

Lecture 5: Energy Transformation in Living Cells

Honor Biology學生 陳俊鴻

1. 學習、思考、問題與解答

所學一：

生命中最通用的能量貨幣是ATP，然而ATP的產生主要卻並非直接由養份中的化學鍵直接轉換產生，反而是透過一步步拆解化學鍵時產生的零碎不一的能量全部先轉換成proton gradient，再由proton gradient轉換成ADP形成ATP的能量。

思考一之一：

老師上課時說這樣的形式最能減少能量的浪費，而我也同時想到以前學過的邏輯電路中，有一個概念是電路中訊號可以被分為analogue與digital，而當面臨複數個輸入端訊號與單個輸出端訊號的digital單位並不一致，此時為了同時兼具目標與準確性，我們會將這些訊號先轉換為連續的analogue signals，將這些第一次轉換後的輸入端訊號都相加後，再轉換為digital signals，如此也便可以減少訊號上的因冗餘被縮減所造成的誤差(概念圖如Fig. 1, Fig. 2)。而對應到生物學上，我認為單位不一致的輸入端訊號就像是NADH, FADH₂...等，轉換為analogue signals則像是轉換成proton gradient，訊號相加後再轉換為digital signals則像是proton gradient轉換成ADP形成ATP的能量。經過這樣的類比，我想也許生物中的不少過程可以轉換成電路表示也說不定。

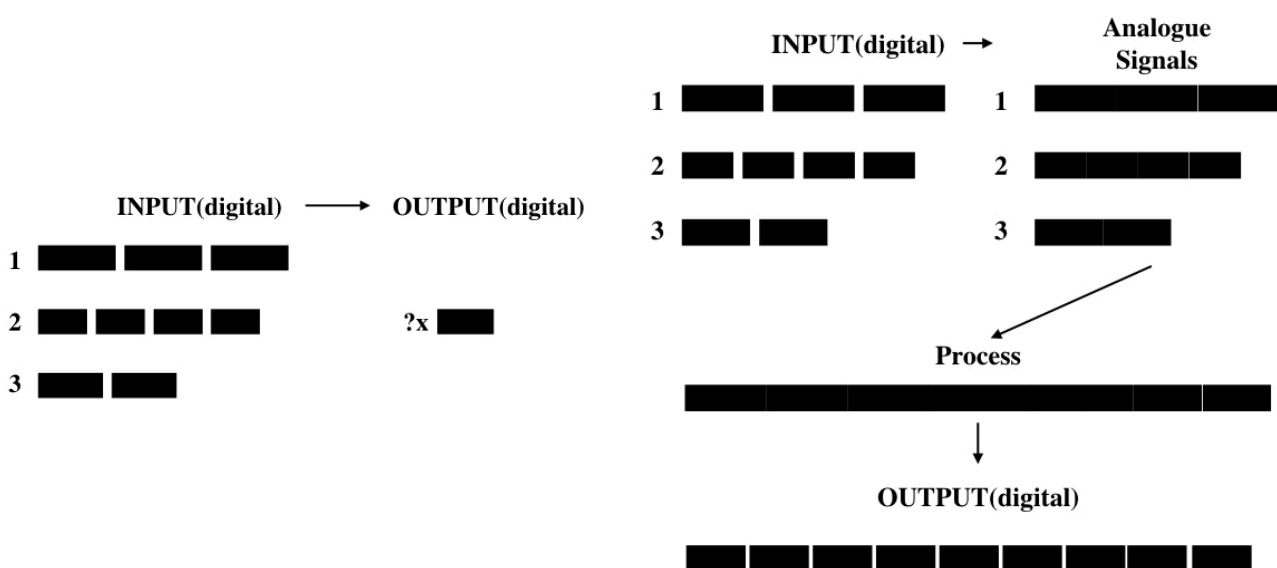


Fig. 1 命題

Fig. 2 解法

思考一之二：

在我之前的報告中，我提出了一個問題「濃度梯度是生命維持的必要條件嗎？」，當時我是以相當物理化學的角度在推論這個問題，也順便推算出了能斯特方程的類似公式，而在這裡我得到了另一個角度的解釋，因為生物在獲取養分時，並非每個養分都具有著相當整齊一致的能量供給，而且他們所提供的能量若直接使用在生命的代謝反應的話，往往會造成浪費。因此在演化的路途上，這種善於浪費能量的生命形式很容易會自身自滅或是淘汰。而能夠盡量不浪費能量的生命形式便得以存活，他們所使用的策略便是透過analogue與digital之間的轉換，而轉換前的能量便是反應熱，轉換後的能量則是以能斯特方程計算，如式(1)。

$$\Delta H = RT \cdot \Delta \ln[H^+] = -2.303RT \cdot \Delta pH \quad (1)$$

而考慮到上週所學習的Gibbs free energy，我們可以列式(2)。

$$\begin{aligned} \Delta G &= \Delta H - T\Delta S_{int} \\ \Delta G &= -2.303RT \cdot \Delta pH - T\Delta S_{int} \end{aligned} \quad (2)$$

