

Základy biochemie KBC / BCH

Centrální metabolické děje

Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu

CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



Centrální metabolické děje

- **Osnova:**
- Cyklus trikarboxylových kyselin a glyoxylátový cyklus.
- Oxidativní fosforylace.
- Tvorba ATP.
- Rozpojovače a inhibitory oxidativní fosforylace.

Cyklus trikarboxylových kyselin (TCA). Citrátový cyklus, Krebsův cyklus.

- Citrátový cyklus je sled osmi důmyslných reakcí ve kterém dochází v cyklu k oxidaci acetylové skupiny acetyl CoA na dvě molekuly CO_2 a uvolněná volná energie se ukládá do redukovaných koenzymů NADH a FADH_2 . Produktem jednoho cyklu jsou dvě molekuly CO_2 , tři NADH, jedna FADH_2 a jedna makroergická sloučenina GTP (=ATP).
- Sled těchto reakcí byl intenzivně studován mezi léty 1932 až 1937 řadou badatelů na létacích svalech holubů.
- V roce 1935 publikoval maďarský vědec Albert Szent-Gyorgyi poznatek, že respirace se urychlí přidáním malého množství sukcinátu, fumarátu, malátu nebo oxaloacetátu. Efekt působení těchto látek byl katalytický.
- Další, jako Carl Martius a Franz Knoop ukázali, že citrát může být převeden na α -oxoglutarát.
- Hans Krebs, který publikoval inhibici přechodu sukcinátu na fumarát (sukcinátdehydrogenasa) malonátem, reakce zastavuje celou oxidaci, tak měl k dispozici sekvenci reakcí: citrát \rightarrow akonitát \rightarrow isocitrát \rightarrow α -oxoglutarát \rightarrow sukcinát \rightarrow fumarát \rightarrow malát \rightarrow oxaloacetát. Citrát musí být obnovován.

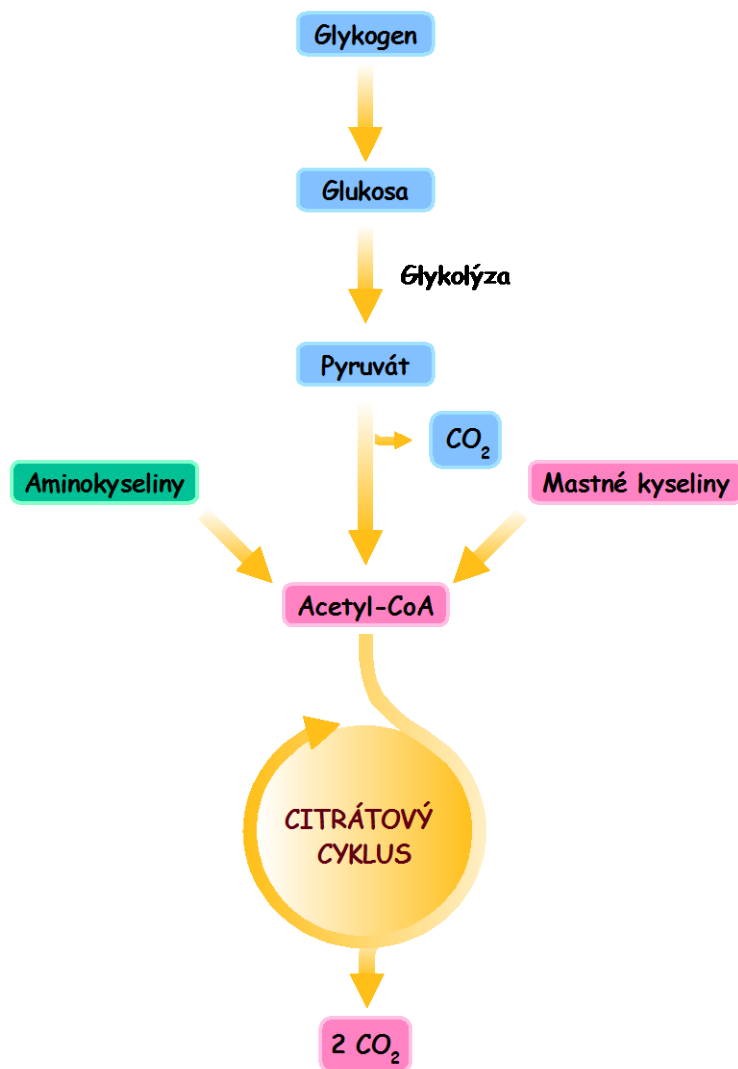
Historie citrátového cyklu

- V roce 1937 publikovali Martius a Knoop klíčový poznatek, který Krebsovi chyběl pro spojení oxidace v citrátovém cyklu s metabolismem glukosy. Oxaloacetát a pyruvát mohou být převedeny na citrát za působení peroxidu vodíku.
- Pyruvát jako produkt odbourávání glukosy v glykolýze se tak stal spojovacím článkem mezi metabolismem sacharidů a citrátovým cyklem.
- Krebs již měl zkušenost s cyklickým dějem - v roce 1932 publikoval spolu Kurtem Henseleitem močovinový (ornithinový) cyklus.
- Krebsův první pokus o publikaci citrátového cyklu v Nature byl neúspěšný. Práce byla přijata do méně prestižního časopisu Enzymologia.
- Krebs, H.A. and Johnson, W.A.: The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4, 148 - 156 (1937).
- Hans Adolf Krebs (1900 - 1981) obdržel Nobelovu cenu za lékařství a fyziologii v roce 1953 spolu s Fritzem Albertem Lipmannem.

- Citrátový cyklus je ústřední metabolická dráha vedoucí k zisku energie ze substrátů jako jsou sacharidy, mastné kyseliny a aminokyseliny, které se odbourávají na acetyl CoA.
- Citrátový cyklus je lokalizován v matrix mitochondrií.
- Citrátový cyklus je aerobní metabolická dráha.
- Citrátový cyklus je amfibolický. V cyklu dochází ke katabolické reakci (odbourávání acetyl CoA na CO_2). Meziprodukty cyklu se využívají k syntézám dalších látek - anabolické reakce.
- Sumární rovnice citrátového cyklu:



Přehled vstupu substrátů do citrátového cyklu.



Syntéza acetylCoA z pyruvátu - pyruvátdehydrogenasový komplex.

- Pyruvát je za aerobních podmínek transportován do matrix mitochondrie transportním proteinem (pyruvát - H^+ symport).
- Multienzymový komplex pyruvátdehydrogenasy je skupina tří nekovalentně vázaných enzymů, který katalyzuje na sebe navazující reakce.
- Výhodou multienzymového komplexu je:
 - A) Sled reakcí je urychlován, protože jsou minimální vzdálenosti mezi enzymy.
 - B) Přímá návaznost reakcí zamezuje vedlejším reakcím.
 - C) Reakce na komplexu mohou být koordinovaně kontrolovány.

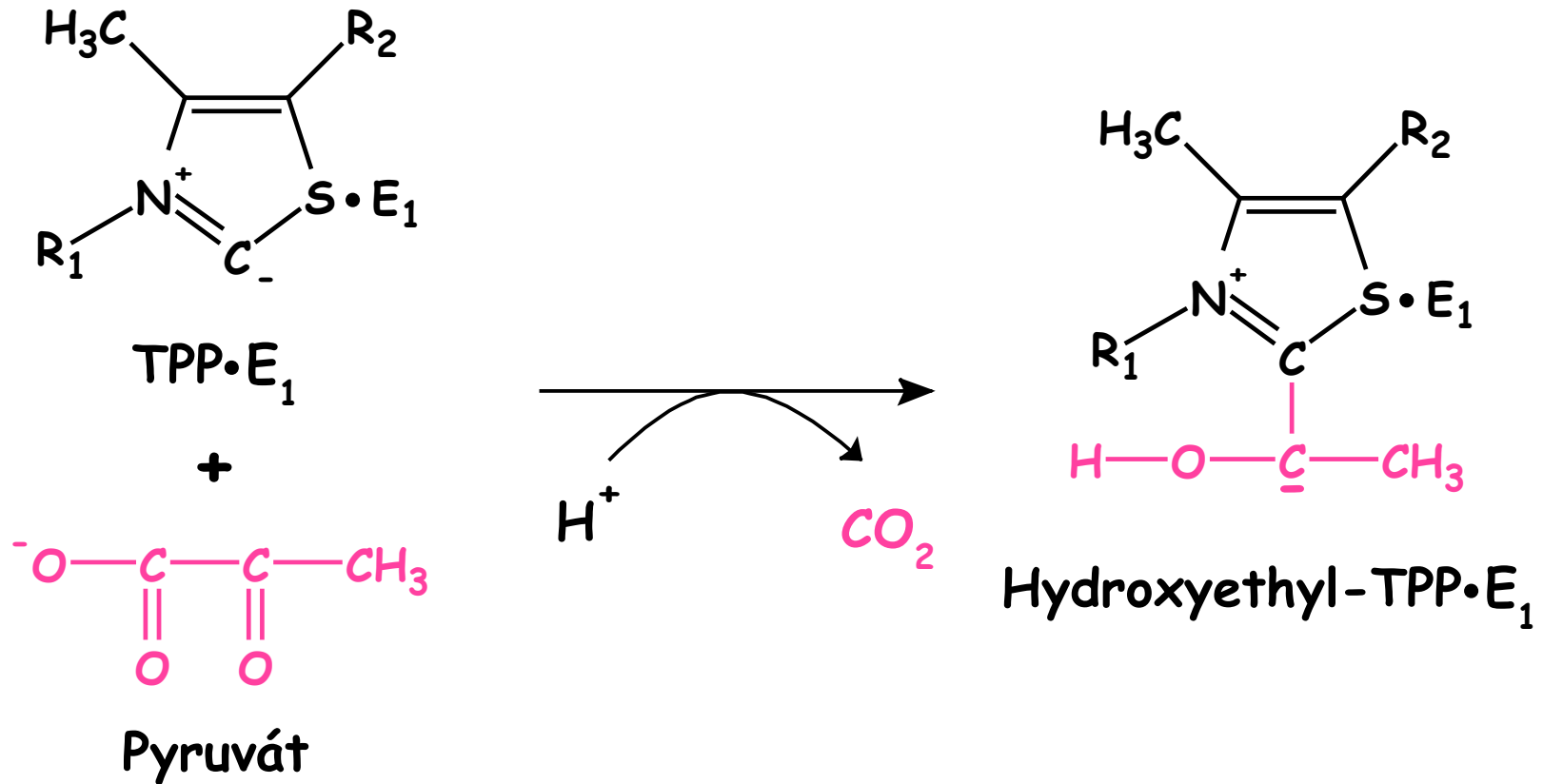
Složení pyruvátdehydrogenasového komplexu:

- Pyruvátdehydrogenasa (E_1)
- Dihydrolipoyltransacetylasa (E_2)
- Dihydrolipoyldehydrogenasa (E_3)
- Např. komplex *E. coli* je 4 600 kD proteinový komplex. Mitochondriální komplex je 10 000 kD protein, obsahující 20 E_2 trimerů obklopených 30 E_1 heterotetramery a 12 E_3 dimerů.
- Pyruvátdehydrogenasový komplex katalyzuje sekvenci tří reakcí, sumárně:

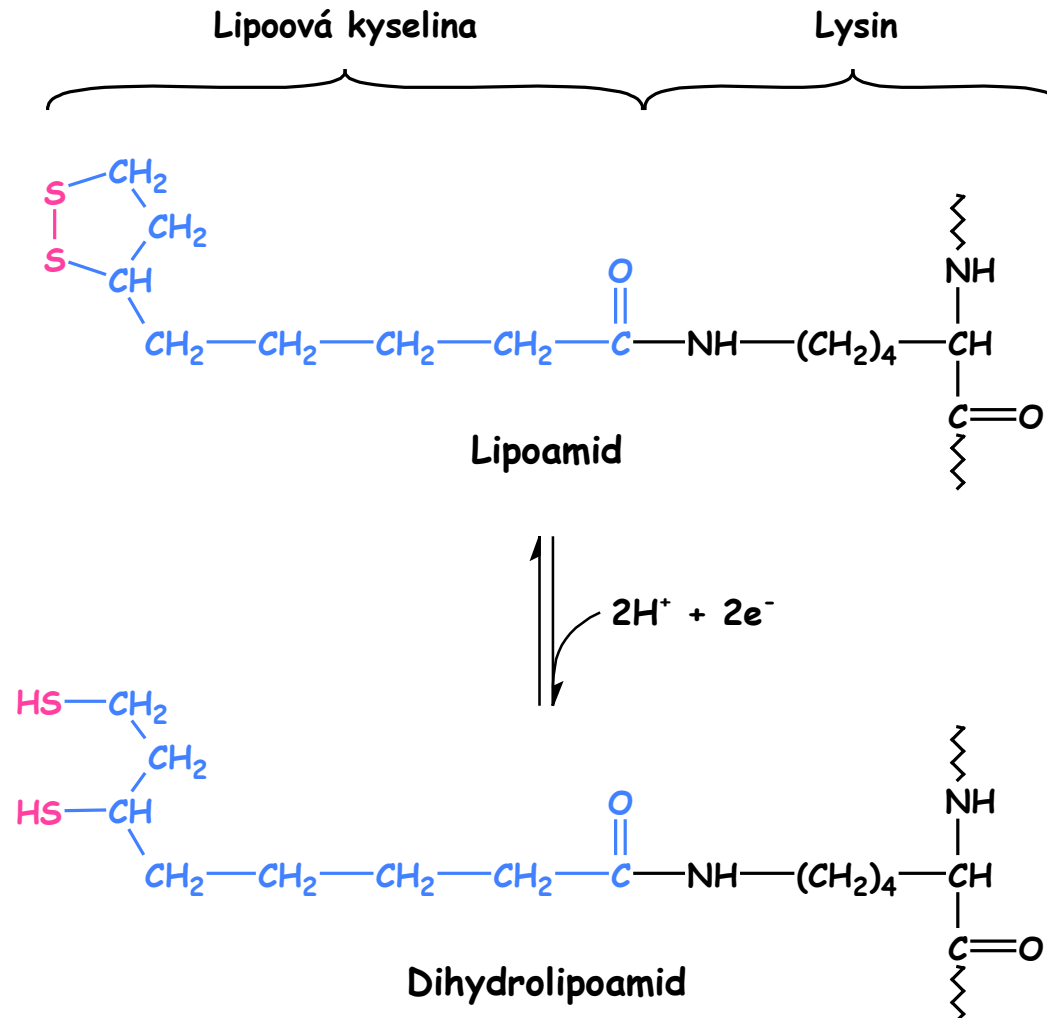
$$\text{Pyruvát} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetyl CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$$
- Komplex využívá pěti různých koenzymů: Thiaminpyrofosfát (TPP), Co A, lipoamid, NAD^+ a FAD.

Pyruvátdehydrogenasa (E₁)

Dekarboxyluje pyruvát za tvorby hydroxyethyl-TPP meziprojektu.

