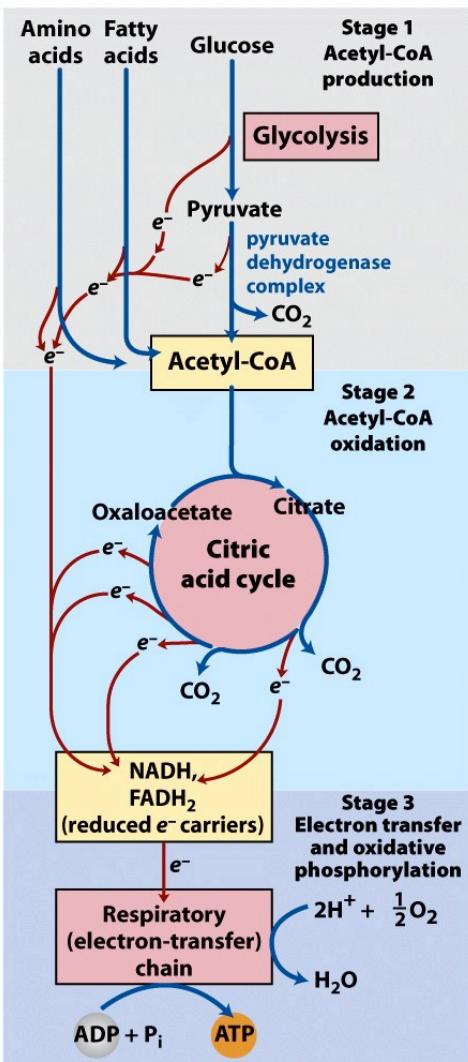
Før de går inn i sitronsyresyklusen må karbonskjelettene i sukker og fettsyrer degraderes til acetylgruppen i acetyl-CoA. Mange aminosyrer går inn i syklusen på samme måte, selv om mange også degraderes til andre intermediater. I det følgende fokuseres det på hvordan pyruvat, framstilt fra glukose og andre sukker ved glykolyse, oksideres til acetyl-CoA og CO_2 av **pyruvat dehydrogenase (PDH)-komplekset**, en enzymansamling bestående av flere kopier av tre ulike enzymer, som finnes i mitokondriene i eukaryote celler og i cytosolen i bakterier. PDH-komplekset er et klassisk eksempel på et multienzymkompleks hvor en serie av intermediater forblir koblet til enzymene helt til det initielle substratet er konvertert til produkt.

6.1.1. Oksidasjon av pyruvat til acetyl-CoA og CO_2

Totalreaksjonen katalysert av PDH-komplekset er en **oksidativ karboksylering**, en irreversibel oksidasjonsprosess hvor karboksylgruppen i pyruvat fjernes i form av CO_2 og de to gjenværende karbonatomene blir acetylgruppen i acetyl-CoA:



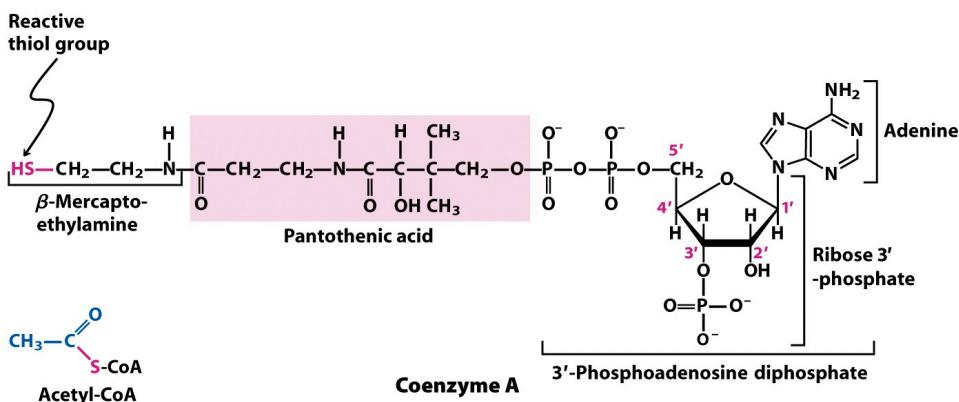
NADH som dannes i denne reaksjonen avgir et hydridion ($:H^-$) til elektrontransportkjeden, og de to elektronene fraktes der til oksygen (i aerobe organismer). Elektronoverføringen resulterer i dannelse av 2.5 ATP-molekyler per elektronpar.



Figur 6.1.: Katabolisme av proteiner, fett og karbohydrater via de tre trinnene i cellulær respirasjon.

6.1.2. Pyruvat dehydrogenase-komplekset krever fem koenzymer

Den kombinerte dehydrogeneringen og dekarboksyleringen av pyruvat til acetylgruppen i acetyl-CoA krever tre ulike enzymer og fem ulike koenzymer eller prostetiske grupper som virker i rekkefølge. De nødvendige koenzymene er tiaminpyrofosfat (TPP), flavinadenindinukleotid (FAD), koenzym A (CoA, eventuelt CoA-SH), nikotinamidadenindinukleotid (NAD) og lipoat. Fire ulike vitaminer er essensielle komponenter i dette systemet: tiamin (i TPP), riboflavin (i FAD), niacin (i NAD) og pantotenat (i CoA).



Figur 6.2.: Strukturen til koenzym A (CoA) og acetyl-CoA.

CoA har en reaktiv tiolgruppe ($-SH$) som er avgjørende for dets rolle som acylbærer i metabolske reaksjoner. Acylgrupper bindes kovalent til tiolgruppen og danner **tioestere**. Tioestere har en relativt høy ΔG for hydrolyse, noe som gir disse forbindelsene et høyt potensial for overføring av acylgrupper. Dette gjør acylgruppemeditasjon til en lang rekke akspeptormolekyler mulig. Acylgruppen som er festet til CoA kan betraktes som "aktivert" for gruppeoverføring.

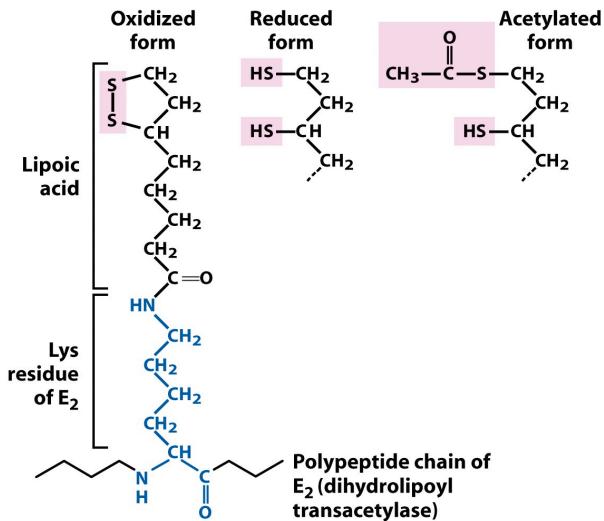
Den femte kofaktoren i PDH-komplekset, **lipoat**, har to tiolgrupper som kan undergå reversibel oksidasjon til en disulfidbinding ($-S-S-$). På grunn av denne evnen til delta-gelse i redoks-reaksjoner, kan lipoat fungere både som elektronbærer (hydrogenbærer) og som acylbærer.

6.1.3. Pyruvat dehydrogenase-komplekset består av tre ulike enzymer

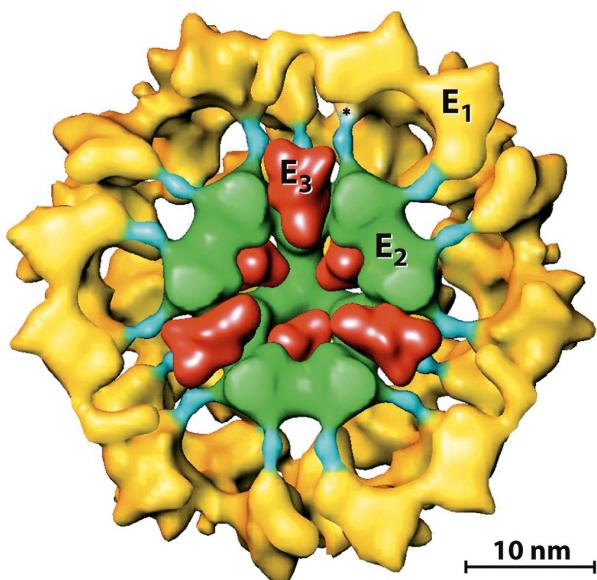
De tre ulike enzymene i PDH-komplekset er **pyruvat dehydrogenase** (E_1), **dihydrolipoyl transacetylase** (E_2) og **dihydrolipoyl dehydrogenase** (E_3). Komplekset inneholder flere kopier av alle tre enzymer med varierende antall av hvert enzym, og dermed varierende størrelse på komplekset, mellom ulike arter. PDH-komplekset i dyr er omrent 50 nm i diameter og dermed mer enn fem ganger større enn et helt ribosom.

E_2 har tre distinkte funksjonelle domener: det aminoterminale *lipoyldomenet* som inneholder lipoyl-Lys-residuene; det sentrale E_1 - og E_3 -bindende domenet; og det *acyl-transferasedomenet* i kompleksets indre kjerne. Domenene til E_2 er adskilt av "linkers", sekvenser

bestående av 20 til 30 aminosyreresiduer som er rike i Ala og Pro adskilt av ladde resider. Linkers antar helst sin utstrakte form slik at de tre domenene holdes fra hverandre. De aktive setene i E₁ og E₃ er bundet til henholdsvis TPP og FAD. To regulatoriske proteiner er også med i komplekset, en proteinkinase og en fosfoproteinfosfatase. Kobling av lipoat til enden av en Lys-sidekjede i E₂, som vist i Figur 6.3, gir en lang, fleksibel arm med evne til å bevege seg fra det aktive setet i E₁ til de aktive setene i E₂ og E₃, en avstand på 5 nm eller mer.



Figur 6.3.: Lipoat amidbundet til en Lys-residue. Lipoylgruppen forekommer både i oksidert form (disulfid) og i redusert form (ditiol).



Figur 6.4.: Tredimensjonal representasjon av PDH-komplekset med underenheter angitt.

Den grunnleggende $E_1-E_2-E_3$ -strukturen er i stor grad konservert gjennom evolusjonen og finnes også igjen i flere andre lignende metabolske reaksjoner, for eksempel oksidasjonen av α -ketoglutarat i sitronsyresyklusen eller oksidasjonen av α -ketosyrer. I en gitt art er E_3 i PDH identisk med E_3 i enzymkompleksene som inngår i de to nevnte reaksjonene.

6.1.4. Reaksjoner i pyruvat dehydrogenase-komplekset

En skjematiske oversikt over de fem sekvensielle reaksjonene i PDH-komplekset finnes i Figur 6.5.

① TPP dekarboksylerer pyruvat

Pyruvat reagerer med bundet tiaminpyrofosfat (TPP) i PDH-kompleksets E_1 . C-1 i pyruvat avgis som CO_2 ved dekarboksylering og C-2, som i pyruvat har samme oksidasjonstilstand som en aldehyd, festes til TPP som en hydroksyetylgruppe. Dette er det langsomste trinnet i reaksjonssekvensen og dermed også det hastighetsbestemende. Trinnet markerer også punktet hvor PDH-komplekset utviser sin substratspesifisitet.

② Donasjon av elektroner og acetylgruppe fra TPP til oksidert lipoyllysin

Hydroksyetylgruppen oksideres til samme nivå som en karboksylsyre ved fjerning av to elektroner. Disse elektronene overføres sammen med den resulterende acetylgruppen på TPP til den oksiderte formen av lipoylgruppen på E_2 som dermed konverteres til en acetylthioester. $-S-S-$ i lipoylgruppen reduseres i denne reaksjonen til en tiolgruppe ($-SH$) og en tioacetylgruppe ($-SCOCH_3$)

③ Transesterifisering mellom CoA og acyl-lipoyllysin

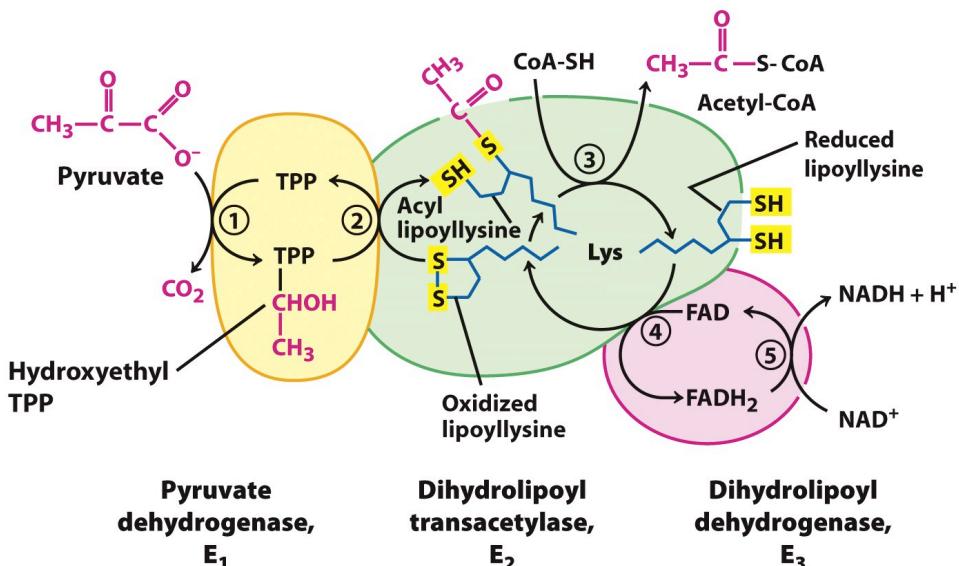
Acetylgruppen som ble esterifisert til den ene tiolgruppen i lipoyllysin i trinn ② overføres til CoA ved transesterifisering. Resultatet er acetyl-CoA og lipoyllysin i sin fullstendig reduserte ditiolform.

④ Elektronoverføring fra redusert lipoyllysin til FAD

Trinnene ④ og ⑤ er begge elektronoverføringer som er nødvendige for regenerering lipoyllysingruppens fullstendig oksiderte disulfidform. I trinn ④ katalyserer E_3 overføringen av to hydrogenatomer fra redusert lipoyllysin i E_2 til en prostetisk FAD-gruppe i E_3 . Resultatet er fullstendig oksidert lipoyllysin og $FADH_2$.

⑤ Elektronoverføring fra $FADH_2$ til NAD^+

Redusert $FADH_2$ i E_3 overfører et hydridion til NAD^+ med dannelse av NADH og avgir et proton. Etter dette trinnet er enzymkomplekset regenerert og klart for en ny katalytisk syklus.



Figur 6.5.: Reaksjoner i PDH-komplekset.

Sentrale aspekter ved reaksjonsyklusen i pyruvat dehydrogenase-komplekset

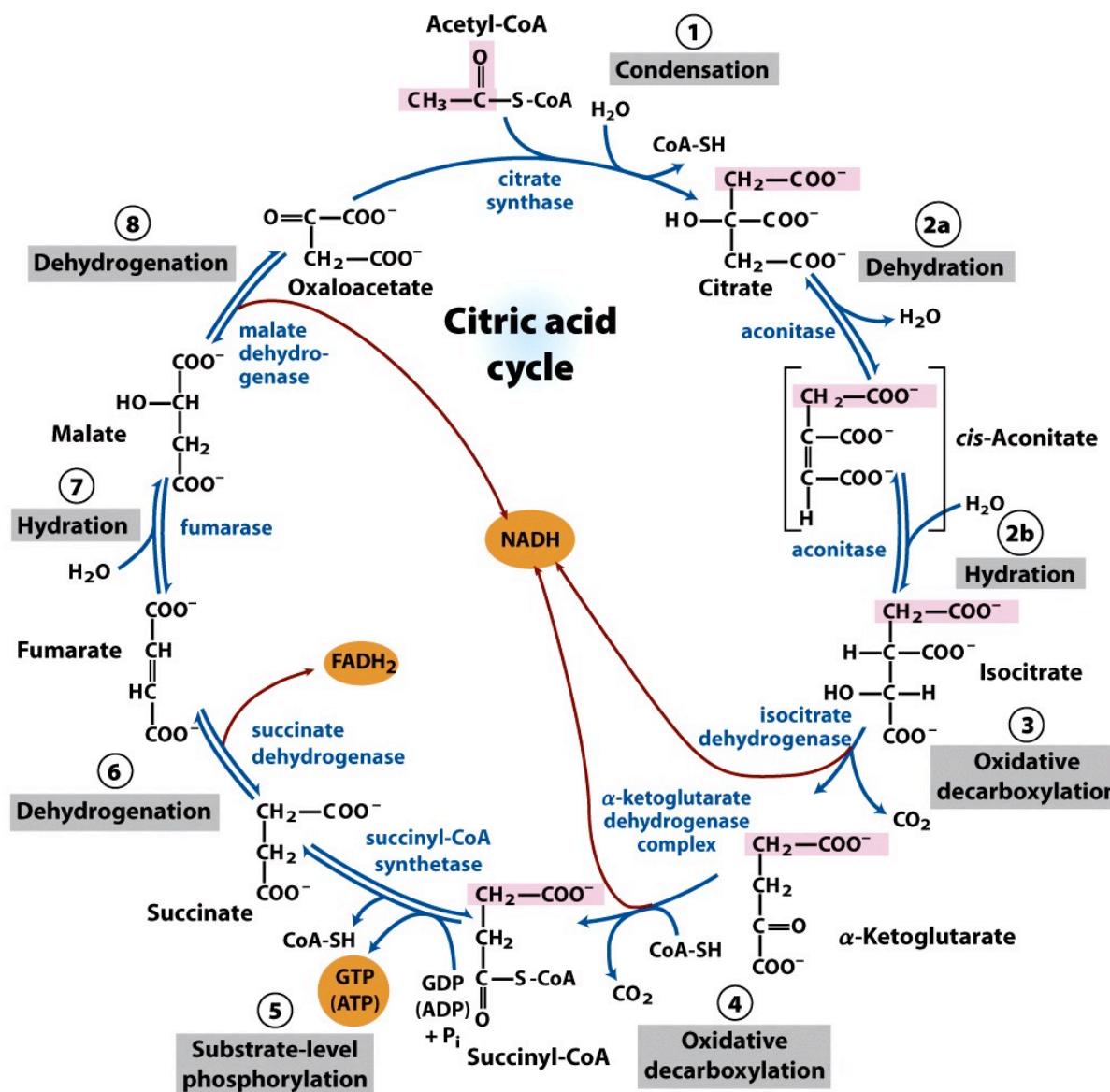
Den svingende lipoyllysinsarmen i E_2 , som aksepterer to elektroner og acetylgruppen som kommer fra pyruvat og sender disse videre til E_3 , er sentral i reaksjonssyklusens mekanisme. Alle enzymer og koenzymer som inngår i komplekset er tett sammenpakket, noe som gjør det mulig for intermediaiter å reagere raskt og hindrer diffusjon vekk fra kompleksets overflate. Dette er et eksempel på **substrate channeling**; intermediatene i reaksjonssekvensen forlater aldri komplekset og den lokale konsentrasjonen av substratet til E_2 holdes svært høy. Channeling hindrer også overføring av den aktiverede acetylgruppen til andre enzymer som bruker den som substrat.

6.2. Sitronsresyklusen

Acetyl-CoA dattet i PDH-komplekset donerer sin acetylgruppe til oksaloacetat ved inngangen til sitronsresyklusen. Acetylgruppen oksideres der til CO_2 og energien som frigjøres ved oksidasjonen konserveres ved dannelsen av de reduserte koenzymene NADH og FADH_2 i fire av syklusens åtte trinn. Oksaloacetat regenereres for hver runde av syklusen, slik at ett oksaloacetatmolekyl i teorien kan facilitere oksidasjon av uendelig mange acetylgrupper fra acetyl-CoA. Dette reflekteres i den cellulære konsentrasjonen av oksaloacetat som er svært lav.

Selv om sitronsresyklusens er sentral i energigivende metabolisme, er ikke dette syklusens eneste formål. Fire- og femkarbonintermediatene i syklusen er alle forløpere for en lang rekke anabolske produkter. For å erstatte intermedierer som går ut av syklusen, benytter cellen anaplerotiske ("etterfyllende") reaksjoner.

I eukaryoter foregår alle reaksjoner i sitronsyresyklusen i mitokondriene, som inneholder alle enzymer og koenzymer som er nødvendige både for sitronsyresyklusen og ATP-syntese ved oksidative fosforylering koblet til elektrontransportkjeden. Mitokondriene inneholder også enzymene som er nødvendige for oksidasjon av fettsyrer og enkelte aminosyrer til acetyl-CoA, samt for oksidativ degradering av andre aminosyrer til sitronsyresyklus-intermediene α -ketoglutarat, succinyl-CoA eller oksaloacetat. Dette gjør mitokondriene til åsted for de fleste energigivende oksidative reaksjonene i ikke-fotosyntetiske eukaryoter. I bakterier finnes de fleste enzymene som inngår i sitronsyresyklusen i cytosolen og plasmamembranen spiller samme rolle som den indre mitokondrielle membranen ved ATP-syntese.



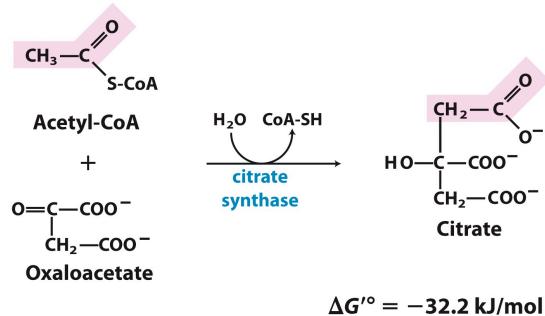
Figur 6.6.: Sitronsyresyklusen.

6.2.1. Reaksjoner i sitronsyresyklusen

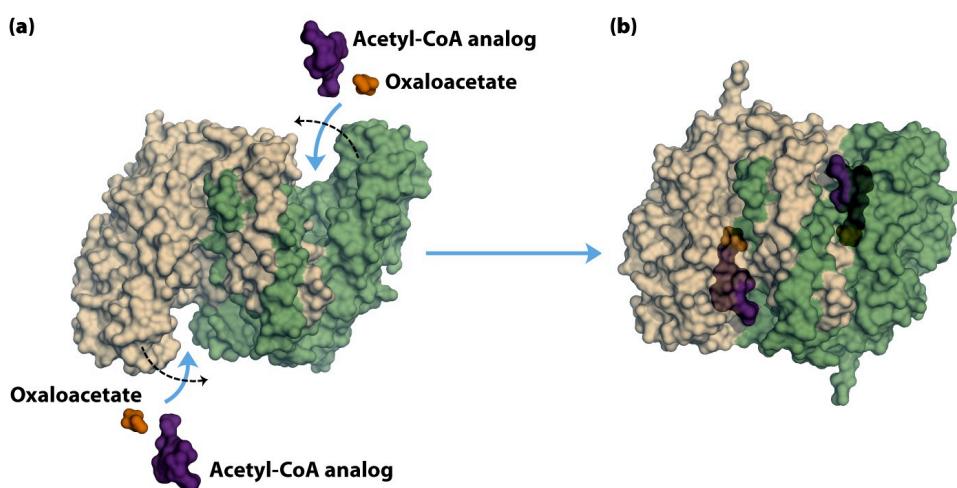
Sitronsyresyklusen består av åtte reaksjonstrinn. Syklusen er illustrert i Figur 6.6.

① Dannelses av sitrat

Den første reaksjonen i syklusen er dannelsen av **sitrat** ved kondensasjon mellom acetyl-CoA og **oksalacetat**, katalysert av **sitrat syntase**:



Metylkarbonet i acetylgruppen festes til karbonylgruppen i oksaloacetat. Oksaloacetat og acetyl-CoA danner et midlertidige intermediat, sitroyl-CoA, i enzymets aktive sete som raskt hydrolyses til fritt CoA og sitrat. Det er primært denne tioester-hydrolysen som gjør reaksjonen eksponensialisk. Den store, negative endringen i fri energi ved reaksjonen er avgjørende, da den cellulære koncentrasjonen av oksaloacetat vanligvis er veldig lav. CoA som frigjøres ved reaksjonen resirkuleres ved hjelp av oksidativ dekarbokslyring av pyruvat i PDH-komplekset.



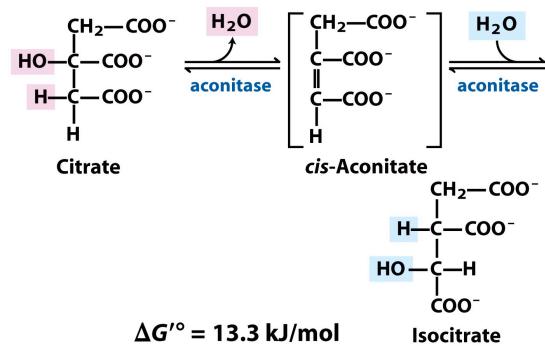
Figur 6.7.: Strukturen til sitrat syntase (a) i åpen form og (b) med oksaloacetat og en stabil Acetyl-CoA-analog bundet.

Sitrat syntase er et homodimerisk enzym; det har to identiske underenheter. Hver underhet består av ett enkelt polypeptid med to domener, et stort og rigid, det andre

mindre og mer fleksibelt. Det aktive setet befinner seg mellom disse to domenene. Oksaloacetat, det første substratet som bindes av enzymet, forårsaker en stor konformasjonell endring i det fleksible domenet med dannelse av bindingssettet for acetyl-CoA, det andre substratet. Når det midlertidige intermediate citroyl-CoA har blitt dannet, promoveres hydrolyse av nok en konformasjonell endring og CoA-SH frigjøres. Induced fit mellom enzymet og substrat og enzym og intermediate gjør for tidlig, og dermed uproduktiv, hydrolyse av tioesterbindingen i sitroyl-CoA langt mindre sannsynlig. Strukturen til sitrat syntase med og uten bundne substrater er vist i Figur 6.7.

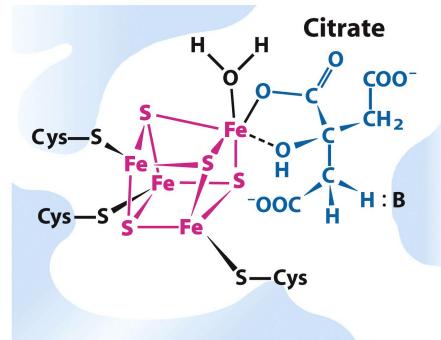
(2) Dannelse av isositrat via *cis*-aconitat

Enzymet **aconitase (aconitat hydratase)** katalyserer den reversible dannelsen av **isocitrat** fra sitrat, via trikarboksylsyre-intermediate ***cis*-aconitat**:



cis-Aconitat disosierer formelt ikke fra det aktive setet. Aconitase kan promotere reversibel addisjon av H_2O til dobbeltbindingen i enzymbundet *cis*-aconitat på to ulike måter, hvorav én gir sitrat og den andre isositrat: Selv om en likevektsblanding av de to komponentene ved pH 7.4 og 25celsius inneholder mindre enn 10% isositrat, er likevekten forskjøvet mot høyre i celler. Dette følger av at isositrat raskt forbrukes i det påfølgende trinnet i syklusen slik at steady state-konsentrasjonen blir lav.

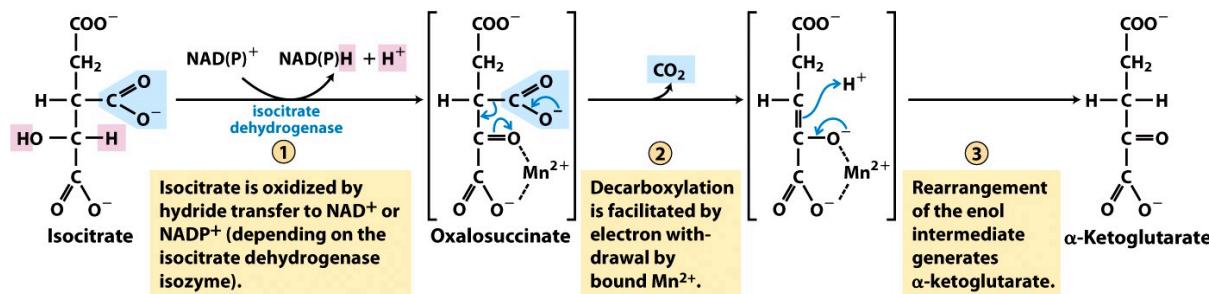
Aconitase inneholder et **jern-svovel-senter** som bidrar både ved bindingen av substratet i det aktive setet og ved den katalytiske addisjonen eller fjerningen av H_2O . Jern-svovel-senteret er vist i Figur 6.8.



Figur 6.8.: Jern-svovel-senteret i aconitase med bundet sitrat.

③ Oksidasjon av isositrat til α -ketoglutarat og CO_2

Isositrat dehydrogenase katalyserer oksidativ dekarboksylering av isositrat med dannelse av α -ketoglutarat:

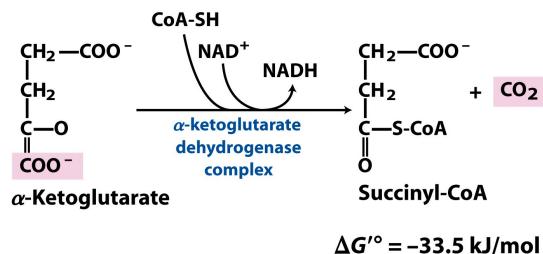


Mn^{2+} i det aktive setet interagerer med karbonylgruppen i intermediatet oksalosuccinat som dannes midlertidig og forblir bundet til det aktive setet inntil det dekarboksyleres til α -ketoglutarat. Mn^{2+} er også ansvarlig for stabiliseringen av enolintermediatet som dannes ved dekarboksyleringen.

Alle celler inneholder to typer isositrat dehydrogenase; den ene krever NAD^+ som elektronakseptor, den andre NADP^+ . Med unntak av dette er totalreaksjonen identisk for begge enzymer.

④ Oksidasjon av α -ketoglutarat til succinyl-CoA og CO_2

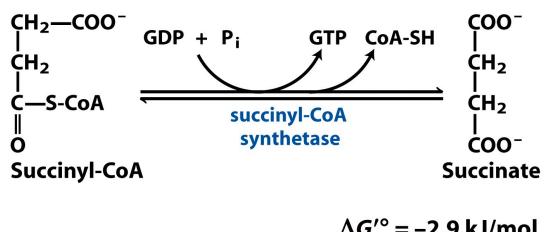
Dette trinnet involverer nok en oksidativ dekarboksylering, denne gang ved omdannelse av α -ketoglutarat til **succinyl-CoA** og CO_2 katalysert av **α -ketoglutarat dehydrogenasekomplekset**:



NAD⁺ er elektronakseptor og CoA bærer succinylgruppen. Oksidasjonsenergien konserveres ved dannelsen av en tioesterbinding i succinyl-CoA. Denne reaksjonen er så godt som identisk med pyruvat dehydrogenase-reaksjonen og α -ketoglutarat dehydrogenasekomplekset er svært likt PDH-komplekset i både stuktur og funksjon. Komplekset som inngår i oksidasjonen av α -ketoglutarat inneholder tre enzymer som er homologer til E₁, E₂ og E₃ i PDH-komplekset, samt enzymbundet TPP, lipoat, FAD, NAD og koenzym A; det er liten tvil om at de to kompleksene har samme evolusjonære opphav.

5 Konvertering av succinyl-CoA til succinat

Succinyl-CoA inneholder, i likhet med, acetyl-CoA, en tioesterbinding med en sterkt negativ ΔG for hydrolyse. Energien som frigjøres ved bryting av denne bindingen brukes til å drive syntesen av en fosfoanhydridbinding i GTP eller ATP med tilhørende dannelse av **succinat**: Enzymet som katalyserer denne reversible reaksjonen kalles **succinyl-CoA synthetase**



syntetase, et navn som indikerer at en nukleosidtrifosfat deltar i reaksjonen. Reaksjonen er energikonserverende og involverer et intermediat hvor enzymet selv fosforyleres på en His-residue i det aktive setet. Denne fosforylgruppen har et høyt gruppeoverføringspotensial som utnyttes ved overføring til ADP eller GDP med dannelse av ATP eller ADP. Dyreceller har to isozymer av succinyl-CoA-syntetase; det ene er spesifikt for ADP, det andre for GDP. Enzymet har to underenheter, α og β , hvorav førstnevnte inneholder (P) -His-residuene og bindingssetet for CoA, mens sistnevnte sørger for spesifisitet for ADP eller GDP. To "power"-helikser i enzymet, orientert med sine positive dipoler mot negativt ladet (P) -His, stabiliserer fosfoenzym-intermediatet.

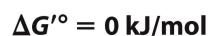
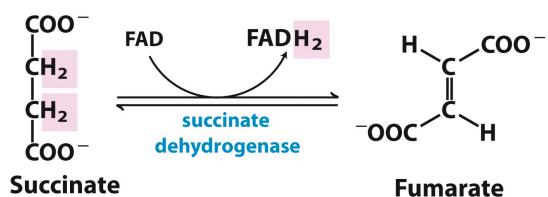
Dannelsen av ATP eller GTP ved reaksjonen skjer ved substratnivå-fosforylering. Deretter som GDP dannes, kan fosforylgruppen doneres videre til ADP med dannelse av ATP i en reaksjon katalysert av **nukleosiddifosfat kinase**:



Netto resultat blir dermed energikonservering i form av ATP uansett hvilket isozym som katalyserer reaksjonen.

6 Oksidasjon av succinat til fumarat

Succinat dannet fra succinyl-CoA oksidases til **fumarat** av flavoproteinet **succinat dehydrogenase**:

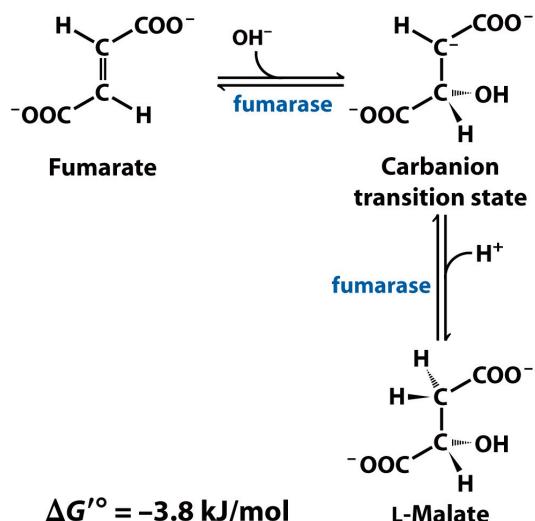


I eukarypter finnes succinat dehydrogenase bundet til den indre mitokondrielle membranen, i bakterier til plasmamembranen. Enzymet inneholder tre ulike jern-svovel-sentre

og et kovalent bundet FAD-molekyl. Elektroner passerer gjennom FAD og jern-svovel-senterene før de går inn i elektrontransportkjeden. Elektronflyt fra succinat, via disse elektronbærerne og til slutt til O_2 , er koblet til syntese av omrent 1.5 ATP-molekyler per elektronpar.