在這裡，可以發現與老師上課投影片中的式(3)相當相似，但我究竟少了什麼條件才無法推論至式(3)呢？

$$\Delta G = -2.303RT \cdot \Delta pH + nF \cdot \Delta \psi \quad (3)$$

問題一：

為什麼Gibbs free energy是以式(3)表示，我沒考慮到什麼條件？

解答一：

(1) 思考流程：

我後來發現在這個情況下，其實 $T\Delta S_{int}$ 並沒有改變，要考慮的反而是擴散的趨勢與電動勢的影響。因此先考慮如果一帶電荷物質穿越存在電位差的膜時， ΔG 究竟會被如何地影響？正如我們所知，物質的自然傾向為 $\Delta G < 0$ ，故當一正電荷向著電位差為正的方向移動，其自由能必定大於零。因此我們可以列出式(4)。

$$\Delta G = q \cdot \Delta E = nF \cdot \Delta E \quad (4)$$

雖然式(4)是用猜的，但似乎可以加入原本只考慮擴散趨勢的計算，得到式(5)。

$$\Delta G = -2.303RT \cdot \Delta pH + nF \cdot \Delta E \quad (5)$$

由此可見， $\Delta \psi$ 應該正是膜電位差 ΔE 。

(2) 驗證：

帶電分子進行跨膜運輸確實需要考慮到以下兩個因子，一個是濃度梯度所造成的擴散力，另一個則是電位梯度所造成的電力，此時我們可以把這兩個梯度合稱為「電化學梯度」(electrochemical gradient)。而氫離子的穿膜過程是借助於ATP synthases，ATP synthases也利用了質子的擴散力及電力轉換成ADP變為ATP的化學能。而在此，相對於電子的電動勢(efm)，一個新名詞被創造了，便是質子的質動勢(pmf)。電子傳遞鏈正是造成pmf的主因，而pmf理論上又是源自於Gibbs free energy，因此可以寫作式(6)。

$$\Delta G = RT \cdot \ln \frac{[H^+]_N}{[H^+]_P} + zF \cdot \Delta\psi \quad (6)$$

又因為Gibbs free energy常常被解釋為電化學離子勢 $\Delta G = \Delta\mu_{X^{z+}}$ ，因此可以將上式改寫為式(7)。

$$\Delta\mu_{H^+} = F \cdot \Delta\psi + RT \cdot \ln \frac{[H^+]_N}{[H^+]_P} = F \cdot \Delta\psi - (ln10)RT\Delta pH \quad (7)$$

而pmf則被定義為 $\Delta p = -\frac{\Delta\mu_{H^+}}{F}$ ，因此可寫作式(8)_{[1][2][3]}。

$$\Delta p = -\Delta\psi + (59.1mV) \cdot \Delta pH \quad (8)$$

所學二：

在高濃度葡萄糖的情況下，酵母菌會出現glucose repression的現象，這是因為進行有氧呼吸相當複雜且困難，而酒精發酵卻比較簡單，因此當酵母菌偵測到葡萄糖濃度太高便不進行有氧呼吸。

思考二：

從化學的角度來看，除非是產物濃度過高或有其他因素介入，否則並沒有理由會使一個已存在的反應因為反應物濃度過高而停止。況且，電子傳遞鏈的蛋白質真的有可能是在偵測到葡萄糖濃度後，才開始製造及組合嗎？我認為因為電子傳遞鏈太複雜了，而養分的供給不足對細胞而言又是相當緊急問題，並不太可能這樣。相反地，我認為比較有可能電子傳遞鏈的蛋白質平時便已經準備在那邊，葡萄糖濃度過高造成的glucose repression反而可能是一些化學上能解釋的因素所造成，而我的想法正寫在以下問答。