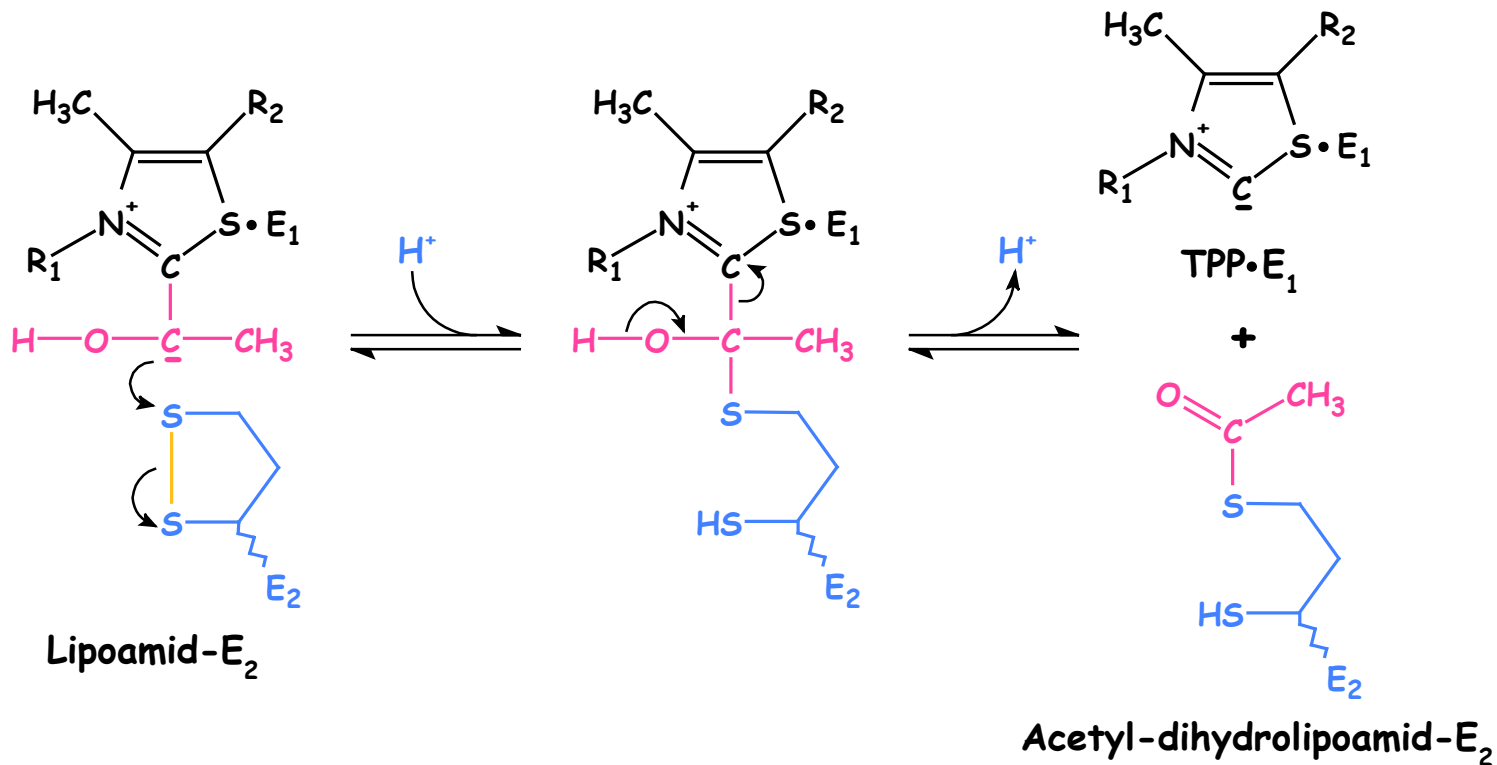


Lipoamid a dihydrolipoamid. Lipoová kyselina je vázána na E₂ amidovou vazbou přes ε-aminoskupinu Lys.

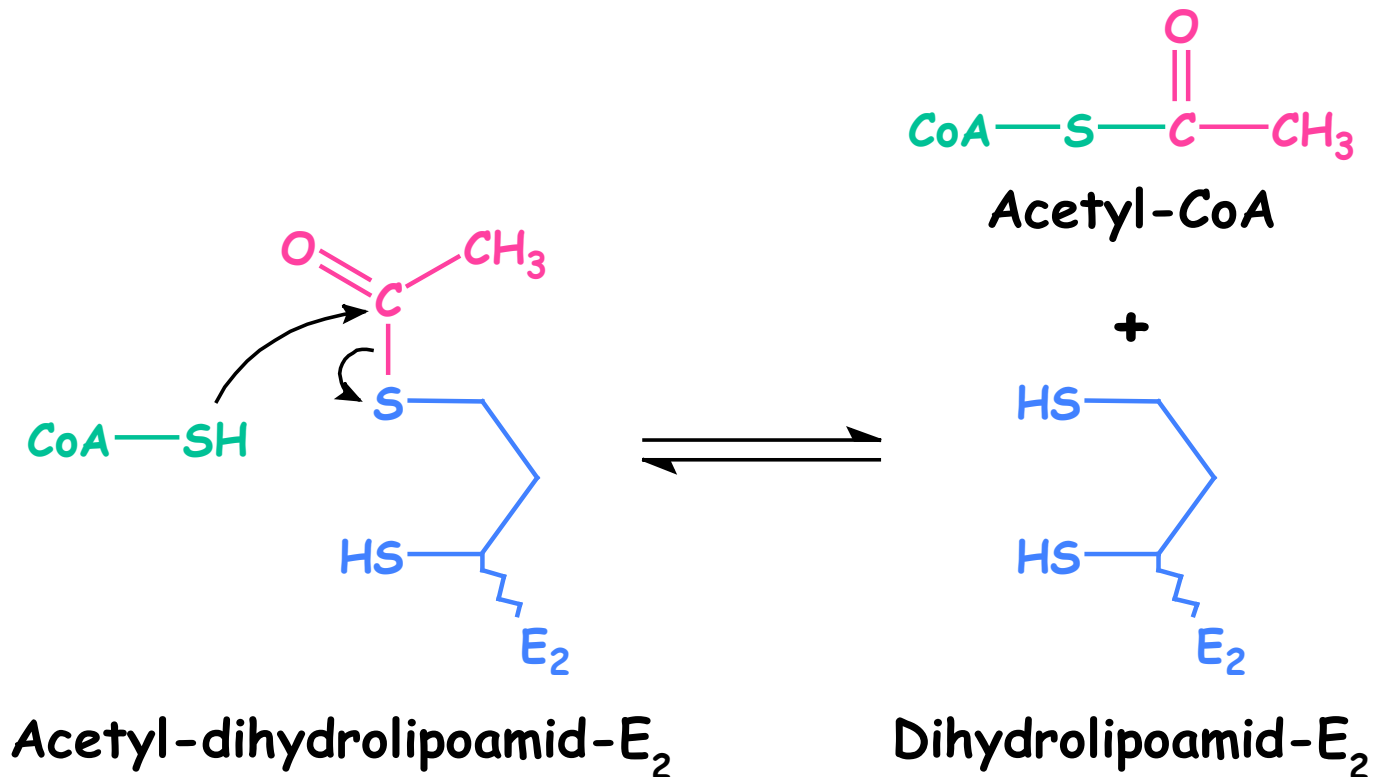


Hydroxyethyllová skupina je přenesena na dihydrolipoyltransacetylasu (E_2).

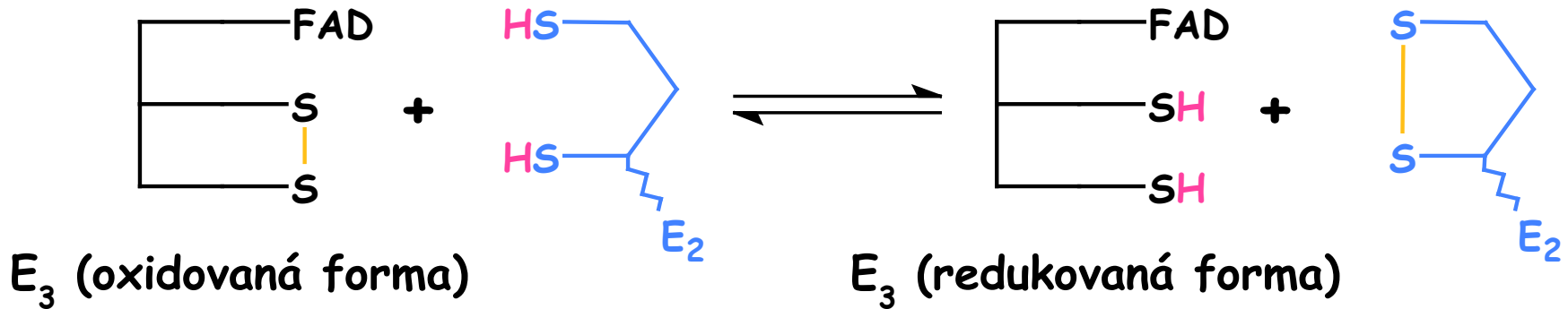
Hydroxyethyllový karbanion je současně oxidován na acetyl a lipoamid
redukován na disulfid.



E_2 poté katalyzuje transesterifikací, při které se acetyl přenesse na CoA za tvorby acetyl-CoA.

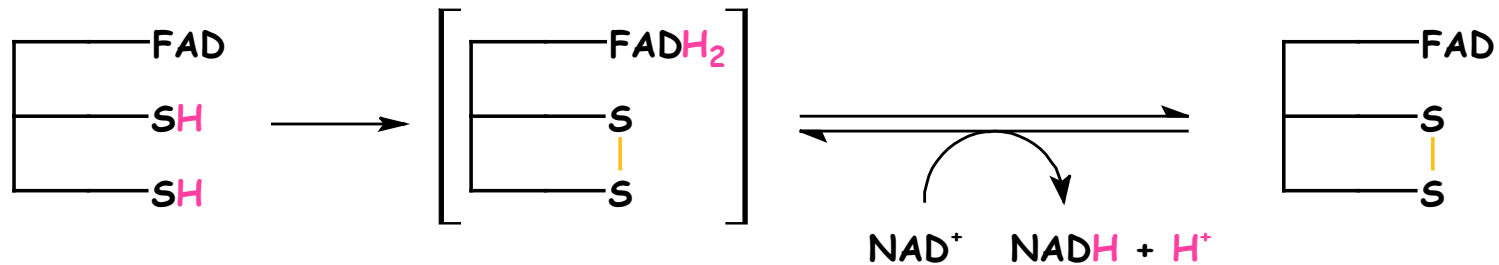


Regenerace lipoamidu na E₂.
Reoxidace probíhá přes kovalentně vázaný FAD.



Reoxidace redukováného E₃.

Elektrony z FADH₂ se přenáší na NAD⁺ za tvorby NADH. FAD slouží spíše jako vodič elektronů !!!



E₃ (redukována forma)

E₃ (oxidovaná forma)

Aktivní místo dihydrolipoamiddehydrogenasy.

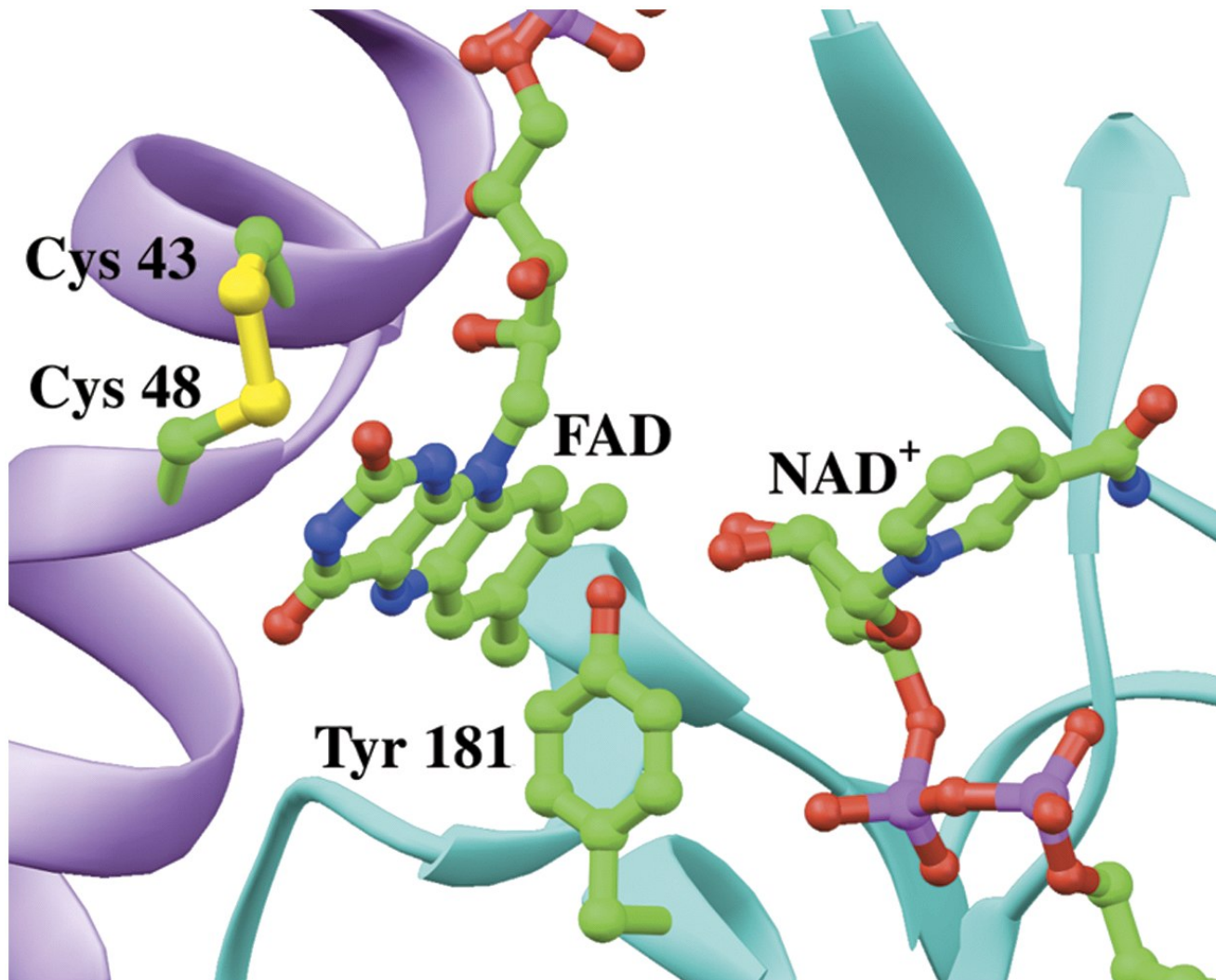
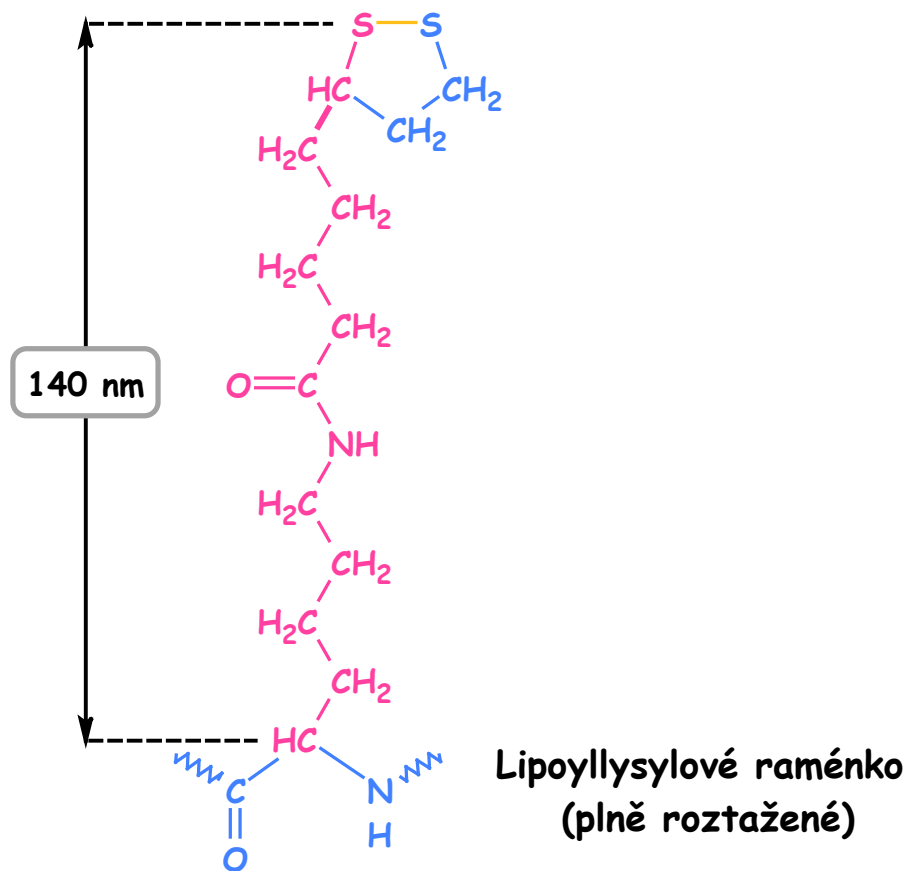


