

SEMINÁRNÍ PRÁCE Z BIOLOGIE

CESTA GLUKÓZY

Glykolýza, tvorba glycogenu a citrátový cyklus.

JAN ŠPAČEK
septima A

WICHTERLOVO GYMNÁZIUM, 2013/2014

Obsah

1	Úvod	3
2	Monosacharidy	4
3	Glykolýza	7
3.1	Přehled	7
3.2	Hexokináza	7
3.3	Glukózafosfátisomeráza	7
3.4	Fosfofruktokináza	8
3.5	Aldoláza	8
3.6	Triosafosfátizomeráza	10
3.7	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa	10
3.8	Fosfoglycerátkináza	11
3.9	Fosfoglycerátmutáza	11
3.10	Enoláza	13
3.11	Pyruvátkináza	15
4	Mléčné kvašení	19
4.1	Laktátdehydrogenáza	19
5	Metabolismus glykogenu	20
5.1	Rozklad glykogenu	20
6	Citrátový cyklus	23
6.1	Přehled	23
6.2	Komplex pyruvátdehydrogenázy	23
6.3	Citrátsyntháza	24
6.4	Akonitáza	24
6.5	Isocitrátdehydrogenáza	25
6.6	2-Oxoglutarátdehydrogenáza	26
6.7	Sukcinyl-CoA-syntetáza	26
6.8	Sukcinátdehydrogenáza	26
6.9	Fumaráza	27
6.10	Malátdehydrogenáza	27

1 Úvod

V této práci jsou nastíněny mechanismy dvou základních metabolických drah, glykolýzy a citrátového cyklu. Glykolýza je asi nejlépe prozkoumanou drahou a je společná téměř všem organismům na Zemi, pro které je hlavním zdrojem energie. Citrátový cyklus pak probíhá v mitochondriích a některých bakteriích a kromě důležité funkce anabolické (meziprodukty cyklu jsou prekurzory mnoha základních stavebních látek) rovněž oxiduje produkt glykolýzy pyruvát a umožňuje tak velmi efektivně využít veškerou energii z rozložené glukózy.

Nejprve v sekci 2 představíme monosacharidy a jejich možné formy, abychom v sekci 3 mohli sledovat cestu monosacharidu glukózy během celé metabolické cesty glykolýzy. Poté v sekci 4 zjistíme, co se s rozloženou glukózou (pyruvátem) stane v anaerobním organismu či při nedostatku kyslíku, když dochází k mléčnému kvašení a pyruvát je přeměňován na laktát.

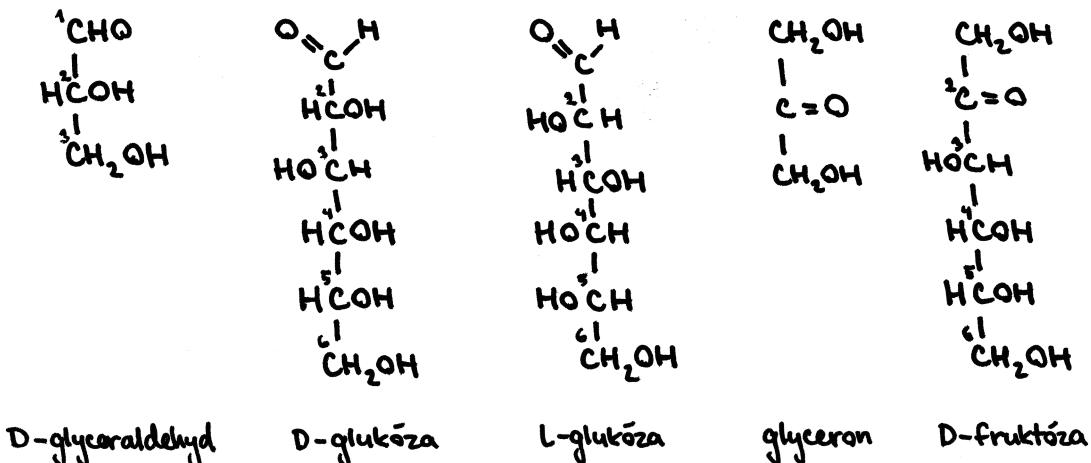
Následně v sekci 5 poohlídeme strukturu glycogenu, zásobní látky živočichů, a nastíníme mechanismus jeho odbourávání. Po této malé odbočce se vrátíme zpět k pyruvátu, který je při aerobních podmírkách oxidován v citrátovém cyklu, který bude představen v sekci 6.

Jelikož při popisu metabolických drah potřebujeme spoustu biochemie, je text doprovázen množstvím obrázků, ilustrujících popsané reakce. Čtenář bude muset omluvit autora, který zlomil hůl nad moderní technikou a místo použití sofistikovaných počítačových programů na tvorbu vzorců raději všechny obrázky kreslil tenkým fixem na kancelářský papír (přesněji na 22 kancelářských papírů).

Na závěr úvodu necht je čtenář předem upozorněn na značný prohřešek proti správné skladbě slohové práce, kterým je absence jakéhokoli závěru, který by měl následovat po úvodu a statí. Práce totiž – jak je snad u seminární práce tolerovatelné – nepřináší žádné nové poznatky, pouze předkládá již známé poznatky, syntetizované během studia. Na závěr tedy nezbývá než odkázat se na literaturu, které tato práce tvoří pouhý chabý stín.

2 Monosacharidy

Monoacharidy jsou deriváty alkoholů s navázanou oxoskupinou (aldehydovou nebo ketonovou), které mají v řetězci alespoň tři atomy uhlíku. Pokud je oxoskupina navázána na koncový uhlík, a tvoří tedy aldehydickou skupinu, je sacharid označován jako aldóza, pokud tvoří keton, označíme jej jako ketózu. Podle délky řetězce pak hovoříme o trióze, tetróze, pentóze, hexóze či heptóze.



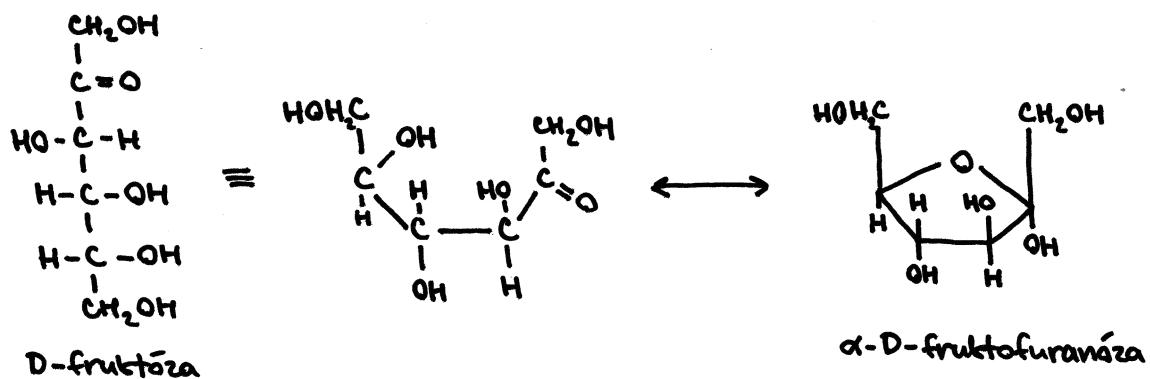
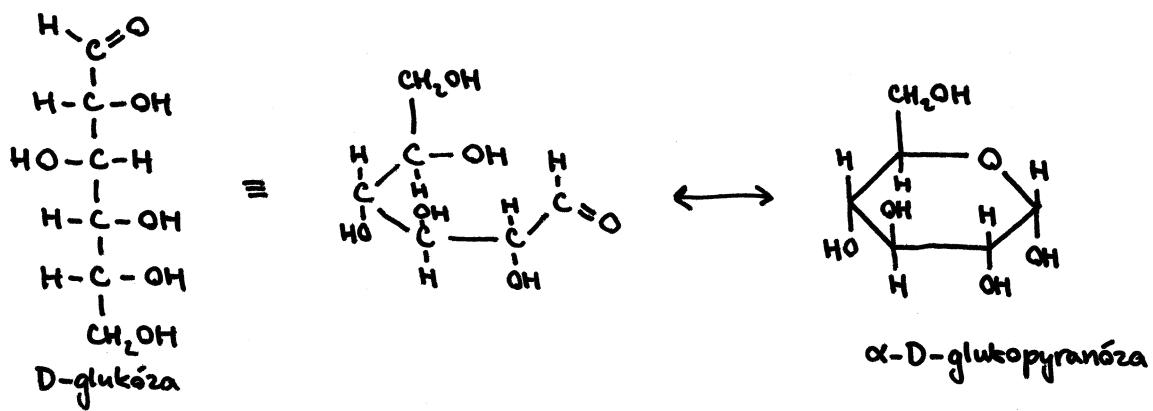
Obrázek 1: Příklady monosacharidů: D-glyceraldehyd (aldotrióza), D-glukóza (aldohevízóza), L-glukóza, glyceron (ketotrióza) a D-fruktóza (ketohexóza), se zaznačeným číslováním uhlíků.

Jelikož všechny vnitřní uhlíky řetězce jsou chirální, mají sacharidy velké množství stereoizomerů. Například D-glukóza (viz obrázek 1), jediná aldóza, která se běžně vyskytuje v přírodě, je jednou z 16 možných hexoaldóz. Podle konfigurace chirálního uhlíku nejvzdálenějšího od oxoskupiny je sacharid označen jako D-sacharid či L-sacharid (Fischerovo pravidlo).

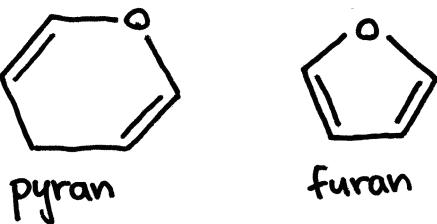
Oxoskupina je velmi reaktivní, takže při dostatečné délce řetězce může dojít k adici na hydroxylovou skupinu téže molekuly (obrázek 2), címž se vytvoří cyklus uzavřený atomem kyslíku. Monosacharidy s cykly o šesti atomech se označují jako pyranózy podle heterocyklu pyranu (viz obrázek 3), a obdobně cykly z pěti atomů jako furanózy podle molekuly furanu.

Vytvořením cyklu vznikne nové centrum asymetrie na prvním uhlíku (v místě původní oxoskupiny). Tyto dvě možné formy označujeme jako anomery a rozlišujeme písmeny řecké abecedy. V α -anomerech je skupina OH na anomerním uhlíku umístěna opačným směrem než skupina CH_2OH navázaná na chirálním centru určujícím konfiguraci D či L, v β -anomerech jsou pak tyto skupiny umístěny stejným směrem (obrázek 4). Tyto anomery se mohou konvertovat z jednoho na druhý přes lineární formu sacharidu.

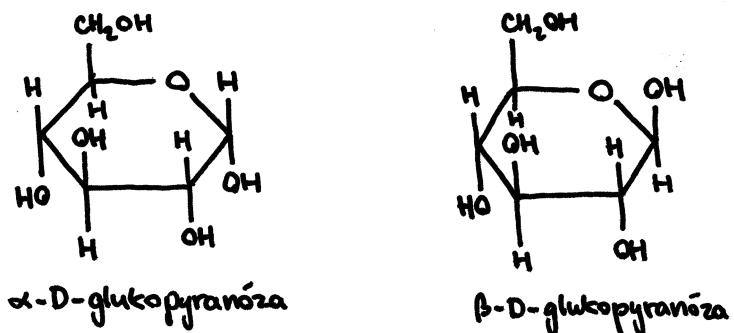
Pro znázornění cyklických forem sacharidů se nejčastěji využívají Haworthovy projekční vzorce, ve kterých je kruh zakreslen v jedné rovině. Ve skutečnosti jsou uhlíky kruhu v hybridizaci sp^3 , takže tvoří vaničkovou či židličkovou konformaci, podobně jako cyklohexan (obrázek 5).



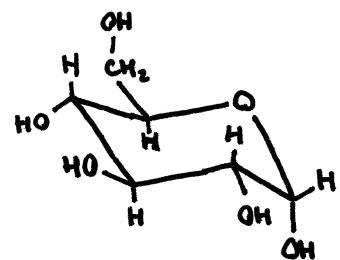
Obrázek 2: Reakce D-glukózy a D-fruktózy za vzniku α -D-glukopyranózy a α -D-fruktofuranózy.



Obrázek 3: Cyklické formy monosacharidů jsou označovány jako pyranózy či furanózy podle pyranu a furanu, nejjednodušších sloučenin obsahujících takovýto kruh.