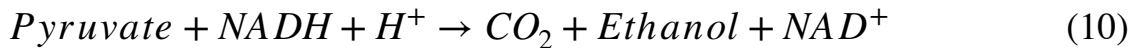
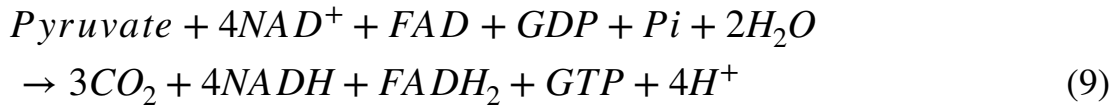
問題二：

為何高葡萄糖濃度下，酵母菌進行酒精發酵比有氧呼吸要明顯？

解答二：

(1) 思考流程：

我認為老師上課所說的解釋我不能接受，因為我有思考到更好的解釋。今天已知有氧呼吸及酒精發酵皆會先經過糖解作用，因此我認為真正的分歧是在葡萄糖轉變為丙酮酸之後。而目前已知，有氧呼吸與酒精發酵從丙酮酸開始的化學反應式分別如式(9), (10)。



因此，我們可以根據式(9), (10)寫出他們的反應商，如式(11), (12)。

$$Q_{\text{resp}} = \frac{[\text{CO}_2]^3[\text{NADH}]^4[\text{FADH}_2][\text{GTP}][\text{H}^+]}{[\text{Pyruvate}][[\text{NAD}^+]^4[\text{FAD}][\text{GDP}][\text{Pi}][\text{H}_2\text{O}]^2}} \quad (11)$$

$$Q_{\text{ferm}} = \frac{[\text{CO}_2][\text{Ethanol}][\text{NAD}^+]}{[\text{Pyruvate}][\text{NADH}][\text{H}^+]} \quad (12)$$

其中，當反應達平衡， $Q_{\text{resp}} = K_{\text{resp}}$, $Q_{\text{ferm}} = K_{\text{ferm}}$ ，而 K_{resp} , K_{ferm} 分別為反應式(9), (10)的平衡常數。

今討論當丙酮酸的濃度提升，顯而易見地，二氧化碳與NADH, FADH₂, GTP的濃度勢必提升，然而 $Q_{\text{resp}} \propto \frac{[\text{CO}_2]^3[\text{NADH}]^4[\text{FADH}_2][\text{GTP}]}{[\text{Pyruvate}][[\text{NAD}^+]^4[\text{FAD}][\text{GDP}]}$,

$Q_{\text{ferm}} \propto \frac{[\text{CO}_2][\text{NAD}^+]}{[\text{Pyruvate}][\text{NADH}]}$ ，因為 Q_{resp} 不僅正比於二氧化碳濃度的三次

方，還和其他三個輔酶濃度也是高次數的正比關係，因此 Q_{resp} 的上升程度會顯著地高於 Q_{ferm} ，故 Q_{resp} 會以相當快的速率(考慮到他的濃度次數非常高)，達到 K_{resp} ，而同一時間 $Q_{\text{ferm}} < K_{\text{ferm}}$ ，因此便會出現glucose repression的現象。因此我認為這個現象並非是酵母菌選擇了經濟上最佳化的途徑，而是演化上篩選出能夠酒精發酵的酵母菌，讓他們在有氧呼吸反應商已達平衡常數時，得以持續地有能量上的供給(畢竟在演化上，粒線體出現在真核細胞早於酒精發酵出現在酵母菌)。

(2) 驗證：

在我查證後，驚訝地發現我前面的推論其實並非是主要原因，真正會影響的機制是，酵母菌其實會依據不只是養分存在與否，還會依據碳源的種類誘發不同的代謝模式。葡萄糖敏感的酵母菌，即使在有氧的環境下依然偏好發酵

勝過呼吸作用。在這些酵母菌中，大量的可發酵糖會抑制呼吸作用中用來異化可代謝糖的關鍵酵素的合成。這時我產生了一個疑惑，明明呼吸作用產生的糖/能量比遠高過酒精發酵，為何這些酵母菌依然偏好酒精發酵呢？這是因為酒精發酵的反應速率遠高過呼吸作用，不僅如此，酒精作為代謝產物也同時可以使這些酵母得以在競爭中生存，因為酒精可以抑制其他微生物的生長。乙醇隨後也可以在有氧情況下於粒線體中透過氧化磷酸化作為不可發酵的碳源，使每個碳都達到與用的極限。但是，以不可發酵的碳源作為養分的酵母菌生長得比以發酵作用為主的酵母菌慢的許多。