Figure 16-8 Fundamentals of Biochemistry, 2/e

Lipoyllysylové raménko E₂

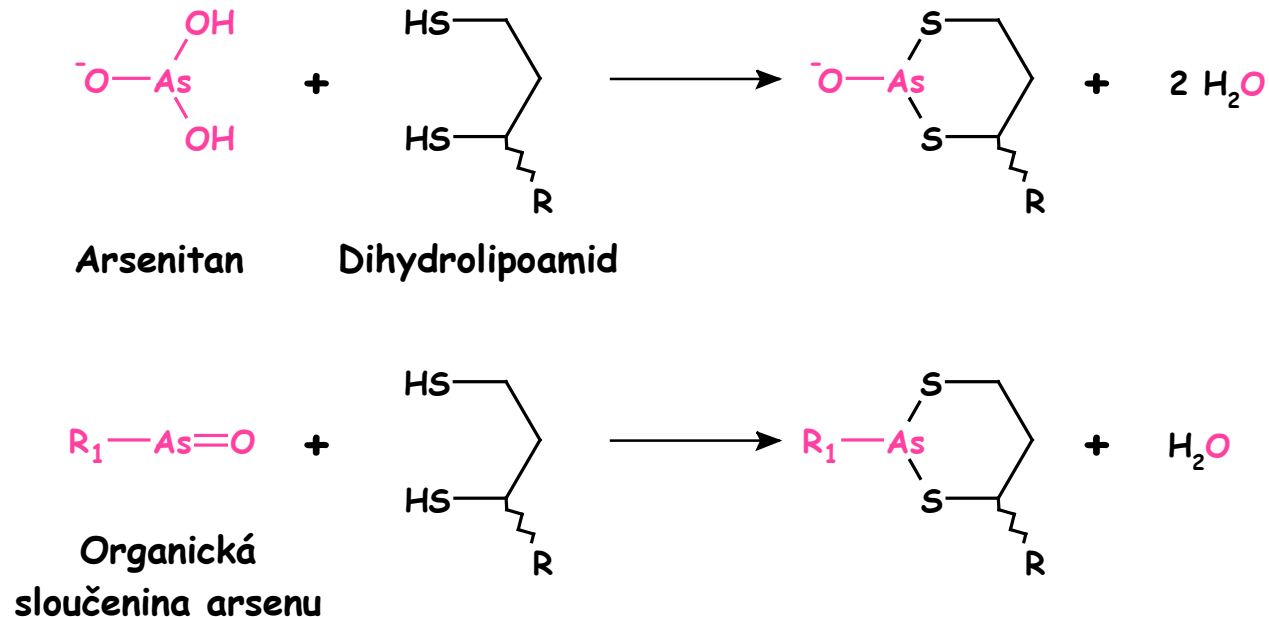
- Raménko přenáší meziprodukty reakce mezi jednotlivými enzymy.



Animated pyruvát dehydrogenasa.

- http://www.brookscole.com/chemistry_d/templates/student_resources/shared_resources/animations/pdc/pdc.html

Toxicita arsenitanu a organických sloučenin arsenu.
Inhibují pyruvátdehydrogenasu a 2-oxoglutarátdehydrogenasu
a tím i respiraci.



Sir Hans Adolf KREBS (1900-1981)



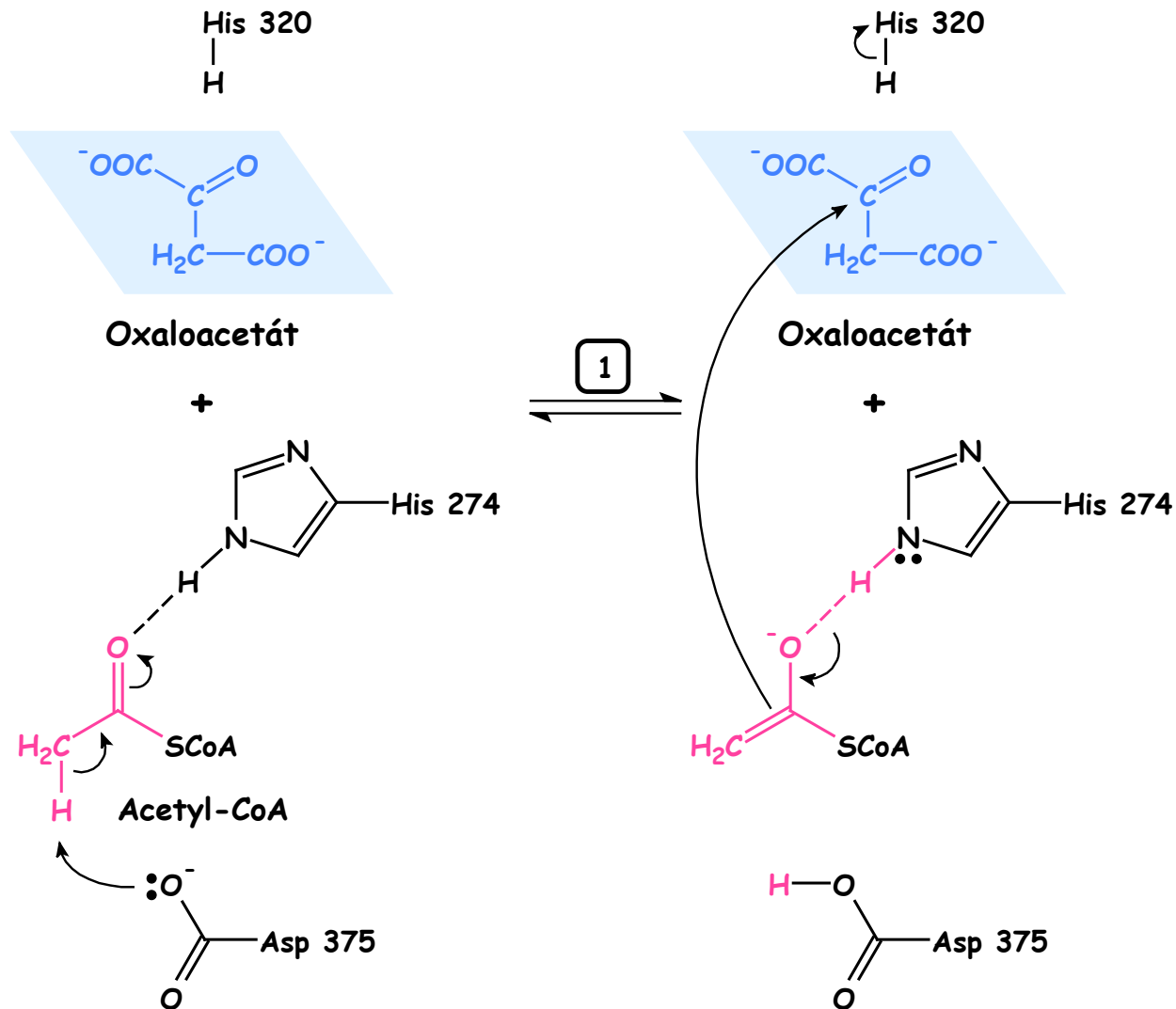
- 1900 Born in Germany
- 1918 Began medical school
- 1923 Graduated from medical school
- 1925 Graduated with Ph.D. from University of Hamburg
- 1932 Identification of Urea Cycle
- 1933 Emigration to the United Kingdom
- 1937 Identification of Citric Acid Cycle or "Krebs Cycle"
- 1945 Became a Professor at University of Sheffield
- 1953 Won the Nobel Prize in Physiology and Medicine
- 1954 University of Oxford
- 1958 Knighted
- 1981 Died in the United Kingdom, Oxford

Citrátový cyklus animated, Voet, Animated fig. Chapt. 16

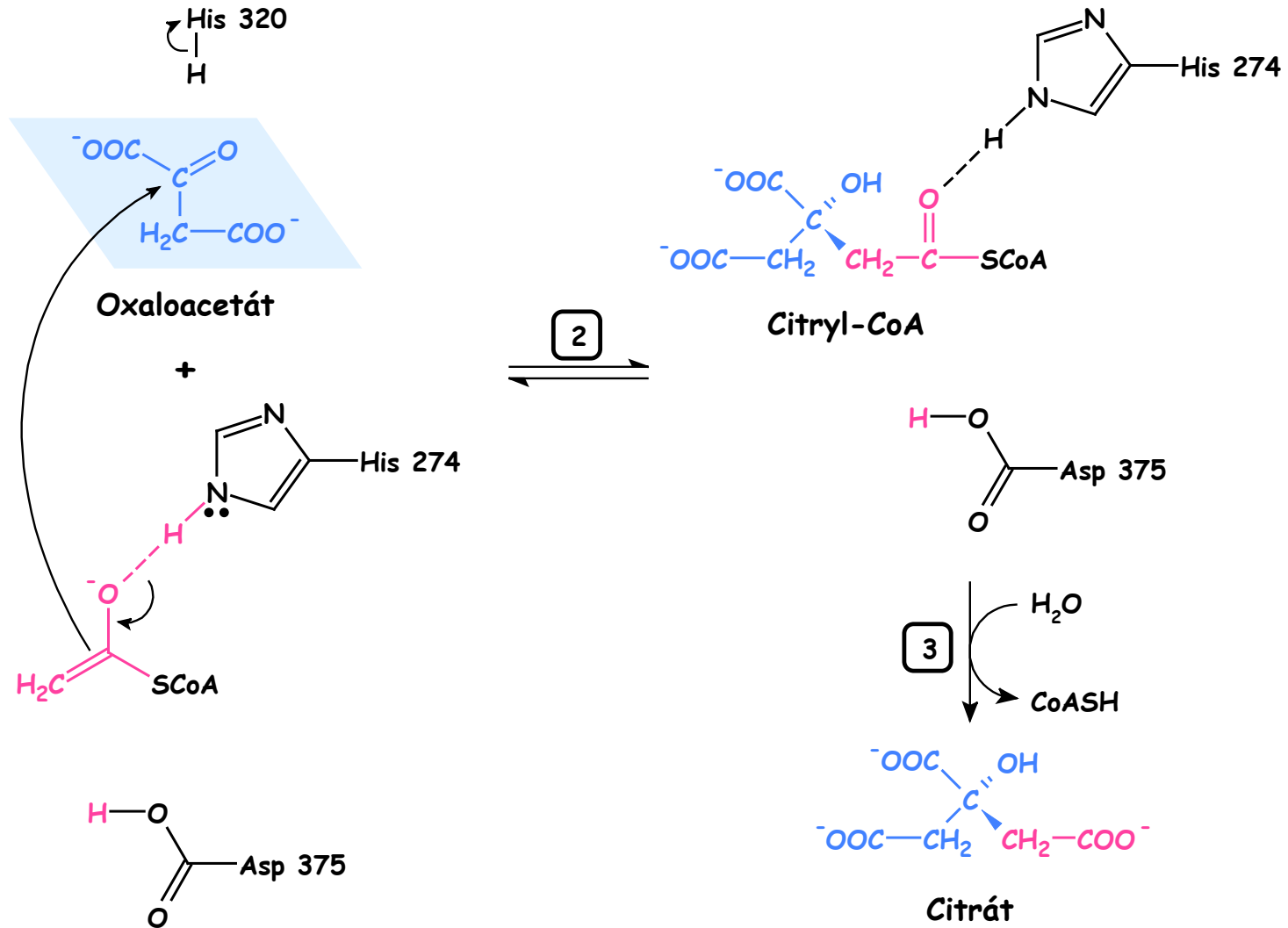
- http://higheredbcs.wiley.com/legacy/college/voet/0471214957/animated_figures/ch16/f16-2.html

Citrátový cyklus. Citrátsynthasa - první reakce.

Tvorba citrátu z acetyl CoA a oxaloacetátu. Asp jako báze.

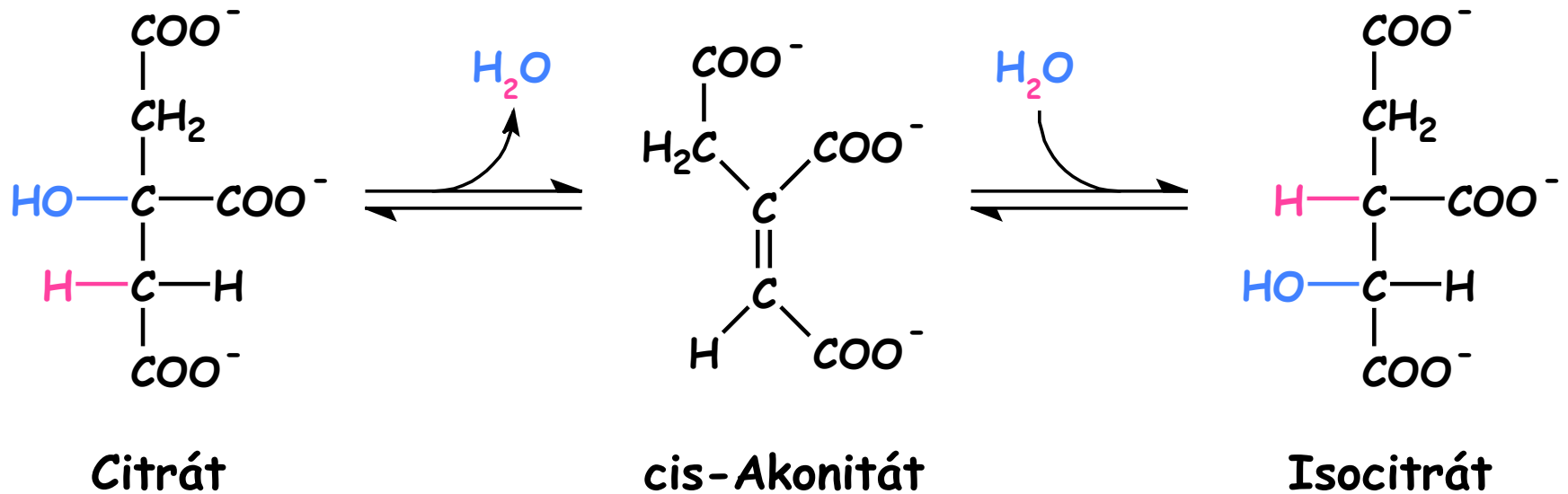


Enol forma acetyl CoA jako nukleofil !!