7) Hydrering av fumarat til malat

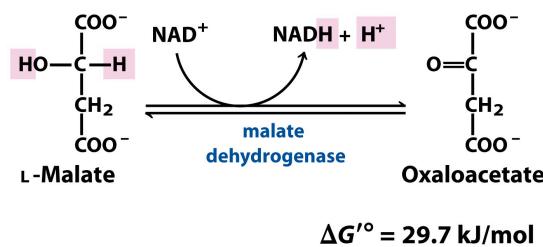
Den reversible hydreringen av fumarat til **L-malat** katalyseres av **fumarase (fumarat hydratase)**:



Reaksjonen inkluderer et karbanion i overgangstilstanden. Fumarase er svært stereospesifikt; det katalyserer hydrering av trans-dobbeltbindingen i fumarate, men ikke cis-dobbeltingingen i maleat (fumarats cis-isomer).

8) Oksidasjon av malat til oksaloacetat

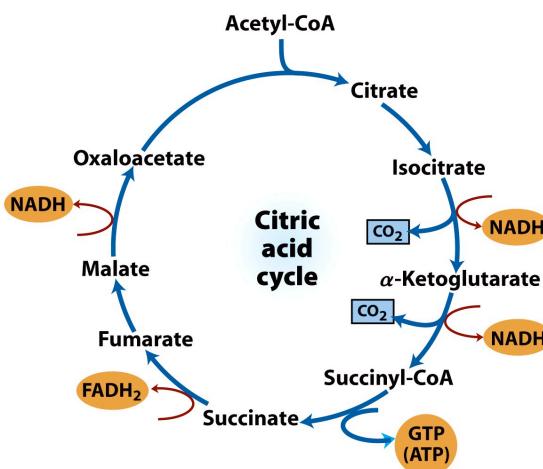
I den siste reaksjonen i sitronsyresyklusen katalyseres oksidasjonen L-malat til oksaloacetat, med tilhørende konvertering av NAD^+ til $NADH + H^+$, av **L-malat dehydrogenase**:



Likevekten til denne reaksjonen er forskjøvet langt mot venstre under ordinære termodynamiske standardbetingelser, men den svært lave konsentrasjonen av oksaloacetat i celler ($< 10^{-6} \text{ M}$) som følger av raskt forbruk av oksaloacetat i sitronsyresyklusens svært eksponensialiske trinn ①, sørger for forskyvning av reaksjonen i retning dannelse av oksaloacetat.

6.2.2. Konservering av energi i sitronsyresyklusen

Én runde i sitronsyresyklusen kan oppsummeres som følger: En tokarbon-acetylgruppe går inn i syklusen ved kombinasjon med oksaloacetat. To karbonatomer går ut i form av CO_2 ved oksidasjon av henholdsvis isositrat og α -ketoglutarat i trinn ③ og trinn ④. Energien som frigjøres ved disse oksidasjonene konserveres ved reduksjon av tre NAD^+ og én FAD samt produksjonen av én ATP eller GTP. Ved slutten av syklusen regenereres det opprinnelige oksaloacetat-molekylet. Merk at de to karbonatomene som går ut i form av CO_2 i en syklus ikke er de samme som går inn i syklusen i form av acetylgruppen i acetyl-CoA.



Figur 6.9.: Produkter fra én runde gjennom sitronsyresyklusen.

Energiutbyttet fra glykolysen er 2 ATP og 2 NADH. Ved oksidativ fosforylering gir overføring av to elektroner til O_2 dannelse av omtrent 2.5 ATP dersom NADH er donor og omtrent 1.5 ATP dersom FADH₂ er donor. Denne støkiometrien tillater beregning av det totale ATP-utbyttet ved komplett oksidasjon av glukose.

Når begge pyruvatmolekyler som går ut av glykolysen oksideres til 6 CO_2 via PDH-komplekset og sitronsyresyklusen og elektronene som frigjøres i disse prosessene overføres til O_2 via oksidativ fosforylering, kan så mange som 32 ATP-molekyler dannes per glukosemolekyl. Dette representerer konservering av omtrent $32 \cdot 30.5 \text{ kJ/mol} = 976 \text{ kJ/mol}$, 34% av det teoretisk maksimale utbyttet på 2840 kJ/mol. Dette er beregnet fra endringer i standard fri energi. Ved korrigering for den reelle frie energien som kreves for å danne ATP i celler, blir effektiviteten nærmere 65%.

6.2.3. Hvorfor bruke åtte reaksjonstrinn på å oksidere acetat?

Å bruke en syklig prosess bestående av åtte reaksjonstrinn for enkel oksidasjon av en acetylgruppe til CO_2 kan virke unødvendig og i strid med det biologiske prinsippet om maksimal økonomi. Det er imidlertid viktig å være klar over at sitronsyresyklusens rolle ikke er begrenset til oksidasjon av acetat; syklusen utgjør også et metabolsk knutepunkt, hvor tre-, fire- og femkarbonprodukter fra mange katabolske prosesser går inn for avslut-

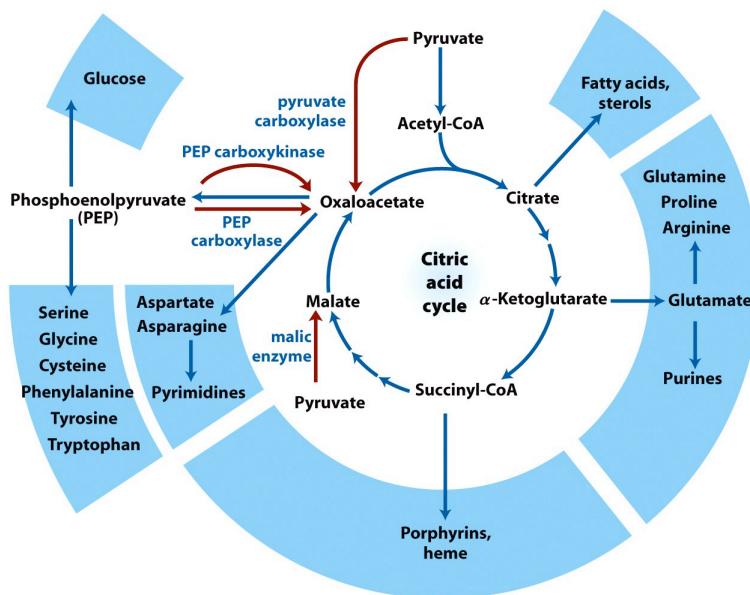
tende, energikonservoerende oksidasjon. Uner enkelte biologiske omstendigheter trekkes også intermediater ut av syklusen for å fungere som forløpere i ulike biosyntetisk spor.

Et annet poeng i denne forbindelse er at sitronsyresyklusen, som alle andre metabolske prosesser, er et produkt av evolusjon, og mye av denne evolusjonen skjedde før uviklingen av aerobe organismer. Selv om den ikke nødvendigvis representerer den *korteste* veien mellom acetat og CO₂, er sitronsyresyklusen den biosyntetiske ruten som, over tid, har gitt de største evolusjonære fordelene. Tidlige anaerobe brukte antageligvis enkelte av reaksjonene i syklusen i lineære biosyntetiske prosesser, noe som støttes av ufullstendige sitronsyresykluser påvist i nålevende anaerobe mikroorganismer. Med utviklingen av cyanobakterier som produserte O₂ fra vann ble jordens atmosfære aerob, og det selektive presset for utvikling av aerob metabolisme fremmet utviklingen av sitronsyresyklusen.

6.2.4. Intermediater går inn og ut av sitronsyresyklusen

I aerobe organismer uggjør sitronsyresyklusen en **amfibolsk prosess**; den fungerer både katabolsk og anabolsk. Intermediater i syklusen er forløpere for mange biosyntetiske spor. Intermediater som fjernes fra syklusen for anabolske formål, erstattes via **anaplerotiske reaksjoner**. Under normale betingelser er reaksjonene som sørger for fjerning av intermediater i dynamisk balanse med de som sørger for etterfylling av intermediater, slik at intermediatkonsentrasjonene forblir tilnærmet konstante.

Den viktigste anaplerotiske reaksjonen i lever og nyrer hos pattedyr er den reversible karboksyleringensreaksjonen hvor oksaloacetat dannes fra pyruvat og CO₂. Denne reaksjonen er katalysert av **pyruvat karboksylase** og forløper når sitronsyresyklusen har for lite oksaloacetat eller andre intermediater. Pyruvat karboksylase er et regulatorisk enzym og er så godt som inaktivt i fravær av acetyl-CoA som fungerer som positiv allosterisk modulator.



Figur 6.10.: Sitronsyresyklusens rolle i anabolisme.

7. Fettsyrekatabolisme

Oksidasjon av langkjedede fettsyrer til acetyl-CoA er en sentral energigivende prosess i mange organismer og vev. Elektronene som fjernes fra fettsyrene ved oksidasjon går inn i elektrontransportkjeden hvor de deriver ATP-syntese; produsert acetyl-CoA kan oksideres fullstendig til CO₂ i sitronsyresyklusen med ytterligere energikonserving som resultat. Den biologiske rollen til fettsyreoksidasjon varierer mellom arter, men kjernen i mekanismen er den samme, en firetrinnsprosess kalt **β-oksidasjon**.

Fettsyrene i triacylglyceroler inneholder lange alkylkjeder, svært reduserte strukturer som ved fulstendig oksidasjon kan frigjøre mer enn dobbelt så mye energi som tilsvarende vekt av karbohydrater eller proteiner. Denne fordelen balanserer av ulempen ved at lipider er ekstremt uløselige i vann, noe som er årsaken til at cellulære triacylglyceroler går sammen i uløste aggregater. Triacylglyceroler er dessuten svært inerte forbindelser og kan derfor lagres i store kvanta i celler uten risiko for uønskede reaksjoner. Også denne egenskapen har imidlertid en bakdel: Fordi de er uløselige i vann, må triacylglycerol emulgeres før de kan opptas av vannløselige enzymer i tarmen og bindes til proteiner som motvirker uløseligheten deres før de kan transporteres via blodstrømmen.

Den komplette oksidasjonen av fettsyrer til CO₂ og H₂O skjer i tre stadier: oksidasjon av langkjedede fettsyrer til tokarbonfragmenter i form av acetyl-CoA (**β-oksidasjon**); oksidasjon av acetyl-CoA til CO₂ i sitronsyresyklusen; og elektronoverføring fra reduserte elektronbærere til elektrontransportkjeden.

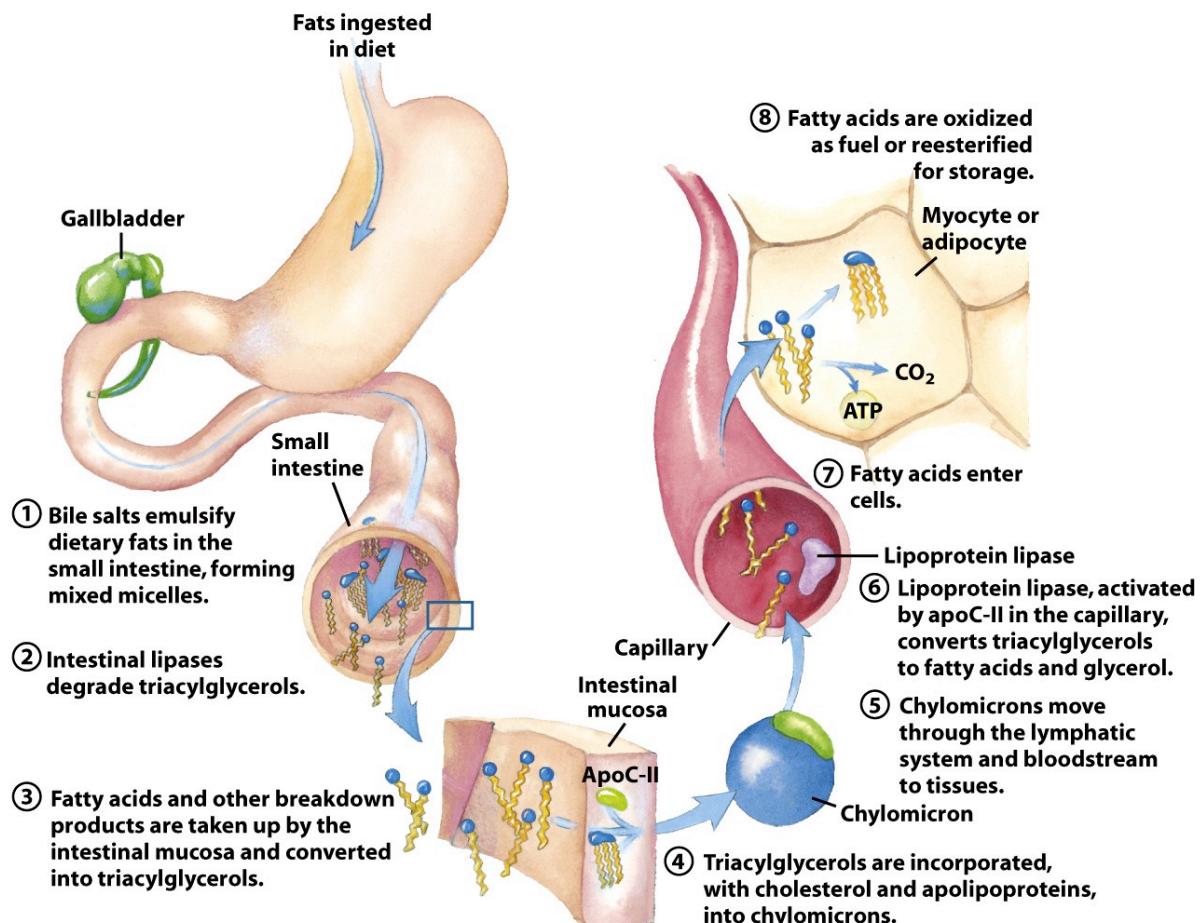
7.1. Opptak, mobilisering og transport av fett

Fettsyrer kan komme til celler fra tre kilder: fett inntatt i kosten, fett lagret som lipiddråper i celler og fett syntetisert i ett organ for eksport til et annet.

7.1.1. Absorpsjon av fett i tynntarmen

I virveldyr må triacylglyceroler inntatt via kosten konverteres fra uløselige, makroskopiske fettpartikler til finfordelte, mikroskopiske miceller før de kan absorberes gjennom tarmveggen. Dette skjer ved hjelp av **gallesalter** som syntetiseres fra kolesterol i leveren, lagres i galleblæren og slippes ut i tynntarmen etter inntak av et måltid med fett. Gallesalter er amfipatiske forbindelser som virker som biologiske detergenter; de konverterer fett til blandede miceller bestående av gallesalt og triacylglyceroler (trinn ① i Figur 7.1). Dannelsen av slike miceller øker andelen lipidmolekyler som er tilgjengelige for vannløselige lipaser i tarmen enormt, og aktiviteten til disse lipasene sørger for konvertering av triacylglyceroler til mono- og diacylglyceroler, frie fettsyrer og glyserol (trinn

(2)). Disse produktene diffunderer deretter inn i celler i tarmen (trinn (3)), hvor de konverteres til triacylglyseroler og pakkes sammen med kolesterol og spesifikke proteiner til lipoproteinaggregater kalt **kylomikroner**. (trinn (4)).



Figur 7.1.: Prosessering av lipider inntatt i kosten hos virveldyr.

Apolipoproteiner er lipidbindende proteiner i blodet som er ansvarlige for transport av triacylglyseroler, fosfolipider, kolesterol og kolesterolsterole mellom organer. Disse proteinene går sammen med lipider og danner flere forskjellige klasser av **lipoproteiner**, sfæriske aggregater med hydrofobiske lipider på innsiden og hydrofile proteinsidekjeder og lipidhoder på overflaten. Funksjonelle grupper i lipoproteinene gjenkjennes av reseptorer på overflaten av celler ved opptak av lipider fra tarmene beveger kylomikroner, som inneholder apolipoprotein C-II (apoC-II), seg fra slimhinnene i tarmen til lymfesystemet før de går inn i blodstrømmen og bæres til muskler og fettvev (trinn (5)). I kapillærene i disse vevene hydrolyserer **lipoprotein lipase**, aktivert av apo-C-II, triacylglyserolene til fettsyrer og glyserol (trinn (6)) som tas opp i celler (trinn (7)). I muskler oksideres fettsyrer for utvinning av energi; i fettvev reestifisieres de for lagring som triacylglyseroler (trinn (8)).

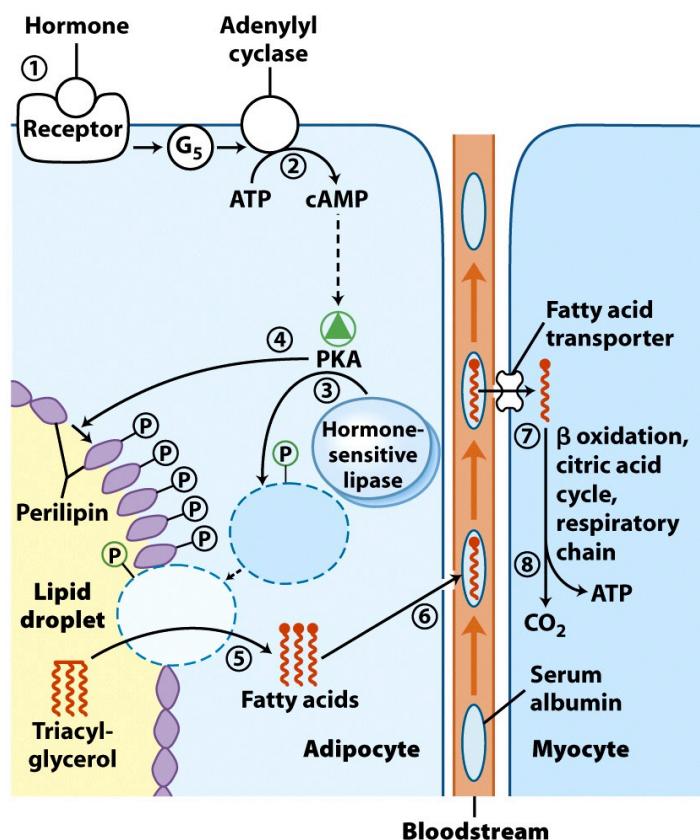
Resten av kylomikroner, tømt for mesteparten av triacylglyserolene, men fortsatt rike i kolesterol og apolipoproteiner, fraktes via blodstrømmen til leveren, hvor de tas opp via

endocytose fasilitert av apolipoproteinreseptorer på celleoverflaten. Triacylglyceroler som kommer inn i leveren på denne måten kan oksideres eller brukes som kilde til forløpere for syntese av "ketone bodies".

7.1.2. Hormoner signaliserer mobilisering av lagrede triacylglyseroler

Nøytrale lipider lagres i adipocytter (fettceller) i form av lipiddråper, hvor en kjerne av sterolestere og triacylglyseroler er omringet av et monolag av fosfolipider. Overflaten til disse dråpene er dekket av **perilipider**, en klasse proteiner som begrenser tilgang til lipiddråper og dermed hindrer at lipider mobiliseres på uønskede tidspunkt. Når hormoner signaliserer at det er behov for metabolisk energi, mobiliseres triacylglyseroler lagret i fettvev og transportereres til vev hvor fettsyrer kan oksideres for uvinning av energi.

Hormonene adrenalin og glukagon sekretieres som respons på lave glukosenivåer i blodet og aktiverer enzymet adenylyl syklase som produserer det intracellulære signalmolekylet cAMP. cAMP-avhengig proteinkinase (PKA) fosforylerer deretter perilipin A; det fosforylerte perilipinet får **hormonsensitiv lipase** i cytosolen til å bevege seg til lipiddråpens overflaten hvor det kan påbegynne hydrolyse av triacylglyseroler til **frie fettsyrer (FFA)** og glycerol.



Figur 7.2.: Mobilisering av triacylglyseroler lagret i fettvev.

Fettsyrer som frigjøres ved hydrolyse av triacylglyceroler i fettvev beveger seg fra fettcellen til blodet, hvor de bindes til blodproteinet **serum albumin**. Dette proteinet kan binde seg ikke-kovalent til så mange som 10 fettsyrer per monomer. Serum albumin frakter de ellers løselige fettsyrene til uike vev, hvor fettsyrene disosierer proteinet og fraktes gjennom plasmamembranene av transportproteiner.

Omtrent 95% av den biologisk tilgjengelige energien i triacylglyceroler finnes i de tre langkjedede fettsyrene; bare 5% finnes i glyserol. Glyserol som frigjøres ved nedbrytning av triacylglyceroler fosforyleres av **glycerol kinase** og det resulterende glycerol-3-fosfatet oksideres til dihydroksyacetonfosfat. Det glykolytiske enzymet triosefosfat isomeraser konverterer denne forbindelsen til glyeraldehyd-3-fosfat som oksideres via glykolysen.

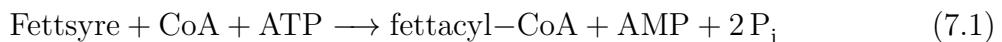
7.1.3. Aktivering av fettsyrer og transport inn i mitokondrier

Enzymene som er nødvendige ved fettsyreoksidasjon finnes i mitokondriene. Fettsyrer med kjeder bestående av 12 eller færre karbonatomer går inn i mitokondriene uten hjelp av transportproteiner i de mitokondrielle membranene. Kjeder med 14 eller flere karbonatomer, noe som inkluderer flesteparten av de frie fettsyrene i kroppen, kan ikke passere direkte gjennom membranen. Disse er avhengige av transport via de tre enzymatiske reaksjonene i **carnitine shuttle**.

① Esterifisering av koenzym A

Den første reaksjonen katalyseres av isozymer kalt **acyl-CoA syntetaser** i den ytre mitokondrielle membranen. Acyl-CoA syntetaser katalyserer generelt dannelsen av en tioesterbinding mellom karboksylgruppen i en fettsyre og tiolgruppen i koenzym A med en **fettacetyl-CoA** som resultat. Reaksjonen er koblet til kløyving av ATP til AMP og PP_i og skjer i to trinn via et fettacetyl-CoA-intermediat.

Fettacetyl-CoA-forbindelser er, i likhet med acetyl-CoA, høyenergiforbindelser. Dannelsen av en fettacetyl-CoA favoriseres som følge av hydrolyse av *to* høyenergibindinger i ATP og reaksjonen trekkes ytterligere mot produktsiden ved at pyrofosfatet som dannes umiddelbart hydrolyses av uorganisk pyrofosfatase. Totalreaksjonen er



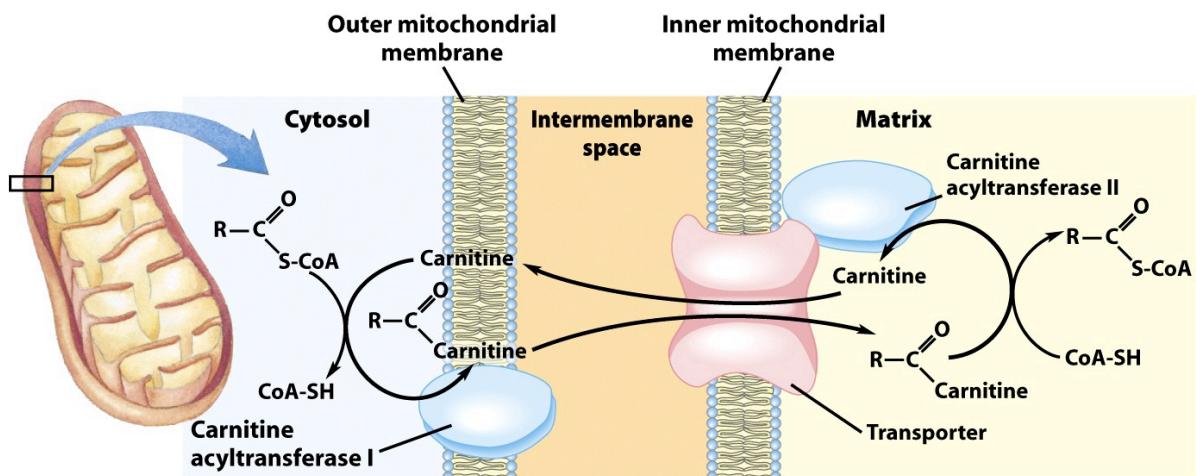
Fettacetyl-CoA som dannes på cytosolsiden av den ytre mitokondrielle membranen kan transporteres inn i mitokondrien og oksideres for ATP-produksjon eller brukes som forløper ved syntese av membranlipider i cytosolen.

② Transesterifisering til karnitin og transport inn i matrix

Fettsyrer som skal fraktes inn i mitokondriene festes midlertidig til hydroksylgruppen i **karnitin** slik at fettacetyl-karnitin dannes. Dette er den andre av de tre reaksjonene i carnitine shuttle, en transesterifisering katalysert av **karnitinacyltransferase I** i den ytre membranen. Fettacetyl-karnitinet fraktes inn til det intermembrane området gjennom store porer i den ytre membranen og deretter videre inn i matrix via fasilitert diffusjon gjennom **acylkarnitin/karnitin-transportproteinet** i den indre membranen.

(3) Transesterifisering tilbake til koenzym A

I det tredje og siste trinnet i carnitine shuttle overføres fettacyl-gruppen enzymatisk fra karnitin til koenzym A i mitokondriene av **karnitinacyl transferase II**. Dette isozymet, som finnes på den indre overflaten av den indre mitokondrielle membranen, regenererer fettacyl-CoA og slipper det ut i i matrix sammen med fritt karnitin. Karnitin går deretter tilbake til det intermembrane området via samme transportprotein som tidligere.



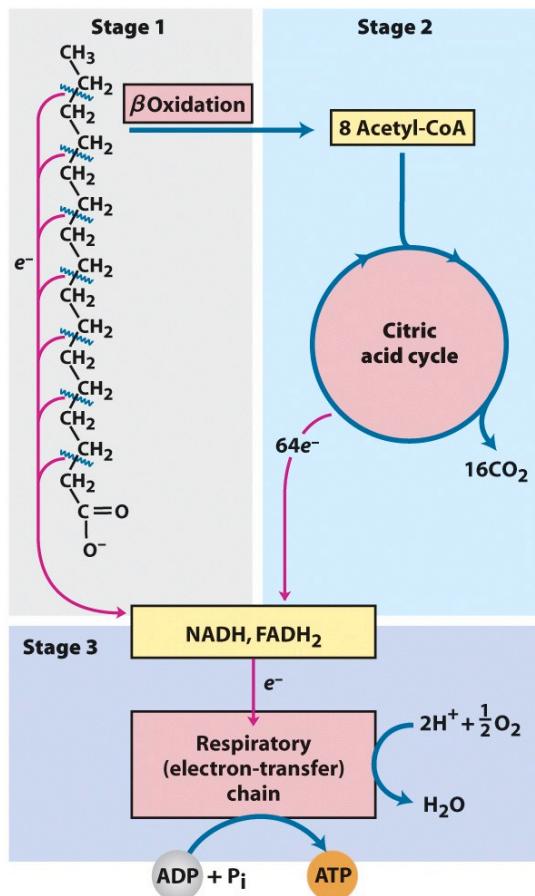
Figur 7.3.: Transport av fettsyrer inn i mitokondrier.

Carnitine shuttle kobler to separate ansamlinger av koenzym A og fettacyl-CoA

Tretrinnsprosessen for overføring av fettsyrer fra cytosolen til mitokondrier som er beskrevet ovenfor kobler to separate ansamlinger av koenzym A og fettacyl-CoA, én i cytosolen og én i mitokondriene. Disse ansamlingene har ulik funksjon. I matrix i mitokondriene brukes koenzym A primært ved oksidativ degradering av pyruvat, fettsyrer og enkelte aminosyrer, mens koenzym A i cytosolen inngår i biosyntesen av fettsyrer. Fettacyl-CoA i cytosolen kan, som tidligere nevnt, benyttes ved syntese av membranlipider eller flyttes inn i matrix for oksidasjon og ATP-produksjon.

7.2. Oksidasjon av fettsyrer

Mitokondriell oksidasjon av fettsyrer skjer i tre trinn. I det første – β -oksidasjon – undergår fettsyrer (konvertert til fettacyl-CoA ved den ytre mitokondrielle membranen) oksidativ fjerning av to og to karbonenheter fra fettacylkjedens karboksyldende. Hvert to-karbonsegment går ut som en acetylgruppe i et acetyl-CoA-molekyl. En mettet fettsyre med 16 C-atomer (palmitinsyre) vil følgelig oksideres i sju trinn med konvertering av 16-karbonkjeden til tokarbon-acetylgrupper i åtte acetyl-CoA-molekyler som resultat. Dette er vist i Figur 7.5.



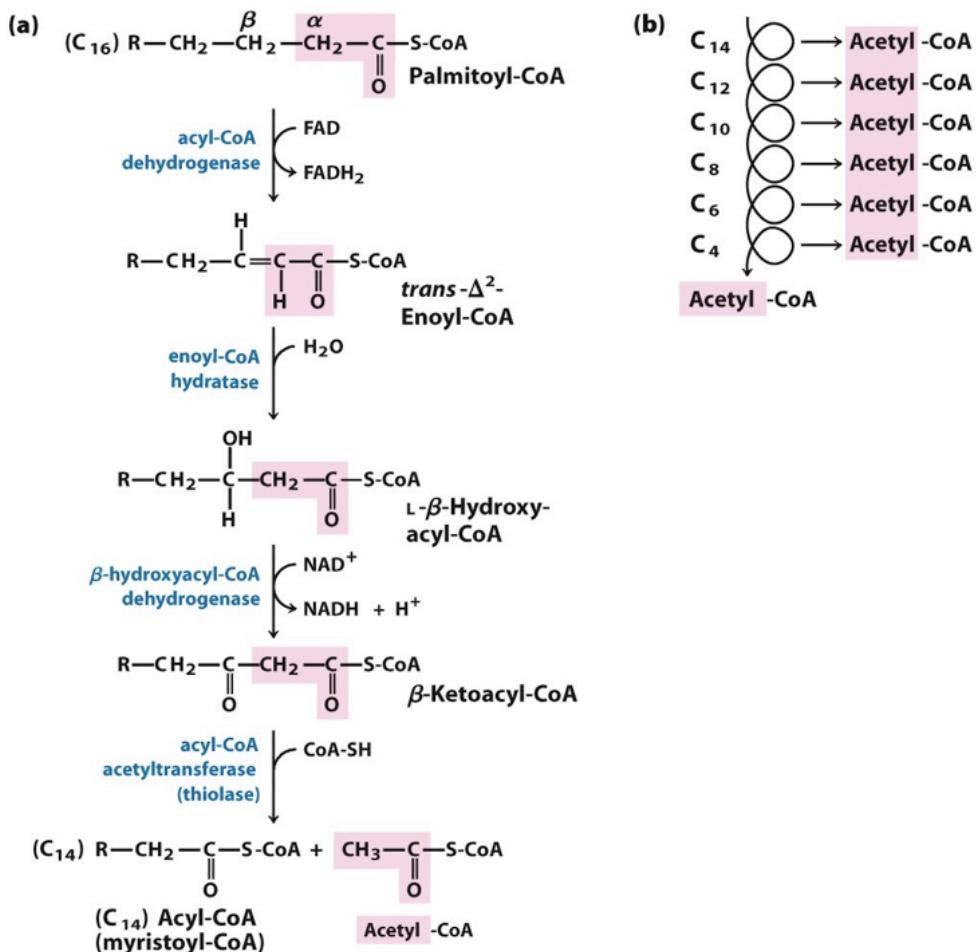
Figur 7.4.: De tre trinnene i fettsyreoksidasjon.

7.2.1. β -oksidasjon av fettsyrer

β -oksidasjon av fettsyrer skjer via fire enzymkatalyserte reaksjoner som eksemplifisert ved oksidasjonen av palmitinsyre i Figur 7.5 og oppsummert i det følgende.

(1) Dehydregenering av α - og β -karbon i en fettacyl-CoA

Dehydregenering av fettacyl-CoA gir dobbeltbinding mellom α - og β -karbonene (C-2 og C-3) og forbindelsen ***trans*- Δ^2 -enoyl-CoA**. Den nye dobbeltbindingene har altså trans-konfigurasjon, noe som står i motsetning til cis-dobbeltbindingene i naturlig forekommende umettede fettsyrer. Reaksjonen katalyses av tre izozymer av **acyl-CoA dehydrogenase** som alle er spesifikke for visse kjedelengder. Alle tre er flavoproteiner med FAD som prostetisk gruppe. Elektronene som fjernes fra fettacyl-CoA-molekylet i reaksjonen overføres til FAD før de umiddelbart doneres videre til en elektronbærer i elektrontransportkjeden, et **elektronoverførende flavoprotein (ETF)**. Dehydrogeneringsreaksjonen beskrevet ovenfor er analog til succinat dehydrogenase-reaksjonen i sitronsyresyklusen.



Figur 7.5.: β -oksidasjon av palmitinsyre. (a) Palmitinsyre går inn i β -oksidasjonen som palmitoyl-CoA. Ved hver gjennomgang av oksidasjonens fire trinn fjernes én acetylgruppe fra fettacylkjedens karboksylende. (b) Seks nye gjennomganger av oksidasjonen gir syv nye acetyl-CoA-molekyler, slik at samlet acetyl-CoA-utbytte blir åtte molekyler.

② Hydrering av dobbeltbindingen i $trans$ - Δ^2 -enoyl-CoA

Vann adderes til dobbeltbindingen i $trans$ - Δ^2 -enoyl-CoA slik at L-stereoisomeren av β -hydroksyacyl-CoA (**3-hydroksyacyl-CoA**) dannes. Denne reaksjonen katalyseres av **enoyl-CoA hydratase** og er analog til fumarasereaksjonen i sitronsyresyklusen.

③ Dehydregenering av L- β -hydroksyacyl-CoA til β -ketoacyl-CoA

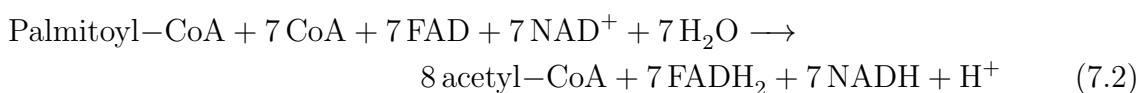
L- β -hydroksyacyl-CoA dehydregeneres til β -ketoacyl-CoA av **β -hydroksyacyl-CoA hydrogenase** med NAD^+ som elektronakseptor. NADH som dannes i denne reaksjonen donerer sine elektroner til **NADH dehydrogenase**, en elektronbærer i elektrontransportkjeden. Reaksjonen er analog til malat dehydrogenase-reaksjonen i sitronsyresyklusen.

4 Kløyving av β -ketoacyl-CoA

Det fjerde og siste trinnet i β -oksidasjonen er katalysert av **acyl-CoA acetyltransferase**, eller **tiolase**, som promoterer reaksjon mellom β -ketoacyl-CoA og fritt koenzym A med avgivelse av det karboksyteminale tokarbonfragmentet i den opprinnelige fettsyren i form av acetyl-CoA som et av to produkter. Det andre produktet er fettsyrens CoA-tioester, nå to karbonatomer kortere enn den var ved starten av reaksjonsskvensen.