Obrázek 4: Dva anomery cyklické formy D-glukózy: α -D-glukopyranóza a β -D-glukopyranóza.



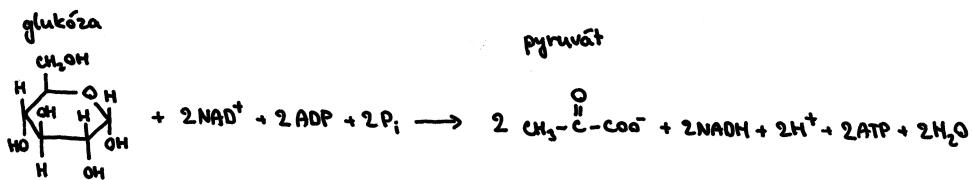
Obrázek 5: Židličková konformace α -D-glukózy.

3 Glykolýza

Glykolýza je metabolický proces, při kterém je glukóza převáděna na pyruvát za vzniku 2 molekul ATP (obrázek 8). U většiny organismů je tímto procesem kryta velká část potřebné energie. Glykolýza slouží rovněž jako předstupeň k další oxidaci pyruvátu v mitochondriích až na oxid uhličitý a vodu s celkovým ziskem 38 ATP.

3.1 Přehled

Souhrnná rovnice glykolýzy je uvedena ve schématu 6. Glukóza do buněk vstupuje většinou specifickým přenášečem, který ji transportuje z okolí buňky do cytosolu, kde se nachází volné glykolytické enzymy. Těchto enzymů je celkem 10 a katalyzují jednotlivé reakce, jejichž přehled nalezneme na obrázku 9.



Obrázek 6: Souhrnná rovnice glykolýzy.

Glykolýzu můžeme rozdělit na dvě fáze. V první přípravné fázi je glukóza fosforylována a rozštěpena na dvě molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu, na což jsou spotřebovány dvě molekuly ATP. Glyceraldehyd-3-fosfát je následně přeměněn na pyruvát za zisku dvou molekul ATP, takže celkový zisk glykolýzy jsou 2 moly ATP na 1 mol glukózy.

Oxidačním činidlem při glykolýze je NAD^+ (obrázek 7). Vznikající NADH tak musí být neustále reoxidován, což se děje jedním ze tří způsobů:

- NADH může být oxidován pyruvátem, který se redukuje na laktát. Tento anaerobní proces, známý jako mléčné kvašení, probíhá ve svalech při námaze. Vznikající laktát je krví přenášen do jater, kde je opět přeměněn na glukózu.
- Některé organismy, například kvasinky, při anaerobních podmínkách dekarboxylují pyruvát na acetaldehyd, který je poté užitím NADH redukován na ethanol.
- Při dostatku kyslíku je NADH oxidován v mitochondriích za vzniku dalších 3 molekul ATP.

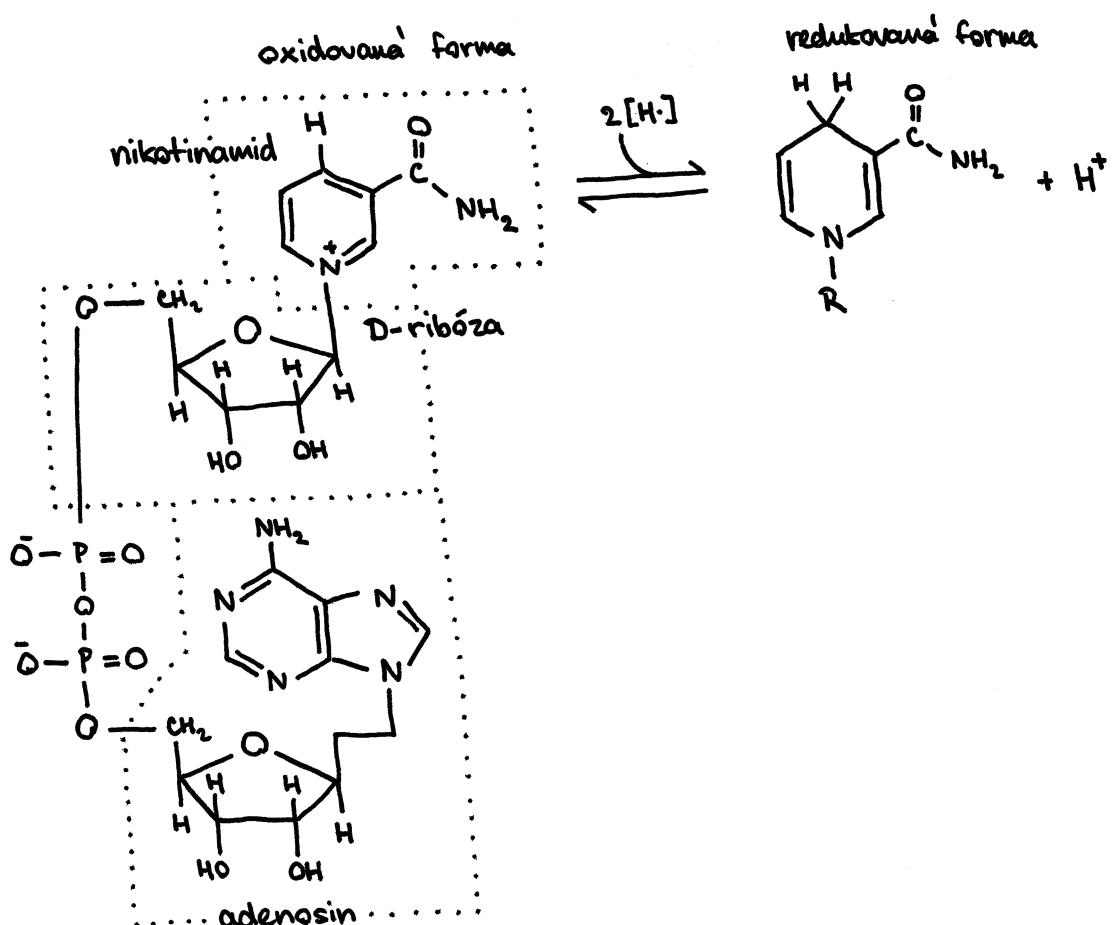
3.2 Hexokináza

První reakcí je fosforylace glukózy hexokinázou za vzniku glukóza-6-fosfátu. Na enzym se naváže glukóza a komplex ATP a hořecnatého iontu. Tento kationt odstínuje záporný náboj fosfátové skupiny, čímž umožní nukleofilní atak hydroxylové skupiny na třetí fosfát molekuly ATP (viz obrázek 11).

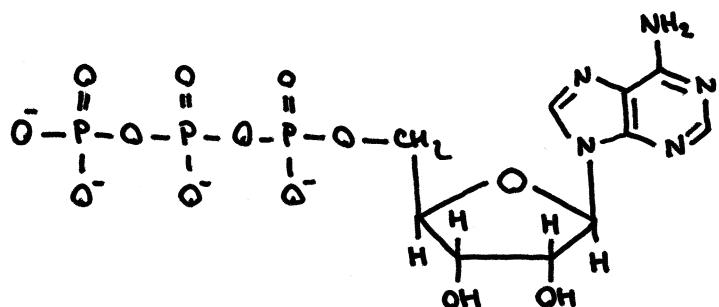
Hexokinasa katalyzuje přenos fosfátu z ATP na glukózu, ale zároveň zabraňuje přenosu fosfátu z ATP na molekulu vody, čímž by byla jeho energie ztracena. Toho je dosaženo prostorovým uspořádáním enzymu, který se po navázání glukózy sevře, čímž jednak přesune ATP do těsné blízkosti patřičné hydroxylové skupiny a zároveň z aktivního místa vytlačí vodu, která tak ATP nemůže hydrolyzovat.

3.3 Glukózafosfátisomeráza

Druhým krokem glykolýzy je konverze glukóza-6-fosfátu na fruktóza-6-fosfát katalyzovaná glukózafosfátisomerázou. Kruh glukóza-6-fosfátu musí být nejprve otevřen, poté dojde k izomeraci a kruh se následně uzavře, čímž se zkrátí o jeden uhlík. Tento mechanismus je naznačen na obrázku 13.



Obrázek 7: Struktura a redukce/oxidace nikotinamidadeninnukleotidu, sloužícího jako přenašeč elektronů (oxidovaná forma NAD^+ , redukovaná NADH).



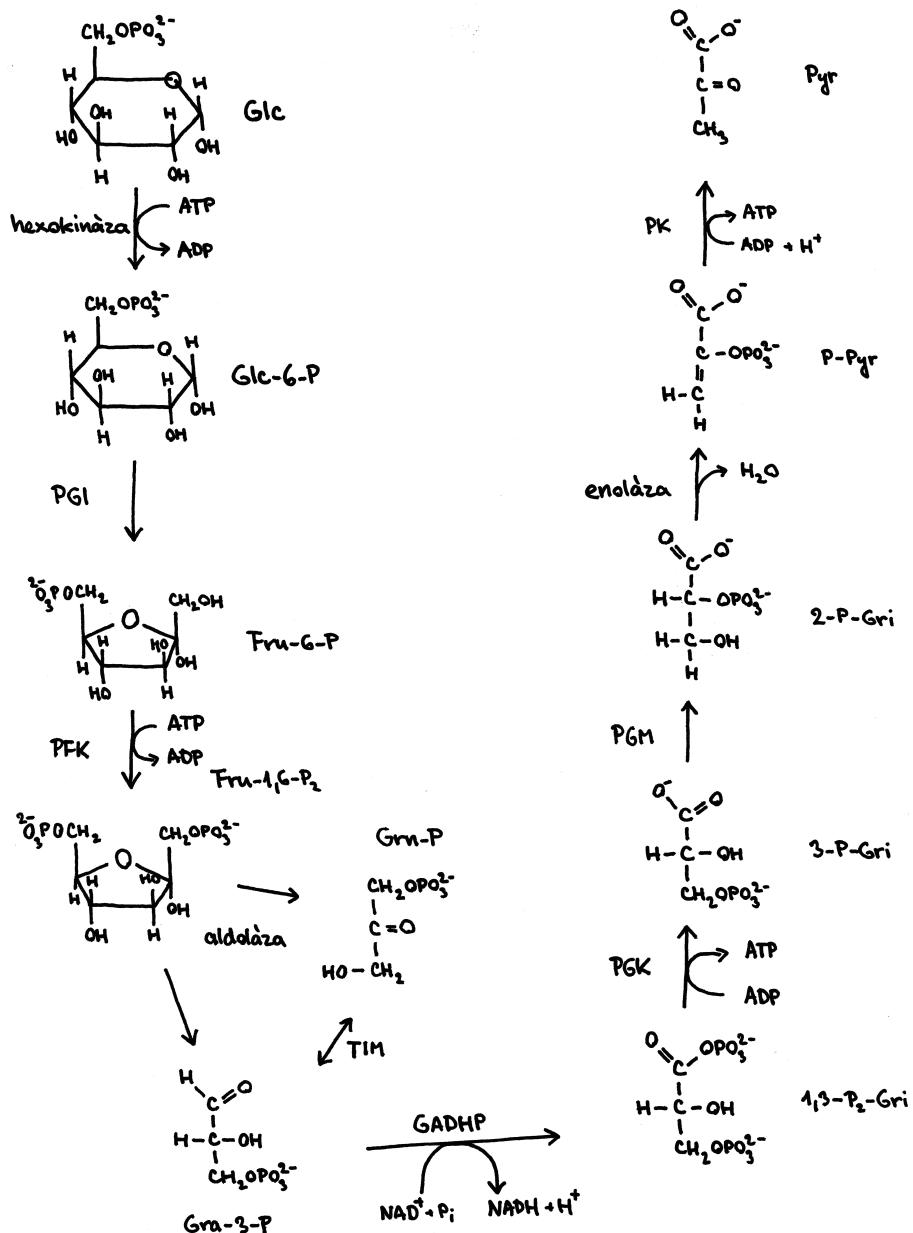
Obrázek 8: Struktura adenosintrifosfátu (ATP), sloužícího jako univerzální přenašeč energie v buňce.

3.4 Fosfofruktokináza

Ve třetím kroku dochází k další fosforylacii fruktóza-6-fosfátu na fruktóza-1,6-bisfosfát za spotřeby druhé molekuly ATP účinkem enzymu fosfofruktokinázy. Tato reakce je obdobou prvního kroku – opět dochází k nukleofilnímu ataku na fosfát, tentokrát ale z hydroxylové skupiny na uhlíku na pozici 1.