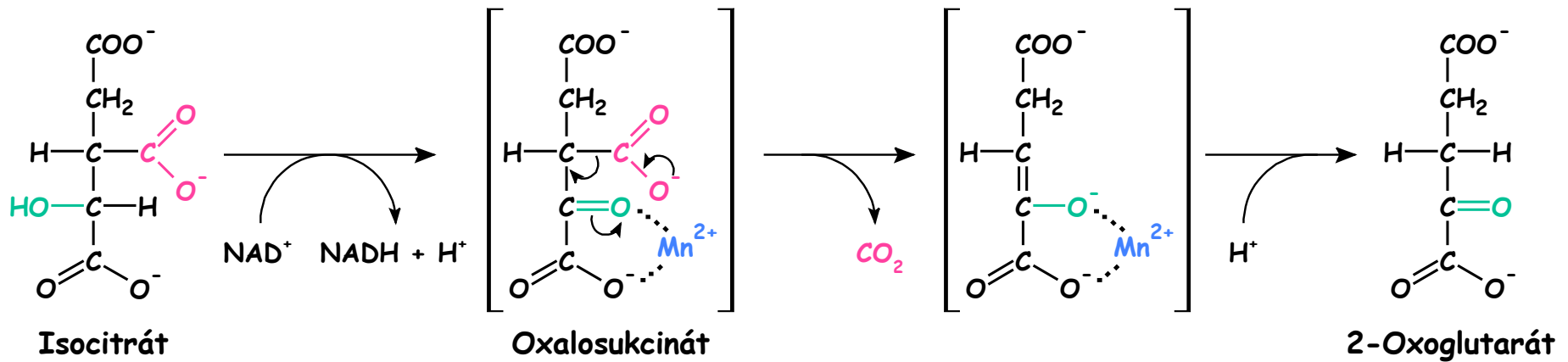


Akonitasa - druhý krok.

Reverzní izomerizace citrátu a isocitrátu přes *cis*-akonitát.

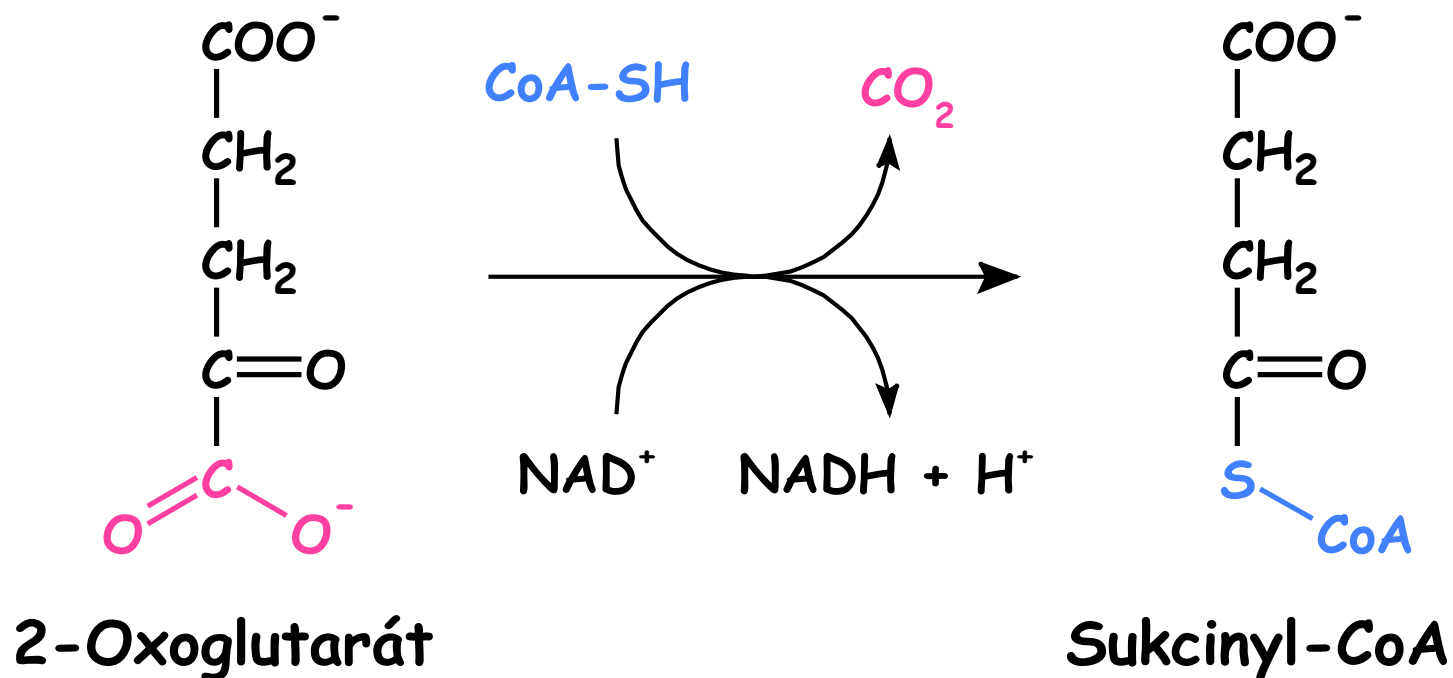


NAD⁺ dependentní isocitrátdehydrogenasa



2-Oxoglutarátdehydrogenasa

Oxidační dekarboxylace - analogie pyruvátdehydrogenasy.
E₂ -dihydrolipoyltranssukcinylasa



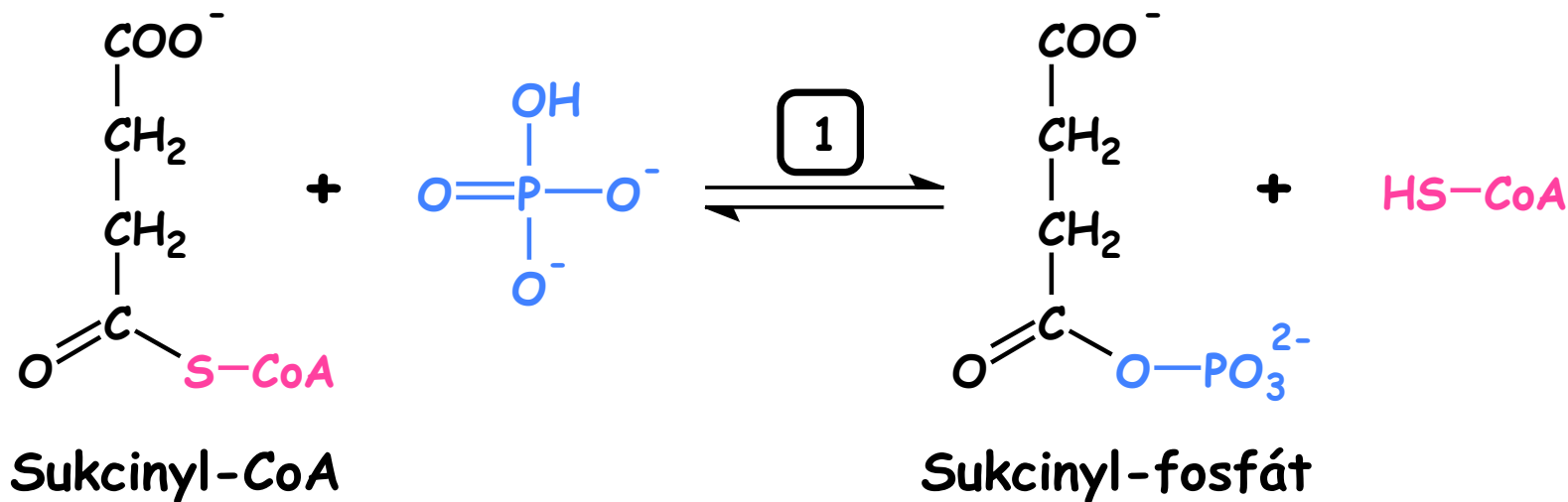
Sukcinyl-CoA syntetasa (sukcinátthiokinasa).

- Savčí enzym obvykle katalyzuje tvorbu GTP z GDP a P_i .
- U rostlin a bakterií je to ATP z ADP a P_i .
- ATP a GTP jsou energeticky ekvivalentní, díky enzymu nukleosiddifosfátkinasa dochází k přechodu:

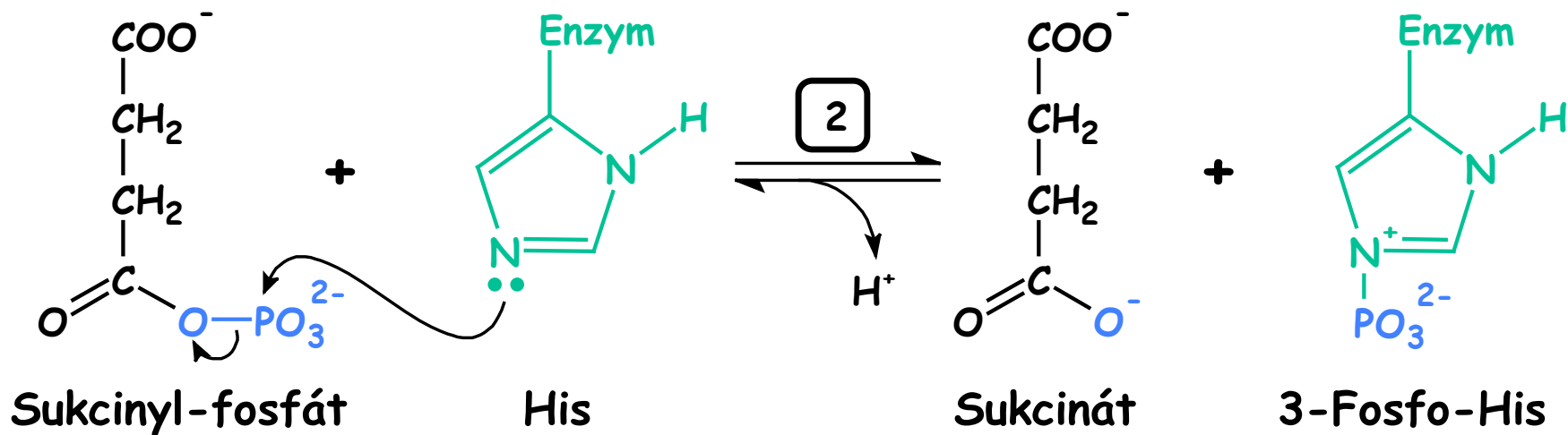


- Reakce katalyzovaná sukcinyl-CoA syntetasou je další příklad fosforylace na úrovni substrátu (nezávisí na přítomnosti kyslíku).
- Reakce probíhá ve třech stupních:
 - A) Sukcinyl-CoA reaguje s P_i za tvorby sukcinylfosfátu a CoA.
 - B) Transfer fosfátu z sukcinylfosfátu na His enzymu za uvolnění sukcinátu.
 - C) Fosfát z enzymu je přenesen na GDP za tvorby GTP .
- V tomto bodě citrátového cyklu je acetyl kompletně oxidován na dvě CO_2 , dva $NADH$ a GTP . Další část cyklu je převod sukcinátu na oxaloacetát.

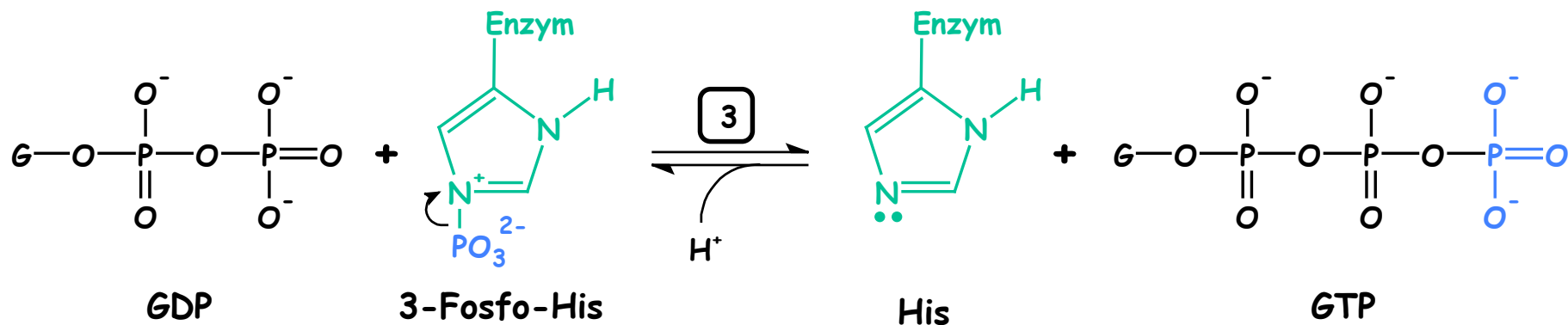
První fáze sukcinyl-CoA syntetasové reakce.



Druhá fáze sukcinyl-CoA syntetasové reakce.



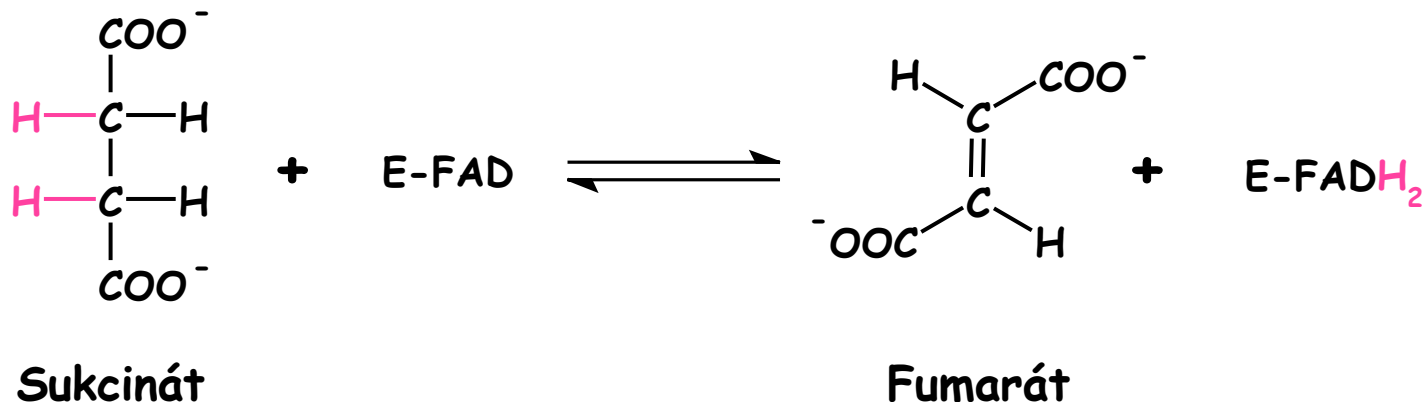
Třetí fáze sukcinyl-CoA syntetasové reakce.