當添加葡萄糖在以不可發酵碳源維生的酵母菌或是stationary-phase cells，會引發大範圍、趨向於最佳化利用碳源的調控過程。糖解作用會被誘發，並且葡萄糖幾乎會被完全地轉換為酒精與二氧化碳。此時，葡萄糖大量地流入且糖解作用被激發，而糖質新生則會被抑制。不僅如此，在核糖體RNA和蛋白質增加前，還會有生長速度的劇增。至於與可替代碳源的使用及代謝相關的酵素基因及與抗壓相關的基因產物則都會被抑制。

酵母菌不僅使用正向的也使用負向的控制機制來調節enzyme levels and activities以完成這個急遽的代謝模式轉換。在基因轉錄、mRNA穩定性、轉錄及酵素穩定性等階段，enzyme levels會被調節，然而enzyme activities會被異位調控和共價激發與抑制轉錄後修飾地調節。大多數這些過程會直接或間接地被特定的glucose sensing和signal transduction pathways所影響^[4]。

所學三：

原來chlorophyll從接受光子到游離電子只需要3picosecond！這效率可不是一般的高，可是同樣在光合作用的過程中，rubisco卻是已知酵素中催化效率最差的，不僅如此，他還會再氧濃度高時進行光呼吸。這些副作用使利用他維生的植物不得不就這些問題而演化出適應不同環境的不同型態構造。

所學四：

癌細胞透過改變pyruvate kinase mRNA的splicing位置，致使產生了效率較低的pyruvate kinase，導致glycolysis的進行效率降低，而glucose累積後造成大量的glucose不進行respiration而是進行pentose phosphate pathway，製造了大量的ribose, NADPH...等以進行快速的細胞分裂，這也就是癌細胞能快速分裂的材料供給來源。

2. 對take home quiz的回應

(1) Rubisco turnover number這麼低，那為什麼沒有演化或被取代？

因為要將二氧化碳固定於碳鏈上是非常困難的(活化能太高)，因此能產生出一個能固碳的酵素實屬不易，可能地球上也只出現過這麼一種，因此在出現其他種能固碳的酶時，使用Rubisco的生物已經盛行於地球上了。

(2) Cancer cell expresses PKM2 instead of PKM1. Can this mechanism explain Warburg Effect of cancer?

抱歉，這個若單純用文字解釋會長篇大論，因此我自己繪製了概念圖來解釋這部分的機制，見Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5。

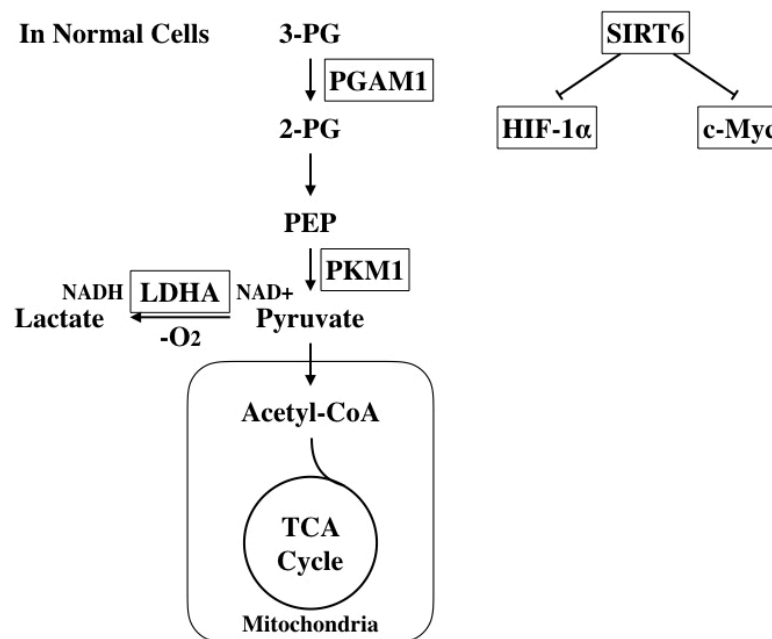


Fig. 3 正常細胞糖解作用的代謝途徑

正常的細胞中，參與糖解作用的蛋白質其tyrosine支鏈都沒有被磷酸化，而HIF-1α與c-Myc則都會被SIRT6抑制，因此不會有PKM2的出現，至於乳糖的形成則必須要在缺氧的情況下才會發生。