3.5 Aldoláza

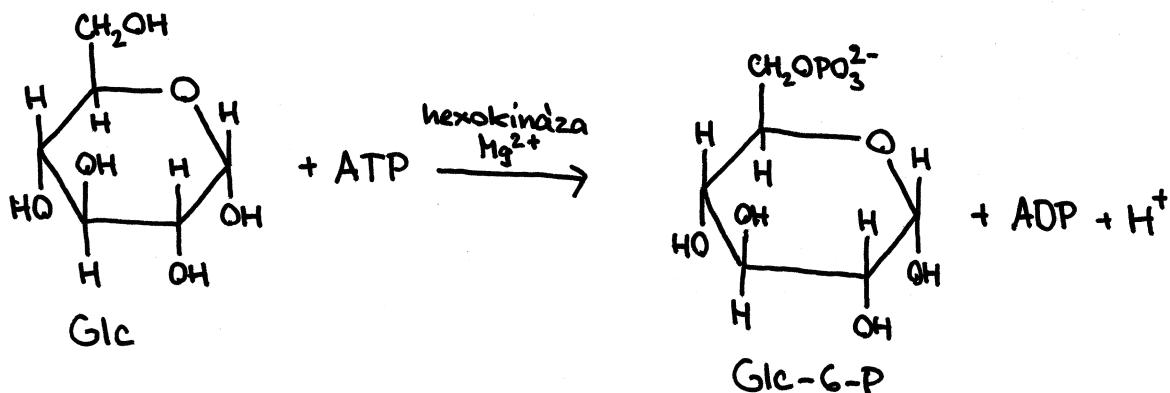
Čtvrtý enzym aldoláza rozštěpí fruktóza-1,6-bisfosfát na glyceraldehyd-3-fosfát a glyceronfosfát. Tato reakce se označuje jako aldolové štěpení a její mechanismus je na obrázku 17. Tento



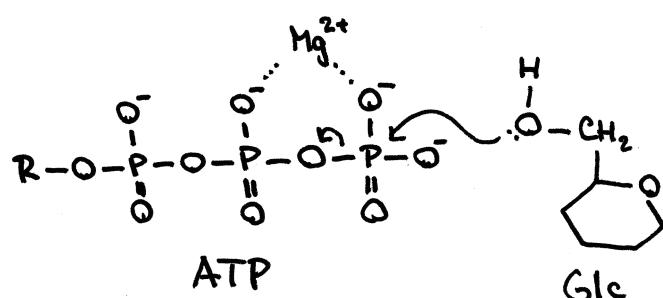
Obrázek 9: Jednotlivé kroky glykolytické dráhy. Enzymy jsou po řadě hexokináza, glukózafosfátizomeráza (PGI), fosfofruktokináza (PFK), aldoláza, triosafosfátizomeráza (TIM), glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GADHP), fosfoglycerátkináza (PGK), fosfoglycerátmutáza (PGM), enoláza a pyruvátkináza (PK). Meziprodukty jsou glukóza (Glc), glukóza-6-fosfát (Glc-6-P), fruktóza-6-fosfát (Fru-6-P), fruktóza-1,6-bisfosfát (Fru-1,6-P₂), glyceronfosfát (Gri-P), glyceraldehyd-3-fosfát (Gra-3-P), 1,3-bisfosfoglycerát (1,3-P₂-Gri), 3-fosfoglycerát (3-P-Gri), 2-fosfoglycerát (2-P-Gri), fosfoenolpyruvát (P-Pyr) a pyruvát (Pyr).

mechanismus je důvod, proč dochází k předchozí izomeraci glukóza-6-fosfátu na fruktóza-6-fosfát, jelikož aldolovým štěpením glukóza-6-fosfátu by vznikly dva řetězce s různou délkou, což by bylo nevhodné v dalších krocích glykolýzy.

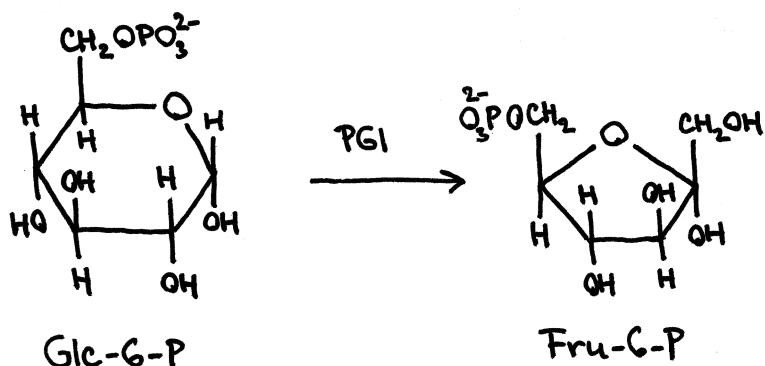
Kromě aldoláz třídy I, která je zde popsána, existuje rovněž aldoláza třídy II, která je ovšem funkčně ekvivalentní. Živočichové, rostliny a zelené řasy obvykle disponují aldolázou I. třídy, zatímco houby a prokaryoty mají aldolázu třídy II. Mnoho organismů ovšem produkuje aldolázy obou tříd, což naznačuje, že se tyto třídy vyvinuly současně a k eliminaci jedné z nich došlo u některých organismů druhotně.



Obrázek 10: Fosforylace glukózy (Glc) na glukóza-6-fosfát (Glc-6-P) enzymem hexokinázou.



Obrázek 11: Nukleofilní atak hydroxylové skupiny z glukózy na fosfátovou skupinu ATP.



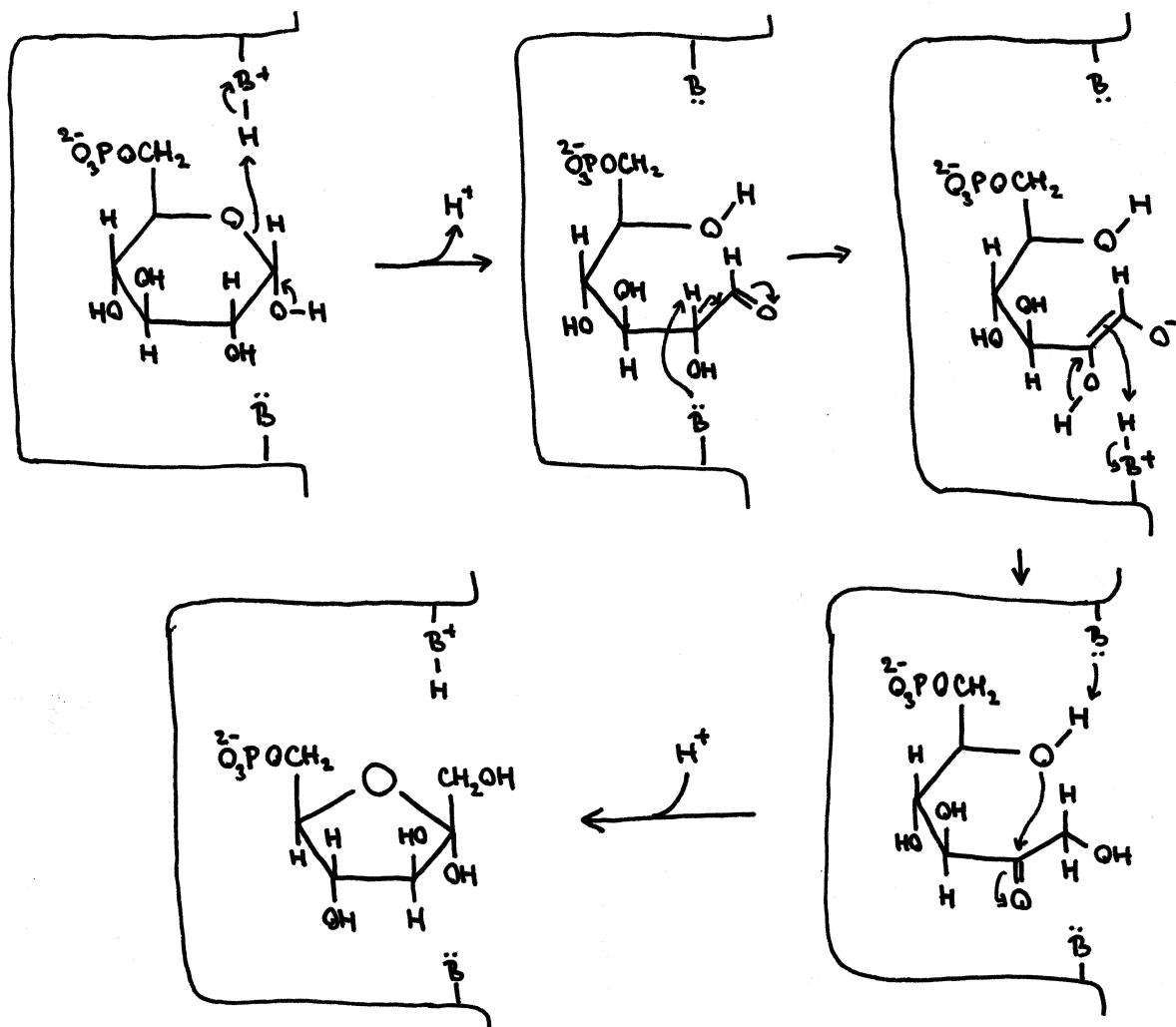
Obrázek 12: Izomerace glukóza-6-fosfátu (Glc-6-P) na fruktóza-6-fosfát (Fru-6-P) katalyzovaná glukózafosfátizomerázou (PGI).

3.6 Triosafosfátizomeráza

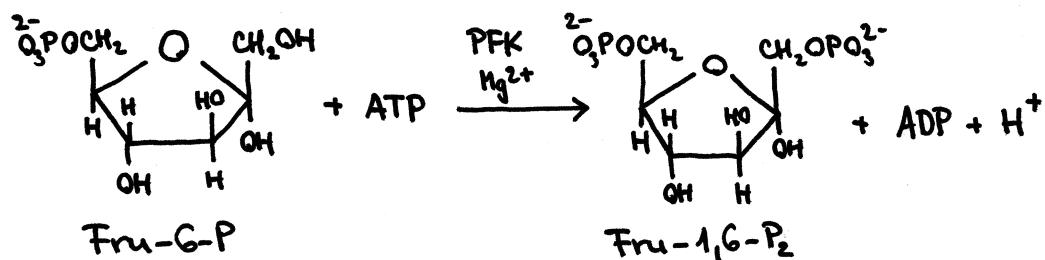
Glyceronfosfát je enzymem triosafosfátizomerázou konvertován na glyceraldehyd-3-fosfát, který je zpracováván v dalších krocích. Tato reakce probíhá v obou směrech, přičemž poměr koncentrací glyceronfosfátu a glyceraldehyd-3-fosfátu je udržován na hodnotě přibližně 20:1.

3.7 Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

Glyceraldehyd-3-fosfát je v dalším kroku oxidován redukcí NAD^+ na NADH , což umožňuje syntézu 1,3-bisfosfoglycerátu, makroergické sloučeniny, jejíž hydrolýzou uvolněná energie bude upotřebena k syntéze ATP (obrázek 20).



Obrázek 13: Enzymový mechanismus glukózafosfátisomerázy. BH^+ a B' jsou s největší pravděpodobností lysin a histidin (viz obrázek 15).



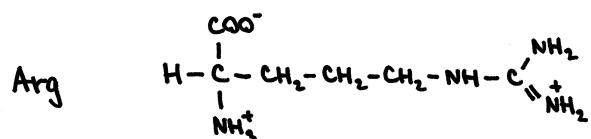
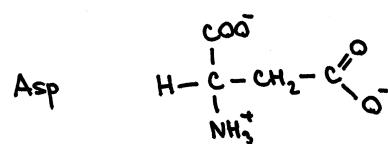
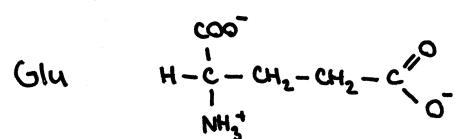
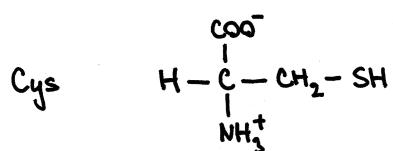
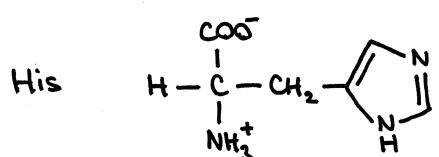
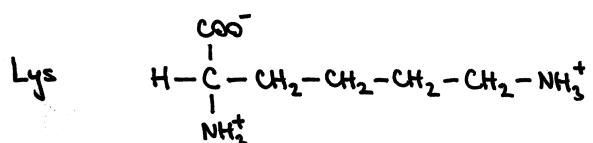
Obrázek 14: Fosforylace fruktóza-6-fosfátu (Fru-6-P) na fruktóza-1,6-bisfosfát (Fru-1,6-P₂) enzymem fosfofruktokinázou (PFK).