7.2.2. Energiutbytte fra β -oksidasjon

En stor andel av energien som frigjøres ved β -oksidasjon konserveres i form av reduserte elektronbærere som kan gi dannelse av ATP ved donasjon av elektroner til elektrontransportkjeden. Ved nedbrytning av palmitinsyre dannes 7 molekyler hver av FADH₂ og NADH. Dette kan ses av netto reaksjonsligning for β -oksidasjonsprosessen:



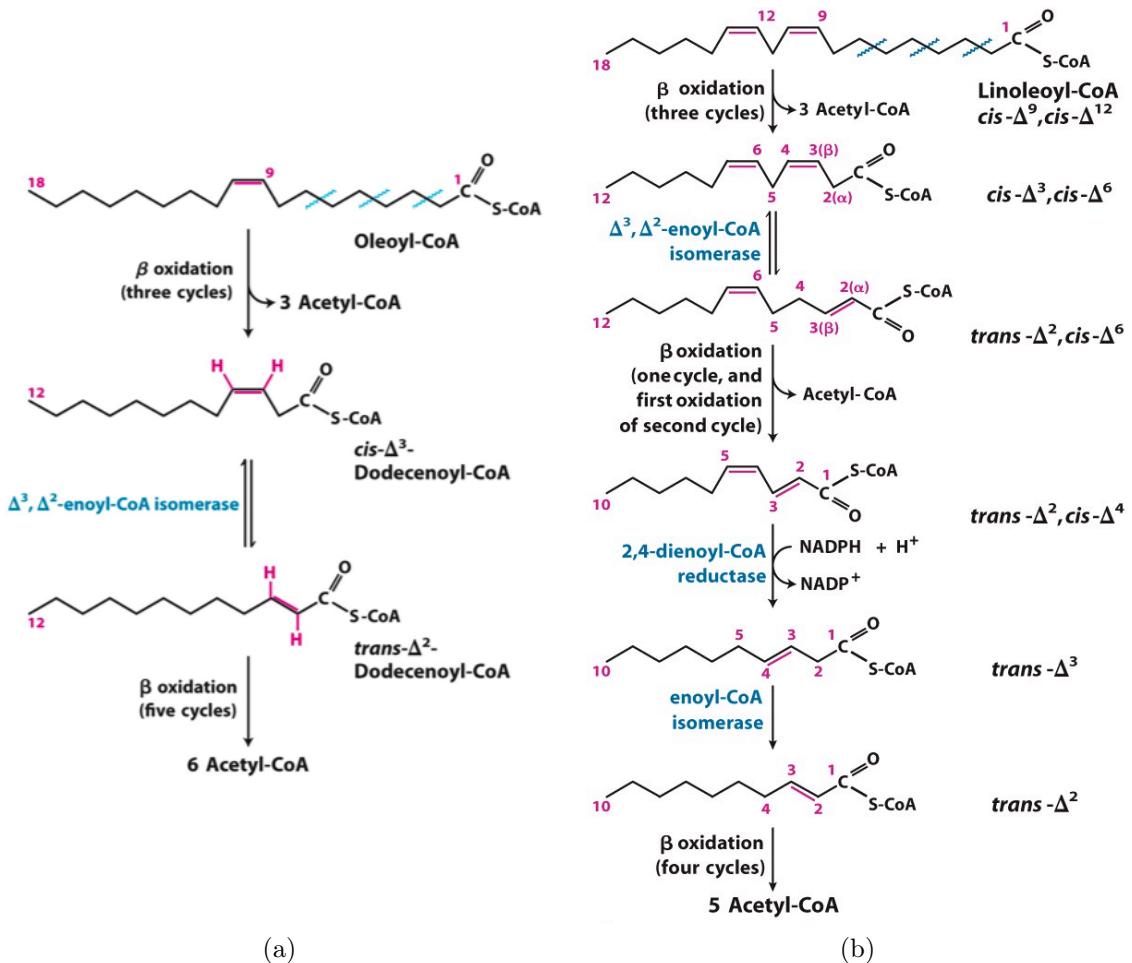
Dersom FADH₂ og NADH donerer sine elektroner til elektrontransportkjeden, vil det omtrentlig resultatet bli henholdsvis 1.5 og 2.5 ATP-molekyler per molekyl. I tillegg kan de åtte acetyl-CoA-molekylene oksideres videre til vann og CO₂ i sitronsyklusen, noe som samlet vil resultere i så mye som 80 ATP-molekyler. Dersom dette slås sammen med det samlede energiutbyttet fra oksidasjonen av palmitoyl-CoA, inkludert elektronoverføringer og oksidative fosforyleringer, blir netto utbytte 106 ATP-molekyler, noe som innebærer en unyttelse av tilgjengelig fri energi på mer enn 60% av det teoretisk maksimale under intracellulære betingelser.

7.2.3. Oksidasjon av umettede fettsyre

For en umettet fettsyre med dobbeltbinding i *cis*-konfigurasjon (noe som er tilfelle for de aller fleste naturlig forekommende fettsyrene) krever oksidasjonen av umettet fettsyre én eller to ekstra reaksjoner (avhengig av om fettsyren er en- eller flerumettet) med tilhørende enzymer: en isomerase og en reduktase. Reduktasen er kun involvert ved nedbrytning av fettsyre som inneholder mer enn én dobbeltbinding. Oksidasjon av enumettede og flerumettede fettsyre er illustrert i Figur 7.6.

Nedbrytningen av fettacyl-CoA forløper for umettede fettsyre ved β -oksidasjon så lenge ingen *cis*-dobbeltbindinger hindrer fjerningen av tokarbonfragmenter fra fettacylkjeden. På et eller annet punkt i nedbrytningsprosessen vil imidlertid karboksylenden være posisjonert slik at neste kjedebrudd må skje ved *cis*-dobbeltbindingen og i dette tilfellet kan ikke fettacyl-kjeden fungere som substrat for enoyl-CoA hydratase, enzymet som katalyserer hydreringen av α - β -dobbeltbindingen i andre trinn av β -oksidasjonen. enoyl-CoA hydratase krever *trans*-konfigurasjon, og substratet isomeriseres derfor ved omgjøring av konfigurasjonen til dobbeltbindingen fra *cis* til *trans*, katalysert av **Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomerase**, før β -oksidasjonen kan fortsette som vanlig. Dobbeltbindingen vil forskyves videre nedover i kjeden etter hvert som tokarbonsegmenter går av, og karboksylgruppen vil før eller siden få et substrat med *trans*- Δ^2 , *cis*- Δ^4 -konfigurasjon. **2,4-dienoyl-CoA**

reduktase sørger da for reduksjon av *cis*-dobbeltbindingen slik at intermediatet kan β -oksideres videre.



Figur 7.6.: Okidasjon av umettede fettsyrer. (a) Enumettet fettsyre. (b) Flerumettet fettsyre.

7.2.4. Fullstendig oksidasjon av fettsyrer med odde antall karbonatomer

Antall karbonatomer er et partall i de fleste naturlig forekommende fettsyrer, men fettsyrer med odde antall karbonatomer er også vanlige i lipider i mange planter og marine organismer. Langkjedede, oddetallige fettsyrer oksideres via samme prosess som partallige fra fettsyrens karboksylende, men substratet for den siste runden gjennom β -oksidasjonen er en fettacyl-CoA med en femkarbon-fettsyre. Når denne oksideres og kløyves er resultatet acetyl-CoA og **propionyl-CoA**. Acetyl-CoA kan gå inn i sitronsyrresyklusen, men propionyl-CoA går inn i et annet spor bestående av tre reaksjoner katalysert av tre ulike enzymer.

Propionyl-CoA karboksyleres først til **D-methylmalonyl-CoA** av **propionyl-CoA karboksylase** som inneholder kofaktoren **biotin**. D-Methylmalonyl-CoA epimeres deretter til sin L-stereoisomer av **methylmalonyl-CoA epimerase**. Videre dannes succinyl-CoA, et intermediat i sitronsyresyklusen, fra L-methylmalonyl-CoA ved intramolekylær omarrangering katalysert av **methylmalonyl-CoA mutase** bundet til koenzymet **5'-deoksyadenosylkobalamin (koenzym B₁₂)**.

8. Oksidativ fosforylering og fotofosforylering

Oksidativ fosforylering representerer kulminasjonen av energigivende metabolisme i aerobe organismer. Alle oksidative trinn i degraderingen av karbohydrater, fett og aminosyrer fører til dette siste trinnet i den cellulære respirasjonen, hvor oksidasjonsenergien brukes til å drive syntese av ATP. Fotosyntetiske organismer utnytter energien i sollys til samme formål, syntese av ATP ved fotofosforylering. Sammen står disse to prosessene for mesteparten av ATP som syntetiseres i de fleste organismer.

Oksidativ fosforylering involverer *reduksjon* av O_2 til H_2O med elektronondonasjon fra NADH og $FADH_2$ og foregår i like stor grad uavhengig av om det er lyst eller mørkt. Fotofosforylering involverer *oksidasjon* av H_2O til O_2 med $NADP^+$ som endelig elektronakseptør; prosessen er absolutt avhengig av lysenergi. Til tross for disse ulikheterne har oksidativ fosforylering og fotofosforylering fundamentale likheter, både hva gjelder funksjon og mekanisme.

Den nåværende forståelsen av ATP-syntese i mitokondrier og kloroplaster baserer seg på den **kjemiosmotiske teorien**, som sier at transmembrane forskjeller i protonkoncentrasjon er reservoaret for ekstraksjon av energi fra biologiske oksidasjonsreaksjoner. Oksidativ fosforylering og fotofosforylering deler tre mekanistiske egenskaper:

1. *Begge prosesser involverer elektronflyt gjennom en serie membranbundne elektronbærere.*
2. *Den frie energien som tilgjengeliggjøres ved den eksagoniske elektronflyten er koblet til den endergoniske transporten av protoner over en proton-impermeabel membran.* Oksidasjonsenergi konserveres på denne måten som et elektrokjemisk transmembranpotensial.
3. *Flyten av protoner over membranen med konsentrasjonsgradienten gir energi til ATP-syntese.* Protonene flyter gjennom spesifikke proteinkanaler og koblingen av denne flyten til osforyleringen av ADP skjer via membranproteinkomplekset ATP syntase.

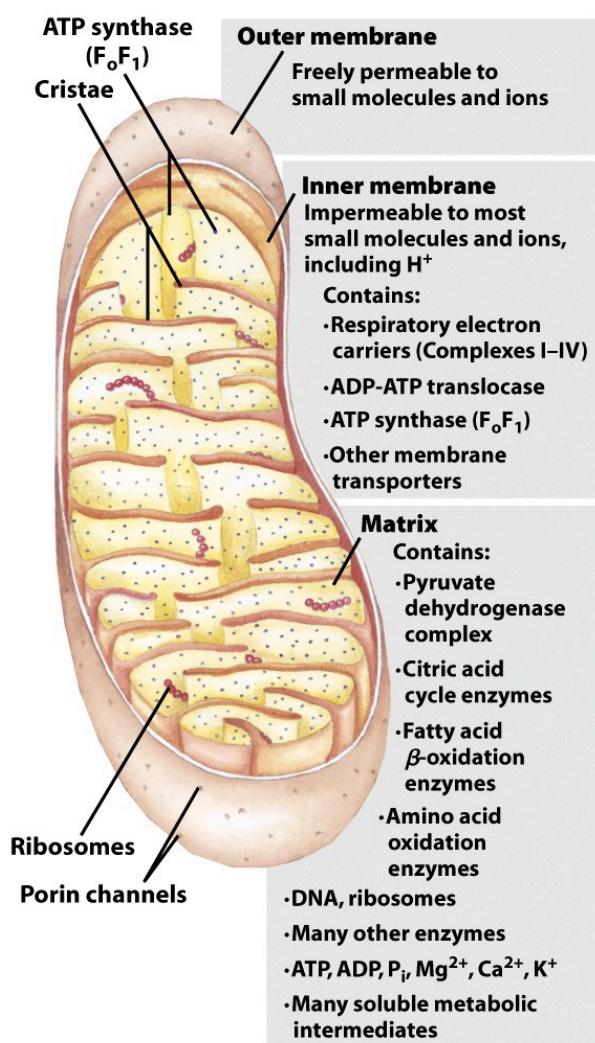
8.1. Oksidativ fosforylering

8.1.1. Mitokondriers struktur og innhold

Mitokondrier har, i likhet med gram-negative bakterier, to membraner. Den ytre mitokondrielle membranen er lett permeabel for små molekyler ($M_r < 5000$) og ioner, som

beveger seg fritt gjennom transmembrankanaler bygd opp av integrale membranproteiner kalt poriner. Den indre membranen er impermeabel til de fleste små molekyler og ioner, inkludert protoner, og kan kun krysses ved hjelp av spesifikke transportproteiner. Komponentene i elektrontransportkjeden og ATP syntase finnes i den indre membranen.

Området innenfor den indre membranen kalles matrix og inneholder pyruvat dehydrogenase-komplekset samt enzymene som er nødvendige for sitronsyresyklusen, β -oksidasjon og aminosyreoksidasjon, altså alle enzymer som inngår i energigivende oksidasjonsreaksjoner unntatt de glykolitiske, som finnes i cytosolen. Den selektivt permeable indre membranen skiller intermediate og enzymer som inngår i cytosoliske metabolske spor fra de som inngår i metabolske prosesser i matrix. Spesifikke transportproteiner kan imidlertid frakte pyruvat, fettsyror og aminosyrer samt deres α -keto-derivater inn i matrix for tilgang til det enzymatiske maskineriet i sitronsyresyklusen. ADP og P_i fraktes spesifikt inn i matrix når syntetisert ATP fraktes ut.



Figur 8.1.: Struktur og innhold i et mitokondrium.

8.1.2. Universelle elektronakseptorer

Oksidativ fosforylering begynner med at elektroner går inn i elektrontransportkjeden. Flesteparten av disse elektronene kommer fra dehydrogenaser som samler elektroner fra katabolske prosesser og sluser dem til universelle elektronakseptorer – nikotinamidnukleotider (NAD^+ eller NADP^+) eller flavinnukleotider (FMN eller FAD).

Nikotinamidnukleotid-koblede dehydrogenaser

Nikotinamidnukleotid-koblede dehydrogenaser katalyserer reversible reaksjoner etter de generelle reaksjonsligningene



De fleste dehydrogenaser som ingår i katabolisme er spesifikke for NAD^+ som elektronakseptor. Noen av disse finnes i cytosolen, andre i mitokondriene og noen har både mitokondrielle og cytosoliske izozymer. NAD-koblede hydrogenaser fjerner to hydrogenatomer fra sine substrater; ett overføres til NAD^+ i form av et hydridion, det andre frigjøres som H^+ . NADH og NADPH er vannløselige elektronbærere som assosierer *reversibelt* med dehydrogenaser.

NADH bærer elektroner fra katabolske reaksjoner til NADH dehydrogenase-komplekset, inngangspunktet for elektroner i elektrontransportkjeden. NADPH forsyner som regel elektroner til anabolske reaksjoner. Celler har som regel separate ansamlinger av NADPH og NADH med ulike redoks-potensialer, noe som oppnås ved å holde forholdet [redusert form]/[oksidert form] relativt høyt for NADPH og relativt lavt for NADH. Verken NADH eller NADPH kan krysse den indre mitokondrielle membranen, men elektronene de bærer kan krysse den indirekte.

Flavoproteiner

Flavoproteiner inneholder en tett, av og til kovalent, bundet flavinnukleotid, enten FMN eller FAD. I oksidert form kan flavinnukleotiden enten akseptere ett elektron og gå over i semiquinon-form eller to elektroner med resulterende dannelse av FMNH_2 eller FADH_2 . Ettersom flavoproteiner kan delta i både en- og toelektronoverføringer, kan de fungere som intermedier mellom reaksjoner hvor to elektron doneres og reaksjoner hvor ett elektroner aksepteres

Elektronoverføring mellom flavoprotein og den bundne flavinnukleotiden skjer som følge av at flavoprotein har et høyere reduksjonspotensial enn den oksiderte flavinnukleotiden. I motsetning til NAD og NADP, er reduksjonspotensial hos flavinnukleotider avhengig av hvilket protein de er assosiert med; relevant reduksjonspotensial blir derfor det som tilhører et spesifikt flavoprotein, ikke det som tilhører isolert FMN eller FAD.

8.1.3. Membranbundne elektronbærere

Den mitokondrielle elektrontransportkjeden består av en lang rekke sekvensielt aktive elektronbærere, hvorav de fleste er integrale proteiner med prostetiske grupper som kan

akseptere eller donere ett eller to elektroner. De tre typene elektronoverføringer som skjer i forbindelse med oksidativ fosforylering er:

1. *Direkte elektronoverføring*, som ved reduksjon av Fe^{3+} til Fe^{2+} .
2. *Overføring som et hydrogenatom* ($\text{H}^+ + e^-$).
3. *Overføring som et hydridion* ($:\text{H}^-$), som bærer to elektroner.

Betegnelsen **reduserende ekvivalent** brukes om én enkelt elektronekvivalent som overføres i en redoks-reaksjon. I tillegg til NAD og flavoproteiner, inngår tre andre elektronbærende molekyler i elektrontransportkjeden: en hydrofobisk quinon (ubiqinon) og to typer jernholdige proteiner (cytokromer og jern-svovel-proteiner). I den samlede reaksjonen for elektrontransportkjeden beveger elektroner seg fra NADH, succinat eller en annen primær elektrondonor via flavoproteiner, ubiqinon, jern-svovel-proteiner og cytokromer til O_2 som er siste elektronakseptor i kjeden.

Ubiquinon

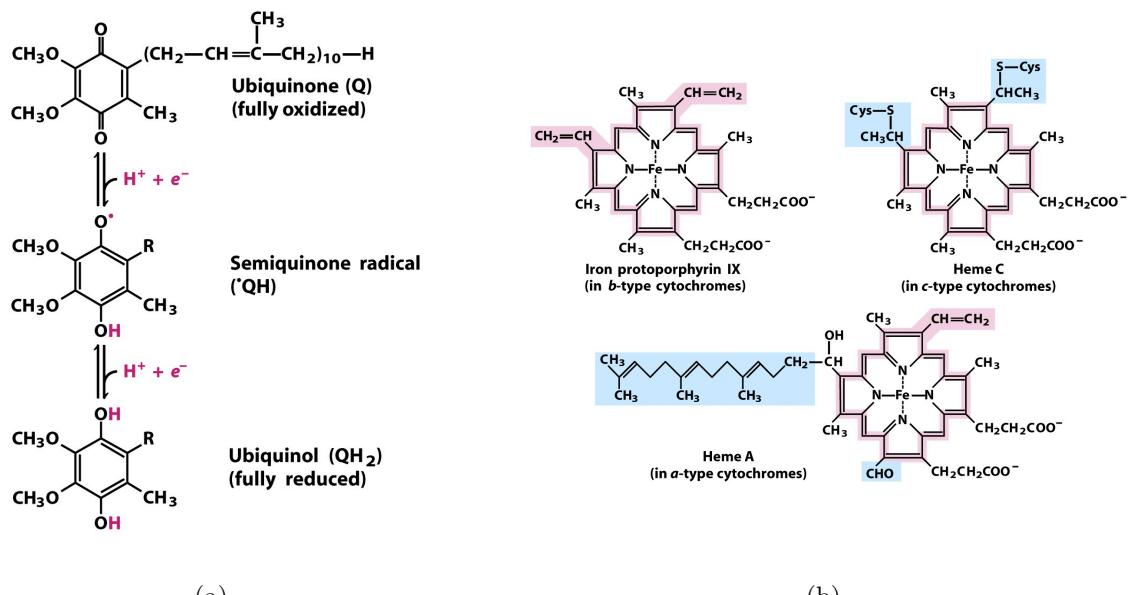
Ubiquinon, også kalt **koenzym Q**, eller bare **Q**, er et lipidløselig benzoquinon med en lang isoprenoid sidekjede. Forbindelsen kan danne en semiquinonradikal ($\cdot\text{QH}$) ved å akseptere ett elektron, eller ubiqinol (QH_2) ved å akseptere to elektroner. I likhet med flavoproteiner, kan den dessuten fungere som et mellomledd mellom en toelektronondonor og en enkeltelektronakseptor. Ettersom ubiqinonmolekylet er både lite og hydrofobisk, kan det diffundere fritt i dobbeltlipidlaget i den indre mitokondrielle membranen og dermed frakte reduserede ekvivalenter mellom andre mindre mobile elektronbærere i membranen. Ubiquinons evne til både å bære elektroner og protoner, fører dessuten til at forbindelsen spiller en sentral rolle i koblingen av elektronflyt til protonbevegelse.

Cytokromer

Cytokromer er proteiner som inneholder prostetiske heme-grupper. Mitokondrier inneholder tre klasser av cytokromer, designert *a*, *b* og *c*, som skiller fra hverandre ved ulike lysabsorpsjonsspektre. Heme-kofaktorene i *a*- og *b*-cytokromer er tett, men ikke kovalent, bundet til sine assoserte proteiner; heme i *c*-cytokromer er kovalent bundet via Cys-residuer. Som for flavoproteiner, avhenger standard reduksjonspotensial for jernatomet i hemegruppen hos et cytokrom av interaksjonene mellom hemegruppen og proteinets sidekjeder. Reduksjonspotensial varierer følgelig fra cytokrom til cytokrom. Cytokromer av type *a* og *b*, samt enkelte av type *c*, er integrale proteiner i den indre mitokondrielle membranen, med cytokrom *c* i mitokondrier som et slående unntak. Dette cytokromet er løselig og assosierer med den ytre overflaten til den indre membranen via elektrostatiske interaksjoner.

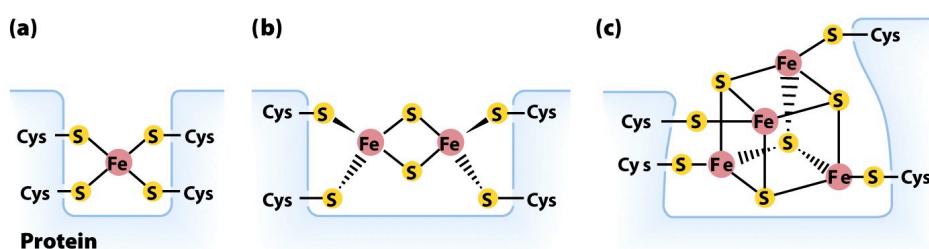
Jern-svovel-proteiner

Jern-svovel-proteiner inneholder også jern, men ikke i en heme gruppe; jernatomene forekommer i assosiasjon med uorganisk svovel, svovelatomer i proteinets Cys-residuer



Figur 8.2.: (a) Fullstendig reduksjon av ubiquinon skjer i to trinn og krever to elektroner og to protoner. (b) Heme-grupper i *b*-, *c*- og *a*-type-cytokromer.

eller begge deler. Disse jern-svovel-sentrene varierer fra enkle strukturer med ett enkelt jernatom koordinert med fire Cys-SH-grupper til mer komplekse sentre med to eller fire Fe-atomer. **Rieske-jern-svovel-proteiner** inneholder ett Fe-atom koordinert med to His-residuer i stedet for to Cys-residuer. Alle jern-svovel-proteiner deltar i enkeltelektrooverføringer hvor et jernatom i jern-svovel-senteret oksideres eller reduseres. Minst åtte jern-svovel-proteiner inngår i elektronoverføringer i mitokondrier.



Figur 8.3.: Ulike typer jern-svovel-sentre i jern-svovel-proteiner. (a) Ett Fe-ion koordinert med S-atomer fra fire Cys-residuer. (b) To Fe-ionaler koordinert med to uorganiske S-atomer og fire S-atomer i Cys-residuer i et 2Fe-2S-senter. (c) Fire Fe-ionaler koordinert med fire uorganiske S-atomer og fire S-atomer i Cys-residuer i et 4Fe-4S-senter.

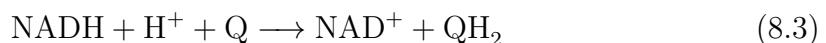
8.1.4. Elektronbærere fungerer i mulitenzymkomplekser

Elektronbærerne i elektrontransportkjeden er organisert i supramolekylære komplekser inkorporert i den indre mitokondrielle membranen. Det finnes fire slike komplekser, alle med evne til å katalysere elektronoverføring gjennom en del av kjeden. Kompleksene I og II katalyserer elektronoverføring til ubiquinon fra to ulike elektrodonorer, NADH (Kompleks I) og succinat (Kompleks II); Kompleks III bærer elektroner fra redusert ubiquinon til cytokrom *c*; og Kompleks IV fullfører kjeden ved overføring av elektroner fra cytokrom *c* til O₂.

⑤ Kompleks I: NADH til ubiquinon

Kompleks I, også kalt **NADH:ubiquinon oksidoreduktase** eller **NADH dehydrogenase**, er et stort enzym bygd opp av 42 forskjellige polypeptidkjelder, inkludert et flavoprotein som inneholder FMN og minst seks jern-svovel-sentre. Komplekset er formet som en L, med én arm i membranen og den andre stikkende ut i matrix. Som vist i Figur 8.4, katalyserer Kompleks I to simultane og koblede prosesser:

1. *Eksergonisk overføring av et hydridion fra NADH og et proton fra matrix til ubiquinon:*



2. *Endergonisk overføring av fire protoner fra matrix til det intermembrane området.*

Kompleks I er altså en protonpumpe drevet av elektronoverføring og reaksjonen det katalyserer er **vektoriell**: den flytter protoner fra et sted til et annet. Aktiviteten til Kompleks I sørger for at matrix blir negativt ladd, ettersom protoner fjernes derfra, mens det intermembrane området får netto positiv ladning. For å understreke at prosessen er vektoriell, skrives den totale reaksjonsligningen ofte med subskript på protonene:

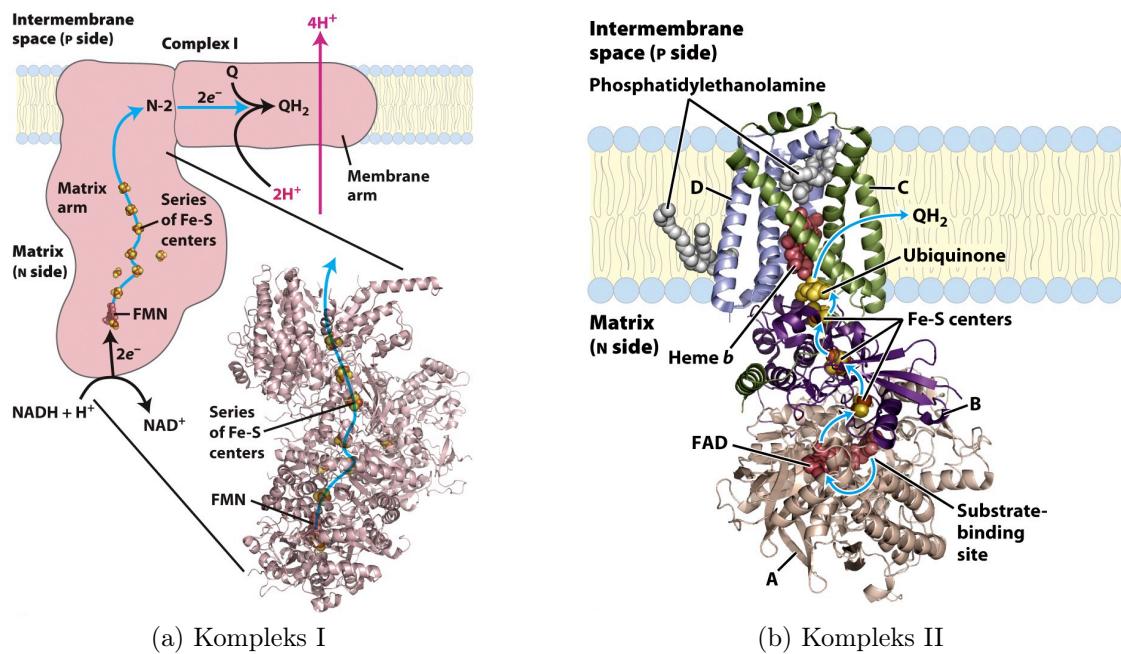


der subskript N angir negativ side av den indre membranen (matrix) og subskript P angir positiv side (det intermembrane området).

Ubiquinol (QH₂) diffunderer i den indre mitokondrielle membranen fra Kompleks I til Kompleks III for oksidasjon til Q i en annen protonpumpende prosess.

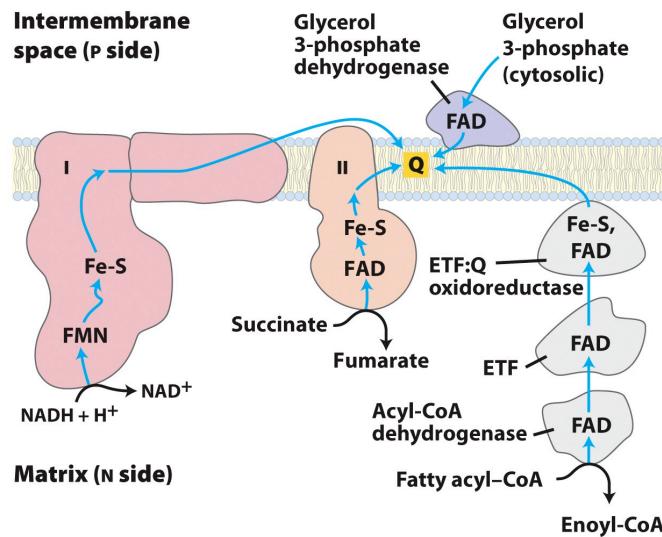
⑥ Kompleks II: Succinat til ubiquinon

Kompleks II inngår også i sitronsyresyklusens trinn ⑥ under navnet **succinat dehydrogenase**, som eneste membranbundne enzym i syklusen. Kompleks II er mindre og enklere enn Kompleks I og består av fem prostetiske grupper av to typer og fire ulike proteinunderenheter. Underenheterne C og D er integrale membranproteiner med tre transmembranhelikser hver. De inneholder en heme-gruppe, heme *b*, og et bindingssett for ubiquinon, den endelige elektronakseptoren i reaksjonen som katalyses av Kompleks II. Underenheterne A og B strekker seg inn i matrix og inneholder tre 2Fe-2S-sentre, bundet FAD og et bindingssett for substratet, succinat. Elektroner overføres fra bindingssettet til



Figur 8.4.: Elektronflyt gjennom (a) Kompleks I og (b) Kompleks II.

FAD og deretter gjennom Fe-S-sentrene til bindingssettet for Q, en rute på til sammen mer enn 40 Å. Heme b-gruppen ser ikke ut til å inngå i ruten for elektronoverføring og har trolig som funksjon å redusere frekvensen av “elektronlekkasjer” ut av komplekset med tilhørende dannelsje av **reaktive oksygenspesier**.

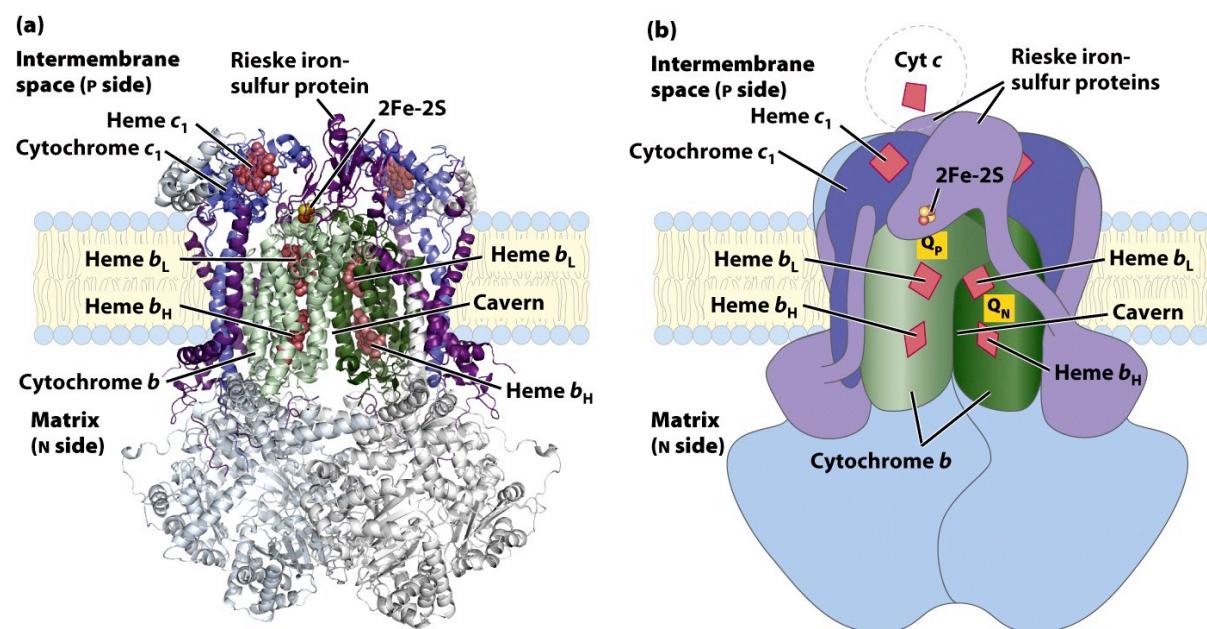


Figur 8.5.: Ruter for elektronflyt fra NADH, succinat, fettacyl-CoA og glyserol-3-fosfat til ubiquinon.

Også andre substrater for mitokondrielle dehydrogenaser overfører elektroner til ubiquinon på dette stadiet i elektrontransportkjeden, men via andre elektronoverførende enzymer enn Kompleks II. Dette gjelder fettacyl-CoA og glyserol-3-fosfat. Disse substratene gir imidlertid også produksjon av QH_2 som kan gå videre til Kompleks III for reoksidasjon. Dette er illustrert i Figur 8.5.

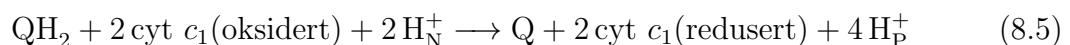
7 Kompleks III: Ubiquinon til cytokrom c

Kompleks III, også kalt **cytokrom bc_1 -komplekset** eller **ubiquinon:cytokrom c oksidoreduktase**, kobler elektronoverføring fra ubiquinol (QH_2) til cytokrom c til den vektorielle transporten av protoner fra matrix til det intermembrane området. Den funksjonelle enheten til Kompleks III er en dimer bestående av to cytokrom b-monomerer som omgir et “hull” midt i membranen hvor ubiquinon kan bevege seg fritt og frakte elektroner og protoner mellom matrix og det intermembrane området.