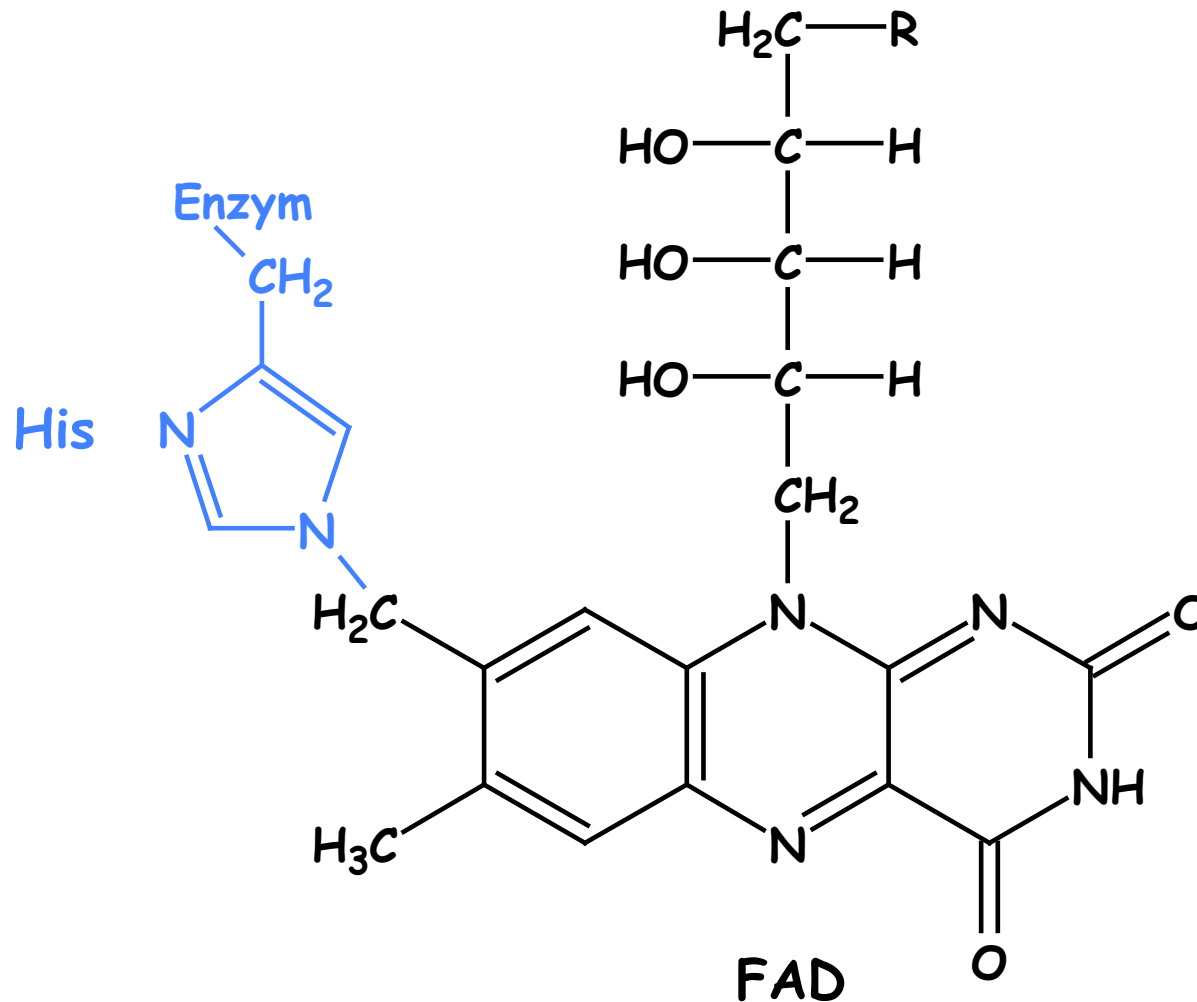
Sukcinátdehydrogenasa

Stereospecifická dehydrogenace sukcinátu na fumarát.

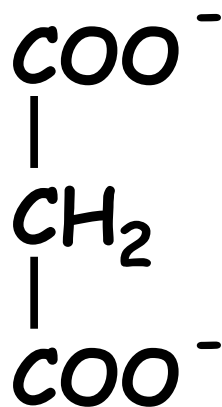
- Enzym je jediným z citrátového cyklu lokalizovaný v mitochondriální membráně a obsahující kovalentně vázaný FAD, který je redukován na FADH_2 .
- FAD se obvykle účastní oxidace alkanů za tvorby alkenů. Pro další katalytický cyklus musí být FADH_2 nejdříve reoxidován. Přenos elektronů je součástí mitochondriálního elektronového transportního řetězce.



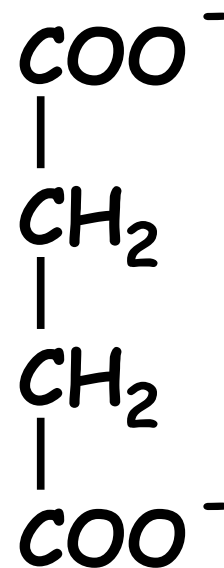
Kovalentní vazba FAD na His sukcinátdehydrogenasy.



Inhibice sukcinátdehydrogenasy substrátovým analogem malonátem
 - jeden z Krebsových příspěvků k objasnění citrátového cyklu.



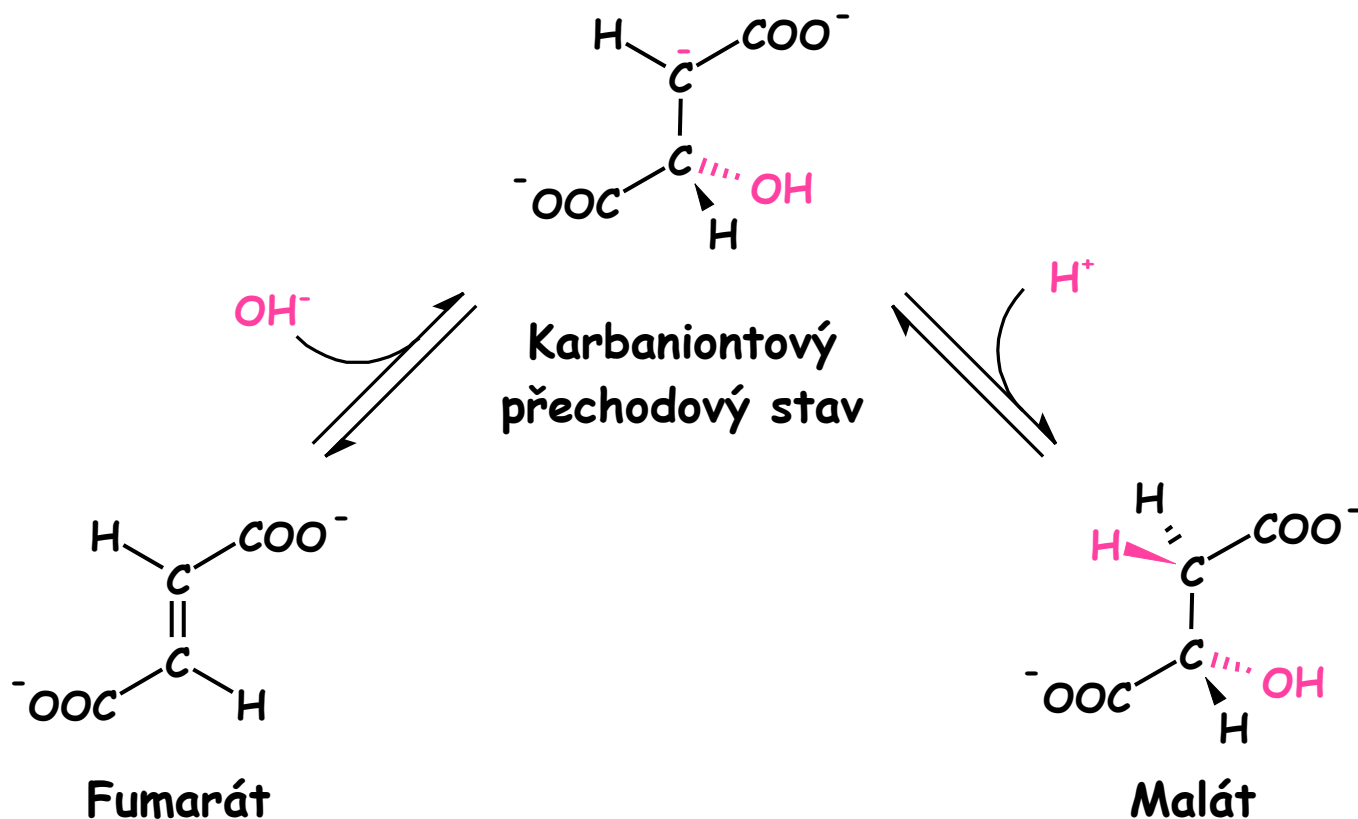
Malonát



Sukcinát

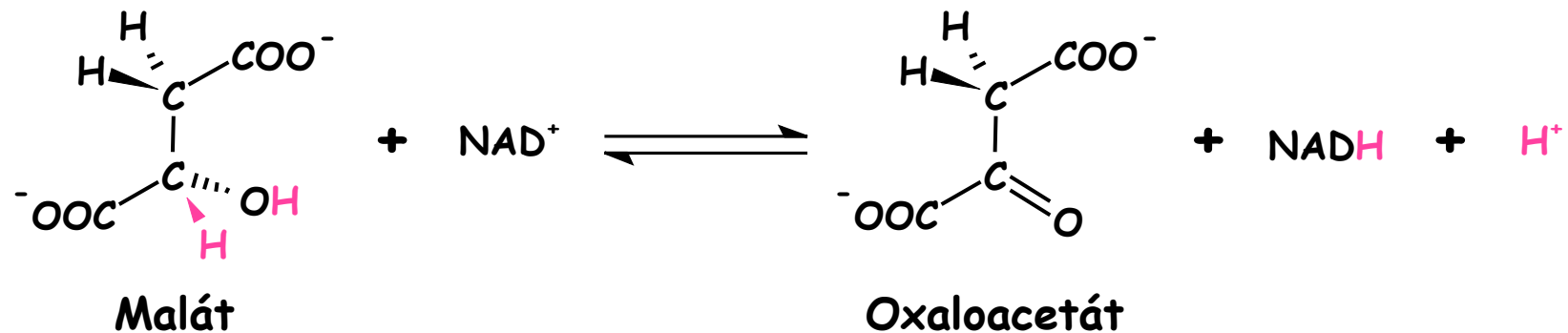
Fumarasa (fumaráthydratasa)

Adice vody na dvojnou vazbu za tvorby malátu. Reakce probíhá přes karbaniontový přechodový stav. Adice OH^- předchází adici H^+ .



Malátdehydrogenasa - regenerace oxaloacetátu

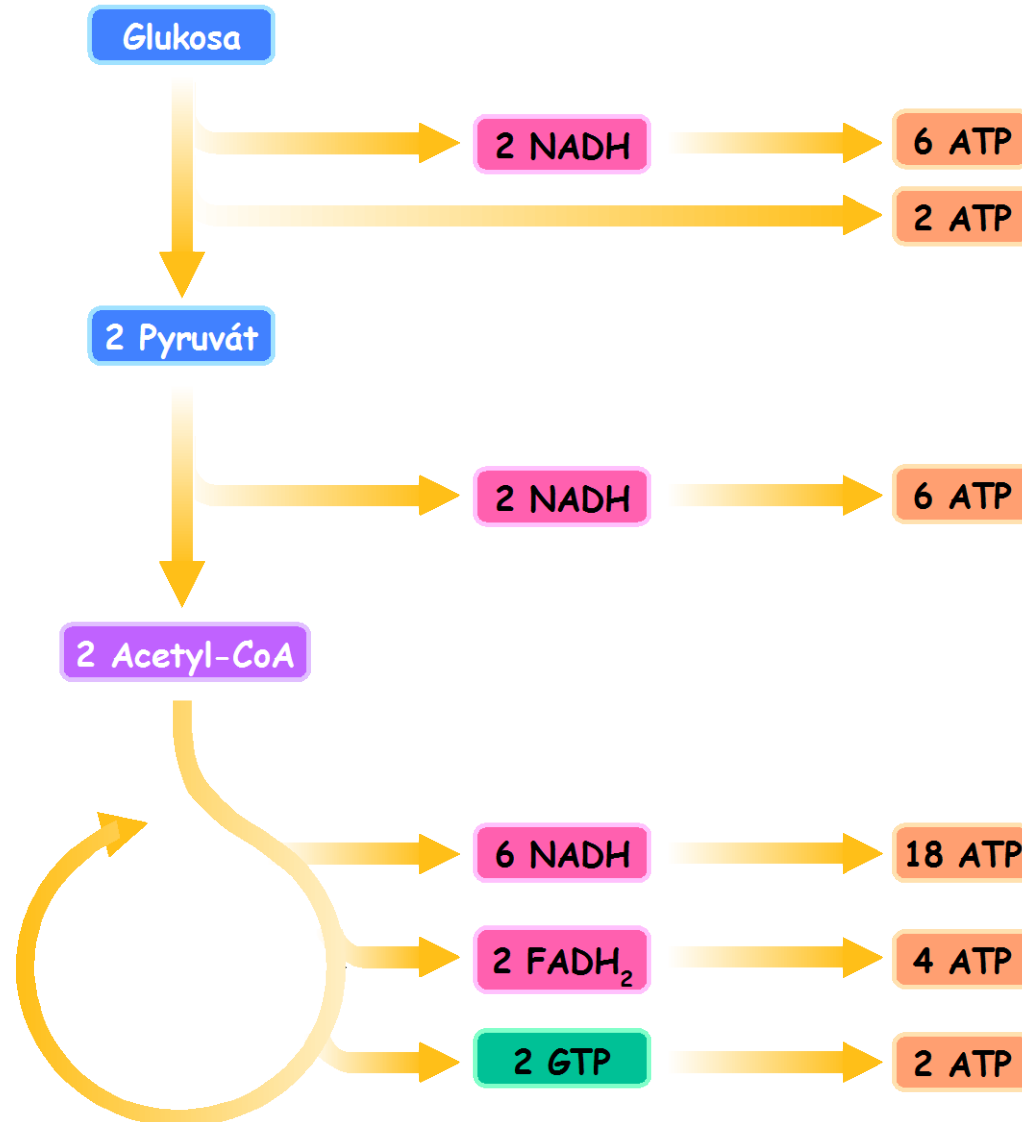
- Mechanismus přenosu hydridového aniontu na NAD^+ je obdobný jako u laktátdehydrogenasy.
- Malátdehydrogenasová reakce má $\Delta G^\circ = + 29,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a proto je koncentrace oxaloacetátu v rovnováze velmi nízká.
- Reakci udržuje odběr oxaloacetátu citrátsynthasou, protože citrátsynthasová reakce má $\Delta G^\circ = - 31,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Regulace citrátového cyklu

- Oxidace jednoho acetylu v jednom cyklu vede ke tvorbě dvou CO_2 (Pozor: to nejsou atomy uhlíku vstupujícího acetyl-CoA) ve 4 x dvouelektronovém procesu.
- Dalším ziskem jsou tři molekuly NADH a jedna FADH_2 a jedno GTP.
- Elektrony z redukovaných koenzymů jsou přeneseny do elektronového transportního řetězce, který vede k redukci O_2 na H_2O a uvolněná energie se zachytí jako ATP.
- Oxidace jednoho NADH vede ke tvorbě tří ATP a oxidace jednoho FADH_2 ke tvorbě dvou ATP.
- Jeden cyklus vede ke tvorbě 12 ATP!!!
- Vyjdeme-li z molekuly glukosy, získáme za aerobních podmínek cca 38 ATP!!!