3.8 Fosfoglycerátkináza

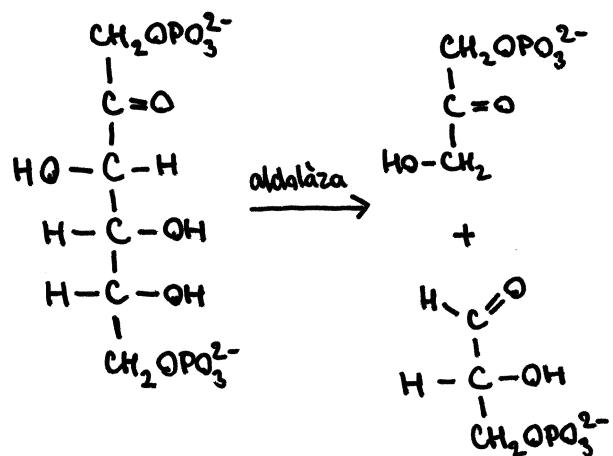
První ATP je uvolněno při reakci katalyzované fosfoglycerátkinázou, při které z 1,3-bisfosfoglycerátu vzniká 3-fosfoglycerát. Tento enzym má funkci podobnou hexokináze (schéma na obrázku 22).

3.9 Fosfoglycerátmutáza

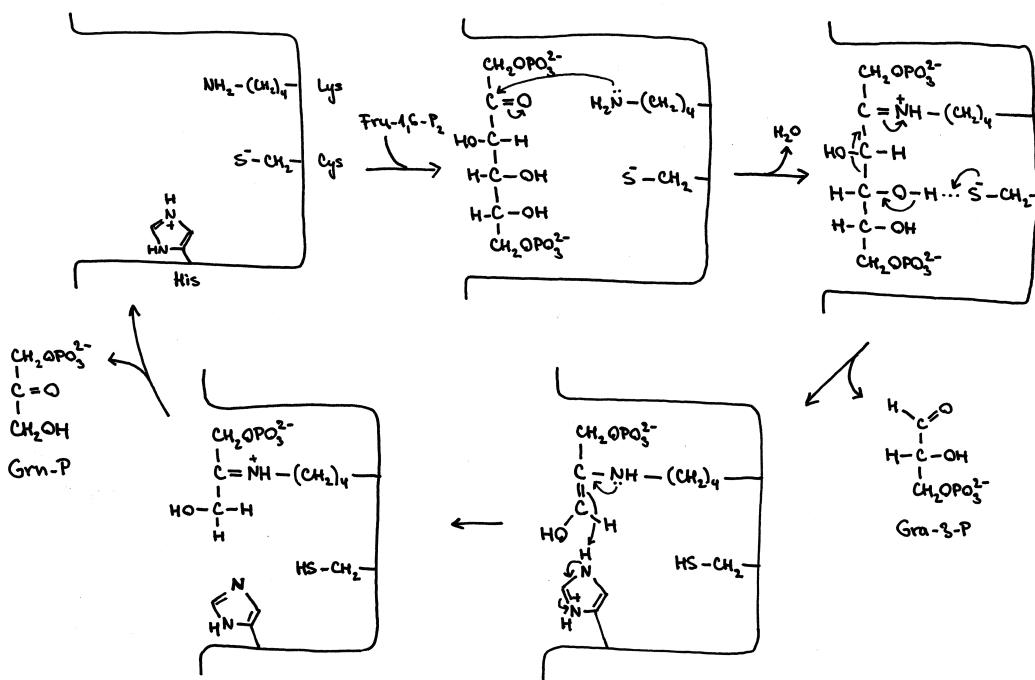
Pro další pokračování glykolýzy je nezbytné přesunout fosfátovou skupinu na druhý uhlík v řetězci fosfoglycerátu. Tuto reakci katalyzuje enzym fosfoglycerátmutáza, na kterou je v aktivní formě navázaná fosfátová skupina. Tato skupina je přenesena na 3-fosfoglycerát za vzniku intermediáту,



Obrázek 15: Aminokyseliny lysin (Lys), histidin (His), cystein (Cys), kyselina glutamová (Glu), arginin (Arg) a kyselina asparagová (Asp).



Obrázek 16: Štěpení fruktóza-1,6-bisfosfátu (Fru-1,6-P₂) na glyceraldehyd-3-fosfát (Gra-3-P) a glyceronfosfát (Grn-P) katalyzované aldolázou.

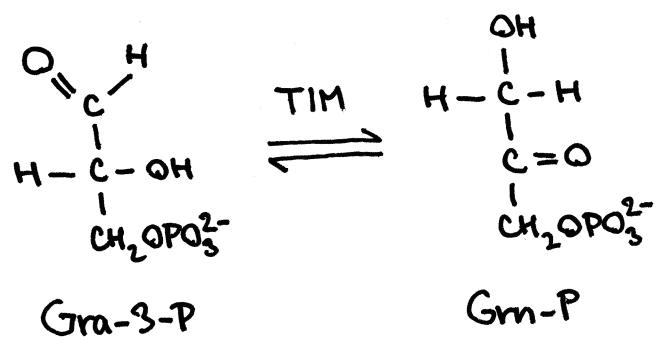


Obrázek 17: Mechanismus štěpení fruktóza-1,6-bisfosfátu aldolázou třídy I. Znázorněné zbytky aminokyselin lysinu, cysteinu a histidinu (obrázek 15) se nachází v aktivním místě enzymu.

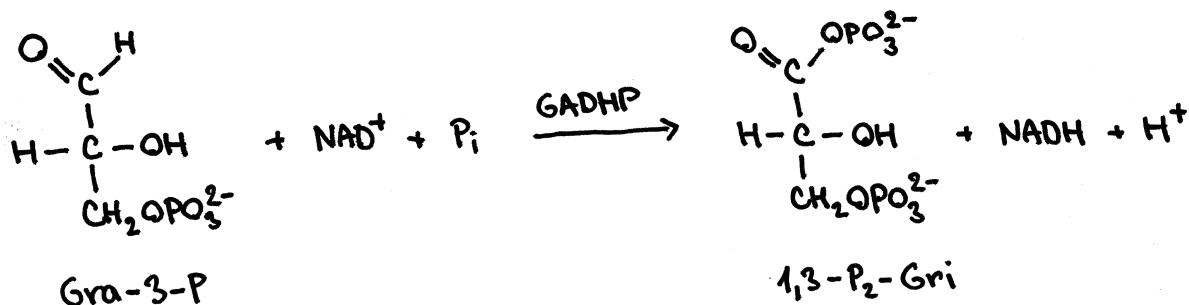
2,3-bisfosfoglycerátu, který posléze refosforyluje enzym a vznikne 2-fosfoglycerát. Intermediát může z fosfoglycerátmutázy disociovat, což způsobí deaktivaci enzymu. Proto musí být stále k dispozici stopová množství 2,3-bisfosfoglycerátu, aby bylo možno enzym regenerovat.

3.10 Enoláza

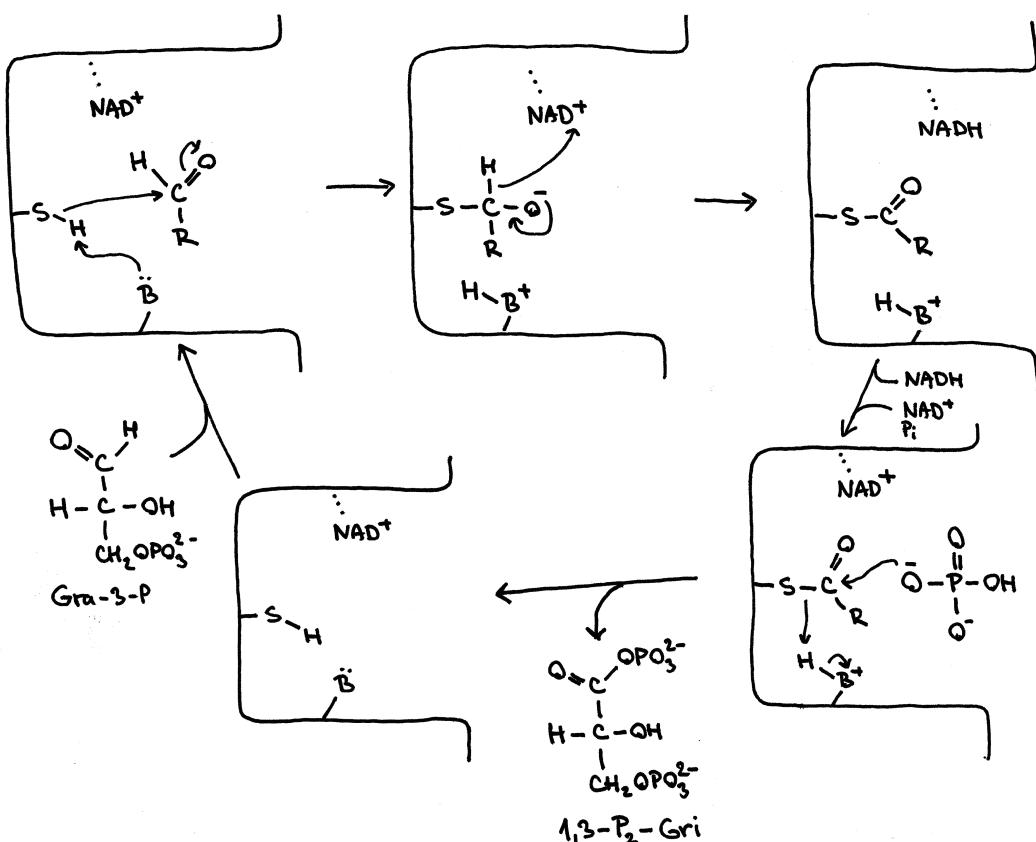
2-fosfoglycerát je v předposledním kroku glykolýzy enzymem enolázou dehydratován na fosfoenolpyruvát. Pro průběh této reakce (obrázek 26) jsou důležité hořečnaté ionty, které se nachází v aktivním místě enzymu. Tyto kationty se koordinují se zápornou hydroxylovou skupinou 2-fosfoglycerátu, což pomáhá rozložit záporný náboj na řetězci poté, co lysin v enoláze naváže proton z uhlíku na druhé pozici. Následuje eliminace hydroxylové skupiny ve formě vody, čímž je fosfoenolpyruvát vytvořen.



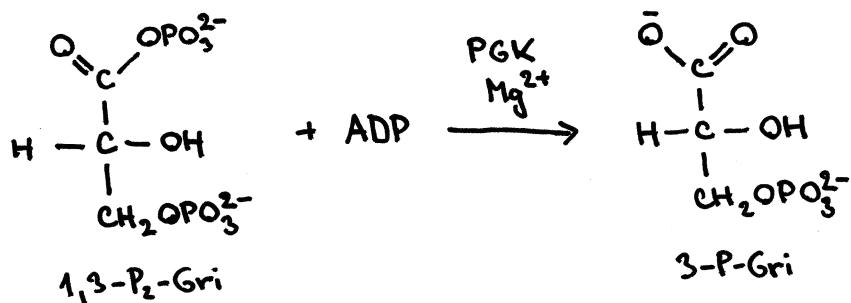
Obrázek 18: Konverze glyceronfosfátu (Grn-P) a glyceraldehyd-3-fosfátu (Gra-3-P) katalyzovaná triosafosfátizomerázou (TIM).