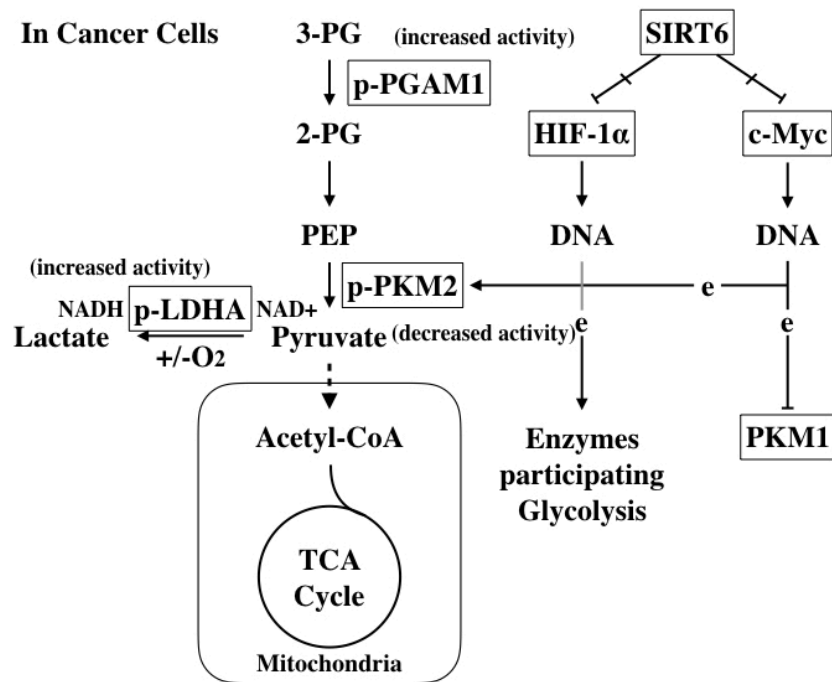


Fig. 4 腫瘤細胞糖解作用的代謝途徑

腫瘤細胞中，參與糖解作用的蛋白質其tyrosine支鏈都被磷酸化了，當中p-PGAM1與p-LDHA的酵素活性皆為增加，故糖解作用增加、乳酸含量增加腫瘤成長顯著，因此有利於Warburg effect的發生。然而p-PKM2的活性卻是減小，這就成為了一個很奇怪的現象，因為就實驗結果而言，p-PKM2存在時還是相對有利於Warburg effect的發生，而這個怪現象便被命名為PKM2 paradox，就我目前看到的文章表示目前還沒辦法清楚地解釋PKM2 paradox。