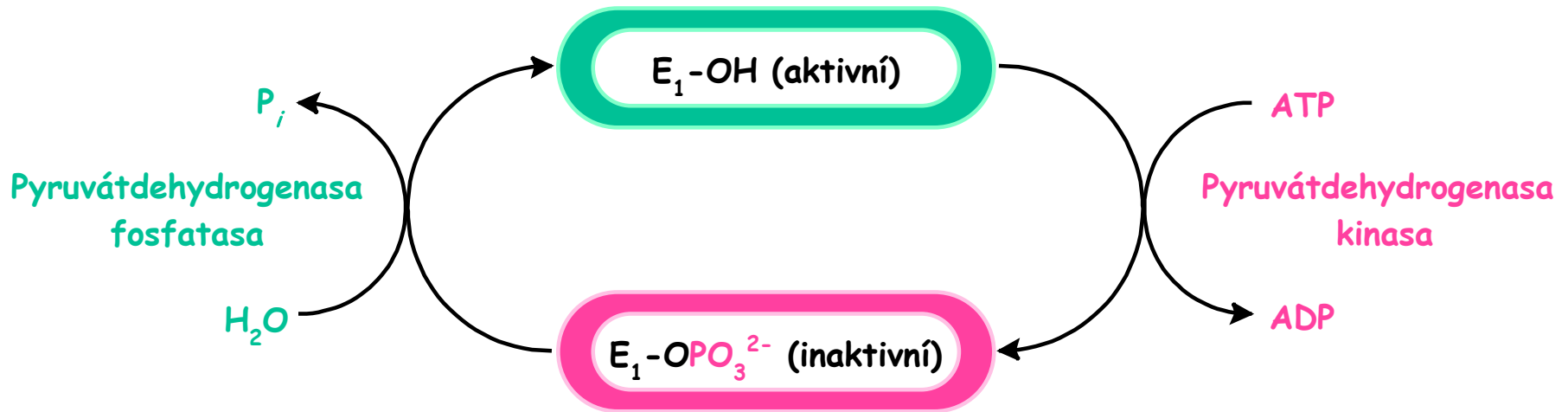
Aerobní zisk ATP z glukosy:



Regulace pyruvátdehydrogenasy

- Pyruvátdehydrogenasa je jediný savčí systém tvorby acetyl CoA z pyruvátu.
- Dva regulační systémy:
 - **A) Inhibice produkty - NADH a acetyl-CoA.**
 - **B) Kovalentní modifikace systémem fosforylace / defosforylace E_1 .**
- A) Vysoké poměry NADH / NAD⁺ a acetyl-CoA / CoA udržují enzym E_2 v acetylovaném stavu, který nepřijímá hydroxyethylovou skupinu - zpomalení pyruvátdehydrogenasy.
- B) U eukaryot produkty jako NADH a acetyl CoA, aktivují pyruvátdehydrogenasakinasu. Výsledná fosforylace specifického Ser vede k inaktivaci pyruvátdehydrogenasy. Insulin, signál dostatku glukosy, aktivuje pyruvátdehydrogenasafosfatasu a tím enzym aktivuje.

Aktivace a deaktivace pyruvátdehydrogenasy defosforylací a fosforylací.



Enzymy kontroly rychlosti citrátového cyklu:

- Změna standardní volné energie (ΔG°) a fyziologická změna volné energie (ΔG) reakcí citrátového cyklu.

	Reakce Enzym	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)
• 1	Citrátsynthasa	- 31, 5	Negativní
• 2	Akonitasa	~ 5	~ 0
• 3	Isocitátdehydrogenasa	- 21	Negativní
• 4	2-Oxoglutarátdehydrogenasa	- 33	Negativní
•	multienzymový komplex		
• 5	Sukcynyl CoAsynthetasa	- 2, 1	~ 0
• 6	Sukcinátdehydrogenasa	+ 6, 0	~ 0
• 7	Fumarasa	- 3, 4	~ 0
• 8	Malátdehydrogenasa	+ 29, 7	~ 0

Regulace citrátového cyklu

- Identifikace rychlost limitujících pochodů *CC* je obtížná, protože neznáme přesné koncentrace substrátů a produktů, které se pohybují mezi matrix a cytosolem.
- Tři enzymy *CC* jsou za fyziologických podmínek mimo rovnováhu:
 - 1) citrátsynthasa
 - 2) NAD^+ -dependentní isocitrátdehydrogenasa
 - 3) 2-oxoglutarátdehydrogenasa.
- V srdečním svalu je průtok metabolitů *CC* závislý na spotřebě kyslíku.
- Citrátový cyklus je kontrolován:
 - A) Dostupností substrátů
 - B) Inhibicí produkty.
 - C) Kompetitivní zpětnovazebnou inhibicí meziprodukty cyklu.

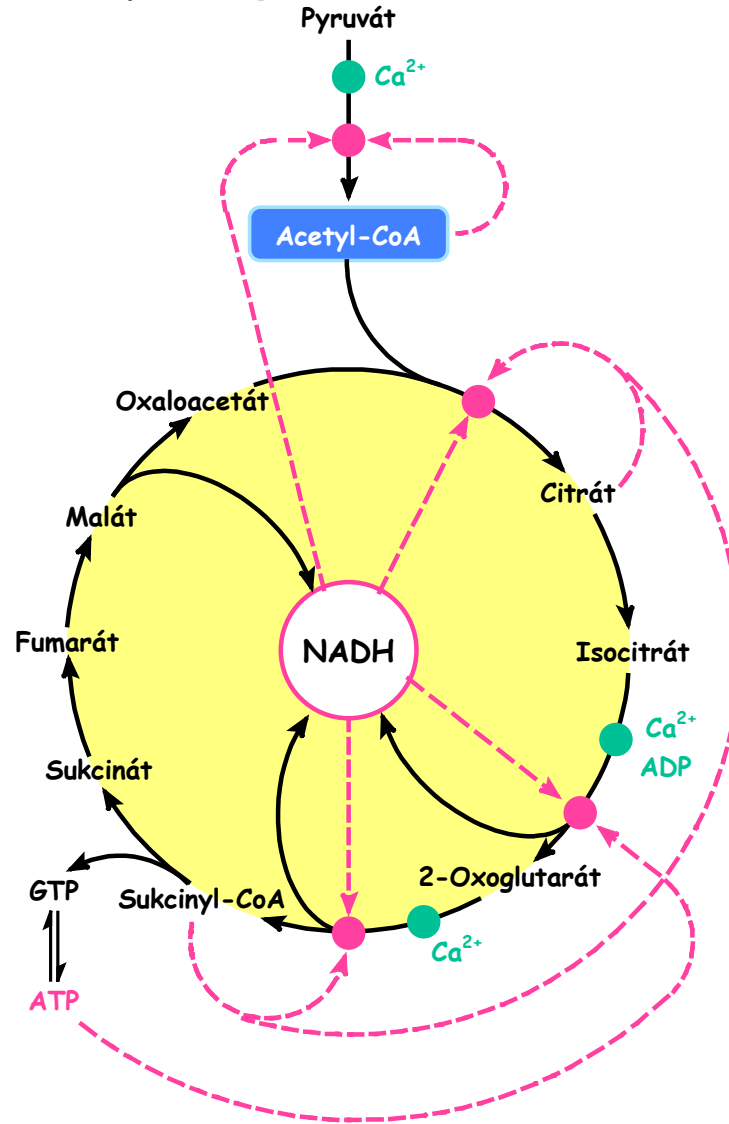
Regulace citrátového cyklu

- Acetyl CoA a oxaloacetát jako hlavní substráty jsou přítomny v matrix v nízkých koncentracích, které nesaturují citrátsynthasu.
- Metabolický tok přes citrátsynthasu závisí na dostupnosti substrátů.
- Koncentrace oxaloacetátu, který je v rovnováze s malátem se pohybuje v závislosti na $[NADH] / [NAD^+]$ dle rovnice:

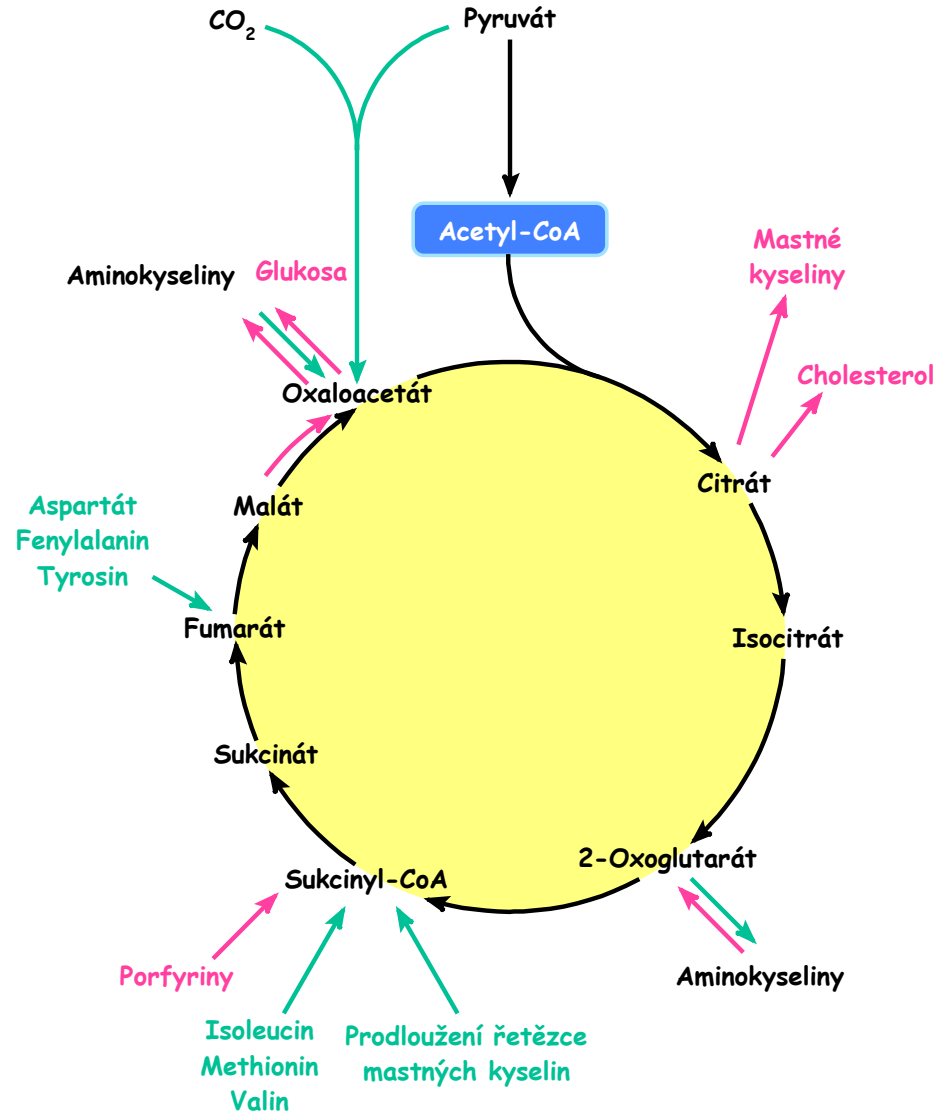
$$K = [\text{oxaloacetát}] \cdot [NADH] / [\text{malát}] \cdot [NAD^+]$$

- Znamená to, že v pracujícím svalu při zvyšující se respiraci klesá současně $[NADH]$ v mitochondrii. To doprovází vzrůst $[oxaloacetátu]$, který stimuluje citrátsynthasu.

Další momenty regulace citrátového cyklu:



Amfibolické funkce citrátového cyklu:

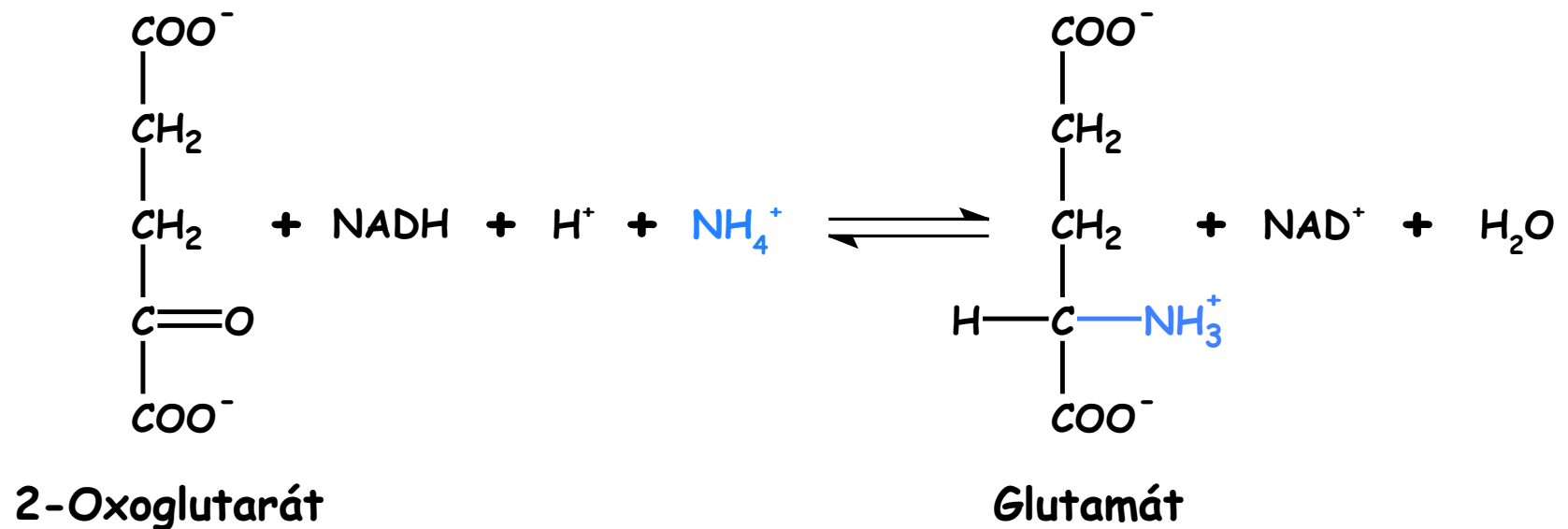


Kataplerotické reakce

- dráhy využívající meziprodukty citrátového cyklu.

- 1. Glukoneogeneze - oxaloacetát k syntéze glukosy. Oxaloacetát musí být transportován do cytosolu, kde glukoneogeneze probíhá. Vstupuje tam ve formě malátu nebo aspartátu. Vzhledem k cyklickému charakteru CC, může být takto využít k syntéze glukosy každý meziprodukt.
- 2. Biosyntéza mastných kyselin - probíhá v cytosolu. Acetyl CoA je do cytosolu transportován ve formě citrátu.
- V cytosolu je ATP-citrátlyasa která katalyzuje reakci:
$$\text{ATP} + \text{citrát} + \text{CoA} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + \text{oxaloacetát} + \text{acetyl CoA}.$$
- 3. Biosyntéza aminokyselin - 2-oxoglutarát přechází na Glu a oxaloacetát na Asp.