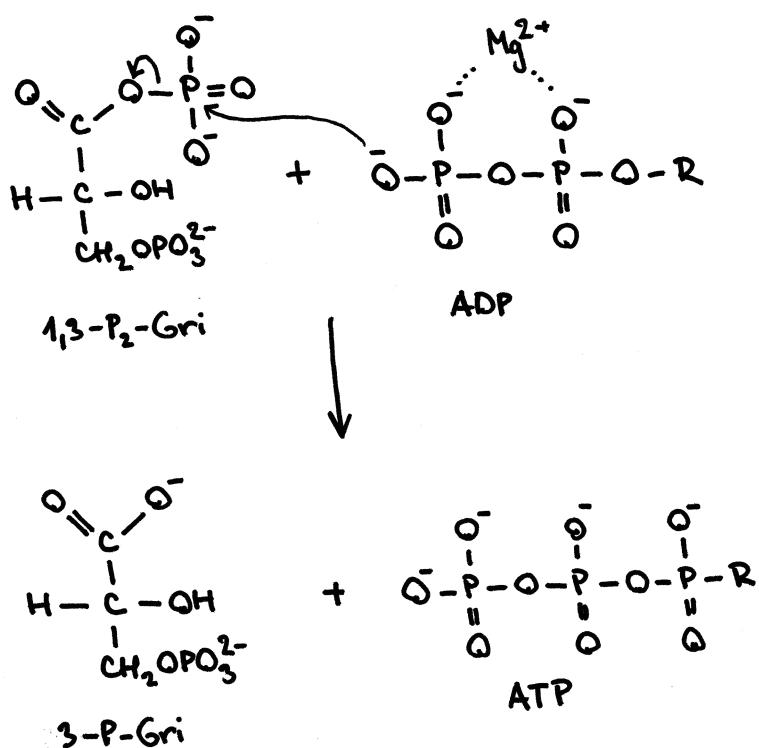
Obrázek 19: Oxidace a fosforylace glyceraldehyd-3-fosfát (Gra-3-P) na 1,3-bisfosfoglycerát (1,3-P₂-Gri) katalyzovaná glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasou (GADHP).



Obrázek 20: Enzymový mechanismus glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy.



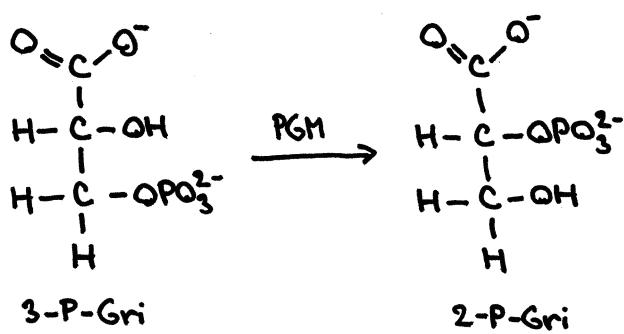
Obrázek 21: Defosforylace 1,3-bisfosfoglycerátu (1,3-P₂-Gri) na 3-fosfoglycerát (3-P-Gri) katalyzovaná fosfoglycerátkinázou (PGK).



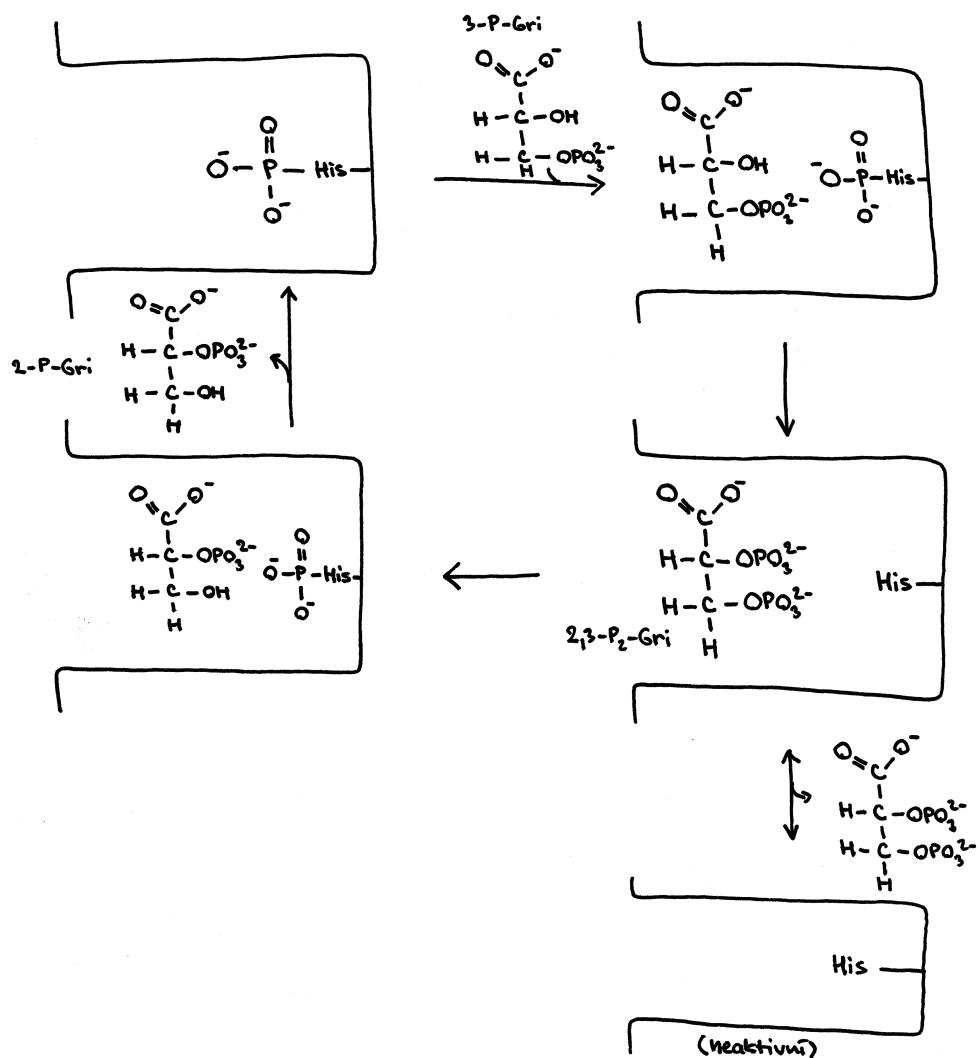
Obrázek 22: Schéma funkce enzymu fosfoglycerátkinázy. Pozice hořečnatého kationtu je pouze přibližná.

3.11 Pyruvátkináza

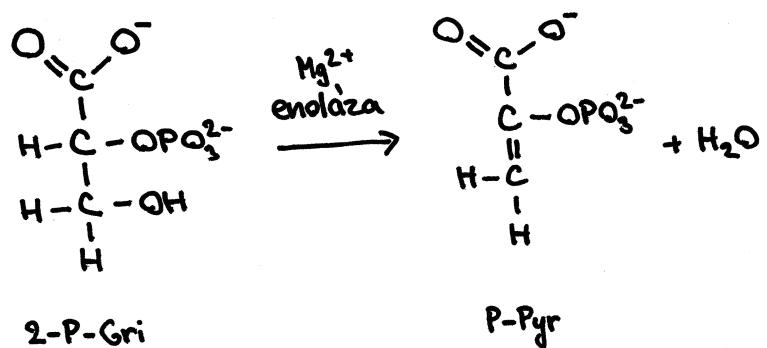
Poslední reakcí glykolýzy je přenos fosfátové skupiny z fosfoenolpyruvátu na ADP, čímž vznikne pyruvát a molekula ATP. Pro průběh reakce (obrázek 28) jsou opět důležité hořečnaté ionty, které umožní kyslíku z fosfátové skupiny ADP nukleofilně napadnout atom fosforu z fosfoenolpyruvátu. Vzniklý enolpyruvát je keto-enol tautomerací přeměněn na pyruvát. Tato tautomerace je dostatečně exergonická k tomu, aby poháněla endergonickou syntézu ATP.



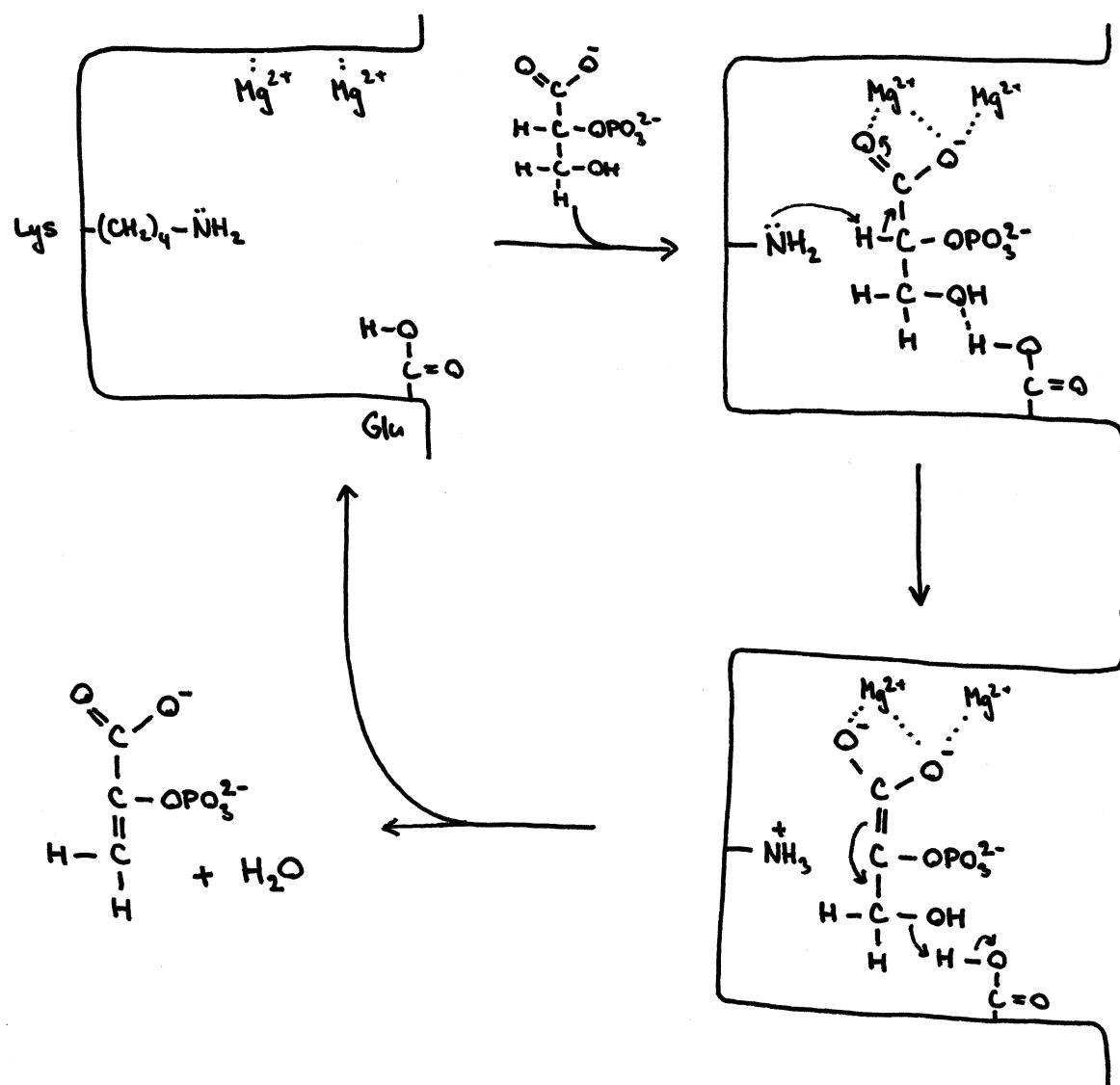
Obrázek 23: Přenos fosfátové skupiny z pozice 3 na pozici 2 ve fosfoglycerátu (Gri) katalyzovaný fosfoglycerátmutázou.



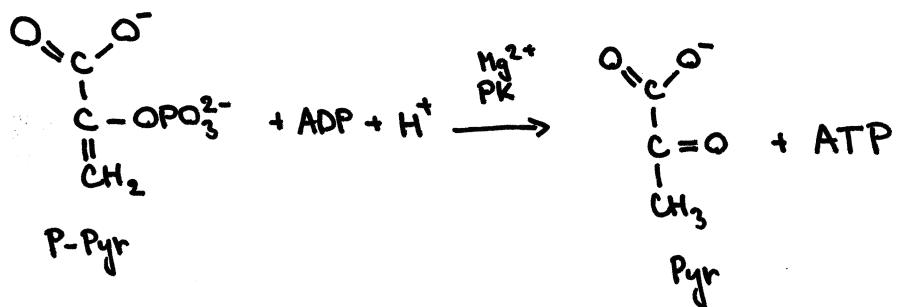
Obrázek 24: Průběh konverze 3-fosfoglycerátu (3-P-Gri) na 2-fosfoglycerát (2-P-Gri) přes 2,3-bisfosfoglycerát (2,3-P₂-Gri), katalyzované fosfoglycerátmutázou.