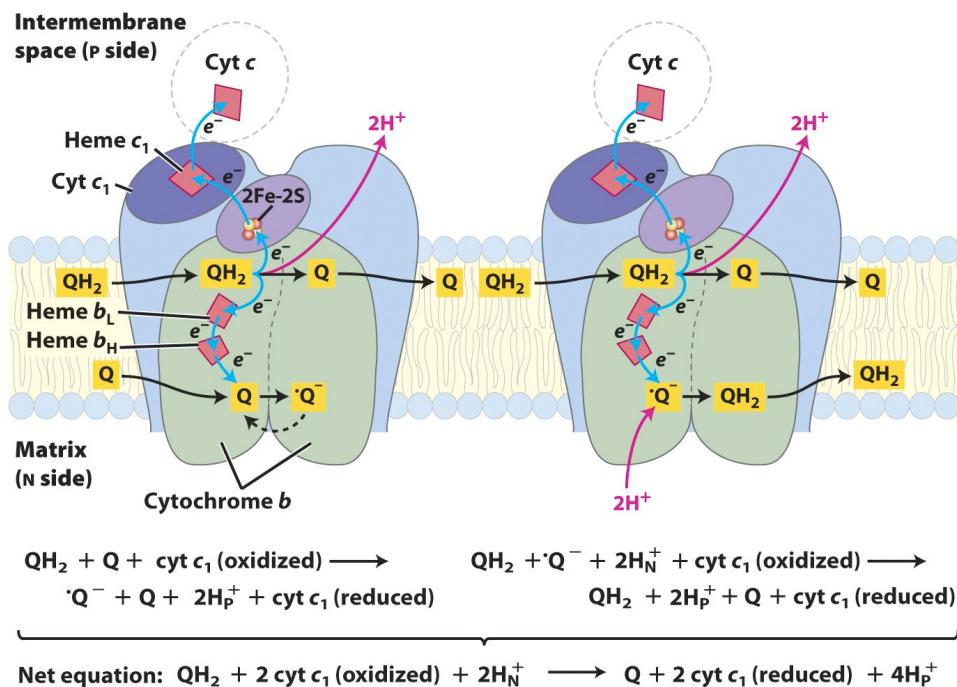
Figur 8.6.: Kompleks III. (a) Detaljert struktur. (b) Illustrasjon som viser interaksjoner mellom cytokrom c_1 og Rieske-jern-svovel-proteinet i komplekset og cytokrom c i det intermembrane området.

En modell for overføringen av elektroner og protoner gjennom komplekset er **Q-syklusen**, med netto ligning



Ruten for elektronoverføring i denne delen av elektrontransportkjeden er kompleks, men effekten av overføringen er enkel: QH_2 oksideres til Q og to cytokrom c-molekyler reduseres.

Cytokrom c er et løselig protein som finnes i det intermembrane området. Etter at heme-gruppen i proteinet har akseptert et elektron fra Kompleks III, beveger det seg videre til Kompleks IV for donasjon av elektroner til et binukleært kobbersenter.



Figur 8.7.: Q-syklusen, vist i to stadier.

8 Kompleks IV: Cytokrom c til O₂

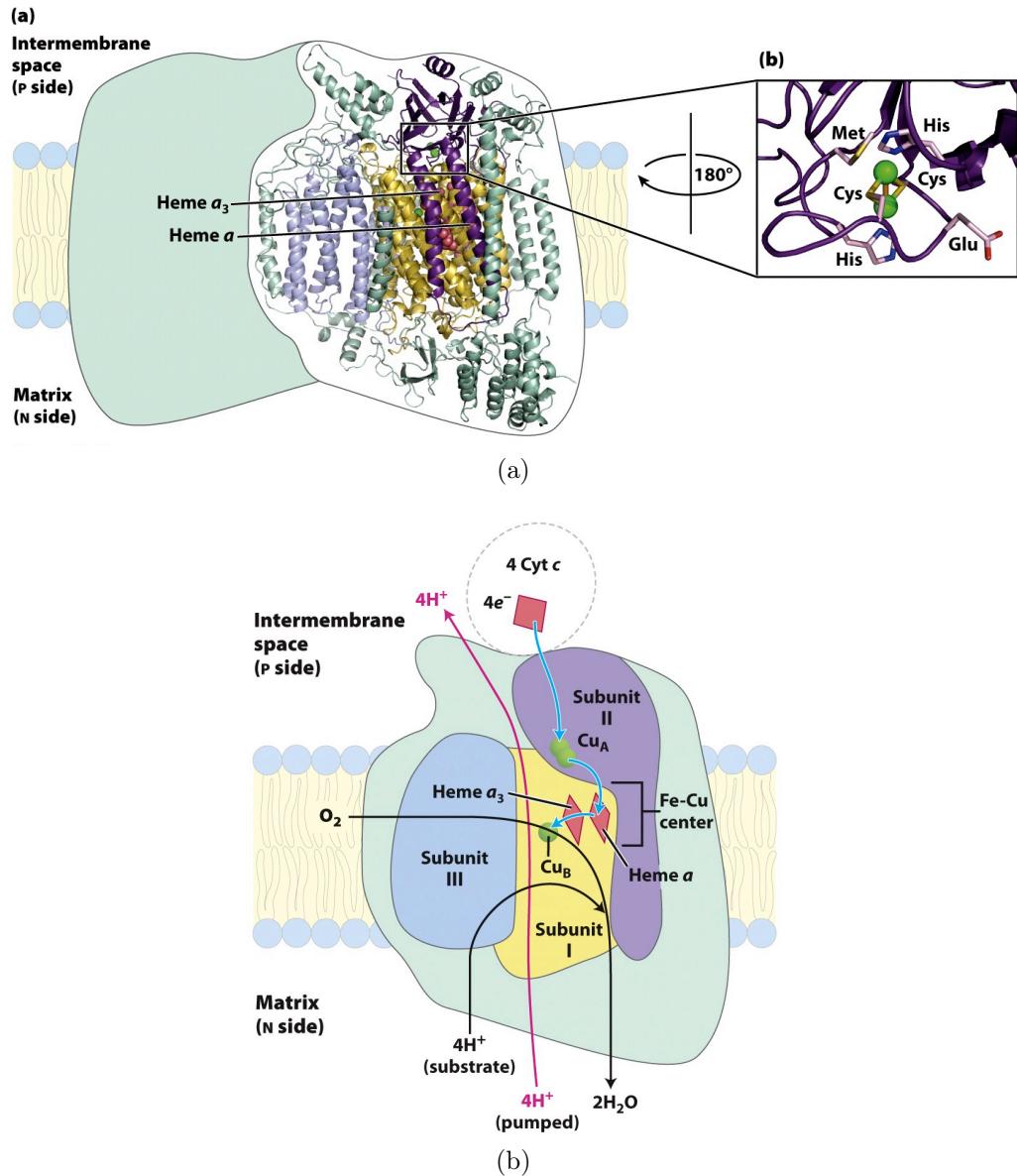
Det siste trinnet i elektrontransportkjeden innebærer reduksjon av molekylært oksygen til H₂O med elektroner fraktet fra cytokrom c av **Kompleks IV**, også kalt **cytokrom oksidase**. Kompleks IV er et stort enzym med 13 underenheter som finnes i den indre mitokondrielle membranen. Bakterier inneholder en langt enklere utgave av komplekset, bestående av tre eller fire underenheter, men også denne er i stand til å katalysere både elektronoverføring og protonpumping. Sammenligning med det mitokondrielle komplekset antyder at tre underenheter er avgjørende for enzymets funksjon.

Underenhet II i det mitokondrielle komplekset inneholder to Cu-ioner kompleksert med –SH-gruppene i to Cys-residuer i et binukleært senter (Cu_A) som minner om 2Fe-2S-sentrene i jern-svovel-proteiner. Underenhet I inneholder to heme-grupper, a og a₃, samt enda et kobberion Cu_B. Heme a₃ og Cu_B danner et andre binukleært senter som aksepterer elektroner fra heme a og overfører dem til O₂ bundet til heme a₃.

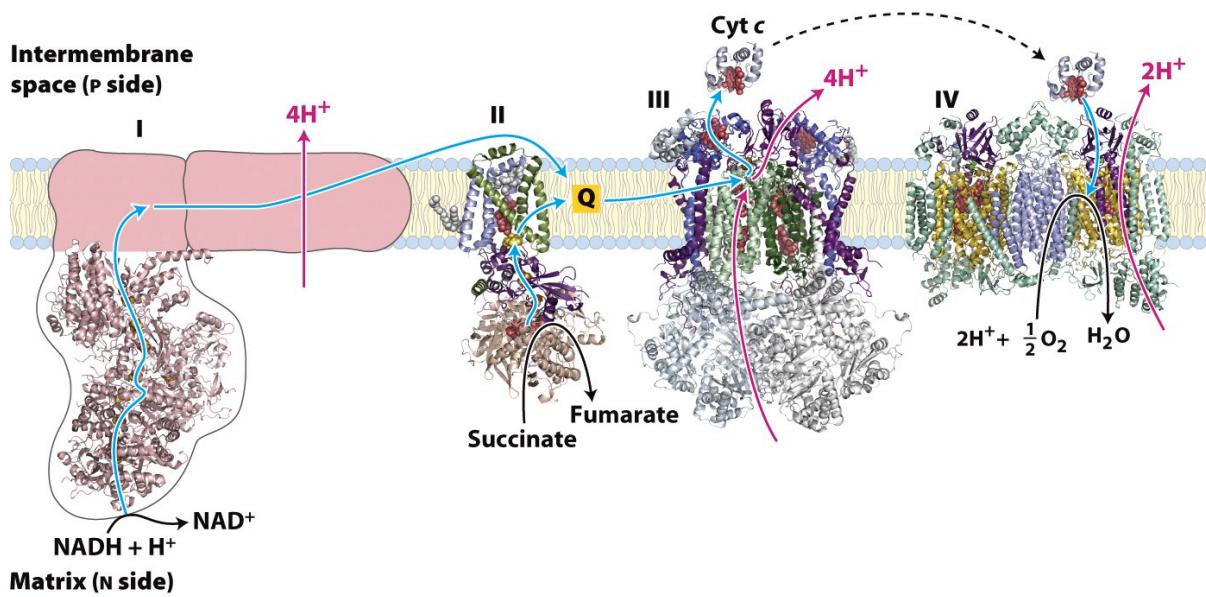
Elektronoverføringen gjennom Kompleks IV begynner i cytokrom c og går deretter via Cu_A-senteret, heme a og heme a₃-Cu_B-senteret til O₂. For hvert fjerde elektron som passerer gjennom komplekset, konsumeres fire protoner fra matrix (N-siden) ved konvertering av O₂ til 2 H₂O. Energien fra denne redoks-reaksjonen brukes også til økning av det elektrokjemiske potensialet over membranen ved pumping av et proton ut til det intermembrane området (P-siden) for hvert elektron som passerer gjennom komplekset. Den samlede reaksjonen som katalyses av Kompleks IV er



Denne fireelektrons-reduksjonen v O_2 involverer redokssentre som kun kan bære ett elektron i gangen, og må skje uten frigjøring av ufullstendig reduerte intermediater som hydrogenperoksid eller frie hydroksylradikaler. Intermediatene forblir derfor tett bundet til komplekset helt til de er fullstendig konvertert til vann.



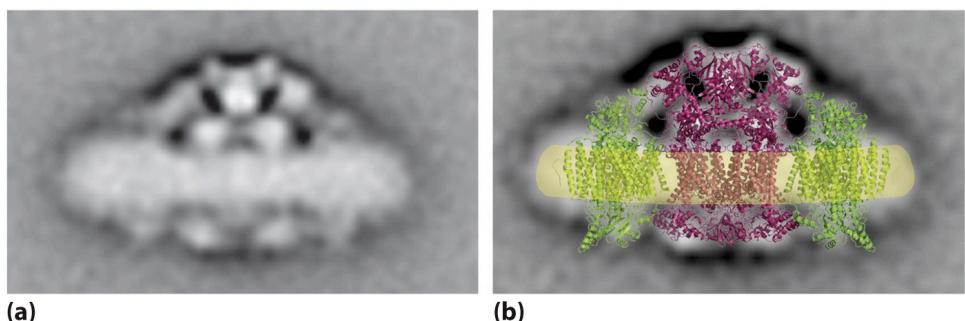
Figur 8.8.: Kompleks IV. (a) Detaljert struktur. (b) Rute for elektronflyt gjennom komplekset.



Figur 8.9.: Oppsummering av elektron- og protonflyt gjennom Kompleksene I til IV i elektrontransportkjeden.

Respirasomer

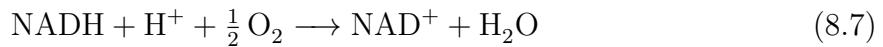
Eksperimentelle bevis antyder at kompleksene som inngår i elektrontransportkjeden er tett assosiert i den indre membranen i **respirasomer**, funksjonelle komplekser bestående av to eller flere elektronoverførende komplekser. Kinetikken til elektronoverføringene avhenger i stor grad av hvor tett kompleksene er assosiert, og kinetiske studier støttet respirasom-modellen.



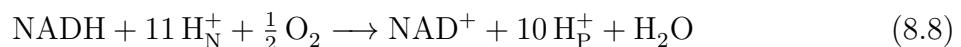
Figur 8.10.: Respirasom bygd opp av Kompleksene III og IV. (a) Visualisering ved bruk av elektronmikroskop. (b) Ett molekyl av Kompleks III og to molekyler av Kompleks IV plassert oppå bildet i (a).

8.1.5. Energi fra elektronoverføringer konserveres i en protongradient

Overføringen av to elektroner fra NADH via elektrontransportkjeden til O₂ kan skrives



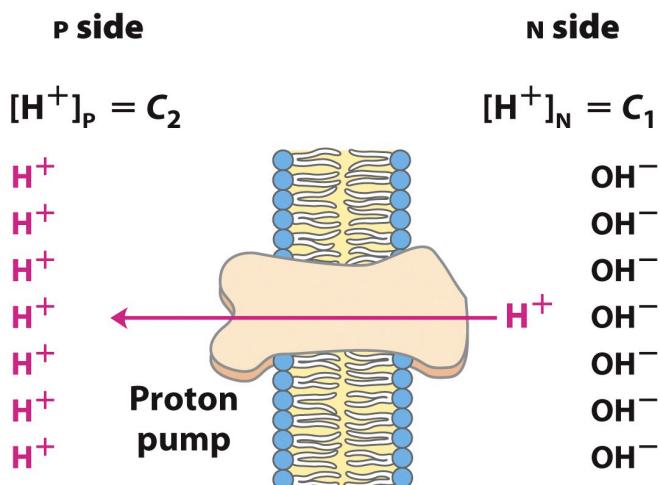
Denne reaksjonen er svært eksertonisk med en reell endring i fri energi på minst -220 kJ/mol . Oksidasjon av succinat gir en mindre negativ endring i fri energi, omtrent -150 kJ/mol , men også denne reaksjonen er svært eksertonisk. Mye av denne energien brukes til å pumpe protoner ut av matrix. For hvert elektronpar som overføres til O₂, pumpes fire protoner ut av Kompleks I, fire av Kompleks III og to av Kompleks IV. Den vektorielle ligningen for prosessen er dermed



Det elektrokjemiske potensialet som oppstår som følge av forskjell i protonkonsentrasjon og ladningsseparasjon, sørger for midlertidig konservering av mye av energien som frigjøres ved elektronoverføringer. Energien som lagres i denne gradienten kalles **protonmotiv kraft** og har to komponenter:

1. *Kjemisk potensiell energi* som følge av konsentrasjonsforskjell.
2. *Elektrisk potensiell energi* som følge av ladningsseparasjon.

Når protoner flyter nedover sin elektrokjemiske gradient, blir energi tilgjengelig for utføring av arbeid. I mitokondrier, kloroplaster og aerobe bakterier, driver protongradienten syntese av ATP fra ADP og P_i.



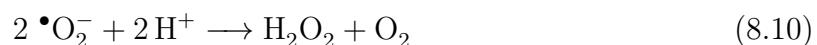
Figur 8.11.: Protongradient.

8.1.6. Dannelse av reaktive oksygenspesier under oksidativ fosforylering

Flere av trinnene i elektrontransportkjeden kan medføre produksjon av svært reaktive frie radikaler som kan være skadelige for cellen; enzymer, membranlipider og nukleinsyrer kan alle reagerer med og skades av frie radikaler. Overføring av elektroner fra QH_2 til Kompleks III og fra Kompleks I til QH_2 involverer radikalet $\cdot\text{QH}^-$ som et intermediat. $\cdot\text{QH}^-$ kan, med lav sannsynlighet, redusere O_2 etter reaksjonen



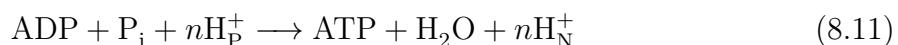
Superoksidradikalet som dannes er svært reaktivt og gir i tillegg dannelse av flere radikaler av samme type. For å hindre oksidativ skade fra $\cdot\text{O}_2^-$, inneholder celler flere ulike utgaver av enzymet **superoksid dismutase** som katalyserer reaksjonen



Hydrogenperoksidet som dannes i denne reaksjonen gjøres deretter harmløst av **glutation peroksidase**.

8.1.7. Den kjemiosmotiske modellen

Den **kjemiosmotiske modellen** sier at den elektrokjemiske energien som finnes i koncentrasjonsforskjellen og ladningsseparasjonen over den indre mitokondrielle membranen driver syntese av ATP. Dette skjer når protoner beveger seg passivt tilbake til matrix gjennom en protonpore assosiert med **ATP syntase**. For å legge vekt på den protonmotive kraftens rolle, skrives nettoligningen for ATP-syntese ofte som



Betegnelsen "kjemiosmotisk" kan brukes om enzymatiske reaksjoner hvor en kjemisk reaksjon og en transportprosess skjer simultant. Det er viktig å bemerke at elektronoverføring og ATP-syntese er koblede prosesser: den ene reaksjonen kan ikke forløpe uten at den andre også gjør det.

8.1.8. ATP syntase

Mitokondriell ATP syntase er en F-type ATPase som ligner ATP syntasene i kloroplaster og bakterier både i struktur og funksjon. Enzymet finnes i den indre mitokondrielle membranen og er et stort kompleks som har som oppgave å katalysere dannelsen av ATP fra ADP og P_i koblet til protonflyt fra P- til N-siden av membranen.

F_o og F_1 , de to funksjonelle domene i ATP syntase

ATP syntase kalles også Kompleks V og har to distinkte komponenter: F_1 , et perifert (midlertidig tilknyttet) membranprotein, og F_o som er integralt i membranen. F_o har en protonpore som tillater flyt av protoner inn i matrix i samme hastighet som de pumpes

inn ut forbindelse med elektronoverførende reaksjoner. F_1 katalyserer ATP-syntese in vivo og den motsatt reaksjonen, hydrolyse av ATP, i isolert form. Denne underenheten ble derfor opprinnelig kalt **F_1 ATPase**.

Stabilisering av ATP på overflaten av F_1

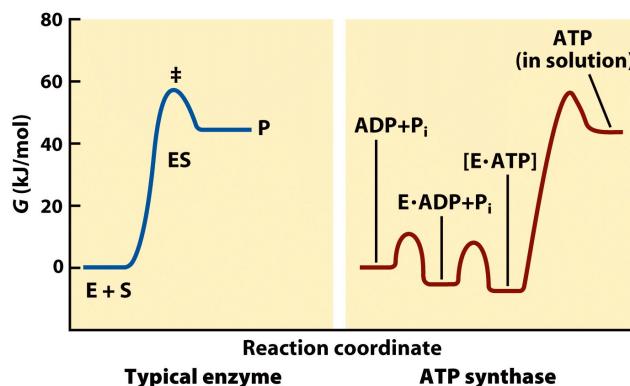
En bemerkelsesverdig termodynamisk egenskap ved den katalytiske mekanismen til F_1 er at den katalyserte reaksjonen



er lett reversibel – ΔG for ATP-syntese er nær null. Dette reflekteres også i eksperimentelle observasjoner av in vivo ATP-hydrolyse; disse indikerer at den terminale pyrofosfat-bindingen i ATP kløyves og gjendannes gjentatte ganger før P_i forlater enzymoverflaten. Disse resultatene er ikke som forventet ut fra endringen i fri energi for reaksjonen når den skjer i løsning, da denne er sterkt negativ ($\Delta G^\circ = -30.5 \text{ kJ/mol}$) og betydelig forskjøvet i retning ATP-hydrolyse. Forklaringen på dette avviket ligger i at ATP er stabilisert på overflaten av F_1 i ATP syntase i forhold til $ADP + P_i$; ATP er tettere bundet til enzymet og energien som frigjøres ved dene stabiliseringen er tilstrekkelig til å balansere energikostnaden ved ATP-syntese. F_oF_1 -komplekset utviser dessuten langt større affinitet, tilsvarende omrent 40 kJ/mol i bindingsenergi, for ATP enn for ADP, noe som driver likevekten i ligning (8.12) mot høyre.

ATP syntase følger en spesiell mekanisme

Selv om ATP syntase gir likevekt mellom ATP og $ADP + P_i$, kreves en protongradient for at syntetisert ATP skal kunne forlate enzymoverflaten. Reaksjonskoordinatdiagrammet for denne prosessen, vist i Figur 8.12, illustrerer forskjellen mellom mekanismen til ATP syntase og en typisk mekanisme hos enzymer som katalyserer endergoniske reaksjoner. Det kan tydelig ses at enzymet må veksle mellom to svært ulike former, en som binder ATP tett og ensom frigjør ATP, for å kunne utføre kontinuerlig syntese av ATP.



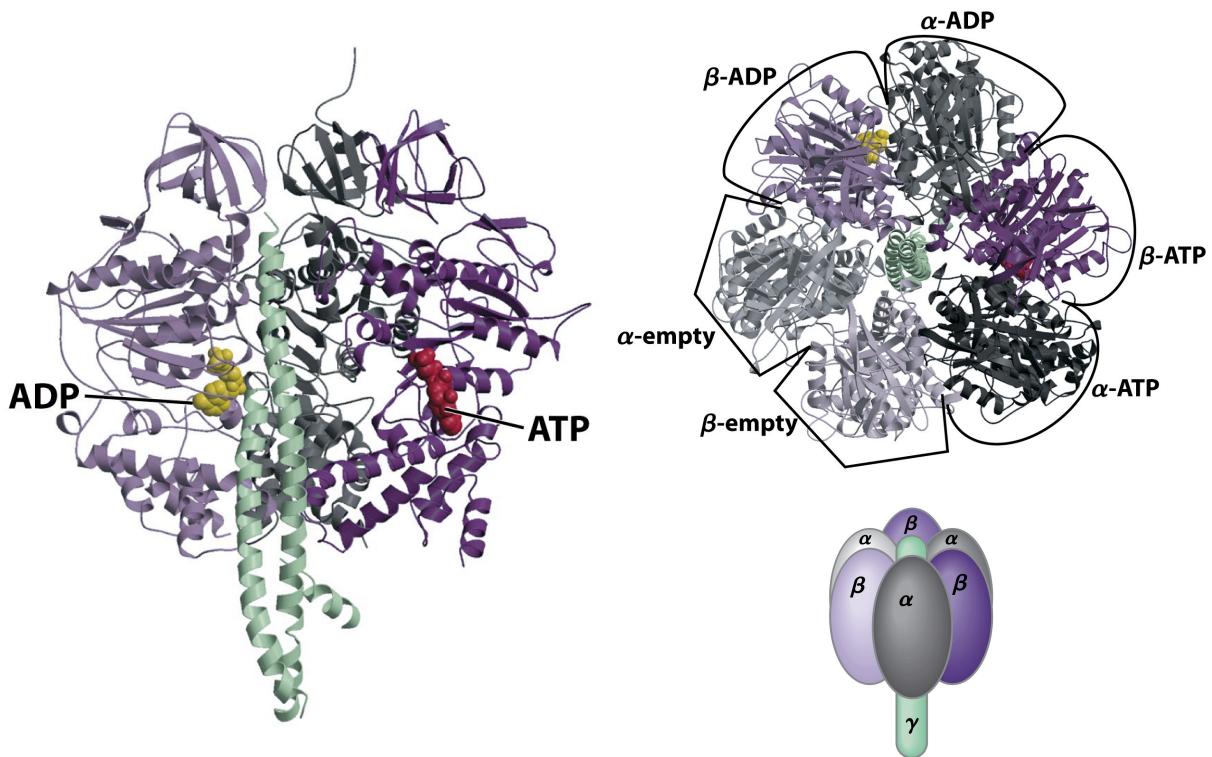
Figur 8.12.: Reaksjonskoordinatdiagrammer for et typisk enzym som katalyserer en endergonisk reaksjon (t.v.) og ATP syntase (t.h.).

Strukturen til F_0F_1 -komplekset

Mitokondriell F_1 har ni underenheter av fem ulike typer med sammensetningen $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Hver av de tre β -underenhetene har et katalytisk sete for ATP-syntese. Tre ulike illustrasjoner av strukturen til F_1 finnes i Figur 8.13.

Den rattlignende delen av F_1 har form som en utflatet sfære og består av alternerende α - og β -underenheter arrangert som båter i en appelsin. Polypeptidene som utgjør "stilken" i domenet er assymetrisk arrangert: Ett av domenene i γ -underenheten utgjør en sentral "aksling" som passerer gjennom F_1 , mens det andre domenet hovedsaklig er assosiert med én av de tre β -underenhetene. β -underenheten som er assosiert med dette domenet i γ kalles β -empty.

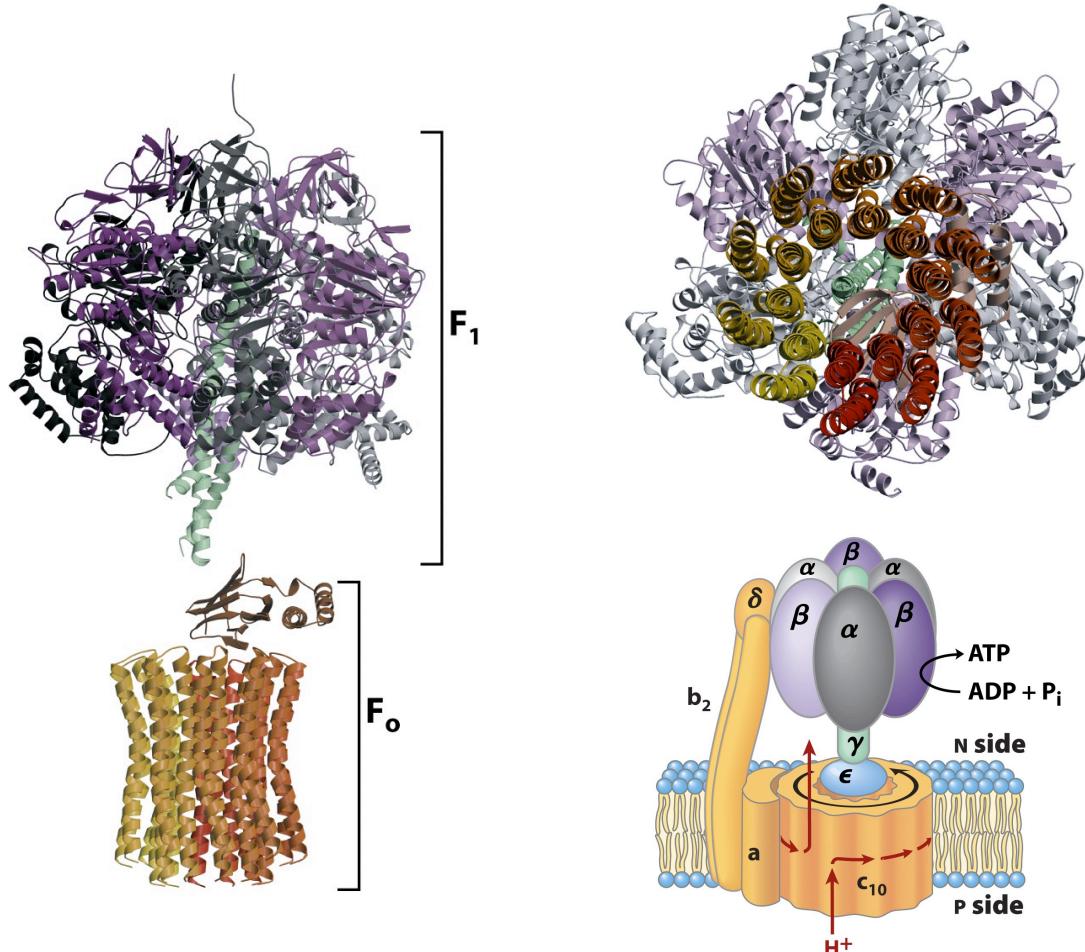
Selv om de tre β -underenhetene har identiske aminosyresekvenser, avviker de fra hver andre i konformasjon, noe som delvis skyldes at bare én av de tre er assosiert med γ . De konformasjonelle ulikhetene mellom β -underenhetene har konsekvenser for ATP/ADP-bindingssetene: Én underenhet binder ATP (β -ATP), den andre binder ADP (β -ADP) og den tredje er tom (β -empty). Denne ulikheten er avgjørende for mekanismen til F_0F_1 -komplekset.



Figur 8.13.: Tre ulike illustrasjoner av strukturen til F_1 -komplekset.

F_0 -komplekset består av tre underenheter, a, b, og c, i forholdet ab_2c_{10-12} . Underenhet c er et lite, svært hydrofobisk polypeptid som nesten utelukkende består av to transmembrane helikser samt en liten loop som stikker ut på matrix-siden av membranen. I gjær

har F_o 10 c-underenheter med to transmembranhelikser hver. Disse står omtrent vinkelrett på membranplanet og er arrangert i to konsentriske sirkler. Den indre sirkelen består av c-underenhetenes aminoterminale helikser, mens den ytre er bygd opp av de karboksyterminale heliksene. ϵ - og γ -underenhettene i F_1 utgjør sammen "akslingen" som stikker ut fra membransiden i F_1 og denne er tett koblet til ringen av c-underenheter i F_o . Strukturen til F_oF_1 -komplekset er vist i Figur 8.14.



Figur 8.14.: Tre ulike illustrasjoner av strukturen til F_oF_1 -komplekset.

8.1.9. Rotasjonell katalyse

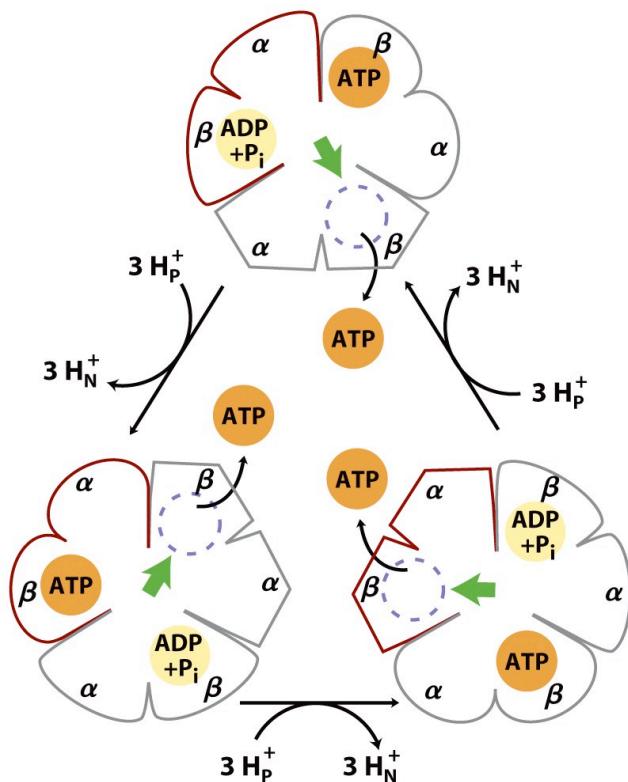
F_oF_1 -reaksjonen følger en **rotasjonell katalyse**-mekanisme, hvor de tre aktive setene i F_1 katalyserer ATP-syntese etter tur. En gitt β -underenhet starter i β -ADP-konformasjon hvor den binder ADP og P_i . Underenheten skifter deretter konformasjon til β -ATP-formen som stabiliserer ATP ved tett binding og dermed innstiller likevekten mellom ATP og ATP + P_i på enzymoverflaten. Til slutt antar underenheten β -empty-konformasjonen, som har svært lav affinitet for ATP, slik at syntetisert ATP kan forlate enzymoverflaten.

En ny katalyserende begynner når underenheten på ny antar β -ADP-konformasjonen og binder nye ADP- og P_i -molekyler.

De konformasjonelle endringene som er avgjørende for denne mekanismen drives av protonflyt gjennom F_o . Protonene som strømmer gjennom "poren" i F_o forårsaker rotasjon av c-underenhet-sylinderen i membranen, noe som forplanter seg via γ -underenheten i F_1 til senteret i $\alpha_3\beta_3$ -sfæroiden. Vertikal bevegelse av F_1 i forhold til membranoverflaten hindres av b_2 - og δ -underenhetene. For hver rotasjon på 120° , kommer γ i kontakt med en ny β -underenhet, og denne kontakten tvinger den aktuelle β inn i β -empty-konformasjon.

Interaksjonen mellom de tre β -underenhetene er slik at β -empty-konformasjon hos én underenhet tvinger naboen (med klokka) til å anta β -ADP-konformasjon og den andre (mot klokka) inn i β -ATP-konformasjon. Én fullstendig rotasjon av γ sørger dermed for at hver β -underenhet går gjennom alle tre mulige konformasjoner i rekkefølgen β -ADP \rightarrow β -ATP \rightarrow β -empty. Hver rotasjon vil følgelig resultere i tre frie ATP-molekyler.

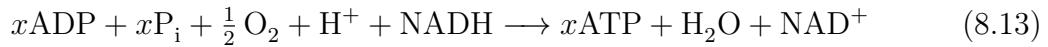
F_oF_1 -komplekset roterer mot klokka og i diskrete steg på 120° . Effektiviteten for konvertering av kjemisk energi til bevegelse via den rotasjonelle katalyse-mekanismen er nær 100%.



Figur 8.15.: Rotasjonell katalyse ved ATP-synese.

8.1.10. Ikke-heltallig støkiometri som følge av kjemiosmotisk kobling

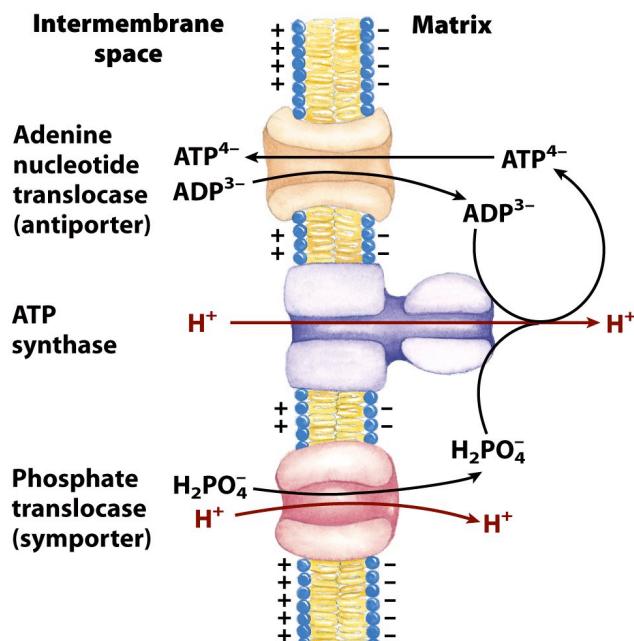
Under den kjemiosmotiske modellen finnes det ikke noe teroretisk krav om at x i reaksjonligningen



må være et heltall. Den relevante størrelsen for støkiometrien er forholdet mellom antall protoner som pumpes ut som følge av elektronoverføring fra ett NADH-molekyl til ett O₂-molekyl og antall protoner som må flyte innover gjennom F_oF₁-komplekset for å gi syntese av ett ATP-molekyl. Konsensusverdien for antall protoner som pumpes ut per elektronpar er 10 for NADH og 6 for succinat. Tilsvarende verdi for antall protoner som kreves for å drive syntesen av ett ATP-molekyl er 4, hvorav 1 brukes til å transportere P_i, ATP og ADP over den mitokondrielle membranen. Forholdet blir dermed 10/4 = 2.5 dersom NADH er elektronondonor og 6/4 = 1.5 dersom elektronene kommer fra succinat.