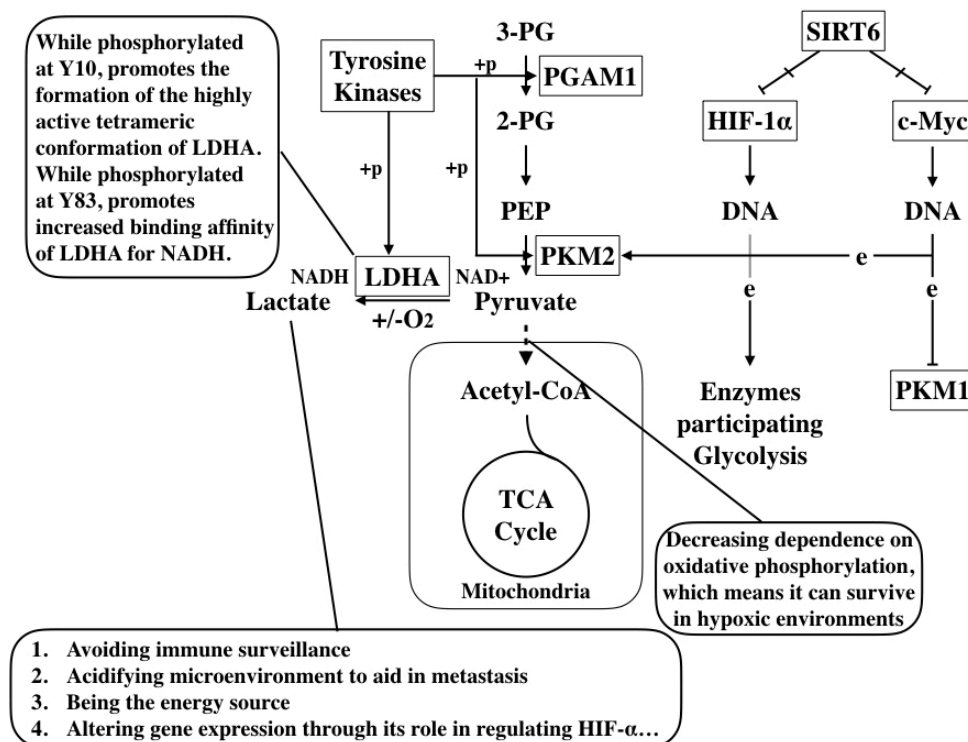


Fig. 5 腫瘤細胞糖解作用的代謝途徑

由於p-PKM2與p-LDHA的作用之下，腫瘤細胞的能量供給來源實際上已經仰賴乳酸發酵與乳酸代謝後的能量了，因此腫瘤細胞才得以在低氧的環境下生存。而乳酸的產生其實也造就了腫瘤不少的特性，比方說避開免疫監視、酸化周遭的微環境以利於轉移、作為能量來源之一以及調控有利腫瘤發育的基因表現。

因此，綜合以上的描述，其實PKM2取代PKM1就直觀上應該不能用來解釋Warburg effect，因為PKM2在被磷酸化之後，實際上活性更低更不利於Warburg effect的發生，這也就是PKM2 paradox。但是，目前就實驗上，並沒有很一致的答案，有的model顯示有利，有的卻顯示不利，因此實際上該如何解釋還是個未解之謎^[5]。

(3) Please make comment on: 植物的光系統II吸收光子的能量而將水分子分解。

在吸收光能後，chlorophyll a的電子游離，使得P680變成P680⁺，至於H₂O的分解則是透過反應中心P680上面的oxygen-evolving complex(OEC)進行。OEC是一個由四個錳離子和一個鈣離子所組成的metallo-oxo cluster。當OEC氧化水時，水形成了氧氣與氫離子，而OEC也隨後將水的四個電子傳遞給一個tyrosine sidechain 再接著傳遞到P680⁺^[6]。

(4) Cancer cell真的不需要有氧呼吸嗎？Explain your answer.

如同我在take home quiz(2)所描述，由於p-PKM2與p-LDHA的作用之下，腫瘤細胞的能量供給來源實際上已經仰賴乳酸發酵與乳酸代謝後的能量了，因此腫瘤細胞才得以在低氧的環境下生存，故我推測可能真的不需要有氧呼吸。

(5) 細胞中glucose氧化燃燒會釋放能量，為什麼這個能量一定要以proton gradient的型式儲存？

因為glucose氧化時釋放的能量太大未必能剛好用在其他代謝反應中而沒有能量浪費，因此需要先轉換成proton gradient，因為單個proton所造成的擴散力與電動是極小，所以當一堆proton形成proton gradient時，proton gradient所造成的proton-motive force可以用來儲存幾乎任意數值的能量，因此可以將能量浪費降到最低。

(6) How yeast degrade glucose in the presence of oxygen? Explain your answer.

如同上方解答二的驗證中所描述，「葡萄糖敏感的酵母菌即使在有氧的環境下，依然偏好發酵勝過呼吸作用。在這些酵母菌中，大量的可發酵糖會抑制呼吸作用中用來異化可代謝糖的關鍵酵素的合成」，因此只要是在葡萄糖濃度高的環境中，酵母菌的呼吸作用必定會被抑制，而相對的酒精發酵則會作為主要代謝葡萄糖的途徑。

(7) 今年諾貝爾生理學或醫學獎得主的貢獻是什麼？

他們發現了細胞感知並適應氧氣供應的機制。當細胞面臨hypoxia，HIF complex會與基因體中的HRE elements結合並活化對於適應低氧環境的重要基因表現。當細胞處於高氧環境時，HIF- 1a在oxygen-dependent manner中先被羥基化後，這個羥基化的過程會使HIF-1a被VHL complex標記隨後再被proteasome摧毀^[7]。

3. 參考資料

[1] https://en.wikipedia.org/wiki/Chemiosmosis#cite_ref-Nicholls92_6-2

[2] https://en.wikipedia.org/wiki/Electrochemical_gradient

[3] <https://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/Goodies/Energetics.html>

[4] <https://academic.oup.com/femsyr/article/2/2/183/536213/>

[5] Wiese EK, Hitosugi T. Tyrosine Kinase Signaling in Cancer Metabolism: PKM2 Paradox in the Warburg Effect. Front Cell Dev Biol. 2018 Jul 24;6:79.

[6] https://en.wikipedia.org/wiki/Photosystem_II

[7] http://www.nobelprizemedicine.org/wp-content/uploads/2019/10/pressm_FINAL_ENG.pdf