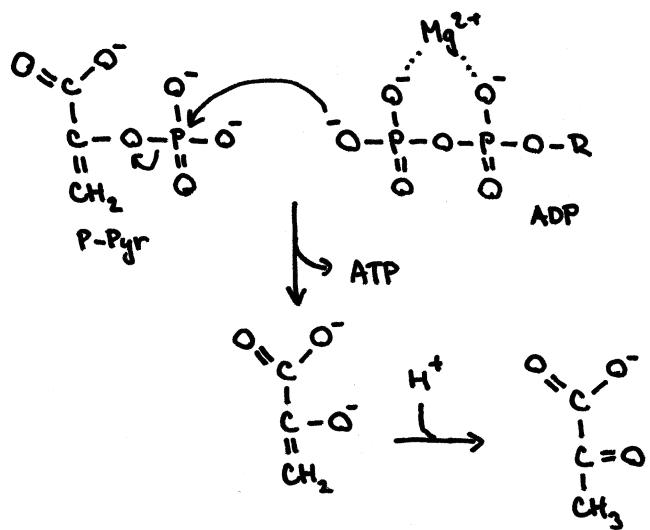
Obrázek 25: Dehydrace 2-fosfoglycerátu (2-P-Gri) na fosfoenolpyruvát (P-Pyr) katalyzovaná enolázou.



Obrázek 26: Enzymový mechanismus enolázy.



Obrázek 27: Syntéza ATP z fosfoenolpyruvátu (P-Pyr) za vzniku pyruvátu (Pyr) katalyzovaná pyruvátkinázou.



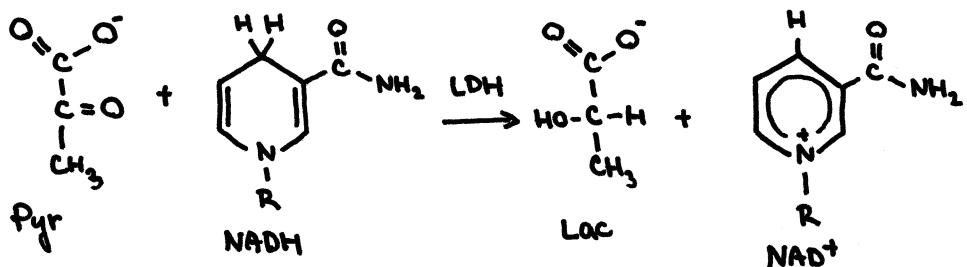
Obrázek 28: Mechanismus reakce pyruvátkinázy. Defosforylací fosfoenolpyruvátu vzniká enolpyruvát, který je následně přeměně na svou keto-formu pyruvát.

4 Mléčné kvašení

Při glykolýze vzniká NADH, který je potřeba reoxidovat zpět na NAD^+ . Při dostatku kyslíku je v aerobních organismech NADH transportován do mitochondrií, kde je oxidován se ziskem ATP. U anaerobních organismů nebo při větší zátěži je ovšem NADH oxidován vznikajícím pyruvátem na laktát, nebo, například u kvasinek, na ethanol.

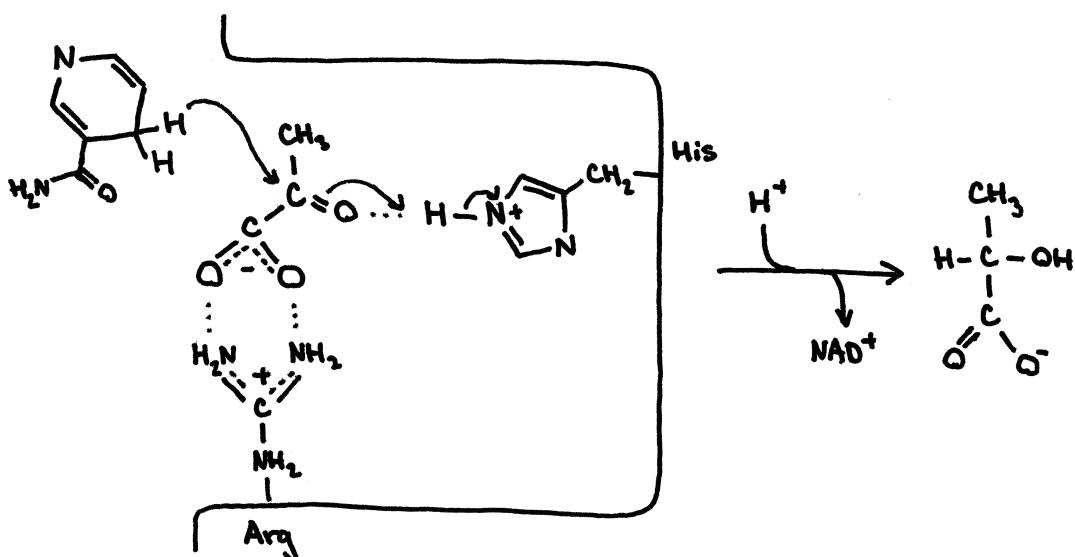
Ve svalu je většina energie získávána anaerobně, přičemž laktát je krví přenášen do jater, kde je znova přeměněn na glukózu.

4.1 Laktátdehydrogenáza



Obrázek 29: Laktátdehydrogenáza (LDH) redukuje pyruvát (Pyr) na laktát (Lac) a oxiduje NADH na NAD^+ .

Mléčné kvašení je katalyzováno enzymem laktátdehydrogenázou. Hydridový iont je přenesen z NADH (viz obrázek 30) přímo na atom uhlíku karbonylové skupiny pyruvátu, která naváže proton z imidazolové skupiny histidinu (obrázek 15) za vzniku hydroxylu. Karboxylová skupina pyruvátu se koordinuje s kladným koncem argininu, což napomáhá přenosu elektronů a udržuje molekulu pyruvátu ve správné pozici pro reakci.

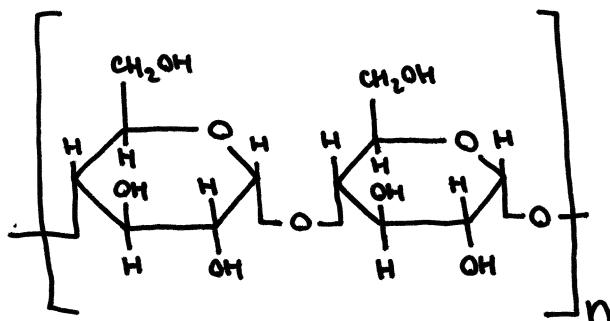


Obrázek 30: Reakční mechanismus laktátdehydrogenázy. Vodík je na pyruvát přenesen z NADH, přičemž karbonylová skupina naváže vodíkový proton z histidinu.

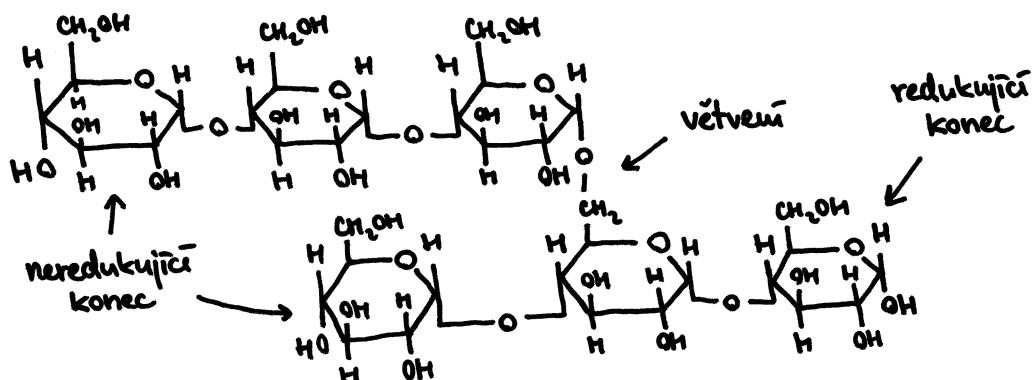
5 Metabolismus glykogenu

Vyšší organismy se před nedostatkem glukózy, hlavního zdroje energie, chrání tvorbou glukanů, glukózových polysacharidů, ze kterých je v případě potřeby možno glukózu rychle uvolnit. U rostlin slouží jako zásobní látka škrob a u živočichů glykogen.

Glykogen se skládá z glukózových jednotek spojených glykosidovými vazbami (α - $(1 \rightarrow 4)$)- α -D- (anomery D-glukózy navázané vazbou mezi uhlíky 1 a 4, obrázek 31). Na každých 8–12 glukózových zbytků pak připadá větvení (α - $(1 \rightarrow 6)$)- α -D-vazbou (obrázek 32).



Obrázek 31: Spojení D-glusových zbytků α -(1→4) vazbami.

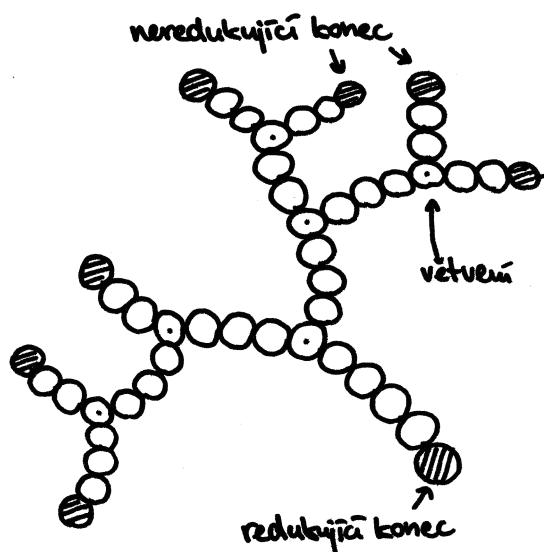


Obrázek 32: Struktura molekuly glycogenu. Hlavní řetězec je rozvětven (α - $(1 \rightarrow 6)$)-vazbou.

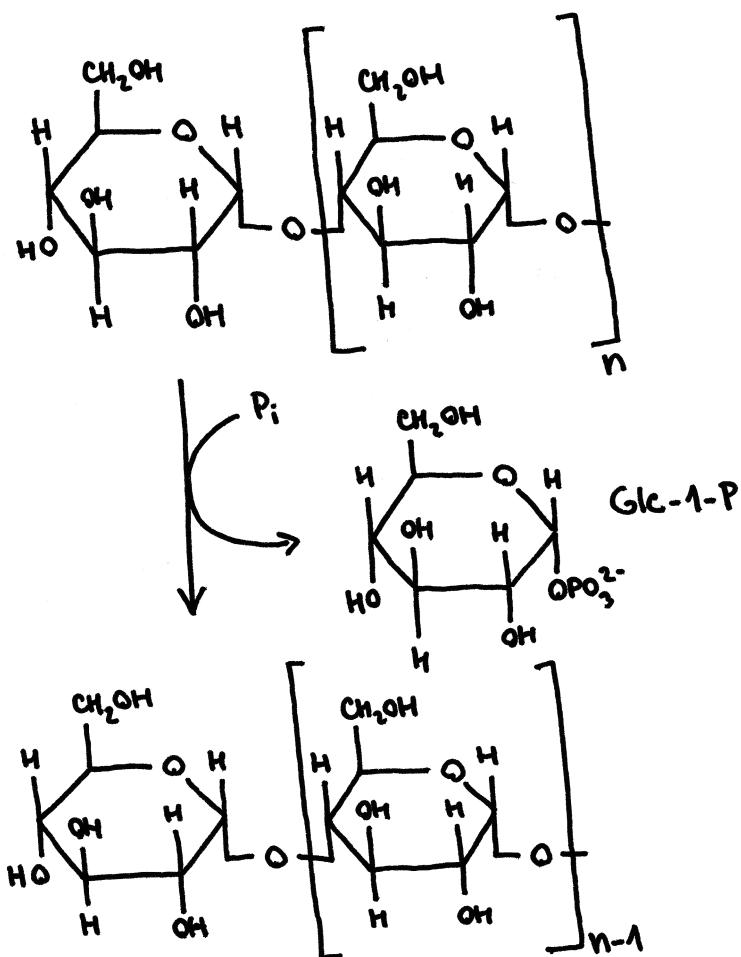
Větvenou strukturu glycogenu bychom mohli přirovnat k matematickému stromu, jak je znázorněno na obrázku 33, kde redukující konec představuje kořen a neredukující konce listy. Tato struktura je velmi výhodná, jelikož odbourávání glycogenu začíná na neredukujících koncích a umožňuje tak začít uvolňovat glukózu z mnoha větvení současně.