8.1.11. Den protonmotive kraften fasiliterer aktiv transport

Selv om den viktigste oppgaven til protongradienten i mitokondriene er å drive ATP-syntese, er den protonmotive kraften også ansvarlig for driften av flere andre transportprosesser som er essensielle for oksidativ fosforylering. Den indre mitokondrielle membranen er generelt impermeabel for ladde spesier, men to spesifikke systemer sørger for transport av ADP og P_i inn i matrix og av ATP ut til cytosolen.



Figur 8.16.: Transportsystemene adeninnukleotid translokase og fosfat translokase er, i likhet med ATP syntase, koblet til den protonmotive kraften.

Adeninnukleotid translokase, et integralt enzym i den indre membranen, binder ADP³⁻ i det intermembrane området og sørger for å utveksle det med et ATP⁴⁻-molekyl. Ettersom denne antiporten flytter fire negative ladninger ut for hver tredje negative ladning som fraktes inn, favoriseres aktiviteten av den elektrokjemiske gradienten over membranen, og den protonmotive kraften er på denne måten ansvarlig for utvekslingen av ATP og ADP mellom matrix og cytosolen.

Fosfat translokase er et transportsystem som promoterer symport av H₂PO₄⁻ og H⁺ inn i matrix. Også denne prosessen favoriseres av den transmembrane protongradienten. Ettersom et proton fraktes inn i matrix, forbruker denne transportprosessen noe av energien fra de elektronoverførende reaksjonene.

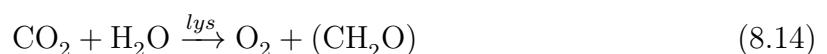
Et kompleks bestående av ATP syntase og begge de nevnte transportsystemene kan isoleres fra mitokondrier, noe som indikerer tett funksjonell kobling mellom disse tre proteinene.

8.1.12. NADH fraktes inn i mitokondrier for oksidasjon

NADH dehydrogenase i den indre mitokondrielle membranen kan kun akseptere elektroner fra NADH i matrix. Ettersom den indre membranen ikke er permeabel for NADH, må det finnes et system for overføring av glykolytisk generert NADH i cytosolen til matrix. Ansvaret for dette innehas av spesielle shuttle-systemer, som bærer reduserende ekvivalenter fra cytosolisk NADH inn i mitokondriene via en indirekte rute. Det mest aktive NADH-shuttle-systemet er **malat-aspartat-shuttle**, som inngår i en transportprosess som forløper som følger: Reduserende ekvivalenter i cytosolisk NADH overøres først til oksaloacetat i cytosolen med malat som resultat. Malat passerer deretter gjennom den indre membranen via transportproteinet malat- α -ketoglutarat transporter. I matrix doneres de reduserende ekvivalentene videre til NAD⁺ som dermed reduseres til NADH. NADH kan deretter donere sine elektroner direkte til elektrontransportkjeden.

8.2. Fotofosforylering

Fotosyntetiske organismers evne til å konvertere solenergi til kjemisk energi er den opprinnelige kilden for nesten all biologisk energi; fotosyntetiske og heterotrope organismer lever i en balansert steady state i biosfæren. Fotosyntetiske organismer danner ATP og NADPH fra fanget solenergi og bruker disse forbindelsen som energikilder ved syntese av karbohydrater og andre organiske forbindelser fra CO₂ og H₂O med tilhørende utslipp av O₂ til atmosfæren. Fotosyntese skjer i en lang rekke bakterier, i unicellulære eukaryoter (alger) samt i vaskulære planter. Selv om detaljene i de energiutvinnende prosessene varierer mellom disse organismene, er de underliggende mekanismene svært like. Totalreaksjonen for fotosyntese i vaskulære planter kan skrives



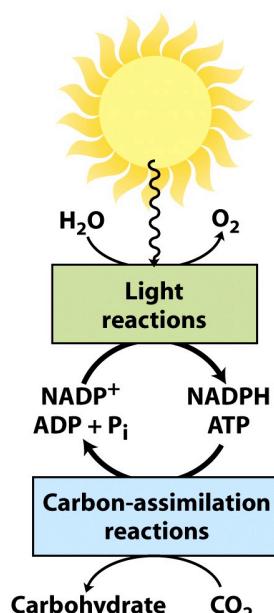
Dette er en redoks-reaksjon hvor H₂O donerer elektroner (i form av hydrogen) til CO₂ som reduseres til karbohydrat.

8.2.1. Generelle egenskaper ved fotofosforylering

I motsetning til NADH, den viktigste elektronondonoren ved oksidativ fosforylering, er H_2O en dårlig elektronondonor. Fotofosforylering skiller seg dermed fra oksidativ fosforylering ved at prosessen krever tilførsel av lysenergi for å *lage* en god elektronondonor og en god elektronakseptør.

Lysavhengige og karbonassimilerende reaksjoner

Fotosyntese i planter inkluderer to prosesser: de **lysavhengige reaksjonene**, eller **lysreaksjonene**, som kun skjer når plantene blyses, og **karbonassimilerende**, eller **karbonfikserende**, reaksjonene, som drives av produktene fra lysreaksjonene. I lysreaksjonene absorberer klorofyll og andre pigmenter i fotosyntetiske celler lysenergi som konserveres i form av ATP og NADPH, samtidig som O_2 dannes. I de karbonassimilerende reaksjonene brukes ATP og NADPH til å redusere CO_2 til triosefosfater, stivelse, sukrose og andre produkter som kan dannes fra disse forbindelsene.

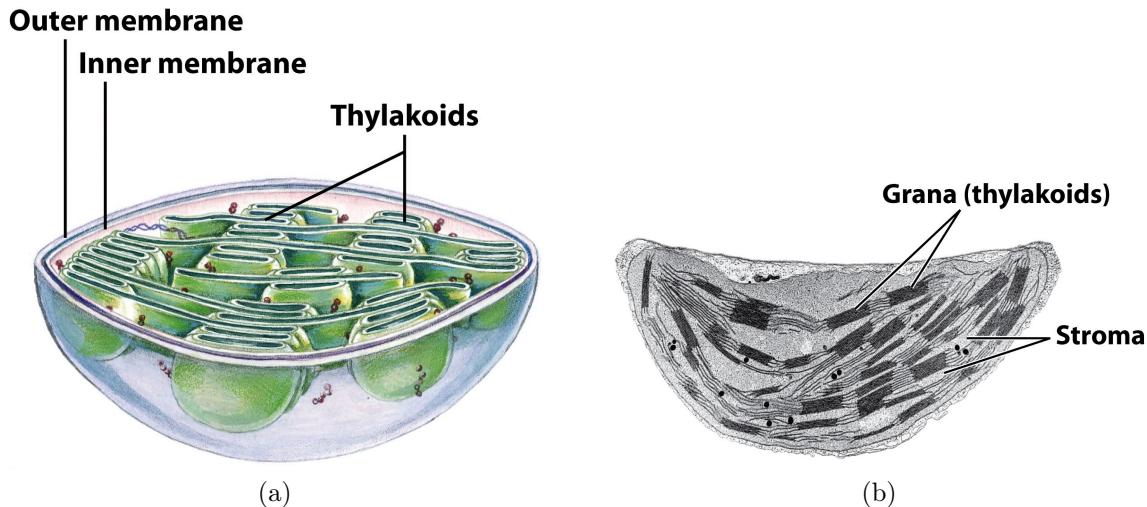


Figur 8.17.: Lysreaksjonene i fotosyntesen genererer energirik NADPH og ATP på bekostning av solenergi.

Fotosyntese i planter finner sted i kloroplaster

I fotosyntetiske eukaryote celler, skjer både de lysavhengige og de karbonassimilerende reaksjonene i kloroplaster, intracellulære organeller som i likhet med mitokondrier er omgitt av to membraner, en ytre membran som er permeabel for små molekyler og ioner, og en indre membran som omgir kloroplastens indre område. Det indre området inneholder mange flate, membranbundne vesikler kalt **thylakoider** arrangert i stabler kalt

grana. Den thylakoide membranen inneholder fotosyntetiske pigmenter og enzymkomplekser som utfører lysreaksjoner og ATP-syntese. **Stroma**, væskefasen som omgis av den indre membranen, inneholder mesteparten av enzymene som er nødvendige for de karbonassimileringens reaksjonene.



Figur 8.18.: Kloroplast. (a) Skjematisk diagram. (b) Bilde tatt med elektronmikroskop viser grana, stabler av thylakoidmembraner.

8.2.2. Pigmenter absorberer lys

Klorofyll

De viktigste lysabsorberende pigmentene i de thylakoide membranene er **klorofyll**, grønne pigmenter med poysyklike, planare strukturer som minner om protoporfyrin i hemoglobin, men har Mg^{2+} , ikke Fe^{2+} , i den sentrale posisjonen. De fire nitrogenatomene i klorofyll er orientert innover mot Mg^{2+} . Alle klorofyll har en lang **fytol**-sidekjede esterifisert til en karboksylgruppe-substituent i ring IV samt en femte femkantet ring som ikke finnes i heme.

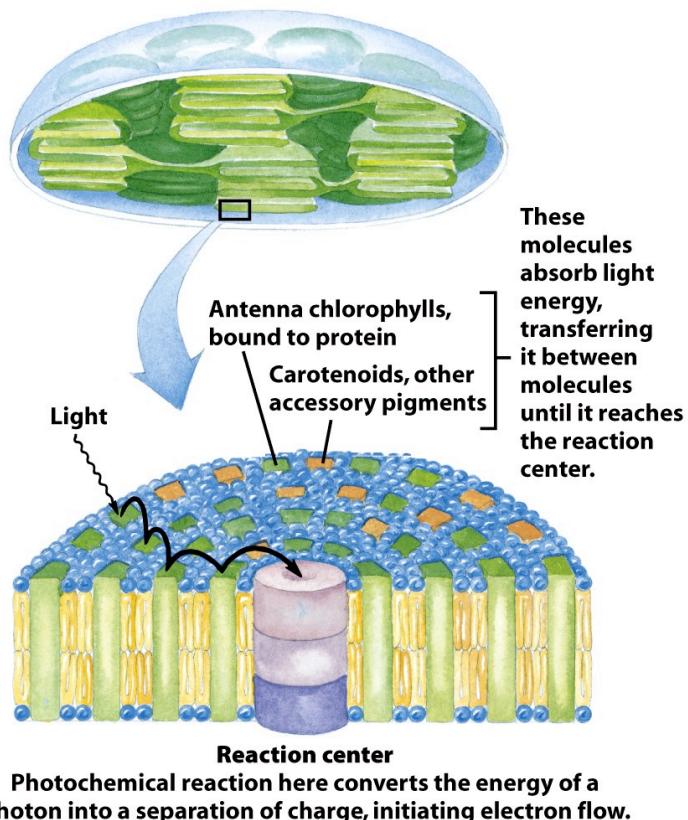
Det heterosykliske femring-systemet som omringer Mg^{2+} har en utvidet polyenstruktur, med alternerende enkelt- og dobbeltbindinger. Slike polyener utviser karakteristisk og sterkt absorpsjon i den synlige delen av det elektromagnetiske spekteret. Kloroplaster inneholder alltid både klorofyll *a* og klorofyll *b*, da disse har tilstrekkelig ulike absorpsjonsspektre til at de komplementerer hverandres bølgelengdeområder hos synlig lys. De fleste planter inneholder dobbelt så mye klorofyll *a* som *b*. Klorofyll er alltid assosiert med spesifikke bindingsproteiner i **lyshøstende komplekser (LHCs)**, hvor klorofyllmolekyler er fiksert i forhold til hverandre, andre proteinkomplekser og membranen.

Karotenoider

I tillegg til klorofyll, inneholder thylakoide membraner sekundære lysabsorberende pigmenter kalt **karotenoider**. Disse pigmentene kan være gule, røde eller lilla. Den viktigste karotenoiden er **β -karoten**, en rød-oransje isoprenoid, og **lutein**, som er gult. Karotenoider absorberer lys med andre bølgelengder enn de som absorberes av klorofyllene, og disse pigmentene utfyller dermed hverandre.

8.2.3. Energioverføring fra klorofyll til reaksjonsentre

De lysabsorberende pigmentene i thylakoide eller bakterielle membraner er arrangert i funksjonelle anordninger kalt **fotosystemer**. Alle pigmenter i et fotosystem kan absorbere fotoner, men bare noen få klorofyllmolekyler, assosiert med et **fotokjemisk reaksjonsenter**, har evnen til å omforme lysenergi til kjemisk energi. De øvrige pigmentmolekylene i fotosystemet kalles **lyshøstende pigmenter** eller **antennepigmenter**. Disse absorberer lysenergi og overfører denne raskt og effektivt til reaksjonsenteret.

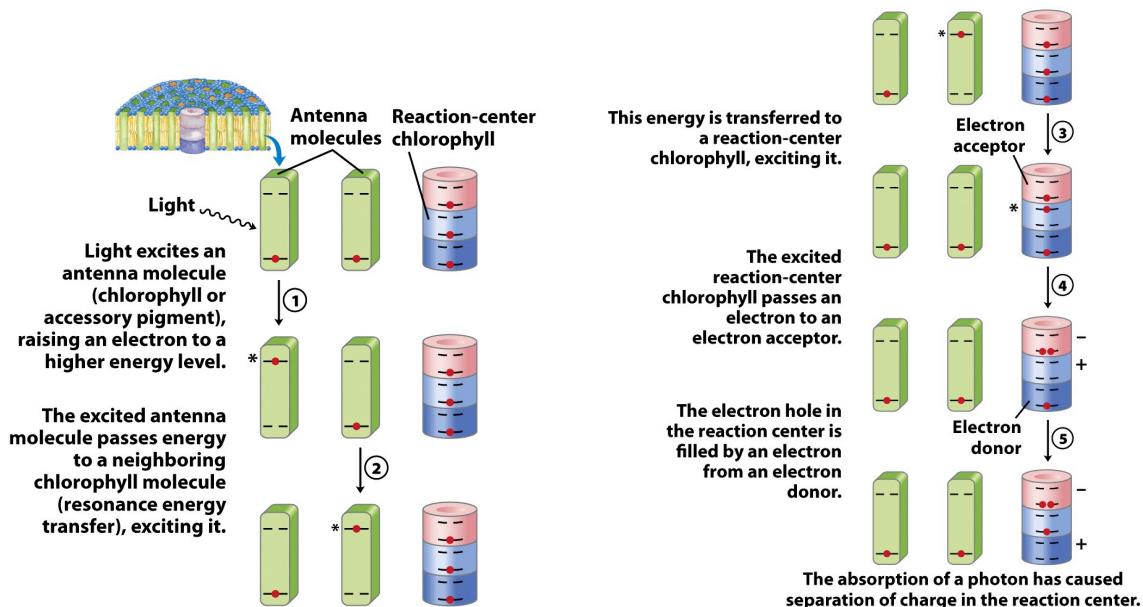


Figur 8.19.: Organisering av fotosystemer i den thylakoide membranen.

De lysabsorberende egenskapene hos klorofyllmolekyler i lyshøstende komplekser skiljer seg noe fra de tilsvarende egenskapene hos fritt klorofyll. Når fritt klorofyll in vitro eksisteres av lys, frigjøres den absorberte energien raskt i form av fluorescens og varme.

Klorofyll i intakte blader gir imidlertid svært lite fluorescens når de utsettes for synlig lys; energien overføres istedet effektivt til reaksjonssenteret via en serie energioverføringer som vist i Figur 8.20 og beskrevet nedenfor.

I trinn ① eksiteres et antenneklorofyll av et innkommende foton og går over i en eksitert energitilstand. Energien overføres deretter direkte til naboklorofyllet (trinn ②); klorofylmolekylet som først ble eksitert går dermed tilbake til grunntilstanden samtidig som nabomolekylet eksiteres. Denne energioverføringen, kalt **exciton-overføring**, fortsetter videre fra klorofyll til klorofyll helt til et spesielt par av klorofyll *a*-molekyler i det fotokjemiske reaksjonssenteret eksiteres (trinn ③). Et elektron i det eksiterte molekylet går over i en orbital med høyere energi, og dette elektronet går videre til en elektronakseptor i nærheten slik at reaksjonssenteret sitter igjen med et “elektronhull”, et manglende elektron (trinn ④). Elektronet som mistes i reaksjonssenterklorofyllet erstattes av et elektron fra en nabo-elektronondonor (trinn ⑤), som dermed blir positivt ladd. På denne måten forårsaker eksitering fra lys separasjon av elektrisk ladning og initierer en kjede av redoks-reaksjoner.



Figur 8.20.: Overføring av excitoner og elektroner fra antennemolekyler til reaksjonssenter-klorofyll.

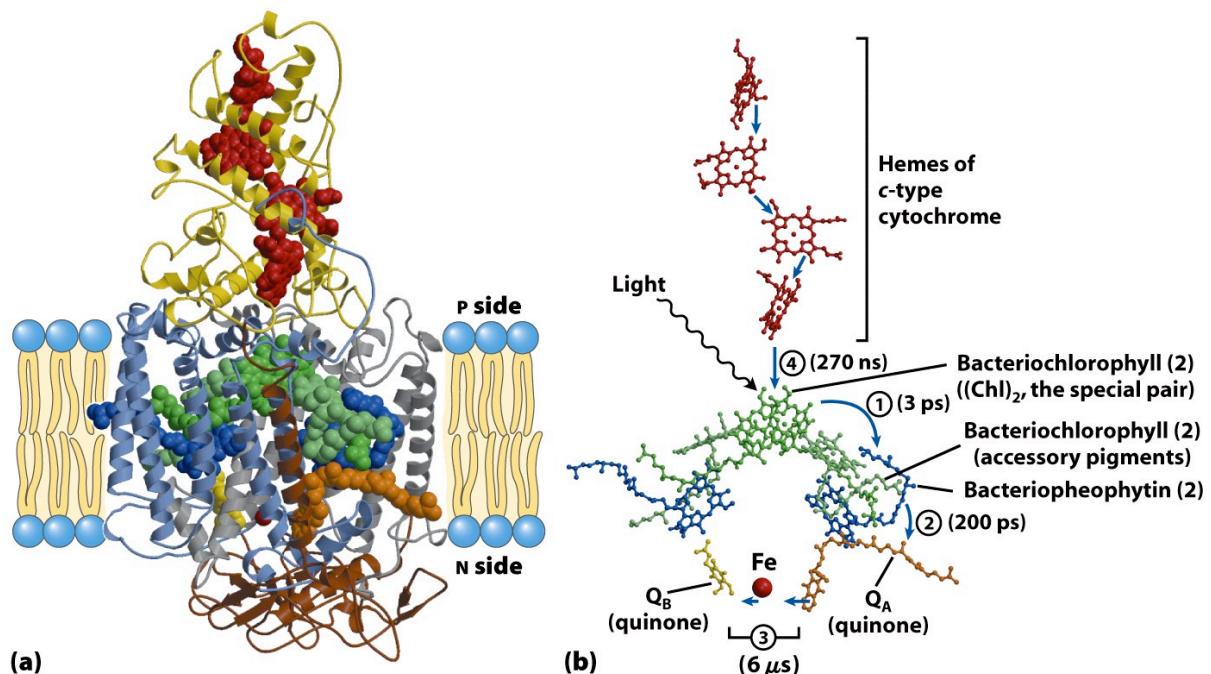
8.2.4. Lysdrevet elektrontransport i bakterier

Bakterier har to typer enkle fotokjemiske reaksjonssentre, feofytin-quinon-reaksjonssenteret (Type II) som finnes i purpurbakterier og Fe-S-reaksjonssenteret (Type I) som finnes i grønnsvovelbakterier.

Feofytin-quinon-reaksjonssenteret (Type II)

Det fotosyntetiske maskineriet i bakterier består av tre grunnleggende moduler: ett enkelt reaksjonssenter (P870), et cytokrom bc_1 -elektronoverføringskompleks som minner om Kompleks III i den mitokondrielle elektrontransportkjeden, og en ATP syntase, også likt det tilsvarende enzymet i mitokondrier. Ved belysning drives elektroner gjennom fefytin og quinon til cytokrom bc_1 -komplekset; etter å ha passert gjennom komplekset, flyter elektroner gjennom cytokrom c_2 tilbake til reaksjonssenteret slik at dette går tilbake til tilstanden det hadde før belysningen. Denne lysdrevne, sykliske flyten av elektroner gir energien som er nødvendig for protonpumping fasilitert av cytokrom bc_1 -komplekset. Den resulterende protongradienten driver ATP-syntese ved ATP syntase på nøyaktig samme vis som i mitokondriene.

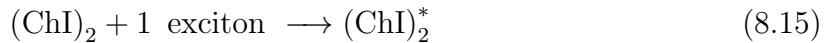
Reaksjonssenteret i purpurbakterien *Rhodopseudomonas viridis* gir et eksempel på strukturen til et Type II-reaksjonssenter: Reaksjonssenteret består av fire polypeptidunderenheter og 13 kofaktorer. Kofaktorene er to par bakterielle klorofyller, et par feofytiner, to quinoner, et ikke-heme-jernatom og fire heme-grupper i det assoserte c -type-cytokromet. Strukturen til dette reaksjonssenteret og elektronoverføringssekvensen gjennom det er vist i Figur 8.21.



Figur 8.21.: Fotoreaksjonssenter i purpurbakterien *Rhodopseudomonas viridis*. (a) Struktur. (b) Rute for elektronoverføringer.

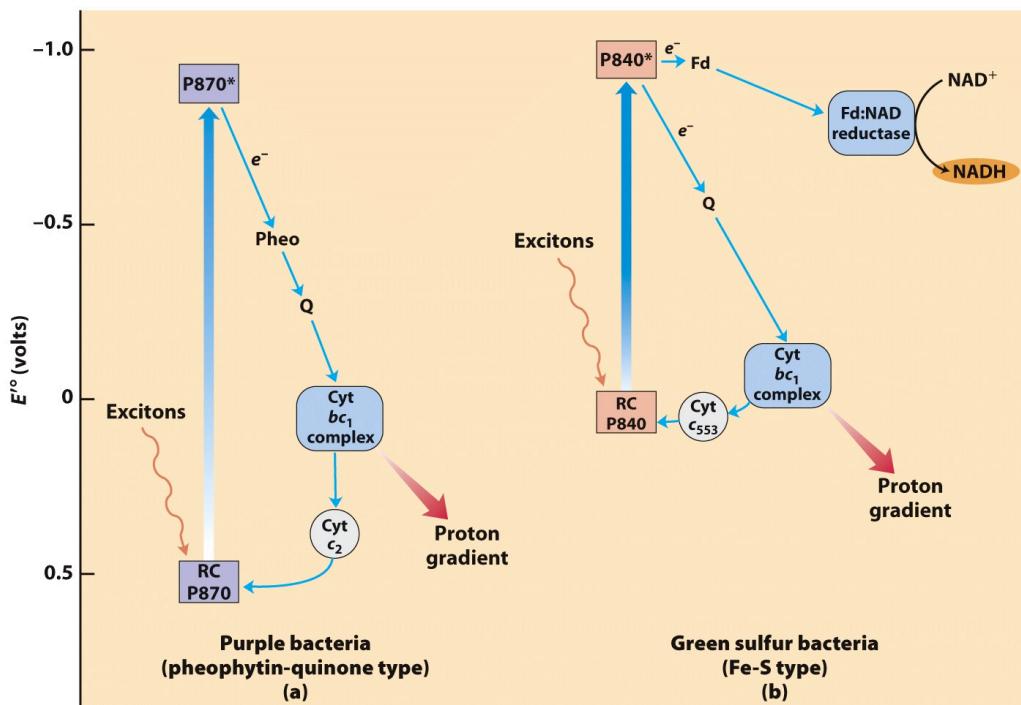
Fotokjemien i reaksjonssenteret hos purpurbakterier begynner i et par bakterielle klorofyller kalt $(\text{Chl})_2$ i reaksjonssenteret. Energien fra et foton som absorberes av et av de mange antenneklorofylene som omgir reaksjonssenteret når $(\text{Chl})_2$ via exciton-overføringer og gir en økning av redoks-potensialet tilsvarende energien i det absorberte fotonet. $(\text{Chl})_2$

konverteres på denne måten til en svært god elektronondonor, og overfører sine elektroner til feofytin(Pheo). Dette gir to radikaler, én positivt ladd ($(\text{ChI})_2$) og én negativt ladd (feofytin):



Feofytin-radikal'en konvertereret tett bundet quinonmolekyl (Q_A) til en semiquinonradikal ved overføring av sine elektroner, og denne radikal'en donerer umiddelbart elektronene videre til et andre, løst bundet quinonmolekyl (Q_B). To slike elektronoverføringer konverterer Q_B til den fullstendig reduserte formen Q_BH_2 , som fritt kan diffundere vekk fra reaksjonssenteret i membranens dobbeltlipidlag. Hydroquinon (Q_BH_2) går inn i ansamlingen av redusert quinon (QH_2) løst i membranen og beveger seg gjennom lipidlaget til cytokrom bc_1 -komplekset.

I likhet med Kompleks III i mitokondrier, bærer cytokrom bc_1 -komplekset i purpurbakterier elektroner fra en quinoldonor (QH_2) til en elektronakseptør og energien fra elektronoverføringen går til pumping av protoner på tvers av membranen. Det antas dessuten at elektronflyten gjennom komplekset ligner svært mye på Q-syklusen i det tilsvarende komplekset i mitokondriene, Kompleks III. Den endelige elektronakseptoren i purpurbakterier er den elektronfattige formen av P870, $\cdot(\text{ChI})_2^+$, som mottar elektroner fra cytokrom bc_1 -komplekset via cytokrom c_2 . Regenerering av P870 markerer starten på en ny syklus av elektronoverføringer.



Figur 8.22.: Funksjonelle moduler i det fotosyntetiske maskineriet hos (a) purpurbakterier og (b) grønnsvovelbakterier.

Fe-S-reaksjonssenteret (Type I)

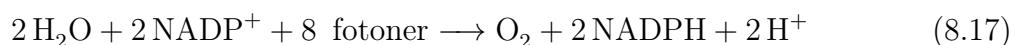
Fotosyntese i grønnsvovelbakterier involverer de samme tre modulene som hos purpurbakterier. De prosessene har imidlertid flere ulikheter; grønnsvovelbakterier benytter blant annet flere enzymatiske reaksjoner. Eksitering av et Fe-S-reaksjonssenter får elektroner til å bevege seg fra reaksjonssenteret til cytokrom bc_1 -komplekset via en quinonbærer. Elektronoverføring gjennom dette komplekset driver protonpumping på samme måte som i purpurbakterier og mitokondrier, men i grønnsvovelbakterier flyter noen av elektronene fra reaksjonssenteret også til et jern-svovel-protein, **ferredoksin**, som videre sender elektronene til NAD^+ via ferredoksin:NAD reduktase med NADH som resultat. Elektronene som fjernes fra reaksjonssenteret for reduksjon av NAD^+ erstattes ved oksidasjon av H_2S til elementært S.

8.2.5. Lysdrevet elektrontransport i planter

To reaksjonssentre samarbeider i planter

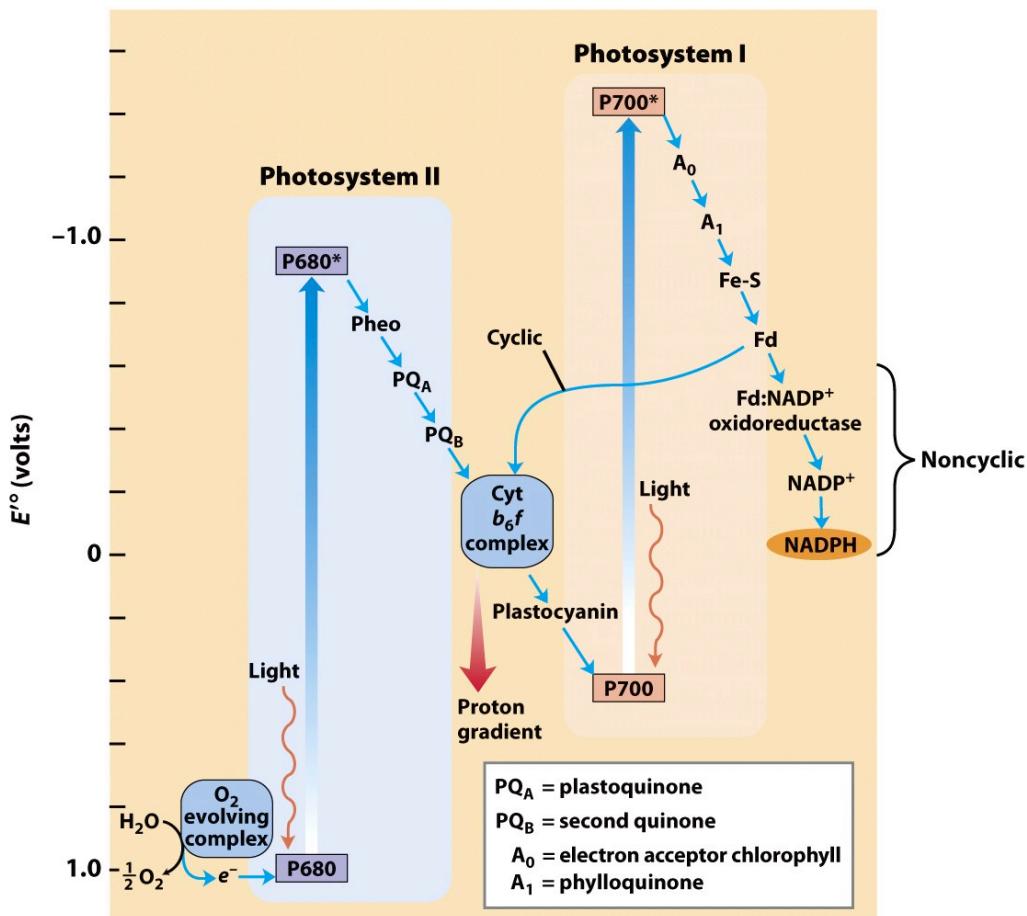
De thylakoide membranene i kloroplaster har to ulike typer fotosystemer med hvert sitt fotokjemiske reaksjonssenter og sett av antenneklorofyller. De to systemene har distinkte og komplementære funksjoner. **Fotosystem II (PSII)** er et feofytin-quinon-system som ligner fotosystemet hos purpurbakterier og inneholder omtrent like mengder av klorofylle *a* og *b*. Eksitering av fotosystemets reaksjonssenter, P860, driver elektroner gjennom cytokrom b_5f -komplekset og protoner på tvers av den thylakoide membranen. **Fotosystem I (PSI)** er strukturelt og funksjonelt beslektet med typeI-reaksjonssenteret hos grønnsvovelbakterier. Det inneholder et reaksjonssenter kalt P700 og mye klorofyll *a* i forhold til klorofyll *b*. Eksitert P700 sender elektroner til Fe-S-proteinet ferredoksin som videre reduserer $NADP^+$ til NADPH.

De to reaksjonssentrene beskrevet ovenfor samarbeider om å katalysere den lysdrevne bevegelsen av elektroner fra H_2O til $NADP^+$. Elektroner bæres mellom de to fotosystemene av det løselige proteinet **plastocyanin**, en enkeltelektronbærer som funksjonelt minner om cytokrom *c* i mitokondriene. For å erstatte elektroner som går fra PSII, via PSI, til $NADP^+$, oksiderer cyanobakterier og planter H_2O til O_2 . Alle O_2 -produserende fotosyntetiske celler inneholder både PSI og PSII; organismer som bare har ett fotosystem produserer ikke O_2 . Ruten for elektronflyt mellom PSI og PSII, samt energiforholdene i lysreaksjonene, kan ses i Figur 8.23; dette er den fullstendige ruten for elektronflyt fra H_2O til $NADP^+$ etter ligningen



Elektronflyt gjennom PSII

Mekanismene til de fotokjemiske reaksjonene i PSI og PSII ligner i stor grad mekanismen til de tilsvarende bakterielle fotosystemene, med noen viktige tillegg. I PSII danner to svært like proteiner, D1 og D2, en nesten symmetrisk dimer som alle de elektronbærende kofaktorene er bundet til. Eksitering av P680 i PSII gir P680*, en svært god elektron-donor, som raskt overfører et elektron til feofytin. Resultatet er at feofytin blir negativt

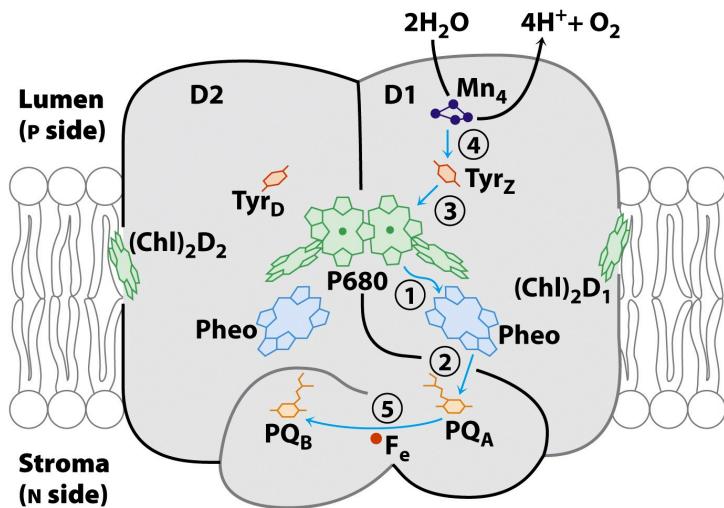


Figur 8.23.: Funksjonelle moduler i det fotosyntetiske maskineriet hos planter. Fotosystemene I og II er koblet sammen via cytokrom b_6f -komplekset.

ladd ($\bullet\text{Pheo}^-$), mens P680 transformeres til et radikalt kation $\text{P}680^+$. $\bullet\text{Pheo}^-$ donerer raskt sitt ekstra elektron til proteinbundet **plastoquinon**, **PQ_A** (eller Q_A), som deretter sender dette elektronet vider til et annet, løsere bundet plastoquinon, **PQ_B** (eller Q_B). Når PQ_B har mottatt to elektroner fra PQ_A på denne måten samt to protoner fra vann i omgivelsene, er resultat den fullstendig reduserte quinolformen PQ_BH_2 , som før eller siden sender sine elektroner gjennom cytokrom b_6f -komplekset. Elektronet som opprinnelig ble fjernet fra P680 erstattes ved oksidasjon av vann.