Glutamátdehydrogenasová reakce tvorby glutamátu:



Anaplerotické reakce

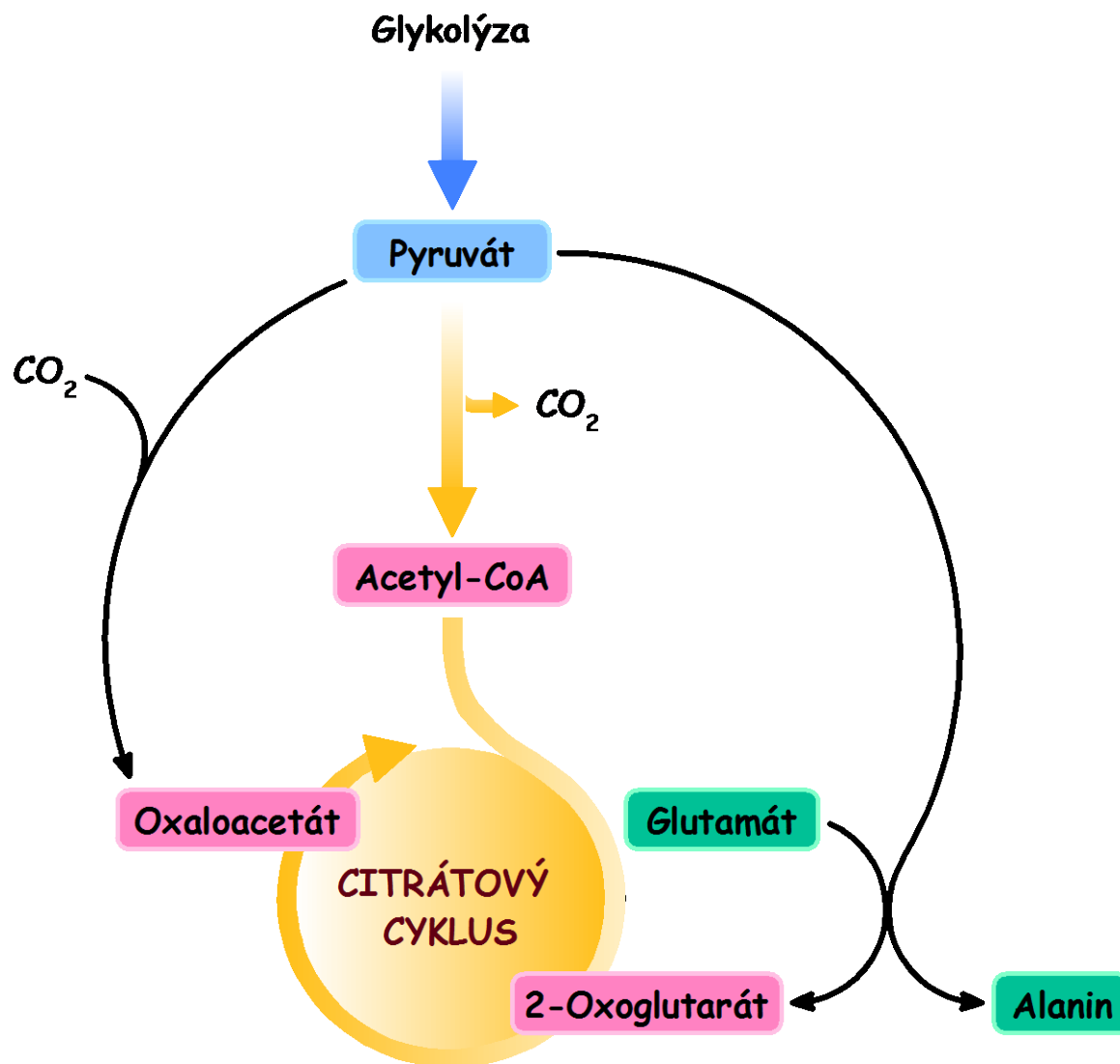
- doplňující meziprodukty citrátového cyklu.

- Nejdůležitější anaplerotickou reakcí je pyruvátkarboxylasová:

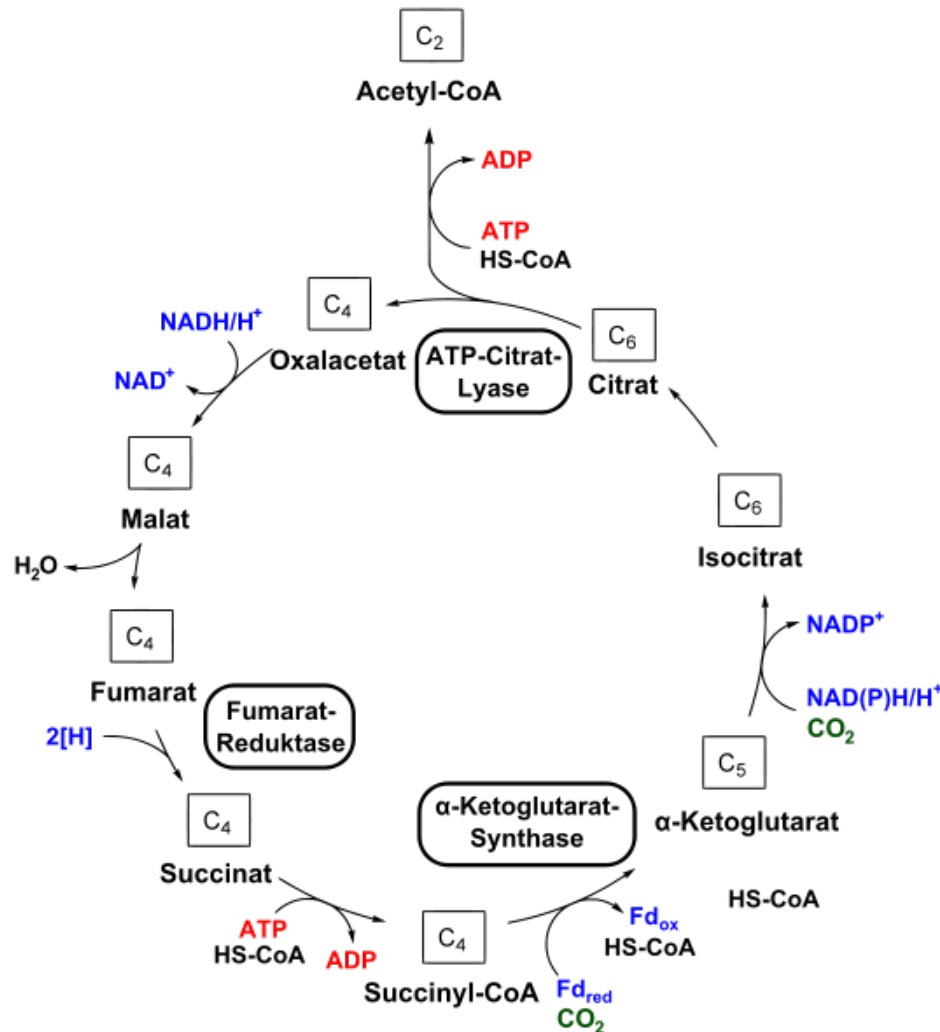


- Reakce je také prvním stupněm glukoneogeneze.
- Pyruvátkarboxylasu aktivuje acetyl CoA.
- Další anaplerotickou látkou je sukcinyl-CoA, který se tvoří při odbourávání mastných kyselin s lichým počtem uhlíků a některých aminokyselin.
- Dále 2-oxoglutarát a oxaloacetát vznikající reverzibilní transaminací Glu a Asp.

Anaplerotické reakce citrátového cyklu:



Reverzní citrátový cyklus. Některé bakterie produkují uhlíkaté stavební jednotky z vody a CO_2 . Jedna z forem fixace CO_2 .



Glyoxylátový cyklus

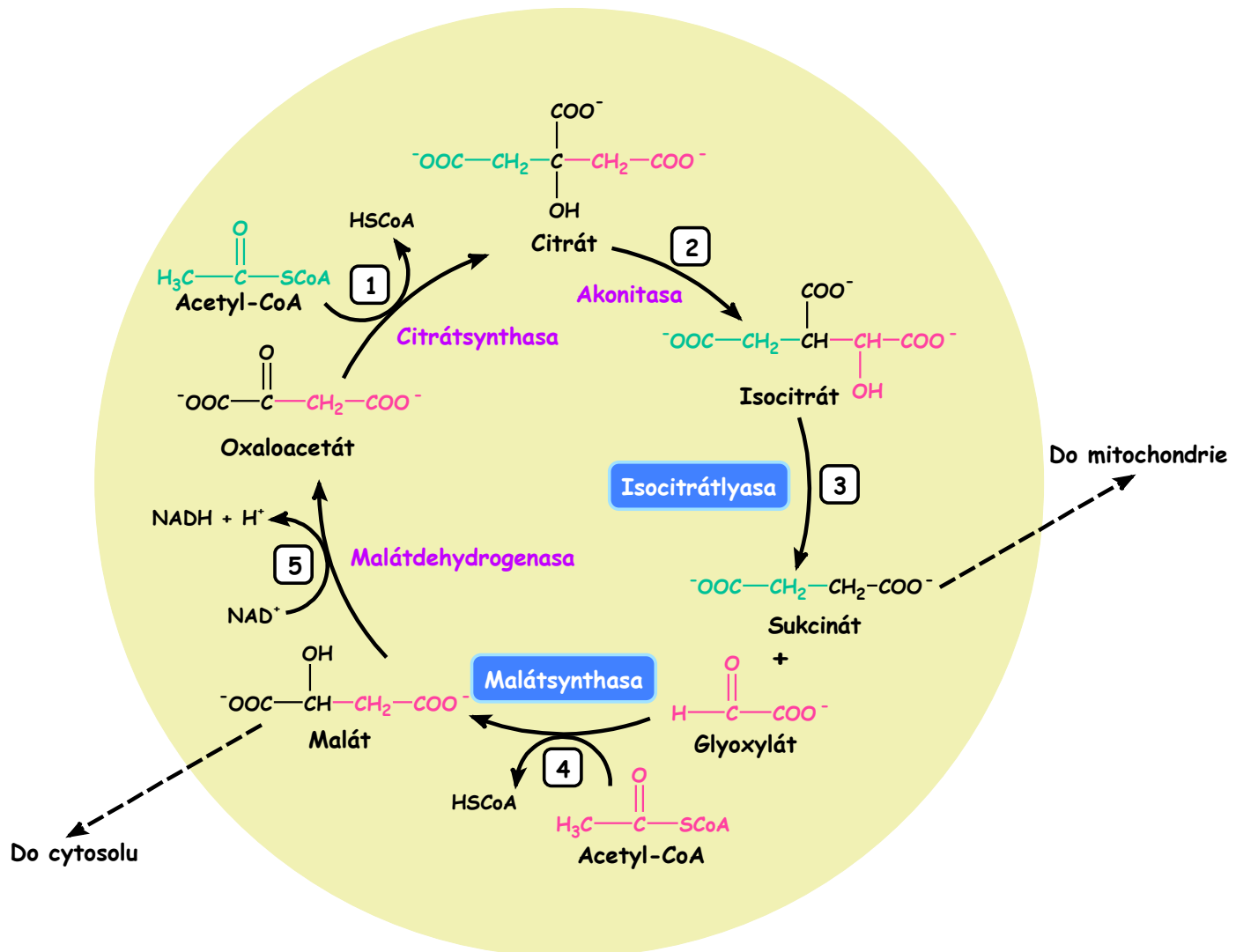
Rostliny, bakterie a plísně obsahují enzymy, které katalyzují konverzi acetyl-CoA na oxaloacetát.

- Glyoxylátový cyklus probíhá v glyoxysomech a mitochondriích. Glyoxysomy jsou na membránu vázané organely, specializované peroxisomy.
- Řada enzymů je společných s citrátovým cyklem.
- Navíc: glyoxysomální **isocitrátlyasa a malátsynthasa**.
- Výsledkem glyoxylátového cyklu je převod dvou molekul acetyl CoA na sukcinát, kdežto v citrátovém cyklu se uhlíky acetyl CoA uvolňují jako CO_2 .
- Vytvořený sukcinát je transportován do mitochondrie - do CC a převeden na malát- anaplerotická reakce !!
- Malát může být převeden na oxaloacetát, nebo transportován do cytosolu a tam převeden na oxaloacetát jako prekurzor glukosy v glukoneogenezi.

Reakce glyoxylátového cyklu v glyoxysomech:

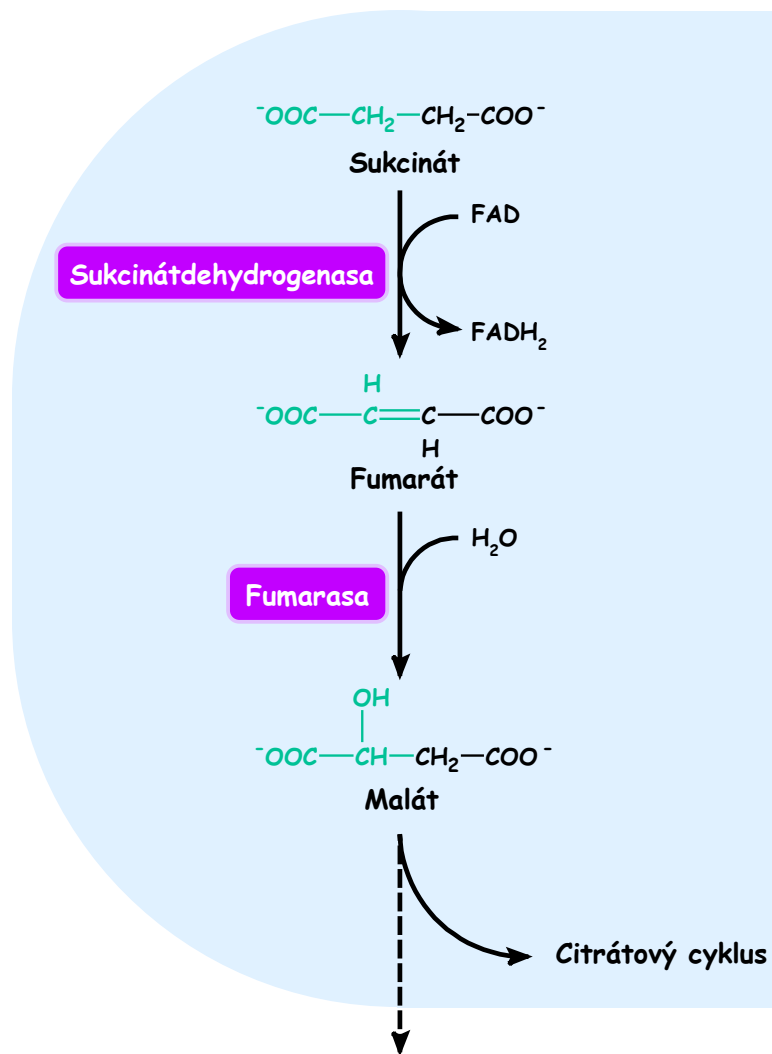
GLYOXYSOM

CYTOSOL

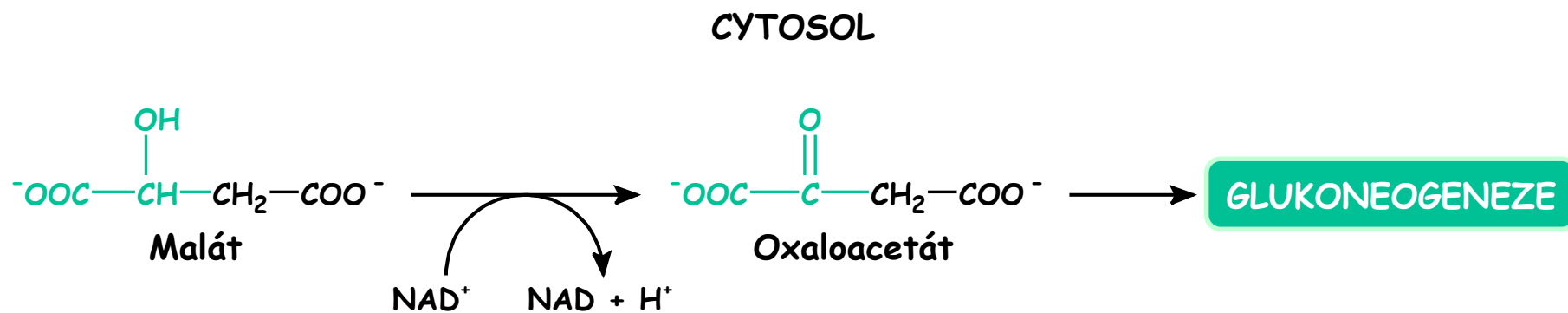


Část glyoxylátového cyklu v mitochondrii:

MITOCHONDRIE

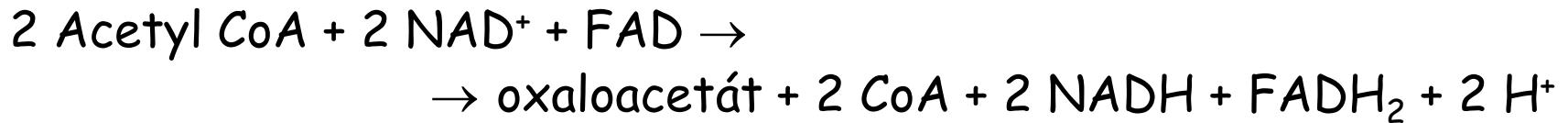


Dráha malátu v cytosolu:



Význam glyoxylátového cyklu.