5.1 Rozklad glycogenu

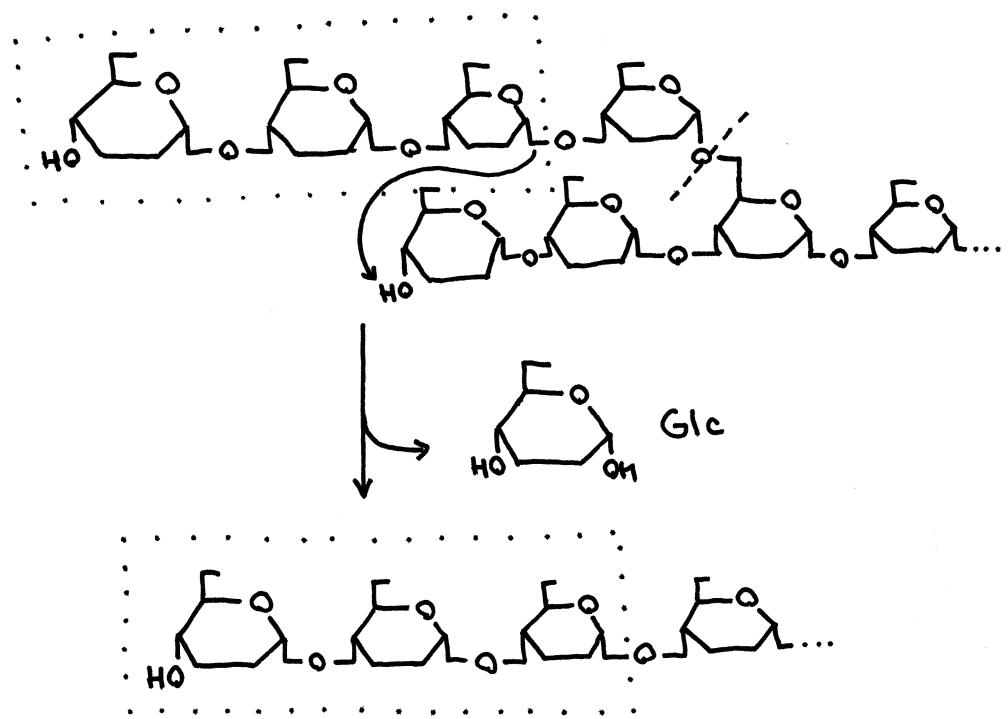
Rozklad glycogenu probíhá ve třech reakcích, které katalyzuje trojice enzymů. Glykogenfosforyláza (obrázek 34) odštěpuje glukóza-1-fosfát zavedením fosfátové skupiny na neredukující konec glycogenu (fosforolýza). Aby enzym mohl pracovat, musí být délka větvení alespoň pět glukózových jednotek. Amylo-1,6-glukosidáza (obrázek 35) štěpí α -(1→6)-vazbu, čímž z glycogenu odstraňuje větvení a umožňuje další působení glycogenfosforylázy. Nakonec fosfoglukomutáza přeměňuje glukóza-1-fosfát na glukóza-6-fosfát, který buď vstoupí do glykolýzy, nebo je v játrech hydrolyzován na glukózu.



Obrázek 33: Struktura glykogenu jako strom. Jednotlivá větvení mají ve skutečné molekule délku 8–12 glukózových zbytků.



Obrázek 34: Fosfolytické odštěpení koncové glukózy z glykogenu za vzniku glukóza-1-fosfátu (Glc-1-P).



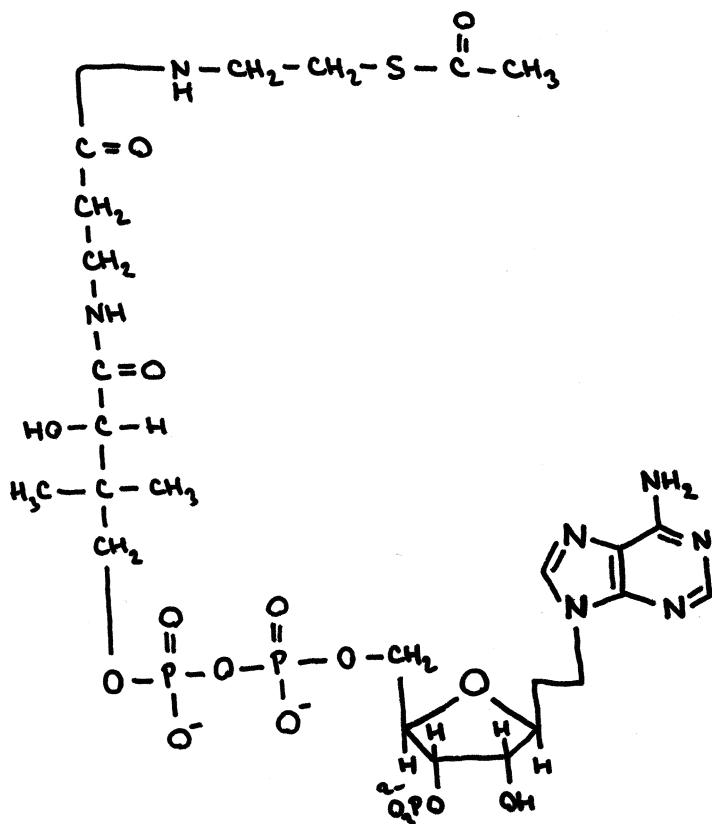
Obrázek 35: Schéma funkce linearizačního enzymu amylo-1,6-glukosidázy. Zbytek větvění, vázaný α -D-(1 \rightarrow 4)-vazbou, je přenesen na konec jiné větve. Vazba α -D-(1 \rightarrow 6) je hydrolyzována, čímž je uvolněna molekula glukózy (Glc).

6 Citrátový cyklus

Citrátový cyklus (známý jako Krebsův cyklus, cyklus trikarboxylových kyselin či TCA-cyklus) je metabolický proces, při kterém je acetyllová skupina navázaná na acetylkoenzym A oxidována na dvě molekuly CO_2 .

6.1 Přehled

Citrátový cyklus (obrázek 37) probíhá v mitochondriích. Vstupem do cyklu je acetylkoenzym A (obrázek 36), produkt štěpení sacharidů, aminokyselin a mastných kyselin.



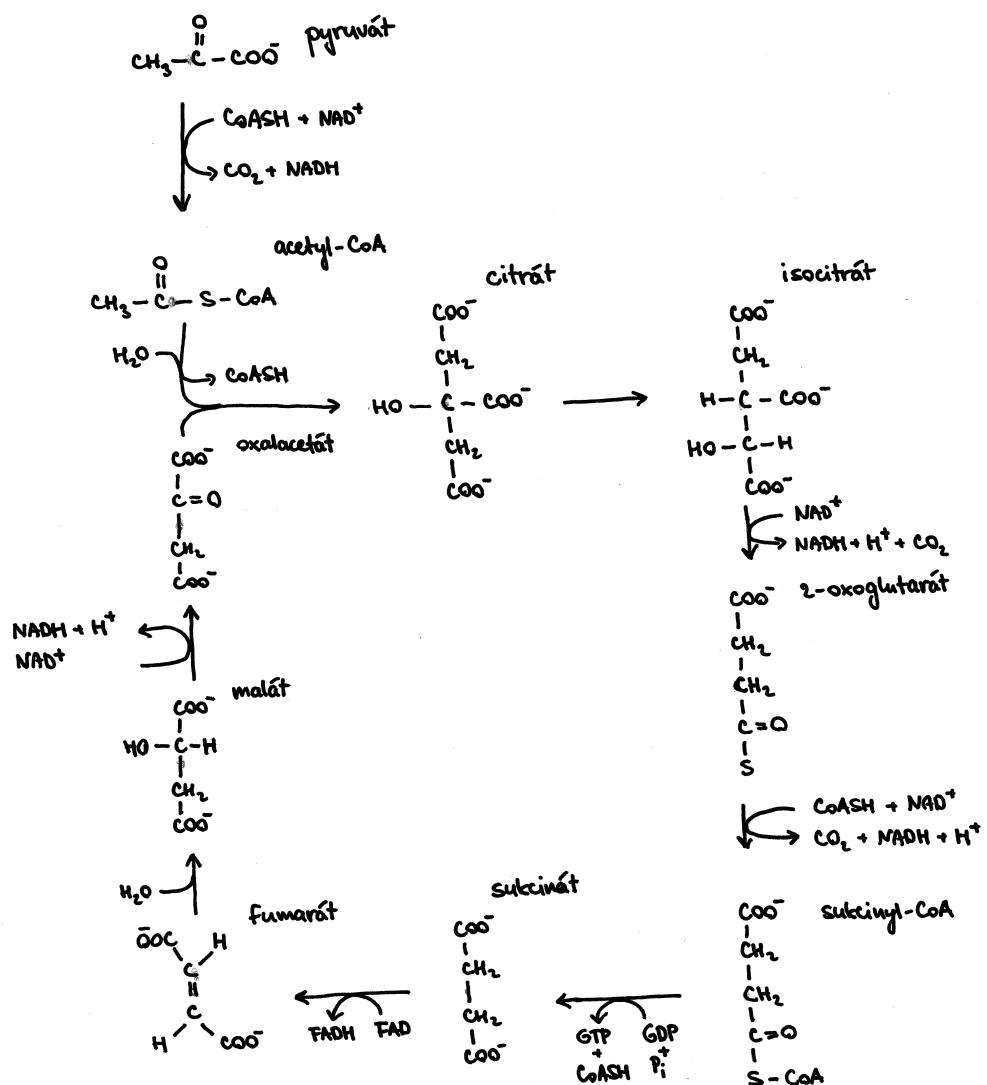
Obrázek 36: Acetylkoenzym A.

Acetyllová skupina je v průběhu cyklu oxidována až na dvě molekuly oxidu uhličitého za vzniku tří molekul NADH, jedné molekuly FADH_2 a jedné molekuly GTP (ekvivalent ATP). Molekuly NADH a FADH_2 jsou poté reoxidovány vzdušným kyslíkem v řetězci transportu elektronů se ziskem energie v podobě ATP.

Kromě energetické funkce je citrátový cyklus zdrojem důležitých stavebních látek, ze kterých buňka syntetizuje mimo jiné aminokyseliny či sacharidy.

6.2 Komplex pyruvátdehydrogenázy

Pyruvát pocházející z glykolýzy je na acetylkoenzym A transformován komplexem enzymů pyruvátdehydrogenázy (obrázek 38). Tento komplex se skládá ze tří enzymů, pyruvátdehydrogenázy (E_1), dihydrolipoylacetyltransferázy (E_2) a dihydrolipoyldehydrogenázy (E_3). Reakce se dále účastní thiamindifosfát (TDP), flavinadeninnukleotid (FAD), nikotinamidadeninnukleotid (NAD^+ , obrázek 7), lipoamid a koenzym A (obrázek 36).



Obrázek 37: Jednotlivé kroky citrátového cyklu.

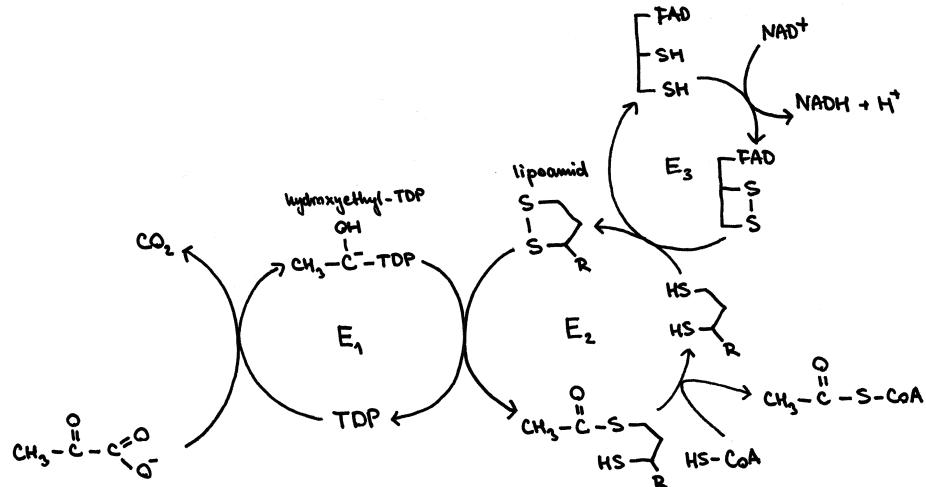
6.3 Citrátsyntháza

Citrátsyntháza katalyzuje kondenzaci oxalacetátu (koncového produktu citrátového cyklu) a acetylkoenzymu A za vzniku citrátu. Mechanismus reakce je naznačen na obrázku 39. Proton z methylové skupiny acetylku je odtažen molekulou zbytku asparagové kyseliny z enzymu (pro strukturu základních aminokyselin viz obrázek 15) a karboxylová skupina je protonována zbytkem histidinu, čímž se acetyl přemění na svou enol formu.