Elektronflyt gjennom PSI

Fotokjemien ved eksitering av P700-reaksjonssenteret i PSI ligner formelt på det som skjer i PSII ved eksitering. Det eksitere reaksjonssenteret $\text{P}700^*$ mister et elektron til en akseptor, A_0^- , med A_0^- og $\text{P}700^+$ som resultat. Det oppstår også her en ladningsseparasjon i det fotokjemiske reaksjonssenteret. $\text{P}700^+$ er sterkt oksiderende, og tilegner seg raskt et elektron fra plastocyanin; A_0^- er tilsvarende sterkt reduserende og overfører sitt elektron til NADP^+ via en kjede av elektronbærere: Først aksepterer **fylloquinon** (A_1)



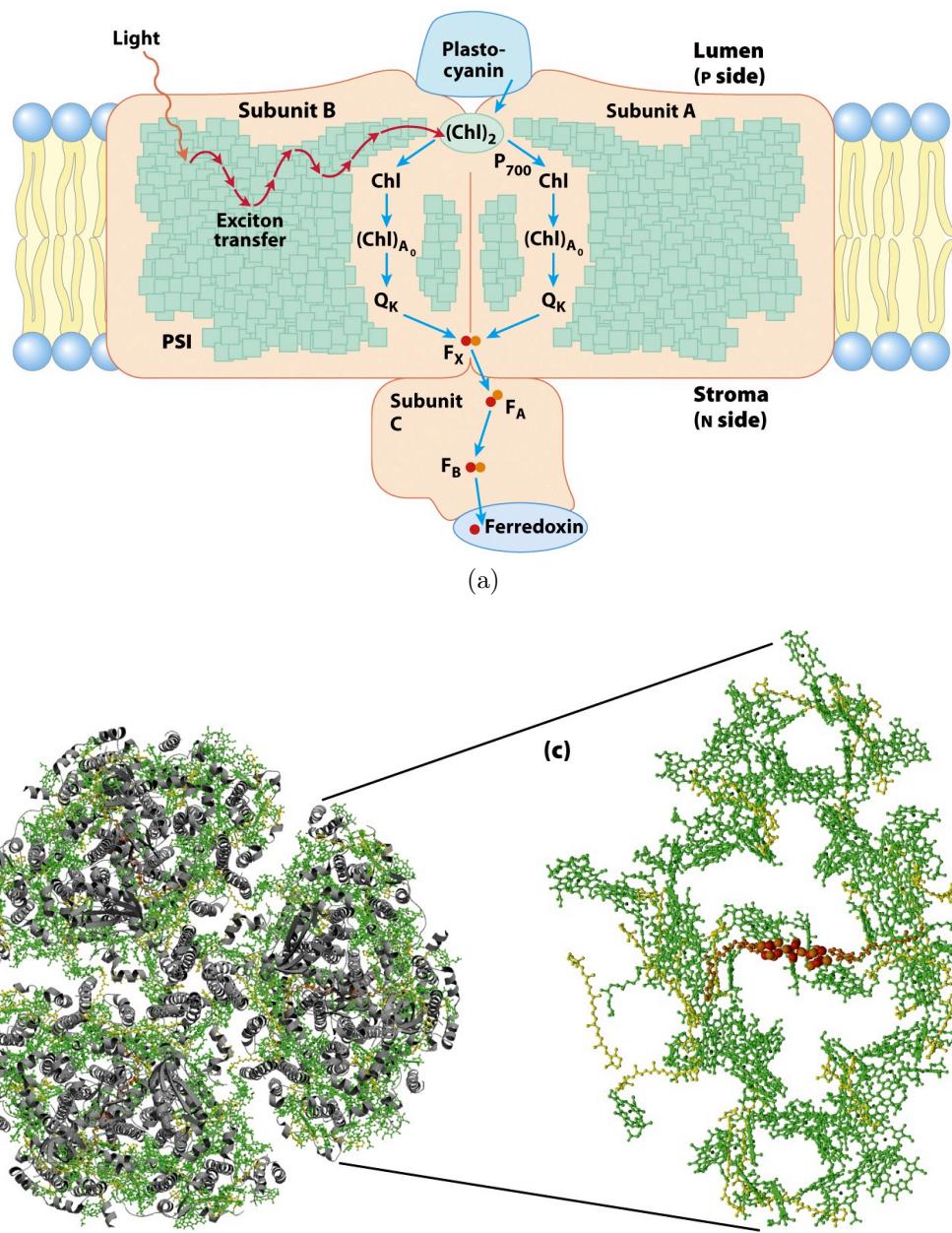
Figur 8.24.: Elektronflyt gjennom PSII.

et elektron og sender det gjennom et jern-svovel-protein. Deretter beveger elektronet seg til **ferredoksin** (Fd), et annet jern-svovel-protein som er løst bundet til den thylakoide membranen. Den fjerde elektronbæreren i kjeden er flavoproteinet **ferredoksin:NADP⁺ oksidoreduktase**, som overfører elektroner fra redusert ferredoksin til NADP⁺.

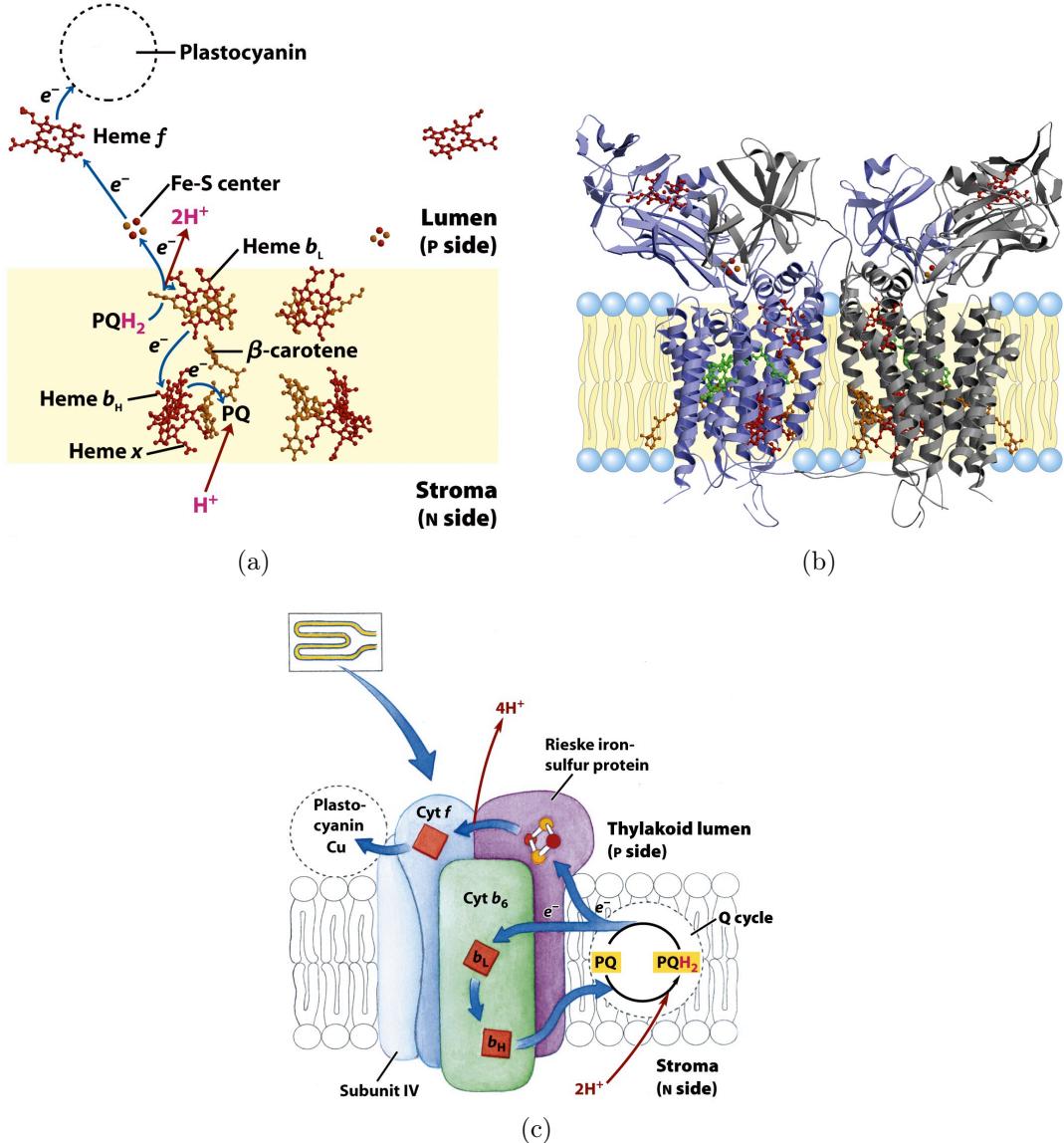
Antenneklorofyller er tett integrerte med elektronbærere i PSI

De elektronbærende kofaktorene i PSI og de lysbærende kompleksene er del av et supramolekylært kompleks. Dette består av tre identiske kompleksene som hver inneholder 11 ulike proteiner. Antenneklorofyller og karotenoider er presist plassert rundt kompleksets reaksjonssenter og reaksjonssenterets elektronbærende kofaktorer er tett integrert med antenneklorofyllene. Dette arrangementet tillater svært rask og effektiv exciton-overføring fra antenneklorofyllene til reaksjonssenteret.

I motsetning til elektronflyten i PSII, som bare følger én rute, antas det at elektronflyten som initieres ved absorpsjon av et foton i PSI skjer via begge de to elektronrutene som er beskrevet ovenfor. Elektroner som lagres midlertidig i plastoquinol som følge av eksitering av P680 i PSII bæres til P700 i PSI via cytokrom *b*₆*f*-komplekset. Elektroner flyter gjennom cytokrom *b*₆*f*-komplekset fra PQ_BH₂ til cytokrom *f*, deretter til plastocyanin og til slutt til P700 som reduseres. I likhet med Kompleks III i mitokondriene, formidler cytokrom *b*₆*f* elektroner fra et redusert quinon til et vannløselig protein som bærer ett elektron (cytokrom *c* i mitokondriene, plastocyanin i kloroplasten) og som i mitokondriene involverer kompleksets funksjon en Q-syklus hvor elektroner overføres en i gangen fra PQ_BH₂ til cytokrom *b*₆. Denne syklusen resulterer i pumping av protoner over membranen slik at en protongradient oppstår; i kloroplasten pumpes protoner fra stroma til innsiden av thylakoider (lumen), i mitokondrier fra matrix til det intermembrane området.



Figur 8.25.: De elektronbærende kofaktorene i PS I og de lysbærende kompleksene er del av et supramolekylært kompleks. (a) Elektronflyt gjennom komplekset. (b) Trimerisk struktur sett fra lumen, vinkelrett på membranen. (c) En PS I-monomer med alle proteiner utelatt. Antenne- og reaksjonssenter-klorofyller er vist.



Figur 8.26.: Elektron- og protonflyt gjennom cytokrom b_6f -komplekset. (a) Rute for elektronoverføring. (b) Tredimensjonal struktur. (c) PQH_2 dannet i PSII oksideres i en serie av trinn som ligner Q-syklusen i mitokondriene.

Syklig elektronflyt mellom PSI og cytokrom b_6f -komplekset

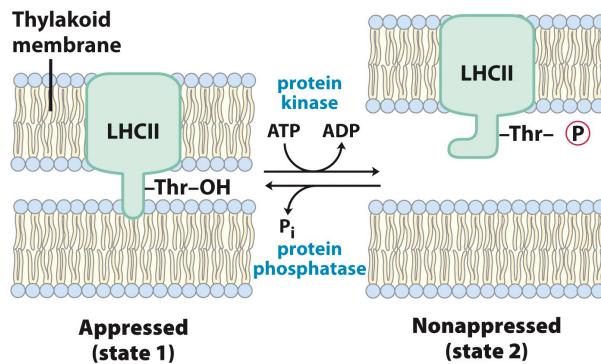
Elektronflyt som følger ruten fra PSII til cytokrom b_6f -komplekset og deretter går via PSI til NADP^+ , kalles av og til **ikke-syklig elektronflyt** for å skille den fra **syklig elektronflyt**. Ikke-syklig elektronflyt gir en protongradient som brukes til å drive ATP-syntese, og NADPH , som brukes som reduksjonsmiddel i biosyntetiske prosesser. Syklig elektronflyt involverer bare PSI, ikke PSII.

I syklig elektronflyt går elektroner som beveger seg fra P700 til ferredoksin tilbake via cytokrom b_6f -komplekset til plastocyanin i stedet for å redusere NADP^+ . Plastocyanin

donerer disse elektronene til P700, som på nytt overfører dem til ferredoksin. På denne måten resirkuleres elektroner gjentatte ganger gjennom cytokrom b_6f -komplekset og reaksjonssenteret i PSI. Resirkuleringen gir verken noe netto NADPH-utbytte eller dannelse av O_2 , men protoner pumpes over membranen av cytokrom b_6f -komplekset slik at ADP kan fosforyleres til ATP. Denne fosforyleringen kalles **syklisk fotofosforylering**.

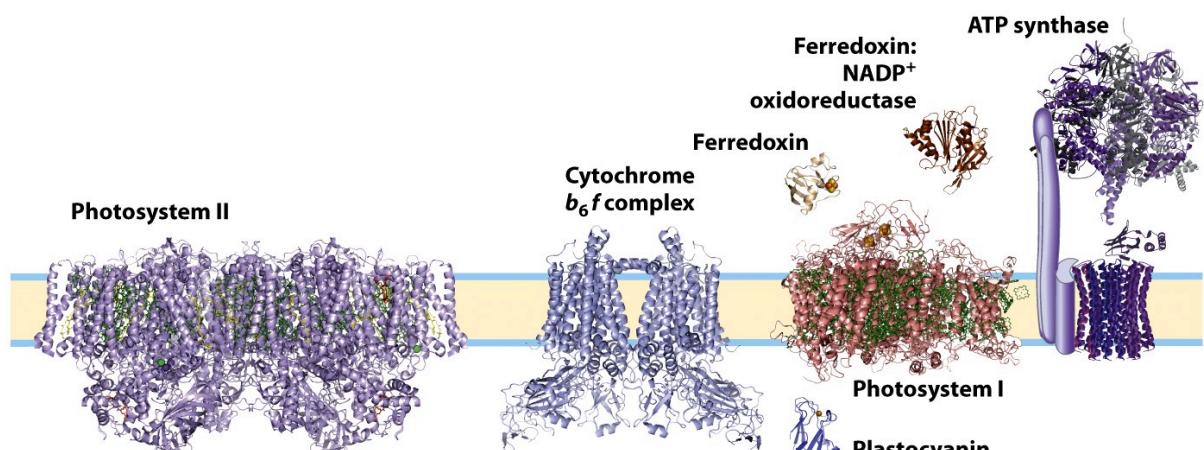
Tilstandsoverganger endrer fordelingen av LHCII mellom de to fotosystemene

Energien som kreves for eksitering av PSI er mindre enn for PSII. Dersom PSI og PSII var fysisk sammenkoblet, ville excitoner bevege seg fra antennesystemet i PSII til reaksjonssenteret i PSI, noe som ville gjort PSII kronisk undereksitert samt forstyrret tosentersystemet. Slik ubalanse forhindres imildertid av at de to systemene er separert i den thylakoide membranen. PSII finnes nesten utelukkende i de tett sammenpressende membranstablene i grana; det assosierte lyshøstende komplekset (LHCII) er ansvarlig for den tette membranstabiliseringen. PSI og ATP syntase finnes nesten utelukkende i de mindre tettpakkede delene av den thylakoide membranen, hvor de har tilgang til innholdet i stroma, inkludert ADP og $NADP^+$. Cytokrom b_6f -komplekset finnes primært i grana.

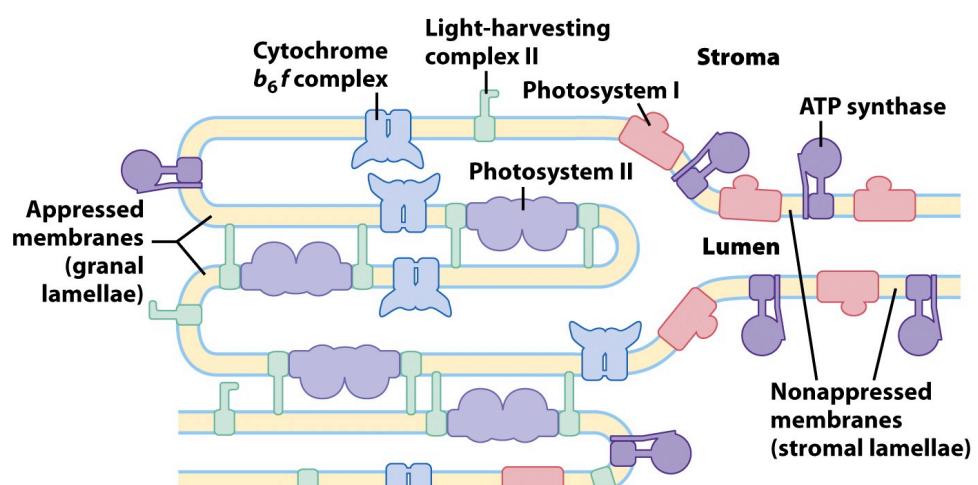


Figur 8.27.: Elektronflyt gjennom PSI og PSII balanseres av tilstandsoverganger.

Assosiasjonen mellom LHCII og de to kompleksene PSI og PSII avhenger av lysintensitet og -bølgelengde, som kan endre seg over kort tid og gi **tilstandsoverganger** i kloroplasten. I tilstand 1 er en kritisk Ser-residue i LHCII ikke fosforylert og LHCII assosieres da med PSII. Dersom det innkommende lyset er veldig intenst eller blått, noe som favoriserer absorpsjon via PSII, reduserer dette fotosystemet plastoquinon til plastoquinol raskere enn dette kan oksideres av PSI. Den resulterende akkumulasjonen av PQH_2 aktiverer en proteinkinase som gir overgang til tilstand 2 ved fosforylering av en Thr-residue i LHCII. Dette fører til at enkelte LHCII disosierer fra PSII og beveger seg til de mindre tettpakkede regionene i membranen hvor de absorberer fotoner for PSI. I det motsatte tilfellet, altså ved svakere lys, når PSI oksiderer PQH_2 raskere enn PSII kan produsere det, defosforyleres LHCII.



(a)



(b)

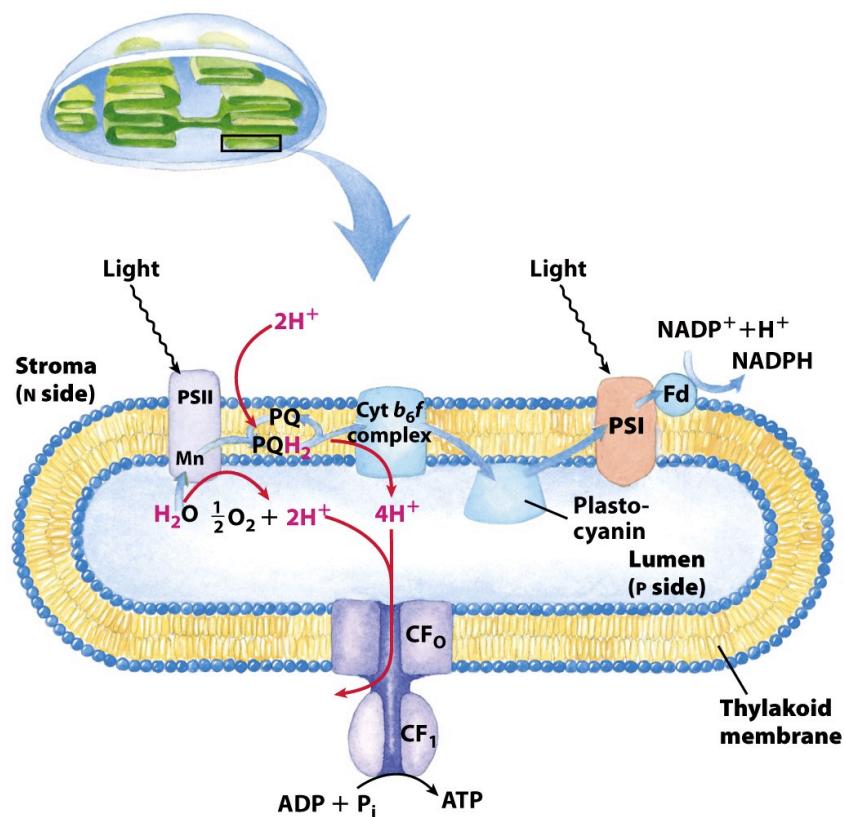
Figur 8.28.: PSI og PSII i thylakoidmembranen. (a) Strukturen til kompleksene og de løselige proteinene som inngår i det fotosyntetiske apparatet hos planter eller alger. (b) LHCII og ATP syntase finnes både i sammenpressede regioner ("granal lamellae") og i ikke-sammenpressede regioner ("stromal lamellae"), mens PSI nesten utelukkende finnes i de ikke-sammenpressede regionene som er eksponert for stroma. LHCII er "limet" som holder granal lamellae sammen

Vann splittes av det oksygenutviklende komplekset

Vann er den opprinnelige kilden til alle elektroner som overføres til NADP^+ ved dannelsen av NADPH i oksygeniske planter. To vannmolekyler splittes med fire elektroner, fire protoner og molekylært oksygen som resultat:



Fire fotoner kreves for å få denne fotolytiske kløyvingsreaksjonen til å gå. De fire elektronene som utvinnes fra vann går ikke direkte til $\text{P}680^+$, som bare kan akseptere ett elektron i gangen. De går i stedet veien om **det oksygenutviklende komplekset**, som sørger for at de fire elektronene fra vann overføres ett om gangen til $\text{P}680^+$. Hver elektronoverføring medfører dannelse av ett proton, og ettersom dette slippes ut i lumen, altså på innsiden av den thylakoide membranen, virker det oksygenutviklende komplekset som en protonpumpe. For hvert O_2 -molekyl som dannes, frigjøres 4H^+ i lumen.



Figur 8.29.: Sirkulering av protoner og elektroner i thylakoider.

8.2.6. ATP-syntese ved fotofosforyling

Fotofosforyling er prosessen hvor energi fra lys, fanget av fotosyntetiske systemer, transformeres til energi i form av fosfatbindinger i ATP. Flere egenskaper ved fotosyntetisk

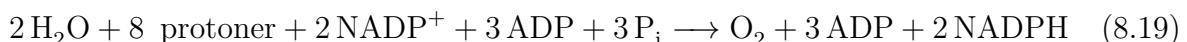
elektronoverføring og fotofosforylering indikerer at en protongradient spiller samme rolle som ved oksidativ fosforylering i mitokondriene:

1. Reaksjonssentrene, elektronbærerne og enzymene som produserer ATP finnes i en membran som er impermeabel for protoner.
2. Fotofosforylering kan kobles fra elektronoverføringer av reagenser som promoverer overføring av protoner gjennom den thylakoide membranen.
3. Fotofosforylering kan blokkeres av samme forbindelser som inhiberer dannelsen av ATP fra ADP og P_i i mitokondriene.
4. ATP-syntese katalyses av CF_oCF₁-komplekser som ligner svært mye på F_oF₁-kompleksene i mitokondrier både i struktur og funksjon.

Fotoindusert elektronflyt resulterer i netto bevegelse av protoner over den thylakoide membranen, fra stroma på utsiden til lumen på innsiden. En pH-gradient over denne membranen gir en protonmotiv kraft som driver produksjonen av ATP.

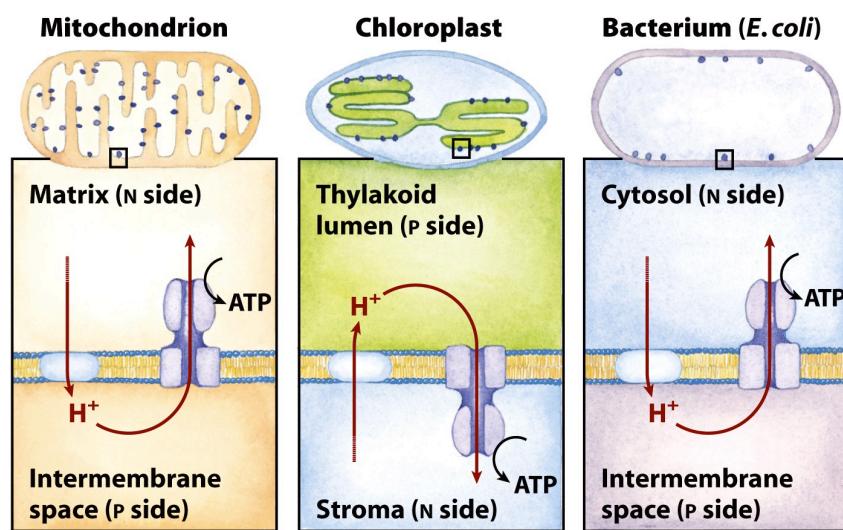
Approksimativ støkiometri og energiutbytte for fotofosforylering

For hvert fjerde elektron som beveger seg fra vann til NADP⁺ i kloroplaster, og dermed for hver O₂ som dannes, går omtrent 12 H⁺ fra stroma til lumen. Fire av disse fraktes av det oksygenutviklende komplekset og opp til åtte av cytokrom b₆f-komplekset. Ut fra dette og eksperimentelle bevis, er energiutbyttet per produserte O₂-molekyl beregnet til 3 ATP-molekyler. ATP-syntese er imidlertid ikke den eneste energikonserverende reaksjonen i planters fotosyntese; NADPH som dannes i den endelige elektronoverføringen er også rik på kjemisk energi. Den (approksimative) samlede ligningen for ikke-syklig fotofosforylering er:



ATP syntase i kloroplaster

Enzymet som er ansvarlig for ATP-syntese i kloroplaster er et stort kompleks med to funksjonelle komponenter, CF_o OG CF₁. CF_o er en transmembranprotonpore bestående av flere integrale membranproteiner; dette proteinet er homologt med F_o i mitokondrier. CF₁ er et perifert membranproteinkompleks som ligner mitokondrielt CF₁ svært mye i oppbygningen av underenheter, struktur og funksjon. CF₁ strekker seg ut i stroma, tilsvarende den basiske N-siden av membranen, i likhet med F₁ i mitokondriene som strekker seg inn i matrix som er fattig på protoner.



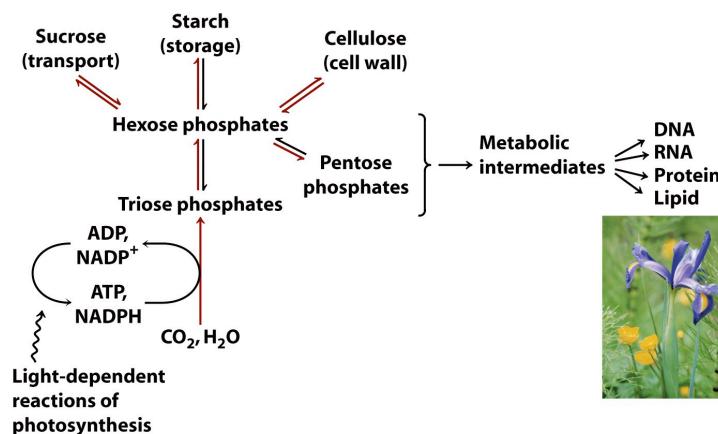
Figur 8.30.: Sammenligning av protonflyt og orientering av ATP syntase i mitokondrier, kloroplaster og bakterien *E. coli*.

9. Biosyntese av karbohydrater i planter og bakterier

Ved biosyntese (anabolisme) brukes kjemisk energi i form av ATP og NADH eller NADPH til å syntetisere cellulære komponenter fra enkle forløpermolekyler. Anabolske ruter er generelt reduktive heller enn oksidative. Anabolisme og katabolisme skjer til samme tid i dynamisk steady state, slik at den energigivende degraderingen av cellulære komponenter balanseres av biosyntetiske prosesser som skaper og opprettholder orden i levende celler.

9.1. Fotosyntetisk karbohydratsyntese

Karbohydratsyntese i dyreceller tar alltid utgangspunkt i forløpere som inneholder minst tre karbonatomer og er mindre oksiderte enn karbonet i CO_2 . Planter og fotosyntetiske mikroorganismer er imidlertid i stand til å syntetisere karbohydrater fra CO_2 og vann på bekostning av energien og den reduserende kraften i ATP og NADPH som dannes i de lysavhengige reaksjonene i fotosyntesen. Planteceller (og andre autotrofer) kan bruke CO_2 som eneste karbonkilde ved biosyntese av cellulose og stivelse, lipider, proteiner og alle andre organiske komponenter i cellen, noe som er umulig for heterotrofer.



Figur 9.1.: Assimilering av CO_2 til biomasse i planter.

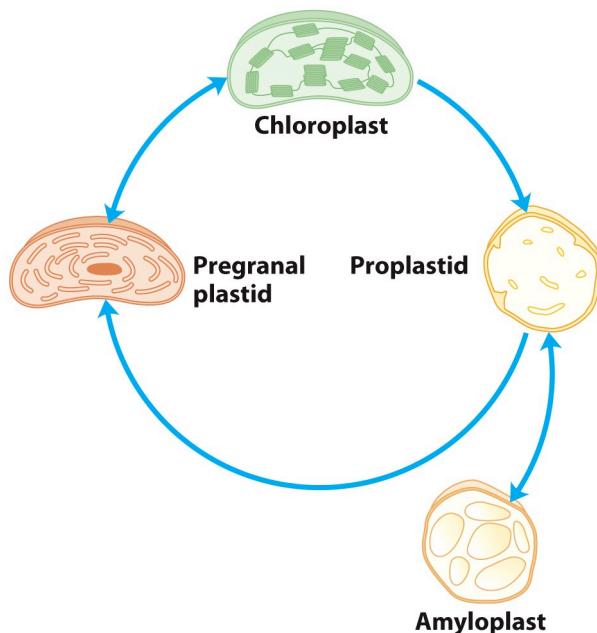
Kloroplastene til grønne planter inneholder et unikt enzymatisk maskineri som katalyser konvertering av CO_2 til enkle organiske forbindelser ved **CO_2 -assimilering**, noe som skjer via en syklig prosess kalt **Calvin-syklusen**, eller **den fotosyntetiske karbon-reduksjonssyklusen**. Karbohydratmetabolismen i otosyntetiske celler er mer kompleks

enn i ikke-fotosyntetiske celler; i tillegg til glyklysen og glukoneogenesen, har planter unike reaksjonssekvenser for reduksjon av CO_2 til triosefosfater samt for det reduktive pentosefosfatsporet.

9.1.1. Plastider

Mesteparten av de biosyntetiske aktivitetene i planter skjer i **plastider**, en gruppe selv-reproduserende organeller. Alle plastider er bundet av en dobbel membran og inneholder et lite, sirkulært kromosom som koder for noen av organellens proteiner. De fleste plastidproteiner kodes imidlertid av gener i organismens DNA og importeres inn i plastider etter transkripsjon og translasjon. Plastider reproducerer seg selv ved binær fision.

CO_2 -assimilering skjer i **kloroplaster** og enzymene som er nødvendige for prosessen finnes i stroma. **Amyloplaster** er fargeløse plastider som, i motsetning til thylakoider og kloroplaster, ikke har noen indre membran. I plantevæv som er rike på stivelse, er disse plastidene fulle av stivelsesgranuler. Kloroplaster kan konverteres til **proplastider** ved avgivelse av den indre membranen samt klorofyll, og proplastider er interkonvertible med amyloplaster. Både amyloplaster og proplastider kan utvikle seg til kloroplaster. Den indre membranen til alle typer plastider er impermeabel for polare og ladde molekyler; bevegelse over disse membranene fasiliteres av spesifikke transportproteiner.

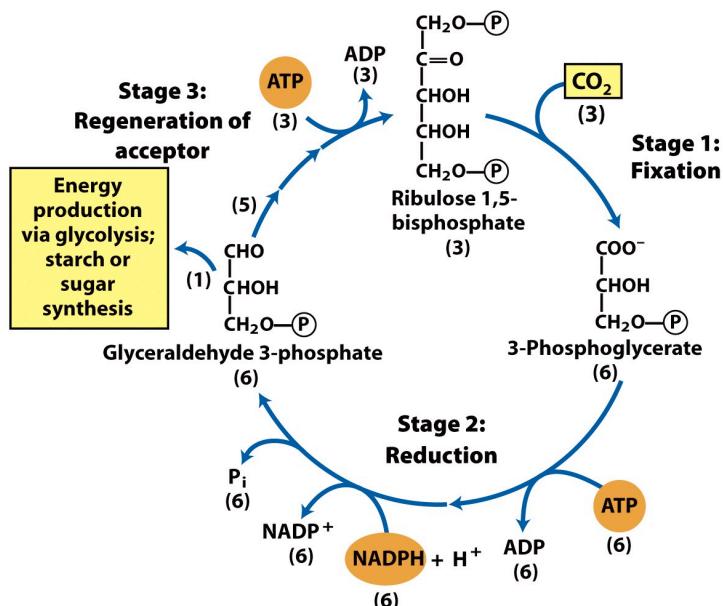


Figur 9.2.: Interkonvertering mellom plastider.

9.1.2. Reaksjoner i Calvin-syklusen

CO_2 -assimilering skjer i tre trinn. Første trinn er den **karbonfikserende reaksjonen**: kondensasjon av CO_2 med en femkarbon-akseptor, **ribulose-1,5-bisfosfat**, med dannels-

se av to molekyler av **3-fosfoglyserat**. I det andre trinnet reduseres 3-fosfoglyserat til triosefosfater. Totalt assimileres tre CO_2 -molekyler til tre ribulose-1,5-bisfosfat-molekyler med seks molekyler av glyeraldehyd-3-fosfat (18 karbonatomer) i likevekt med dihydorketosyaceton som resultat. I tredje trinn brukes fem av de seks triosefosfatemolekylene (15 karbonatomer) til å regenerere tre molekyler av ribulose-1,5-bisfosfat (15 karbonatomer). Det sjette triosefosfatemolekylet, nettoproduktet fra fotosyntesen, kan brukes til å lage heksoser, sukrose eller stivelse. Totalprosessen er dermed syklisk, med kontinuerlig konvertering av CO_2 til triose og heksosefosfater. Fruktose-6-fosfat er et nøkkelinneintermediat i trinn 3; forbindelsen står ved et veiskille hvor den enten kan regenerere ribulose-1,5-bisfosfat eller inngå i syntese av stivelse. Alle enzymer som er nødvendige for konvertering av de produserte triosefosfaten til stivelse finnes i stroma, og den syntetiserte stivelsen lagres i uløselige grauler i kloroplaster.