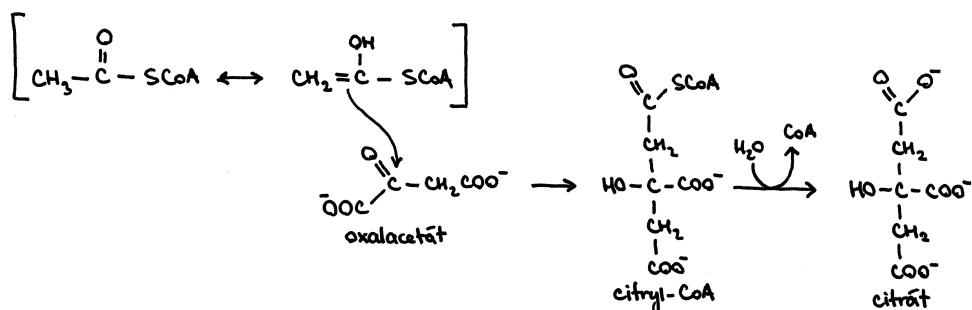
Tento enol nukeofilně napadne oxalacetát, přičemž enzym vrátí dříve odebraný proton na karboxylovou skupinu oxalacetátu a odebere proton, který původně daroval. Vzniknoucí citrylkoenzym A je hydrolyzován na citrát a koenzym A.

6.4 Akonitáza

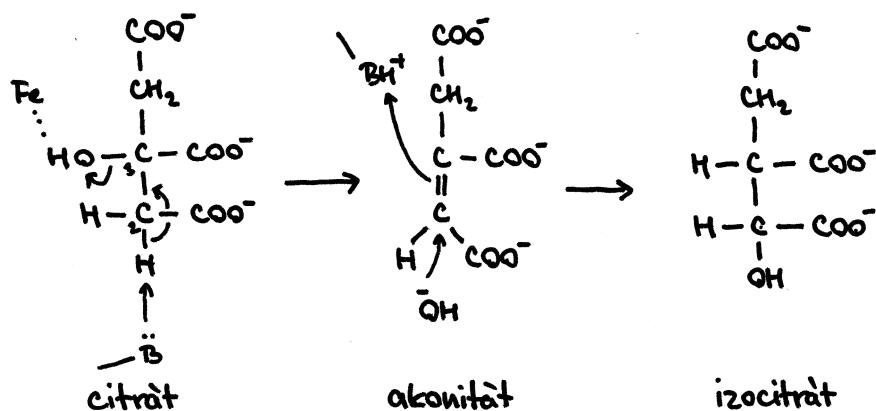
V dalším kroku cyklu je citrát izomerován na izocitrát v reakci katalyzované enzymem akonitázou (obrázek 40). Hydroxylová skupina se koordinuje s atomem železa umístěným v blízkosti aktivní oblasti enzymu, což usnadňuje její odštěpení poté, co enzym odejme proton z druhého uhlíku řetězce citrátu. Tímto způsobem vznikne akonitátový intermediát, který je posléze rehydratován za vzniku izocitrátu.



Obrázek 38: Schéma reakcí komplexu pyruvátdehydrogenázy. E₁ (pyruvátdehydrogenáza) pomocí koenzymu TDP (thiamindifosfát) dekarboxyluje pyruvát za vzniku meziproduktu hydroxyethyl-TDP. Tento intermediat je oxidován lipoamidem vázaným na enzym E₂ (dihydrolipoylacetyltransferáza), poté je TDP eliminován a acetylskupina je přenesena na koenzym A. E₂ je poté reoxidován enzymem E₃ (dihydrolipoyldehydrogenáza), který je sám oxidován NAD⁺.



Obrázek 39: Mechanismus reakce citrásyntházy. Acetyl je přeměněn na enol-formu, nukleofilně napadne oxalacetát a poté je hydrolyzován, čímž se uvolní koenzym A.

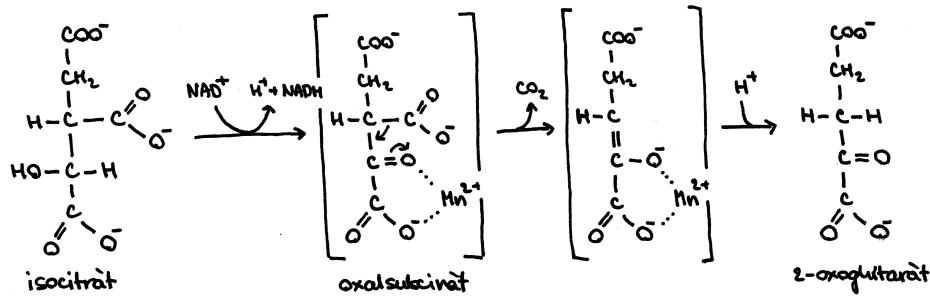


Obrázek 40: Mechanismus reakce akonitázy. Citrát je dehydratován na akonitát, který je posléze znova hydratován na izocitrát.

6.5 Isocitrátdehydrogenáza

Izocitrát je dekarboxylován enzymem isocitrátdehydrogenázou (obrázek 41) za vzniku první molekuly NADH. Enzym katalyzuje oxidaci alkoholu (isocitrátu) na keton (oxalsukcinát) a karboxylová skupina je následně odštěpena za přispění manganatého či hořečnatého iontu, který

koordinuje novou karboxylovou skupinu.



Obrázek 41: Reakční mechanismus isocitrátdehydrogenázy. Isocitrát je oxidován a dekarboxylován na 2-oxoglutarát přes intermediátní oxalsukcinát.

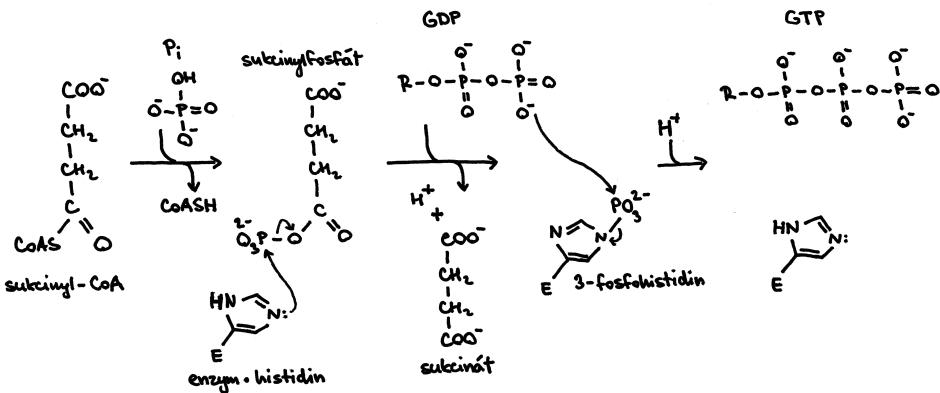
6.6 2-Oxoglutarátdehydrogenáza

Oxidace a dekarboxylace 2-oxoglutarátu katalyzovaná 2-oxoglutarátdehydrogenázou je velmi podobná reakci komplexu pyruvátdehydrogenázy (obrázek 38). Rovněž se jedná o komplex složený ze tří enzymů a mechanismus reakce je obdobný. Produktem reakce je sukcinylkoenzym A, molekula oxidu uhličitého a NADH.

6.7 Sukcinylo-CoA-syntetáza

Dalším krokem cyklu je štěpení energeticky bohaté vazby sukcinylkoenzymu A za přeměny jedné molekuly guanosindifosfátu (GDP) na guanosintrifosfát (GTP). Molekula GTP je analogická molekule ATP a jedna v druhou mohou být snadno převedeny enzymem nukleosiddifosfátkinázou.

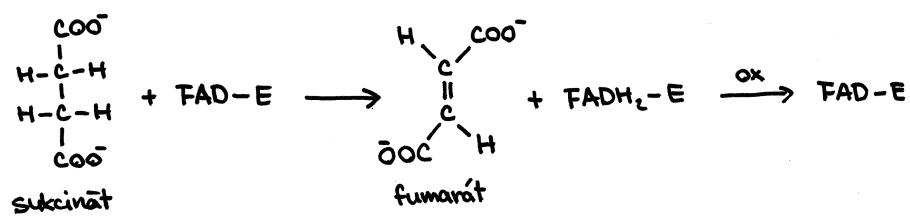
V prvním kroku reakce (obrázek 42) reaguje sukcinylkoenzym A s hydrogenfosfátem (P_i), čímž se uvolní koenzym A a vznikne sukcinylfosfát. Fosfátová skupina je z něj poté přenesena na histidin z enzymu a z něj vzápětí na molekulu GDP, čímž se přemění na GTP.



Obrázek 42: Mechanismus reakce sukcinyl-CoA-syntetázy. Koenzym A na sukcinylu je nahrazen fosfátovou skupinou, která poté přes histidinový zbytek v enzymu přechází na molekulu GDP a dává tak vzniknout makroergické molekule GTP.

6.8 Sukcinátdehydrogenáza

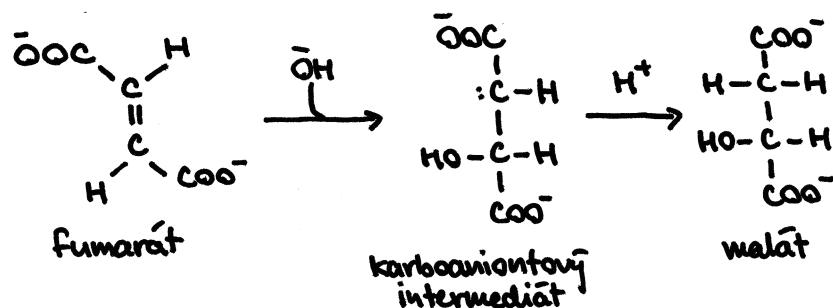
Sukcinátdehydrogenáza katalyzuje dehydrogenaci sukcinátu (obrázek 43) na fumarát. Oxidačním činidlem (akceptorem elektronů) je zde molekula flavinadenindinukleotidu (FAD), která je posléze obnovena v oxidačním řetězci.



Obrázek 43: Sukcinát je v reakci katalyzované enzymem sukcinátdehydrogenázou dehydrogenován na fumarát za účasti FAD, který slouží jako akceptor elektronů a je poté obnoven v řetězci transportu elektronů.

6.9 Fumaráza

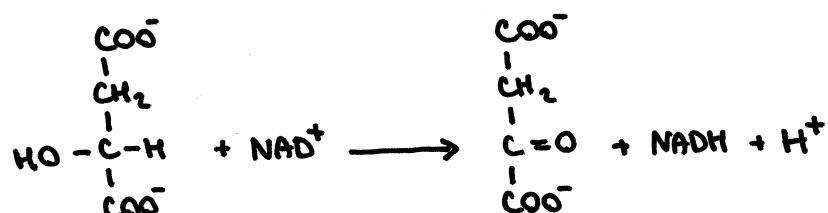
Fumarát je hydratován na malát enzymem fumarázou (obrázek 44). Nejprve je navázána hydroxyskupina za vzniku carbaniontového intermediátu, který je poté protonován.



Obrázek 44: Reakce fumarázy. Fumarát je přes karbaniontový intermediát hydratován na malát.

6.10 Malátdehydrogenáza

V poslední reakci citrátového cyklu je malát dehydrogenován zpět na oxalacetát (obrázek 45). Hydroxyskupina malátu je oxidována na keton molekulou NAD^+ .



Obrázek 45: Oxidace malátu na oxalacetát katalyzovaná malátdehydrogenázou za redukce NAD^+ na NADH.

Reference

- [1] Donald Voet, Judith G. Voet: *Biochemie*. Victoria Publishing, 1995.
- [2] Jan Jelínek, Vladimír Zicháček: *Biologie pro gymnázia*. Nakladatelství Olomouc, 9. vydání edice, 2007.
- [3] Vodrážka, Zdeněk: *Biochemie*. Academia, Praha, 2., opravené vydání (dotisk) edice, 2002.
- [4] Wikipedia: *Enolase — Wikipedia, The Free Encyclopedia*, 2014. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Enolase&oldid=606946557>, [Online; accessed 10-May-2014].
- [5] Wikipedia: *Fumarase — Wikipedia, The Free Encyclopedia*, 2014. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Fumarase&oldid=594271262>, [Online; accessed 12-May-2014].
- [6] Wikipedia: *Glycolysis — Wikipedia, The Free Encyclopedia*, 2014. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Glycolysis&oldid=607807250>, [Online; accessed 10-May-2014].
- [7] Wikipedia: *Monosaccharide — Wikipedia, The Free Encyclopedia*, 2014. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Monosaccharide&oldid=606336541>, [Online; accessed 11-May-2014].
- [8] Wikipedia: *Triosephosphate isomerase — Wikipedia, The Free Encyclopedia*, 2014. http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Triosephosphate_isomerase&oldid=607165216, [Online; accessed 10-May-2014].