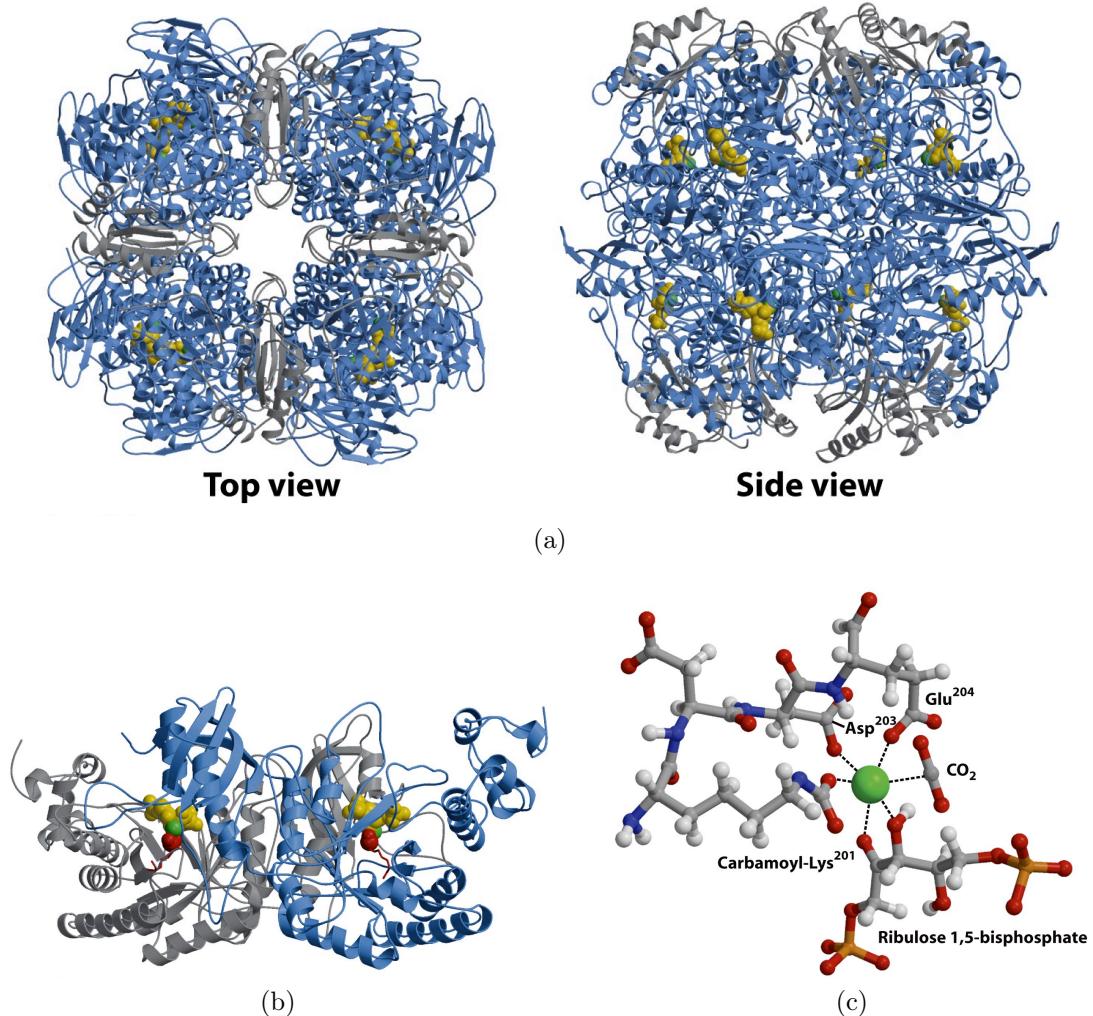
Figur 9.3.: Oversikt over de tre trinnene som inngår i CO_2 -assimilering i fotosyntetiske organismer. (Calvin-syklusen).

① Fiksering av CO_2 til 3-fosfoglyserat

Enzymet som katalyserer inkorporering av CO_2 i en organisk form er **ribulose-1,5-bisfosfat karboksylase/oksygenase**, eller **rubisco**. Som karboksylase katalyserer rubisco den kovalente bindingen av CO_2 til femkarbon-sukekret ribulose-1,5-bisfosfat samt kløyving av det ustabile sekskarbon-intermediatet slik at to 3-fosfoglyserat-molekyler dannes. Det ene av disse triosefosfatemolekylene bærer det "nye" karbonatomet fra CO_2 som sin karboksylgruppe.

Det finnes to distinkte former av rubisco. Form I finnes i vaskulære planter, alger og cyanobakterier, mens form II bare finnes i enkelte fotosyntetiske bakterier. Planterubisco har en kompleks form I-struktur med åtte identiske underenheter som alle inneholder et

katalytisk sete og åtte identiske små underenheter med ukjent funksjon. Form II har en enklere struktur med to underenheter som på mange måter ligner de store underenhetene i planteenzymet. Planterubisco har en eksepsjonelt lav omsetningsgrad, og planter må derfor ha store mengder av enzymet for å oppnå effektiv CO_2 -fiksering. Mg^{2+} er sentralt i den foreslalte mekanismen til enzymet; ionet bringer reaktantene sammen, orienterer dem i det aktive setet og polariserer CO_2 slik at molekylet åpnes for nukleofilt angrep fra enediolat-intermediatet som dannes i fiksingsreaksjonen.

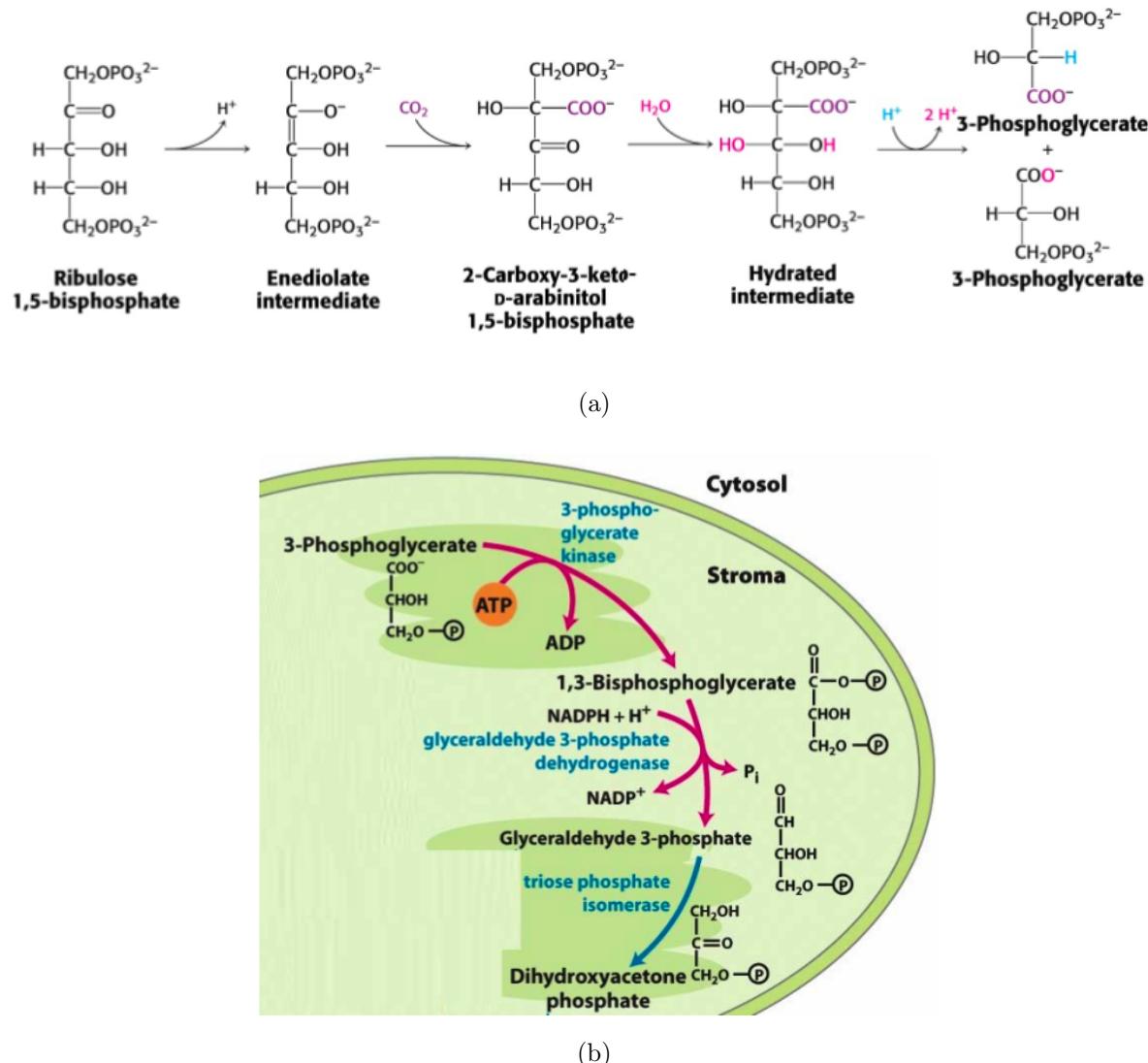


Figur 9.4.: Ribulose-1,5-bisfosfat karboksylase/oksygenase (rubisco). (a) Form I sett overnfra og fra siden. (b) Båndmodell av form I. (c) Mg^{2+} i det aktive settet.

② Konvertering av 3-fosfoglyserat til glyeraldehyd-3-fosfat

3-fosfoglyserat som dannes i trinn ① konverteres til glyeraldehyd-3-fosfat i to trinn som i praksis er de omvendte av de korresponderende trinnene i glykolysen. Det eneste unntaket er at nukleotidfaktoren som inngår ved reduksjon av 1,3-bisfosfoglyserat er

NADPH, ikke NADH. Alle glykolytiske enzymer unntatt fosfoglyserat mutase finnes i stroma. De stromale og de cytosoliske enzymene er isozymer; de katalyserer samme reaksjon, men kodes av ulike gener.

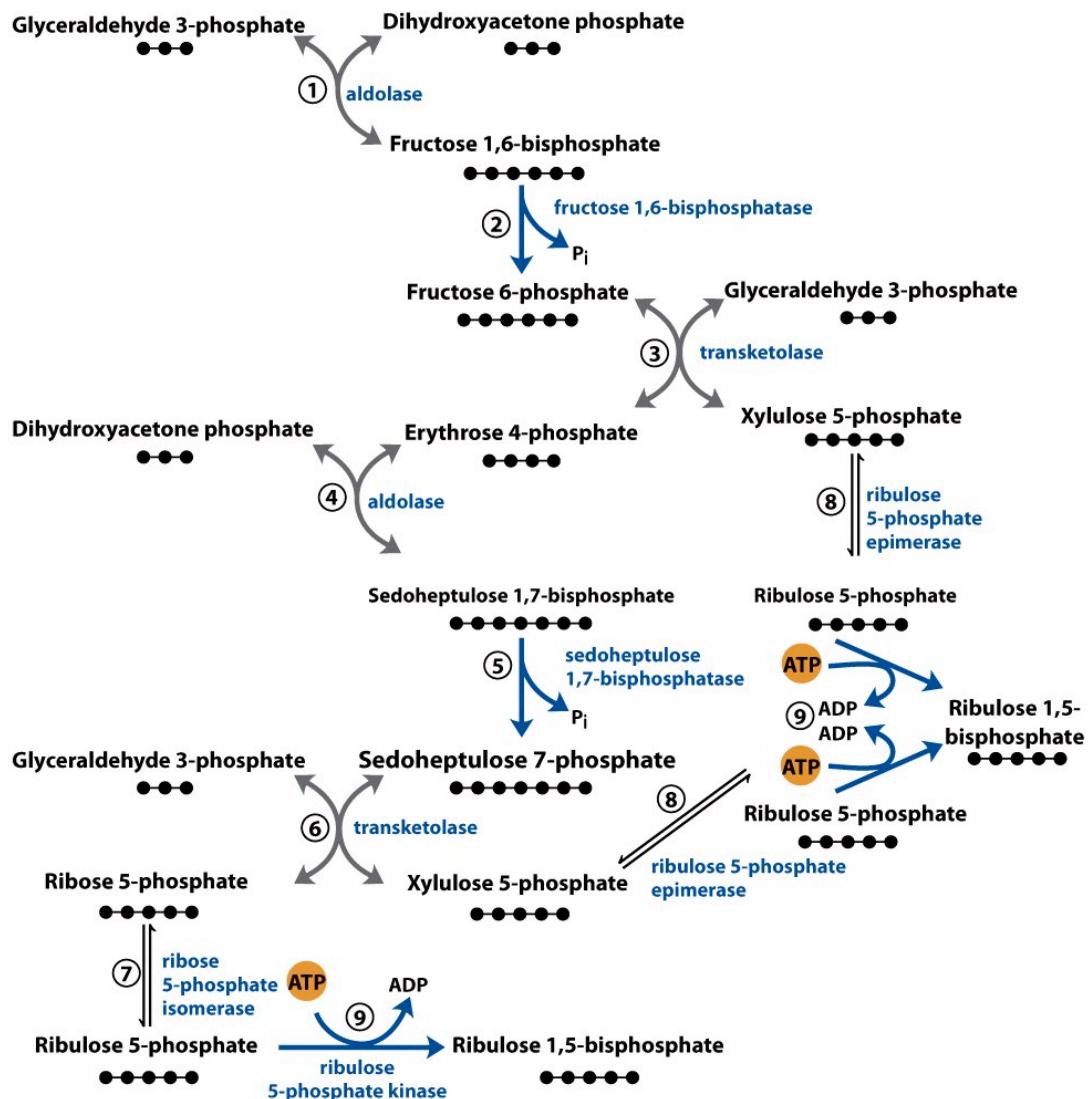


Figur 9.5.: CO₂-assimilering. (a) Første trinn. (b) Andre trinn.

I første trinn ② katalyseres overføringen av en fosforylgruppe fra ATP til 3-fosfoglyserat av **3-fosfoglyserat kinase** med 1,3-bisfosfoglyserat som resultat. Deretter donerer NADPH elektroner til reduksjonen av 1,3-bisfosfoglyserat til glyeraldehyd-3-fosfat og P_i, katalysert av det kloroplast-spesifikke isozymet til **glyeraldehyd-3-fosfat dehydrogenase**. Triosefositat isomerasen konverterer deretter glyeraldehyd-3-fosfat til dihydroksyacetonfositat.

Mesteparten av triosefositatene som produseres går til regenerering av ribulose-1,5-bisfositat; resten konverteres enten til stivele i kloroplaster og spares til senere bruk eller

eksporteres direkte til cytosolen og konverteres til sukrose for transport til voksende regioner i planten.



Figur 9.6.: Tredje trinn i CO_2 -assimileringen.

③ Regenerering av ribulose-1,5-bisfosfat fra triosefosfater

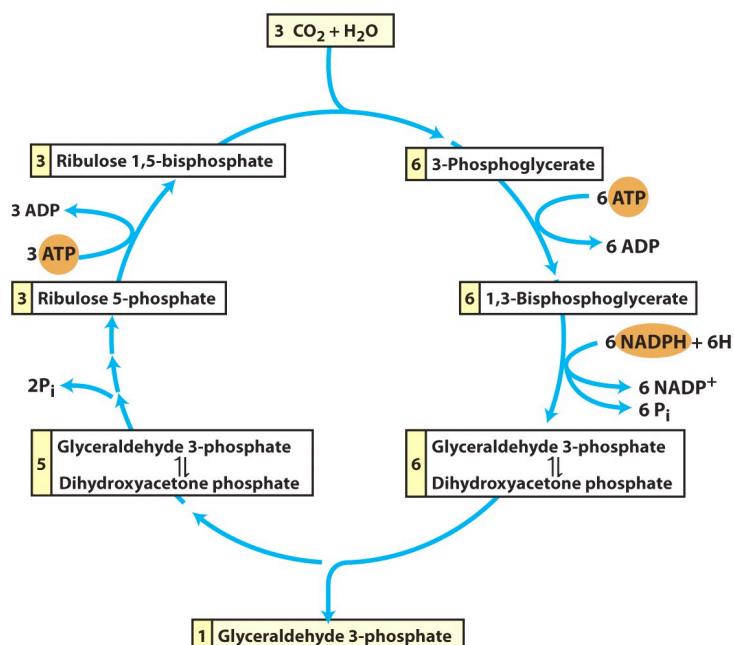
Regenereringen av ribulose-1,5-bisfosfat skjer via en serie reaksjoner som vist i de 9 trinnene i Figur 9.8. Alle referanser til trinn som følger henviser til denne figuren.

Trinnene ① og ④ katalyseres begge av **aldolase**. I trinn ① katalyserer enzymet reversibel kondensasjon av glyeraldehyd-3-fosfat med dihydroksyacetonfosfat og gir fruktose-1,6-fosfat, som deretter kløyves til fruktose-6-fosfat og P_i av FBPase-1 i trinn ②. I trinn ③ katalyseres den reversible overføringen av en tokarbon-ketolgruppe ($-\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$) fra en ketosefosfatdonor, fruktose-6-fosfat, til en aldosefosfatakseptør, glyeraldehyd-3-fosfat, av enzymet **transketolase**. Resultatet er pentosen xylulose-5-fosfat og tetrosen

erytrose-4-fosfat. I trinn ④ kombineres erytrose-4-fosfat med dihydroksyacetonfosfat til **sedoheptulose-1,7-bisfosfat** av aldolase, før sedoheptulose-1,7-bisfosfatase konverterer bisfosfatet til sedoheptulose-7-fosfat i trinn ⑤. Transketolase konverterer sedoheptulose-7-fosfat og glyeraldehyd-3-fosfat til to pentosefosfater i trinn ⑥. Ribose-5-fosfat og xylulose-5-fosfat dannet i trinn ③ konverteres til **ribulose-5-fosfat** i trinnene ⑦ og ⑧, og denne forbindelsen fosforyleres i trinn ⑨ til ribulose-1,5-fosfat av ribulose-5-fosfat kinase.

9.1.3. Energiforbruk ved syntese av triosefosfater fra CO_2

Nettoresultatet etter tre runder gjennom Calvin-syklusen er konvertering av tre CO_2 -molekyler og ett fosfatmolekyl til ett triosefosfat-molekyl. Støkiometrien for syklusen er vist i Figur 9.7, hvor det kan ses at hvert triosefosfat som produseres krever 6 molekyler av NADPH og 9 molekyler av ATP.

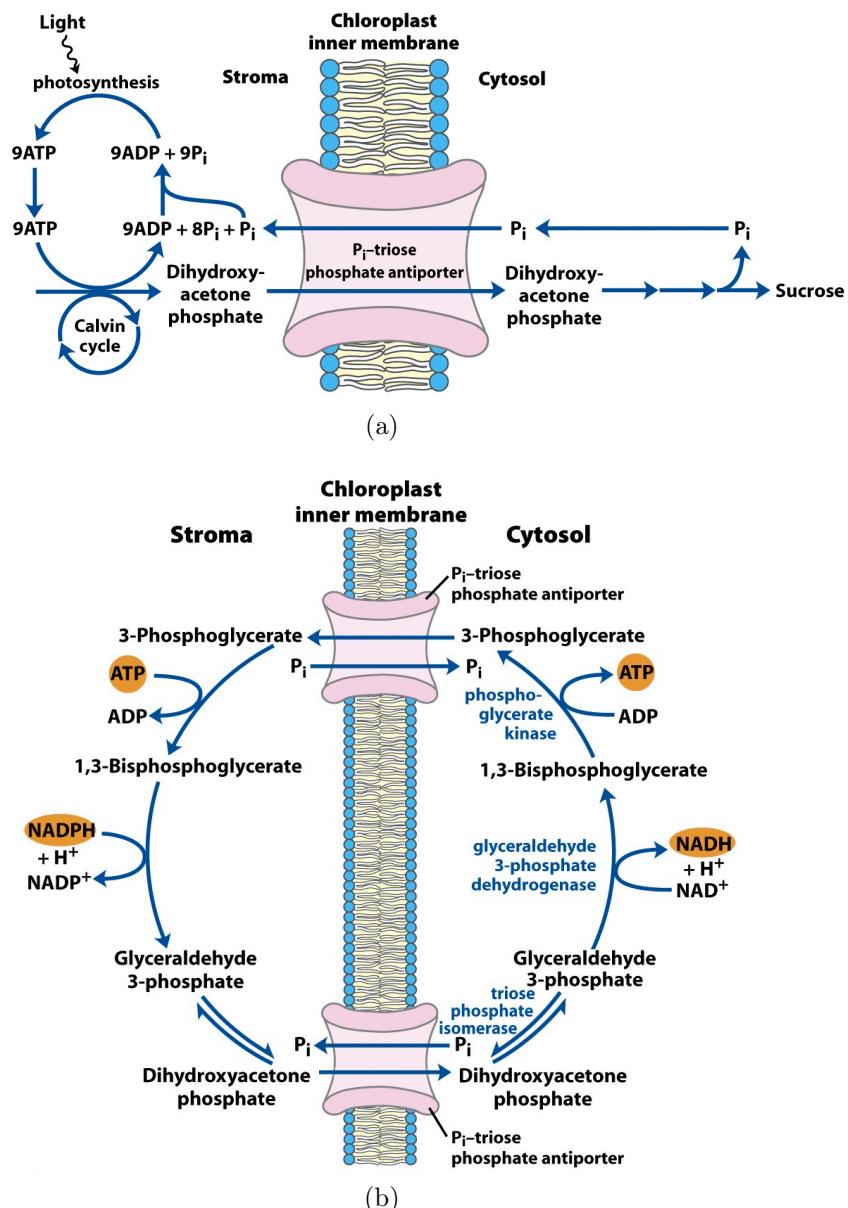


Figur 9.7.: Støkiometri for CO₂-assimilering i Calvin-syklusen.

9.1.4. Utveksling av triosefosfater og fosfat mellom cytosol og kloroplaster

Den indre kloroplastmembranen er impermeabel for de fleste fosforyerte forbindelser, men har en spesifikk antiport som katalyserer utveksling av P_i og triosefosfatene dihydroksyacetonfosfat og 3-fosfoglyserat i forholdet 1 : 1. Denne antiporten frakter P_i inn i kloroplasten for deltagelse i fotofosforylering, mens triosefosfater fraktes ut i cytosolen for sukrosesyntese. Syntese av sukrose er det største sporet for "høsting" av overflødige

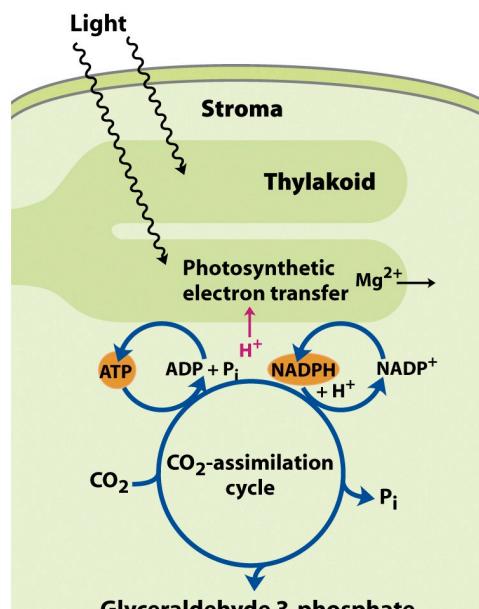
triosefosfater og frigjør fire P_i -molekyler fra de fire triosefosfatene som kreves for å danne ett sukrosemolekyl. En indirekte effekt av P_i -triosefosfat-antiportsystemet er at ATP-ekvivalenter og reduserende ekvivalenter flyttes fra kloroplaster til cytosolen.



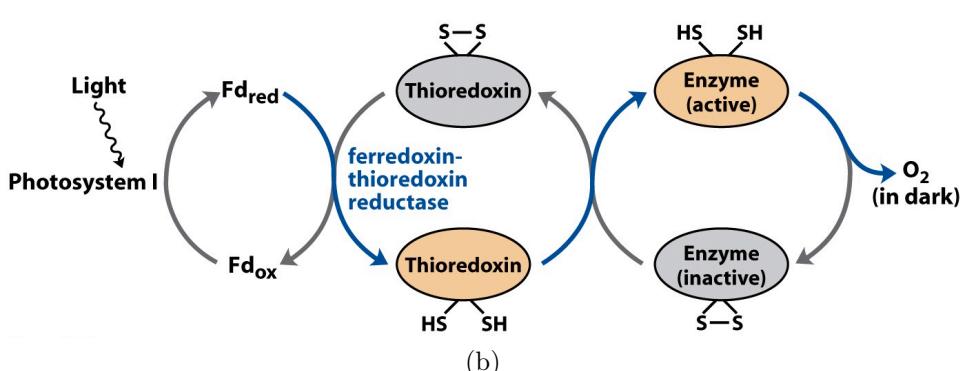
Figur 9.8.: P_i -triosefosfat-antiportsystemet i den indre kloroplastmembranen. (a) Utveksling av P_i og dihydroksyacetonfosfat. (b) Rolle i transport av ATP og reduserende ekvivalenter.

9.1.5. Lysregulering av enzymer i Calvin-syklusen

Når kloroplaster blyses, øker kosentrasjonen av ATP og NADPH i stroma. Lysindusert protontransport over den thylakoide membranen øker dessuten pH i stroma betraktelig, og økningen i $[H^+]$ i thylakoide-lumen fører til at også $[Mg^{2+}]$ øker i stroma. Store mengder ATP og NADPH er nødvendig ved CO_2 -assimilering, og mange enzymer i stroma har derfor utviklet seg slik at aktivitet er regulert av lysavhengige betingelser som pH og Mg^{2+} -konsentrasjon; enzymene er mest aktive i basiske miljøer og ved høy $[Mg^{2+}]$.



(a)



(b)

Figur 9.9.: Lysregulering i Calvin-syklusen. (a) Konsentrasjonen av ATP og NADPH i stroma øker ved belysning. pH og $[Mg^{2+}]$ øker også, noe som utnyttes i reguleringen av fire enzymer i Calvin-syklusen. (b) Lysaktiverting av enzymer i Calvin-syklusen skjer via tioredoksin og innebærer reduksjon av disulfidbindinger i enzymene.

Fire enzymer i Calvin-syklusen undergår en spesiell type lysregulering: ribulose-4-fosfat kinase, fruktose-1,6-bisfosfatase, sedoheptulose-1,7-bisfosfatase og glyeraldehyd-3-fosfat dehydrogenase. Alle disse enzymene aktiveres av lysdrevet reduksjon av en disulfidbinding mellom to Cys-residuer som er avgjørende for aktivitet. Når Cys-residuene er disulfidbundet (oksidert), er enzymene inaktive, noe som er den vanlige situasjonen i mørket. Ved belysning flyter elektroner fra PSI til ferredoksin, som sender elektronene videre til en lite, løselig protein med disulfidbindinger kalt **tioredoksin** i en reaksjon katalyseret av **ferredoksin-tioreddoksin reduktase**. Redusert tioredoksin donerer elektroner til reduksjonen av disulfidbindingene i de lysaktiverte enzymene, og den konformasjonelle endringen som følger øker enzymaktiviteten. Når belysningen opphører, reoksideres Cys-residuene og aktivitet opphører slik at ATP ikke forbrukes ved CO₂-assimilering; i stedet degraderes syntetisert stivelse for drift av glyklysen. Glukose-6-fosfat, det første enzymet i den *oksidative* pentosefosit-ruten, reguleres også av samme lysdrevne reuleringsmekanisme, men med motsatt endring i aktivitet.

9.2. Fotorespirasjon og C₄- og CAM-sporene

fotosyntetiske celler produserer O₂ i de lysdrevne reaksjonene og bruker CO₂ i de lys-uavhengige reaksjonene. I mørket utfører planter også **mitokondriell respirasjon** og **fotorespirasjon**, en kostbar sidereaksjon i fotosyntesen som følger av mangel på spesifisitet hos rubisco.

9.2.1. Fotorespirasjon

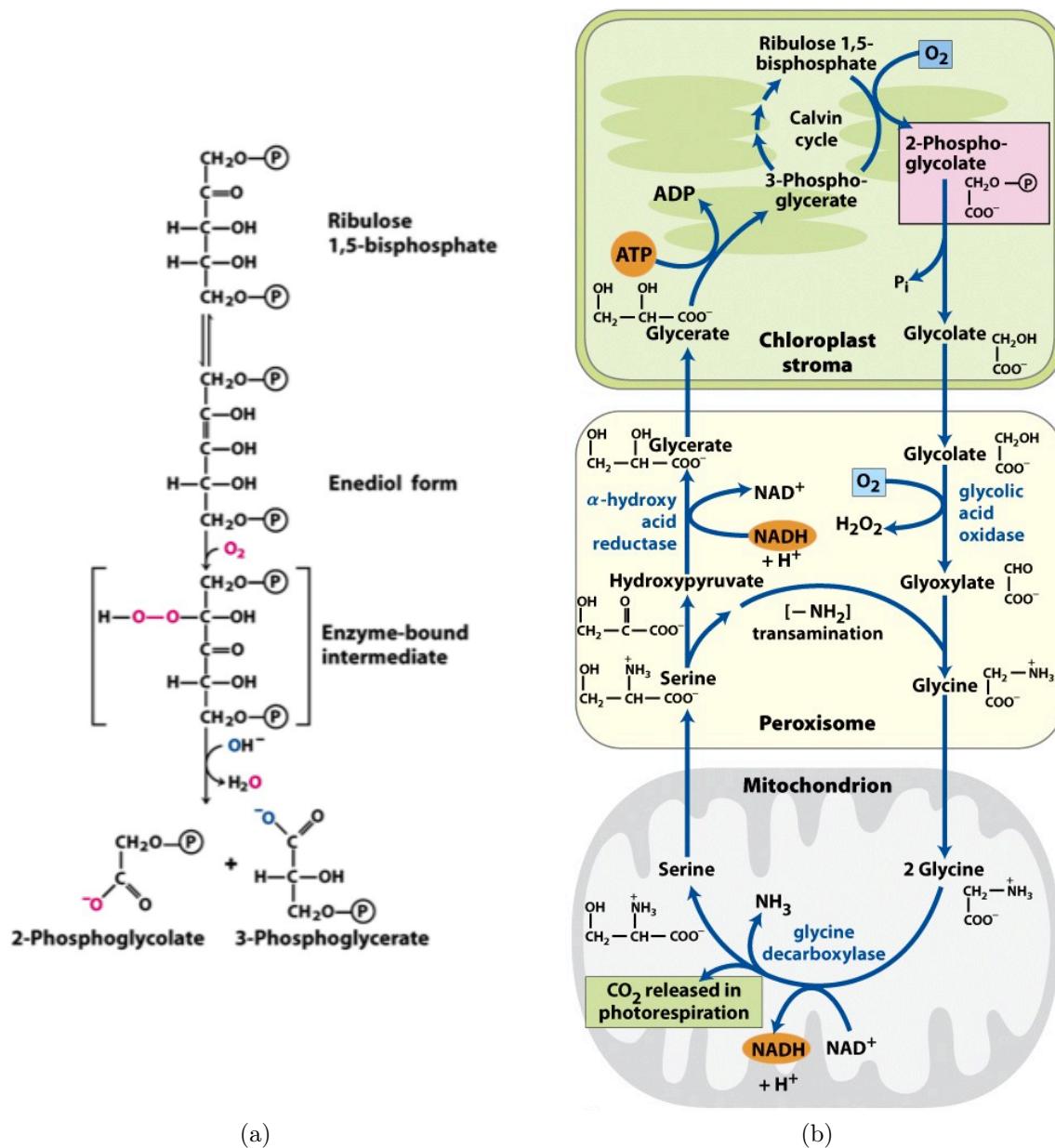
Rubisco er ikke absolutt substratspesifikt for CO₂. O₂ konkurrerer med CO₂ i det aktive setet, noe som fører til at hver tredje eller fjerde reaksjon rubisco katalyserer er en kondensasjonsreaksjon mellom O₂ og ribulose-1,5-bisfosit med dannelse av 3-fosfoglyserat og **2-fosfoglyserat**, et metabolsk unyttig produkt. Reaksjonen med O₂ resulterer ikke i noen netto karbonfiksering og ser ut til å være en belastning for cellen; å redde karbonatomene fra 2-fosfoglyserat er kostbart samtidig som det frigjør tidligere fiksert CO₂.

Løselighetene til O₂ og CO₂ oppfører seg slik at forholdet [O₂]/[CO₂] øker med økende temperatur. I tillegg synker rubiscos affinitet for CO₂ med økende temperatur, slik at tendensen til å utføre den unyttige oksygenase-reaksjonen øker. Etter hvert som CO₂ konsumeres i assimilasjonsreaksjoner, vil forholdet mellom O₂ og CO₂ dessuten øke ytterligere, slik at oksygenasereaksjonen favoriseres i større grad.

Glykolatsporet konverterer to 2-fosfoglyserat-molekyler til ett serin-molekyl og ett CO₂-molekyl. En fosfatase i kloroplasten konverterer 2-fosfoglyserat til glykolat, som deretter eksporteres til peroksisomet. Der oksideres glykolat av molekylært oksygen og det resulterende aldehydet (glyoksylat), transamineres til glycine. Glycine går videre til den mitokondrielle matrixen og undergår der oksidativ dekarboksylering via **glycin dekarboksylase-komplekset**. Resultatet er CO₂ og NH₃ samt reduksjon av NAD⁺ til NADH og overføring av det resterende karbonet fra glycine til kofaktoren tetrahydrofolat. Enkeltkarbonet på tetrahydrofolat overføres deretter til et annet glycine-molekyl og gir serin som konverteres videre til 3-fosfoglyserat via hydroksypyruvat og glycerat. 3-fosfoglyserat fullfører

den lange og kostbare syklusen ved å regenerere ribulose-1,5-bisfosfat.

I sterkt sollys kan fluksen gjennom dette sporet være veldig høy, og mitokondriene inneholder derfor store mengder av glycine dekarboksylase-komplekset. Fotorespirasjon konserverer ikke energi og kan hindre netto dannelse av biomasse med så mye som 50%.

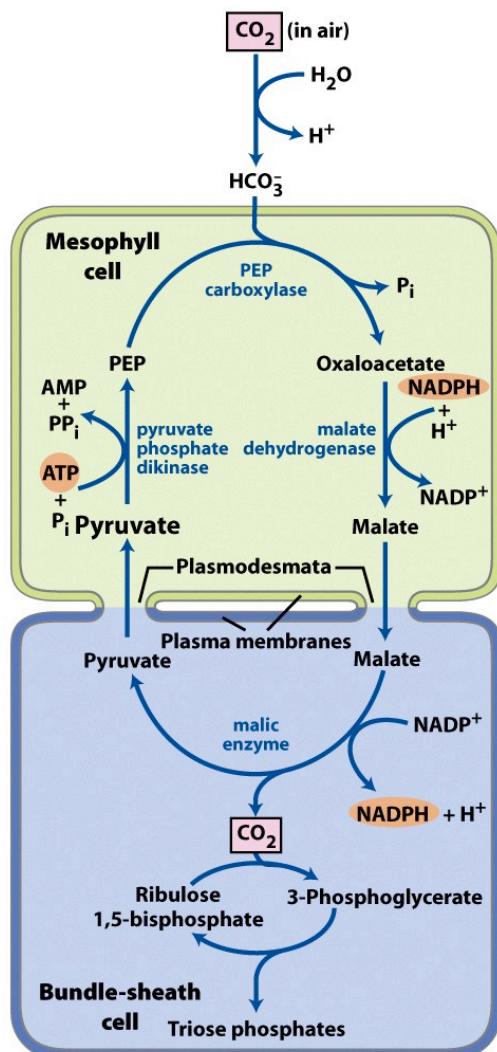


Figur 9.10.: (a) Oksygenaseaktivitet hos rubisco. (b) Glykolatsporet.

9.2.2. Separasjon av CO₂-fiksering og rubisco-aktivitet i C₄-planter

Mange planter som vokser i tropiske strøk har utviklet en mekanisme som omgår problemet med fotorespirasjon. I disse plantene følger fiksering av CO₂ i et trekarbon-produkt etter flere tidligere trinn, blant annet ett hvor CO₂ midlertidig fikses i en firekarbon-forbindelse. Planter som benytter denne prosessen kalles **C₄-planter** og assimileringsprosessen de benytter kalles tilsvarende **C₄-metabolisme** eller **C₄-sporet**. Planters som bruker karbonassimileringssmetoden som beskrevet tidligere, kalles **C₃-planter**.

C₄-planter gror typisk i områder med høy lysintensitet og høye temperaturer og har flere viktige kjennetegn: rask fotosyntese, rask vekst, langsom fotorespirasjon, langsomt vanntap og spesialisert løvstruktur. Fotosyntese i bladene til C₄-planter involverer to celletyper: mesofyller og "bundle-sheat"-celler. Det finnes tre ulike varianter av C₄-metabolisme.



Figur 9.11.: CO₂-assimilering i C₄-planter.

I planter som vokser i tropiske strøk, fikseres CO_2 først i oksaloacetat i en reaksjon katalysert av **fosfoenolpyruvat karboksylase**. Oksaloacetat reduseres deretter enten til malat med forbruk av NADPH eller konverteres til aspartat ved transaminering. Malat eller aspartat som dannes i mesofyllceller sendes deretter videre til bundle-sheat-cellene ved siden av gjennom plasmodesmata, kanaler bygd opp av proteiner som kobler sammen to planteceller. Malat oksideres og karboksyleres der med pyruvat og CO_2 samt NADPH som resultat. I planter som bruker aspartat som CO_2 -bærer, transaminerer aspartat tilbake til oksaloacetat som reduseres til malat. Malat oksideres og CO_2 frigjøres.

Pyruvat som dannes ved dekarboksylering av malat overføres tilbake til mesofyll-cellene, hvor det konverteres til PEP via en uvanlig enzymatisk reaksjon katalysert av **pyruvatfosfat dikinase**. Enzymet kalles dikinase fordi to molekyler fosforyleres samtidig av samme ATP: pyruvat til PEP og fosfat til pyrofosfat. Pyrofosfat hydrolyses til fosfat, slik at to høyenergibindinger i ATP brytes for å regenerere PEP. PEP er nå klar for å ta imot et nytt CO_2 -molekyl fra mesofyllcellen.

9.2.3. Separasjon av CO_2 -fiksering og rubisco-aktivitet i CAM-planter

Sukkulenter som vokser i svært varme og tørre miljøer, benytter en annen variant av fotosyntetisk CO_2 -fiksering. Om natten, når luften er kald og fuktig, åpnes stomata slik at CO_2 kan komme inn og fikseres til oksaloacetat. Oksaloacetat reduseres deretter til malat som lagres i vakuolene. Om dagen lukkes stomata, slik at vann ikke kan komme ut og CO_2 som er fanget i løpet av natten og lagret i form av malat slippes ut. Planter som benytter denne mekanismen kalles **CAM-planter**.

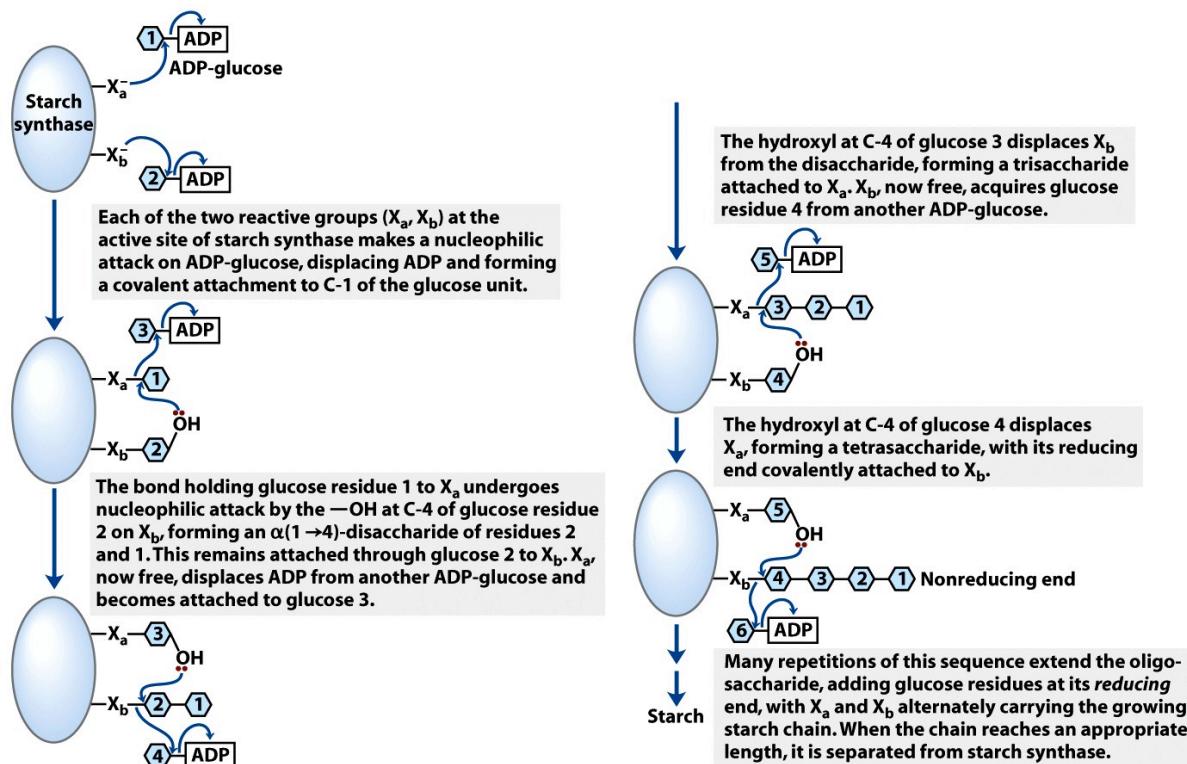
9.3. Biosyntese av stivelse og sukrose

Under aktiv fotosyntese i sterkt sollys, produserer et planteblad mer karbohydrat (i form av triosefosfater) enn det som er nødvendig for generering av energi eller som syntetiske forløpere. Overskuddet konverteres til sukrose og transporteres til andre deler av planten for bruk som brensel eller lagring. Stivelse er den vanligste lagringsformen i de fleste planter.

9.3.1. Syntese av stivelse

Mekanismen for glukoseaktivering ved syntese av stivelse minner om den som benyttes ved glykogensyntese. En aktivert **nukleotidsukker**, i dette tilfellet **ADP-glukose**, dannes ved kondensasjon mellom glukose-1-fosfat og ATP og **stivelse syntase** overfører deretter glukoseresiduen fra ADP-glukose til et allerede eksisterende stivelsemolekyl. Eksperimentelle bevis antyder at stivelse syntase har to ekvivalente aktive seter som bter på å sette inn en glukosylresidue på den reduserende enden av den voksende stivelsekjeden. Denne enden forblir kovalent bundet til enzymet, men veksler mellom de to aktive setene. Festing til det aktive setet aktiverer den reduserende enden i stivelsekjeden for nukleofil

utskifting av enzymet. Nukleofilen er en angripende C-4-OH-gruppe i en glukosylgruppe bundet til det andre aktive setet og resultatet av reaksjonene er stivelsesmolekylets karakteristiske ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-bindinger.



Figur 9.12.: Modell for biosyntese av stivelse.

9.3.2. Syntese av sukrose

Mesteparten av triosefositatene som dannes ved CO₂-fiksering i planter konverteres til sukrose eller stivelse. Sukrose syntetiseres i cytosolen med utgangspunkt i dihydroksyacetonfosfat og glyseraldehyd-3-fosfat eksportert fra kloroplaster. To triosefositater kondenseres til fruktose-1,6-bisfosfat som deretter hydrolyses til fruktose-6-fosfat av fruktose-1,6-bisfosfatase. **Sukrose -6-fosfat syntase** katalyserer deretter reaksjon mellom fruktose-6-fosfat og UDP-glukose til **sukrose-6-fosfat**, før fosfatgruppen til slutt fjernes av **sukrose-6-fosfat fosfatase**. Resultatet er fritt sukrose som er klart for eksport til andre vev.

10. Biosyntese av lipider

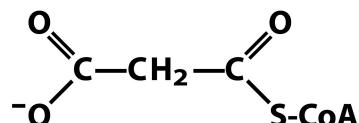
Evne til å syntetisere lipider er avgjørende for alle organismer. I likhet med andre biosyntetiske spor, er reaksjonssekvensene som inngår i lipidsyntese enderгонiske og reduktive. De bruker ATP som kilde til metabolsk energi og en redusert elektronbærer, som regel NADPH, som reduksjonmiddel.

10.1. Biosyntese av fettsyrer

Fettsyreanabolisme følger et annet spor enn fettsyrekatabolisme og de to prosessene finner sted i ulike deler av cellen. Biosyntese krever også et trekarbon-intermediat, **malonyl-CoA**, som ikke inngår i degraderingen av fettsyrer.

10.1.1. Dannelse av malonyl-CoA fra acetyl-CoA og bikarbonat

Dannelsen av malonyl-CoA fra acetyl-CoA er en irreversibel prosess katalysert av **acetyl-CoA karboksylase**. Dette enzymet inneholder en prostetisk biotin-gruppe kovalent bundet til ϵ -aminogruppen i en Lys-residue. Reaksjonen som katalyses går i to trinn: Først overføres en karboksylgruppe fra bikarbonat (HCO_3^-) til biotin i en ATP-avhengig reaksjon. Biotinylgruppen som dannes fungerer som en midlertidig bærer av CO_2 som den overfører til acetyl-CoA i reaksjonens andre trinn med malonyl-CoA som resultat.



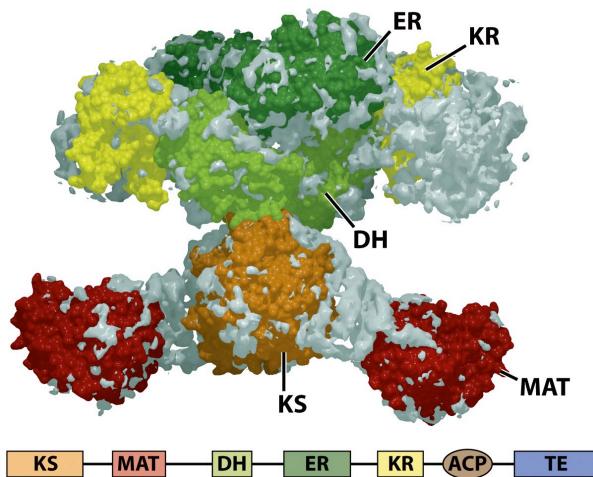
Figur 10.1.: Malonyl-CoA

10.1.2. Fettsyre syntase (FAS)

De lange karbonkjedene i fettsyrer syntetiseres i en syklisk firetrinnssekvens i alle organismer. Denne katalyseses av et system som kollektivt betegnes som **fettsyre syntase**. En mettet acylgruppe som produseres i hver sekvens utgjør substratet for kondensasjon med en aktivert malonylgruppe ved starten av en ny runde. For hver syklus utvides fetacylkjeden med to karbonatomer. Reduksjonsmiddelet i syklusen er NADPH og de to ulike enzymbundne -SH-grupper fungerer som aktiverende grupper.

Det finnes to viktige varianter av fettsyre syntase: fettsyre syntase I (FAS I) som finnes i virveldyr og sopp, og fettsyre syntase II (FAS II), som finnes i planter og bakterier. FAS I

i virveldyr består av én multifunksjonell polypeptidkjede; varianten som finnes i pattedyr er prototypen. Sju aktive seter for ulike reaksjoner ligger i ulike domener og ser ut til å fungere uavhengig av hverandre – enzymet er en homodimer. En noe annerledes FAS I finnes i sopp. Denne består av to multifunksjonelle polypeptider som sammen danner et kompleks med en oppbygning som skiller seg fra den som finnes i pattedyr. Tre av de aktive setene finnes på α -underenheten og fire på β -underenheten.



Figur 10.2.: Strukturen til FAS I i pattedyr.

I FAS I-systemer fører fettsyresyntese til ett enkelt produkt uten frigjøring av intermediater på veien. Produktet forlater syklusen når kjedelengden når 16 karbonatomer (palmitat). Karbonatomene C-16 og C-15 i palmitat kommer fra henholdsvis methyl- og karboksyl-karbonene i acetyl-CoA som brukes til å sette i gang reaksjonen. Resten av karbonatomene kommer fra acetyl-CoA via malonyl-CoA.

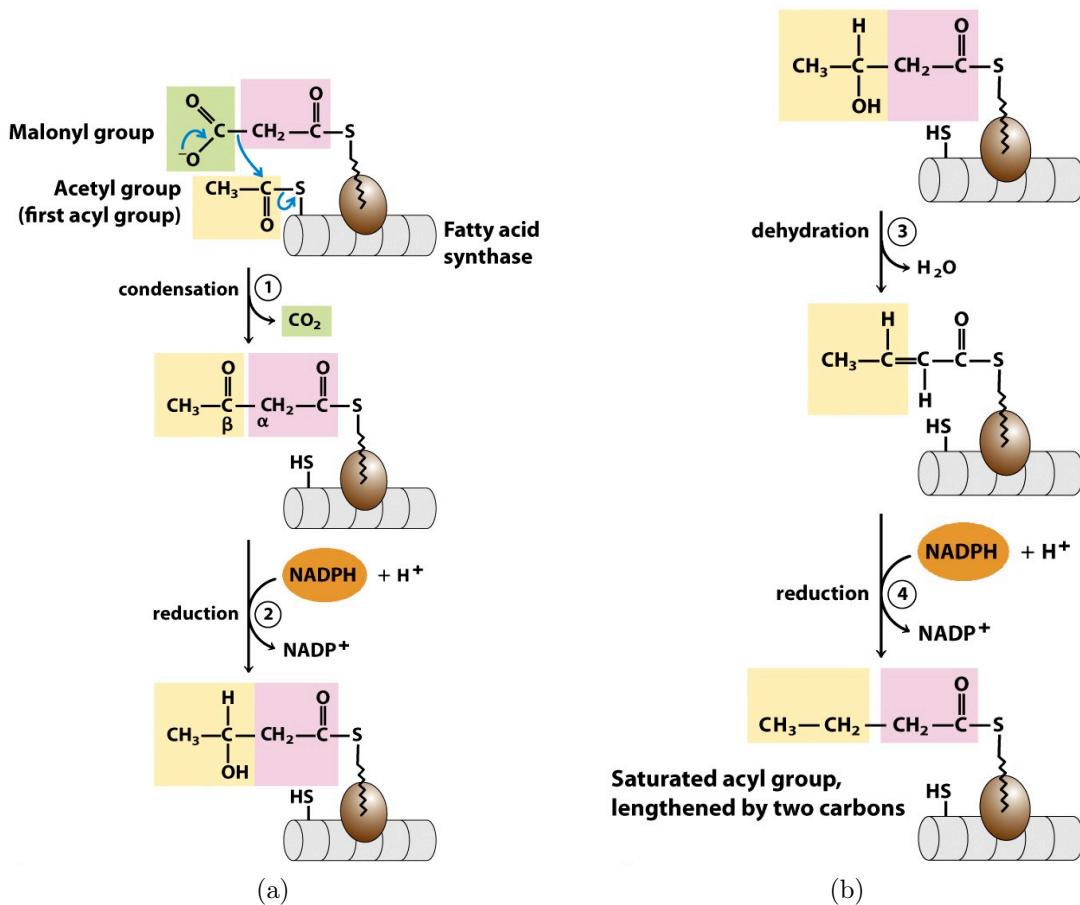
FAS II er et disosiert system; hvert trinn i fettsyresyntesen katalyses av et separat enzym som fritt kan diffundere. Intermediater kan også diffundere og kan gå inn i andre biokjemiske spor. I motsetning til FAS I, genererer FAS II en lang rekke produkter, for eksempel mettede fettsyrer med flere forskjellige lengder.

Domenene i FAS I i pattedyr fungerer som distinkte men sammenkoblede enzymer. Det aktive setet for hvert enzym finnes i et separat domene i polypeptidet. Intermediater forblir kovalent bundet til enzymet som tioestere til én av to tiolgrupper gjennom hele fettsyresyntesen. Den ene tiolgruppen finnes en Cys-residue i det ene domenet, mens den andre tilhører acylbærende protein, et annet domene i samme polypeptid.

Acylbærende protein (ACP) er ansvarlig for å holde hele systemet sammen. I *Escherichia coli* er ACP et lite protein med en prostetisk gruppe, **4'-fosfopantetein**, som antas å fungere som en fleksibel arm. Denne armen holder den voksende fettacyl-kjeden fast til overflaten av FAS-komplekset samtidig som den bærer reaksjonsintermediater fra det ene aktive setet til det neste. ACP i pattedyr har lignende funksjon og samme prostetiske gruppe, men inngår i et domene i et langt større, multifunksjonelt polypeptid.

10.1.3. Reaksjoner i fettsyresyntesen

Før kondensasjonsreaksjonene som bygger opp fettsyrekjeden kan komme i gang, må de to tiolgruppene på enzymkomplekset lades med de riktige acylgruppene. Først overføres acetylgruppen i acetyl-CoA til ACP i en reaksjon katalysert av **malonyl/acetyl-ACP-ACP transferase**, et domene i det multifunksjonelle polypeptidet. Acetylgruppen overføres deretter til en Cys-SH-gruppe i **β -ketoacyl-ACP-syntase**. Den andre reaksjonen, overføringen av malonylgruppen fra malonyl-CoA til tiolgruppen i ACP, katalyseses av samme domene som den første. I det ladde syntase-komplekset er både acetyl- og malonylgruppen aktivert for den kjedeforlengende prosessen.



Figur 10.3.: De fire trinnene i fettsyresyntesen.

① Kondensasjon

Trinn ① er en formell Claisen-kondensasjon hvor **acetoacetyl-ACP** dannes fra de aktiverede gruppene samtidig som et CO_2 -molekyl produseres. Reaksjonen katalyseses av β -ketoacyl-ACP syntase og involverer overføring av acetylgruppen fra Cys-SH-gruppen i enzymet til malonylgruppen på -SH-gruppen i ACP. Acetylgruppen blir dermed den metylterminale tokarbonenheten i den nye acetoacetylgruppen.

Bruken av en aktivert malonylgruppe heller enn en acetylgruppe får kondensasjonsreaksjonen til å bli favorisert termodynamisk. Dekarboksylering av malonylgruppen fasiliterer nukleofilt angrep fra metylenkarbonet på tioesterbindingen mellom acetylgruppen og β -ketoacyl-ACP-syntase, og denne koblingen mellom kondensasjon og dekarboksylering gjør totalprosessen svært eksponensialt.

② Reduksjon av karbonylgruppen

Acetoacetyl-ACP dannet ved kondensasjon undergår reduksjon av karbonylgruppen på C-3 med dannelse av D- β hydroksybutyryl-ACP. Denne reaksjonen katalyseres av β -ketoacyl-ACP-reduktase og benytter NADPH som elektronondonor.

③ Dehydrering

Til sammen ett vannmolekyl fjernes fra C-2 og C-3 i D- β hydroksybutyryl-ACP, noe som gir en dobbeltbinding i produktet ***trans*- Δ^2 -butenoyl-ACP**. Katalyserende enzym er β -hydroksyacyl-ACP dehydratase.

④ Reduksjon av dobbeltbindingen

Dobbeltbindingen i *trans*- Δ^2 -butenoyl-ACP reduseres ved dannelse av **butyryl-ACP** katalysert av **enoyl-ACP reduktase**. Også her er elektronondonor NADPH.

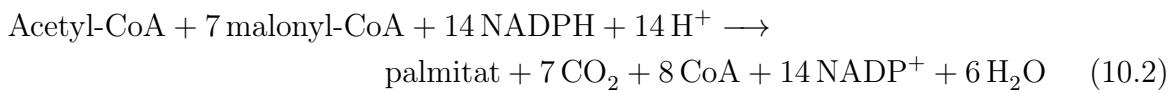
10.1.4. Produktet ved fettsyresyntese er palmitat

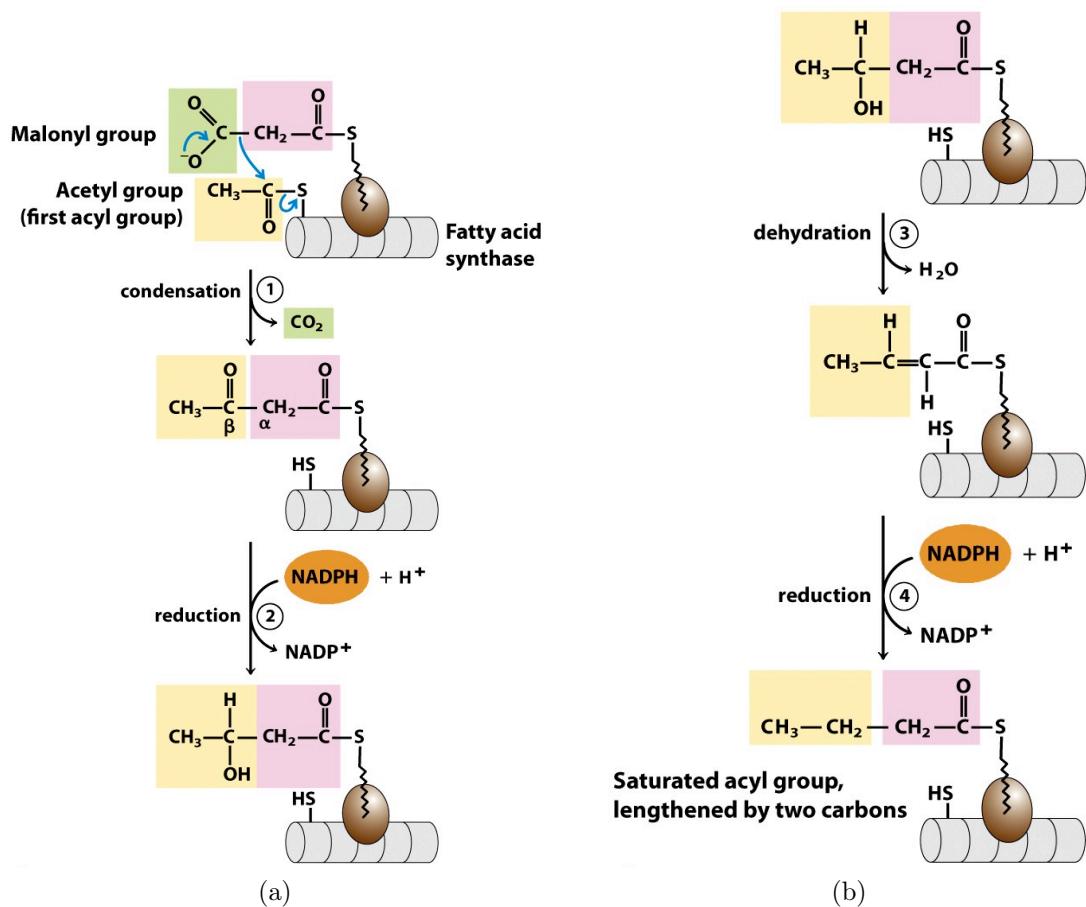
Produksjon av mettet fettacyl-ACP med fire karbonatomer, markerer slutten på første runde gjennom fettsyre syntase-komplekset. Butyrylgruppen overføres videre fra $-SH$ -gruppen i fosfopantetein til $-SH$ -gruppen i β -ketoacyl-ACP syntase, som opprinnelig bar acetylgruppen. For start av neste firreaksjons-syklus, festes en ny malonylgruppe til den nå ledige $-SH$ -gruppen på fosfopanteteingruppen i ACP. Kondensasjon skjer når butyrylgruppen, på samme måte som acetylgruppen i første syklus, kobles til de to karbonatomene i malonyl-ACP-gruppen med avgivelse av karboksylgruppen som CO_2 . Kondensasjonsproduktet er en seksskarbon-acylgruppe, kovalent bundet til $-SH$ -gruppen i fosfopantetein β -ketogrupper til denne acylgruppen reduseres i de neste tre trinnene i syntasesyklusen slik at resultatet ved endt syklus blir en mettet seksskarbon-acetylgruppe.

Sju sykluser med kondensasjon og reduksjon gir en mettet palmitoylgruppe med 16-karbonatomer, fortsatt bundet til ACP. Elongeringen stopper som regel ved dette punktet og fritt palmitat slippes ut til omgivelsene ved hydrolyse av tioesterbindingen som binder det til enzymet. Totalreaksjonen for syntesen kan ses på som todelt. Først dannes sju malonyl-CoA-molekyler:



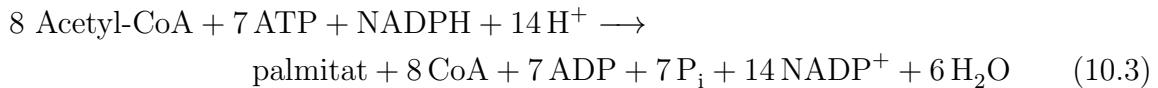
Deretter følger sju sykluser med kondensasjon og reduksjon:





Figur 10.4.: Trinn i biosyntese av fettsyrer.

Merk at bare 6 H₂O-molekyler produseres, ettersom ett brukes til å hydrolyser tioesterbindingen mellom palmitat og fettsyre syntase. Totalligningen for prosessen blir dermed:

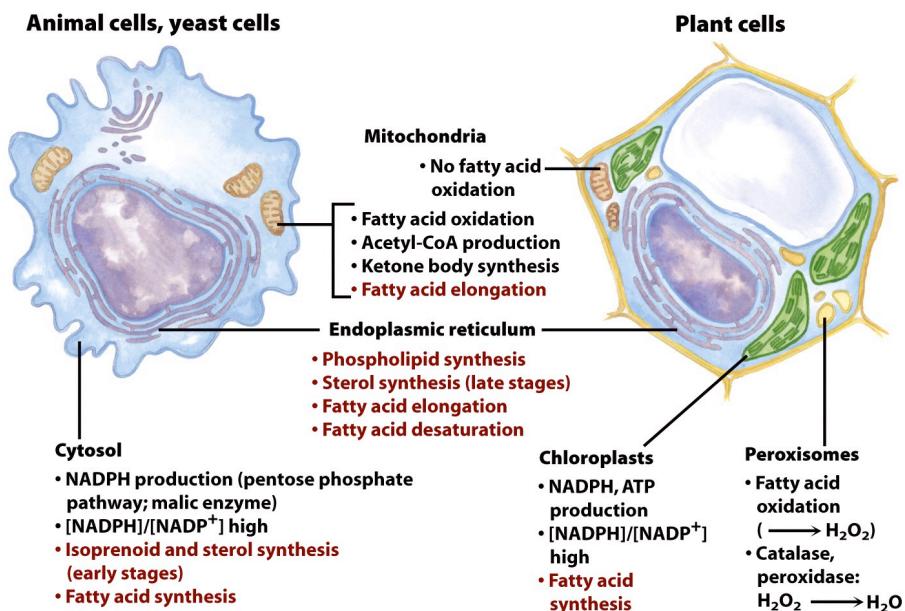


Biosyntesen av fettsyrer som palmitat krever altså acetyl-CoA samt tilførsel av to typer kjemisk energi: gruppeoverføringspotensialet fra ATP og den reduserende evnen til NADPH. ATP kreves for festing av CO₂ til acetyl-CoA ved dannelsen av malonyl-CoA; NADPH kreves for reduksjon av dobbeltbindinger.

I ikke-fotosyntetiske eukaryoter er energikostnaden ved fettsyresyntese noe større, ettersom acetyl-CoA dannes i mitokondriene og må transporteres til cytosolen. Dette ekstra trinnet krever to ekstra ATP-molekyler per acetyl-CoA som transporteres.

10.1.5. Fettsyresyntese skjer i cytosolen eller i kloroplaster

Fettsyre syntase-komplekset finnes utelukkende i cytosolen hos de fleste høyere eukaryoter, i likhet med de biosyntetiske enzymene for nukleotider, aminosyrer og glukose. Dette segregerer syntetiske prosesser fra degradende reaksjoner, som helst skjer i matrix i mitokondriene; de elektronbærende kofaktorene som inngår i anabolisme er skilt fra de som inngår i katablisme på samme vis.



Figur 10.5.: Subcellulær plassering av lipidmetabolisme i dyre- og planteceller.

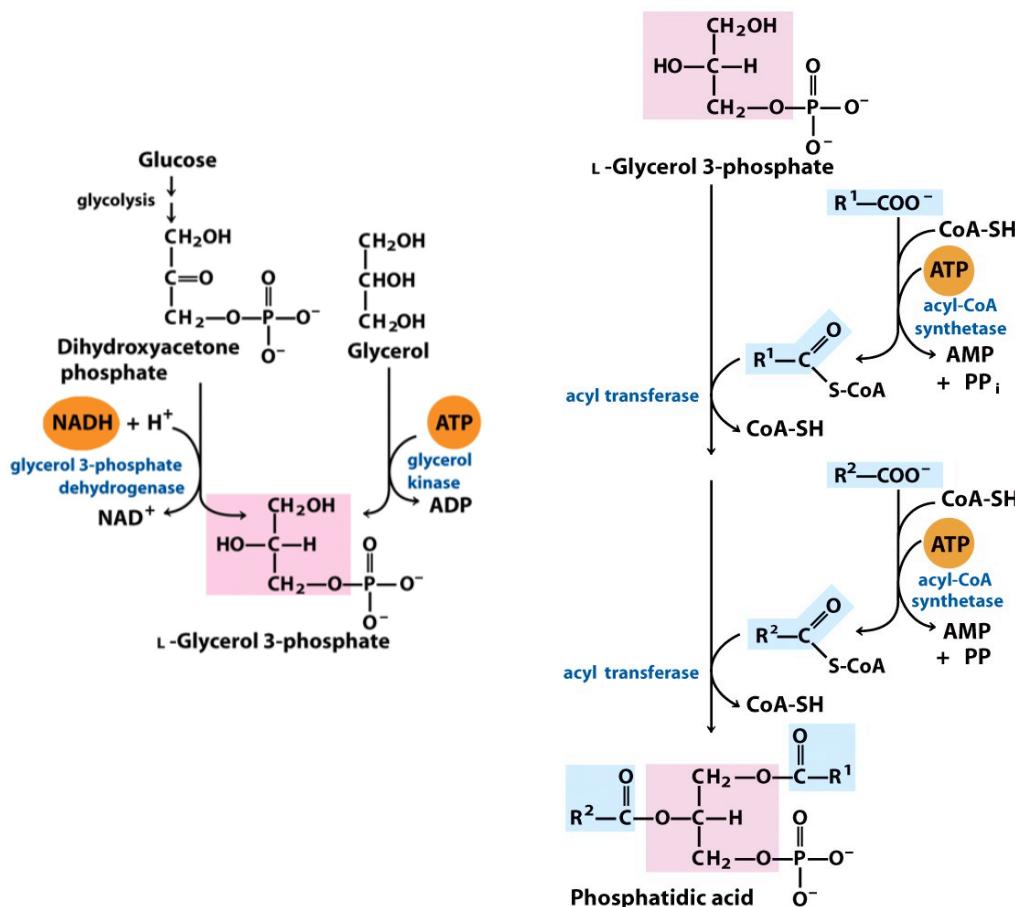
NADPH er vanligste elektronbærer for anabolske reaksjoner, mens NAD⁺ som regel inngår i katabolske reaksjoner. I hepatocytter, er forholdet [NADPH]/[NADP⁺] i cytosolen svært høyt, noe som gir et sterkt reduserende miljø fr syntese av fettsyrer og andre biomolekyler. Det cytosoliske [NADH]/[NAD⁺]-forholdet er mye lavere, noe som sørger

for at den NAD^+ -avhenige glukosekatabolismen kan foregå parallelt med fettsyresyntese. Forholdet $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ er langt høyere i mitokondriene enn i cytosolen, som følge av elektronflytt til NAD^+ fra oksidative prosesser, og dette favoriserer reduksjon av O_2 via elektrontransportkjeden.

I fotosyntetiske planteceller skjer fettsyresyntese i stroma i kloroplaster, ikke i cytosolen. Dette gir mening, da NADPH produseres i kloroplaster av lysreaksjonene i fotosyntesen.

10.2. Biosyntese av triacylglyseroler

De fleste fettsyrer som syntetiseres eller inntas av en organisme møter én av to skjebner: inkorporering i triacylglyseroler for energilagring eller inkorporering i fosfolipidkomponentene i membraner. Fordelingen mellom disse to alternativene avhenger av organismens behov. Triacylglyseroler har det høyeste energiinnholdet av alle lagrede næringsstoffer. Når det inntas flere karbohydrater enn det organismen er i stand til å lagre som glykogen, konverteres overskuddet til triacylglyseroler som lagres i fettvev.

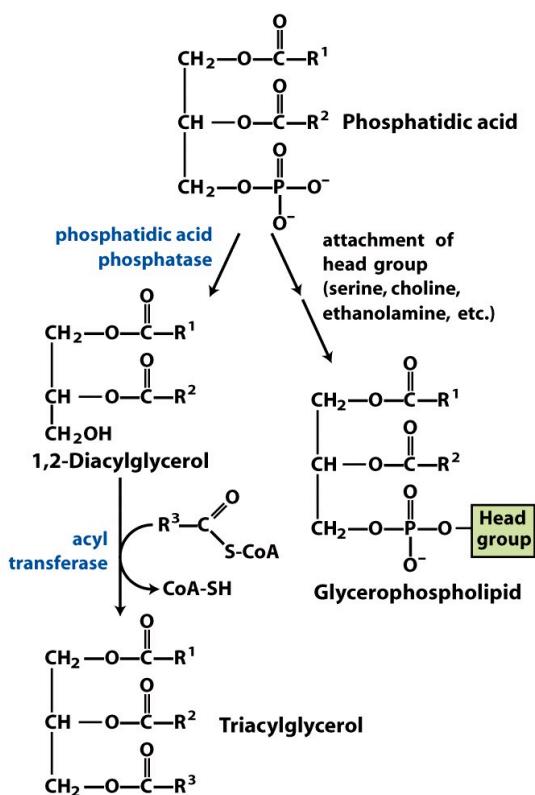


Figur 10.6.: Biosyntese av fosfatidinsyre.

I dyrevev, deler triacylglyseroler og glyserofosfolipider to forløpere, fettacyl-CoA og

L-glyserol-3-fosfat, og flere biosyntetiske trinn. Størsteparten av alt glyserol-3-fosfat utvinnes fra det glykolytiske intermediatet dihydroksyacetonfosfat via det cytosolisk, NAD-koblede enzymet **glycerol-3-fosfat dehydrogenase**. I lever og nyrer, dannes også noe glyserol-3-fosfat fra glyserol katalysert av **glycerol kinase**. De andre forløperne for triacylglyceroler er ulike variater av fettacyl-CoA, dannet fra fettsyrer av **acyl-CoA syntetaser**, de samme enzymene som er ansvarlige for aktivering av fettsyrer ved β -oksidasjon.

Det første trinnet i biosyntesen av triacylglyceroler er acylering av de to frie hydroksylgruppene i L-glyserol-3-fosfat av to fettacyl-CoA-molekyler. Resultatet er **diacylglycerol-3-fosfat**, eller **fosfatidinsyre**. Denne forbindelsen finnes bare i små mengder i celler, men er et sentralt intermediat i biosyntesen av lipider; den kan konverteres enten til en triacylglycerol eller til et glyserofosfolipid. Ved konvertering til en triacylglycerol, hydrolyses fosfatidinsyre av **fosfatidinsyre fosfatase** til en 1,2-diacylglycerol som videre konverteres til en triacylglycerol ved transesterifisering med en tredje fettacyl-CoA.



Figur 10.7.: Forgreningspunkt i biosyntesen av en triacylglycerol. Intermediatet fosfatidinsyre kan konverteres enten til en triacylglycerol eller til et glyserofosfolipid