- Celková reakce glyoxylátového cyklu:



- Isocitrátlyasa a malátsynthasa existují jen u rostlin a některých mikroorganismů.
- Umožňují klíčovým rostlinám využívat skladované triacylglyceroly.
- Jedná se o anaplerotickou reakci !! Vnáší oxaloacetát do citrátového cyklu.
- Patogen, jako *Mycobacterium tuberculosis* přežívá v plicích aniž by bylo odhaleno imunitním systémem. Využívá glyoxylátový cyklus. Možnost zásahu - inhibice isocitrátlyasy. Obdobně kvasinka *Candida albicans*.

Elektronový transport a oxidativní fosforylace

- Mitochondrie
- Elektronový transport
- Oxidativní fosforylace
- Kontrolní systém oxidativního metabolismu.

- Moto:
- Odpočívající lidské tělo spotřebuje asi 420 kJ energie za hodinu, což odpovídá spotřebě 100 W žárovky.

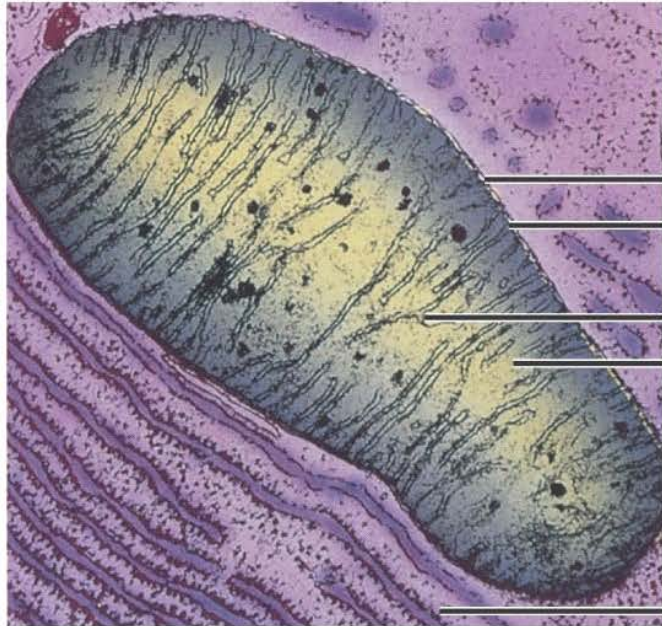
- Energie se získává elektrochemicky v mitochondriích při napětí 0,2 V (v el. síti 220 V), ale proud odpovídá 500 Amp, což reprezentuje transmembránový pohyb přibližně 3×10^{21} protonů za sekundu. Tento pohyb vede k tvorbě ATP.

Mitochondrie

- Mitochondrie jsou místem eukaryotního oxidačního metabolismu.
- Mitochondrie obsahují:

Pyruvátdehydrogenasu, enzymy citrátového cyklu, enzymy katabolismu mastných kyselin a enzymy, spolu s proteiny, elektronového transportního řetězce a oxidativní fosforylace.

Mitochondrie



Vnější membrána

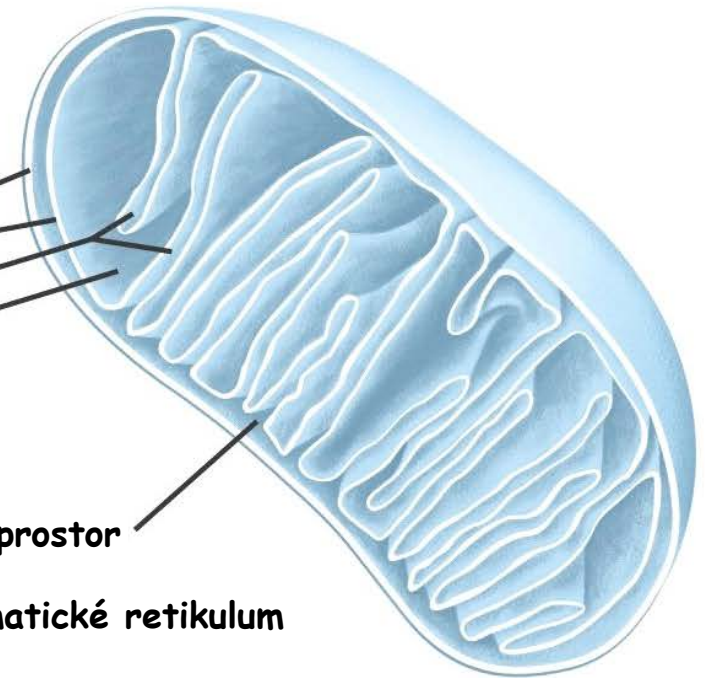
Vnitřní membrána

Kristy

Matrix

Mezimembránový prostor

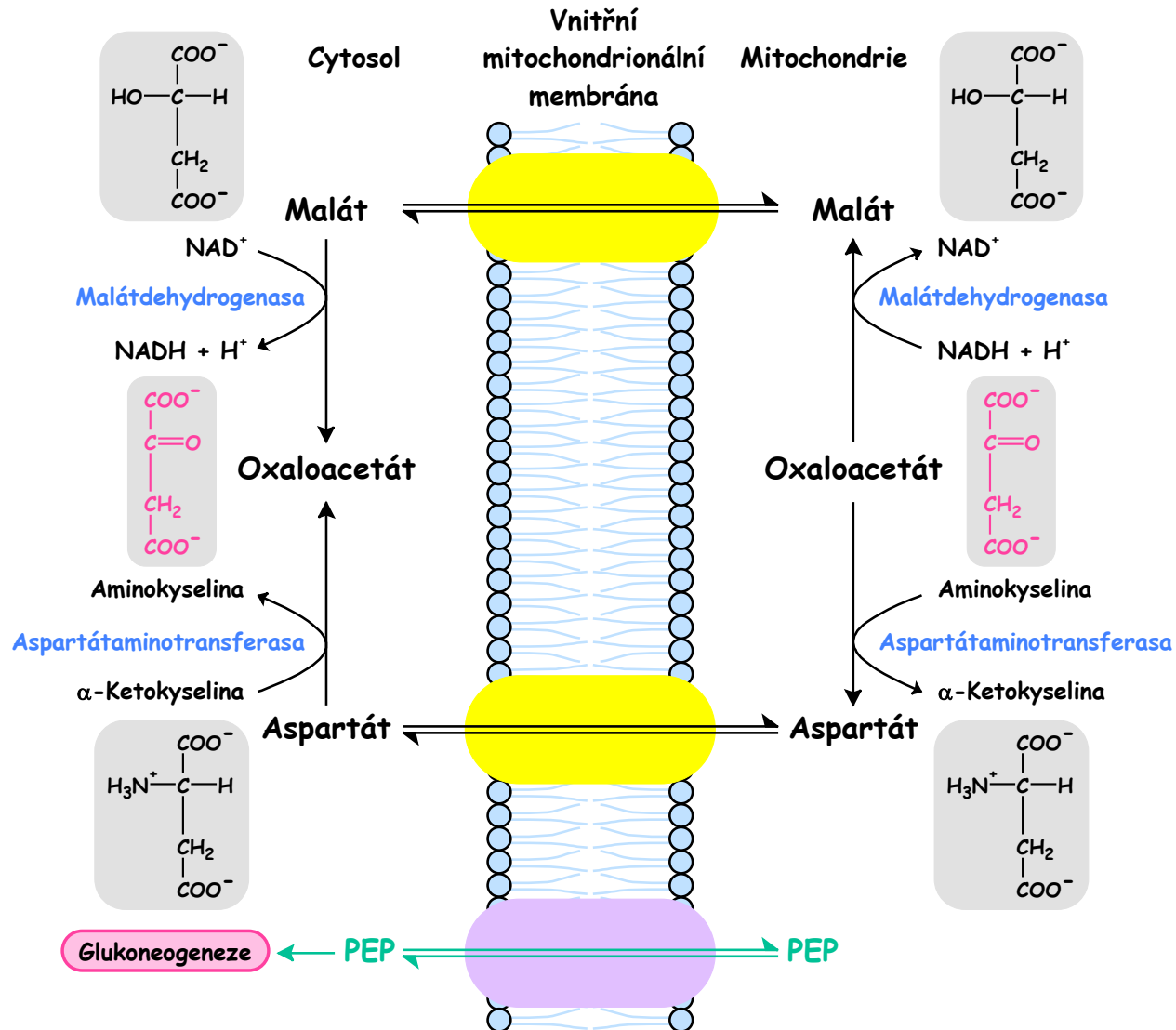
Drsné endoplazmatické retikulum



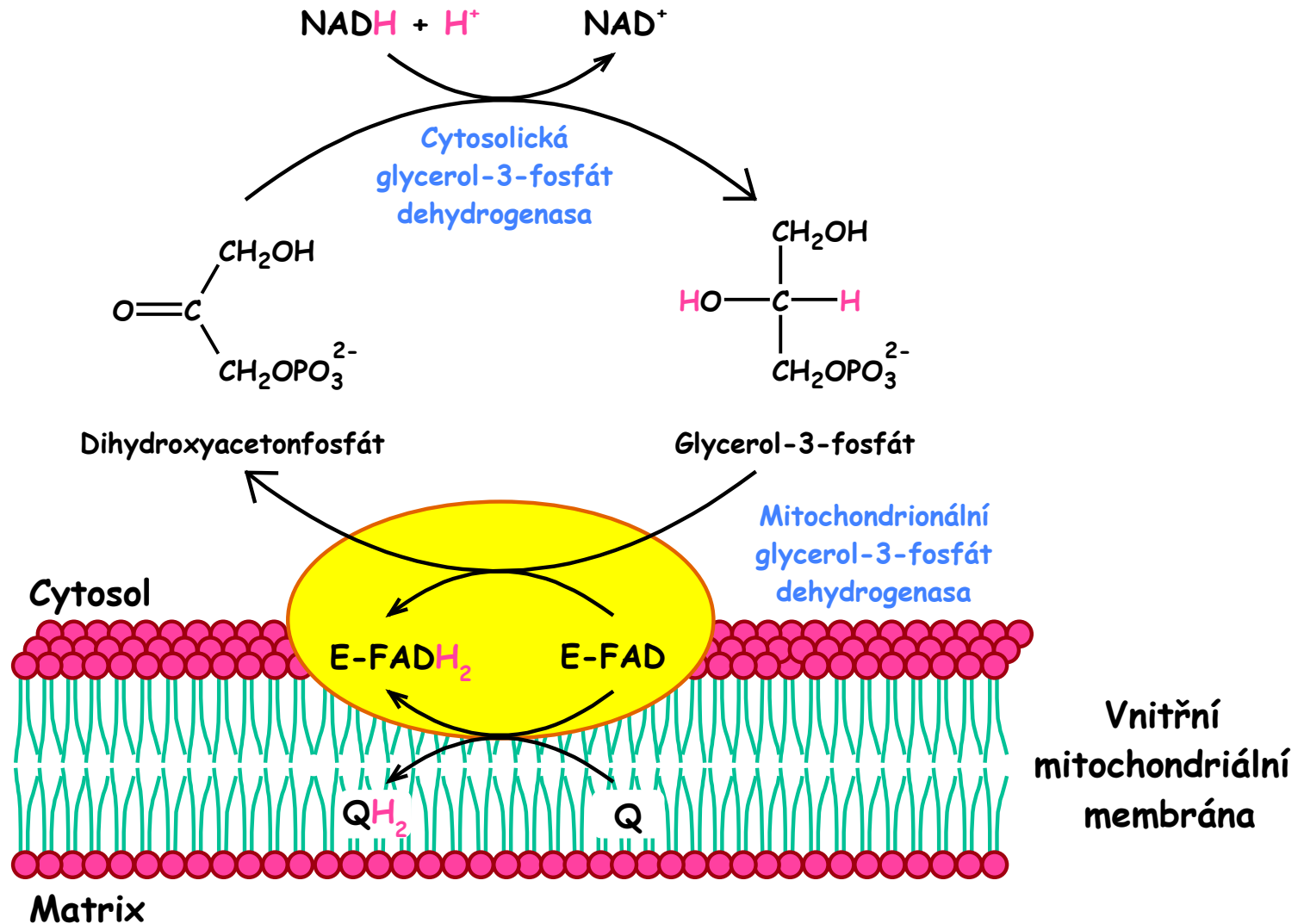
Mitochondriální transportní systém

- Vnější mitochondriální membrána, stejně jako bakteriální, obsahuje poriny, proteiny, které dovolují volnou difúzi molekul do 10 kD. Je tedy ekvivalentní s cytosolem.
- Vnitřní membrána, která je hmotnostně složena ze 75 % z proteinů, volně propouští O_2 , CO_2 a H_2O . Jinak obsahuje řadu transportních proteinů, které kontrolují průchod metabolitů jako jsou ATP, ADP, pyruvát, Ca^{2+} a fosfát.
- Redukované ekvivalenty (NADH) se transportují z cytosolu do mitochondrie, buď malát-aspartátovým člunkem nebo glycerol-3-fosfátovým člunkem.
- NADH transportované malát-aspartátovým člunkem poskytuje po oxidaci jen 2 ATP.

Malát-aspartátový člunek:



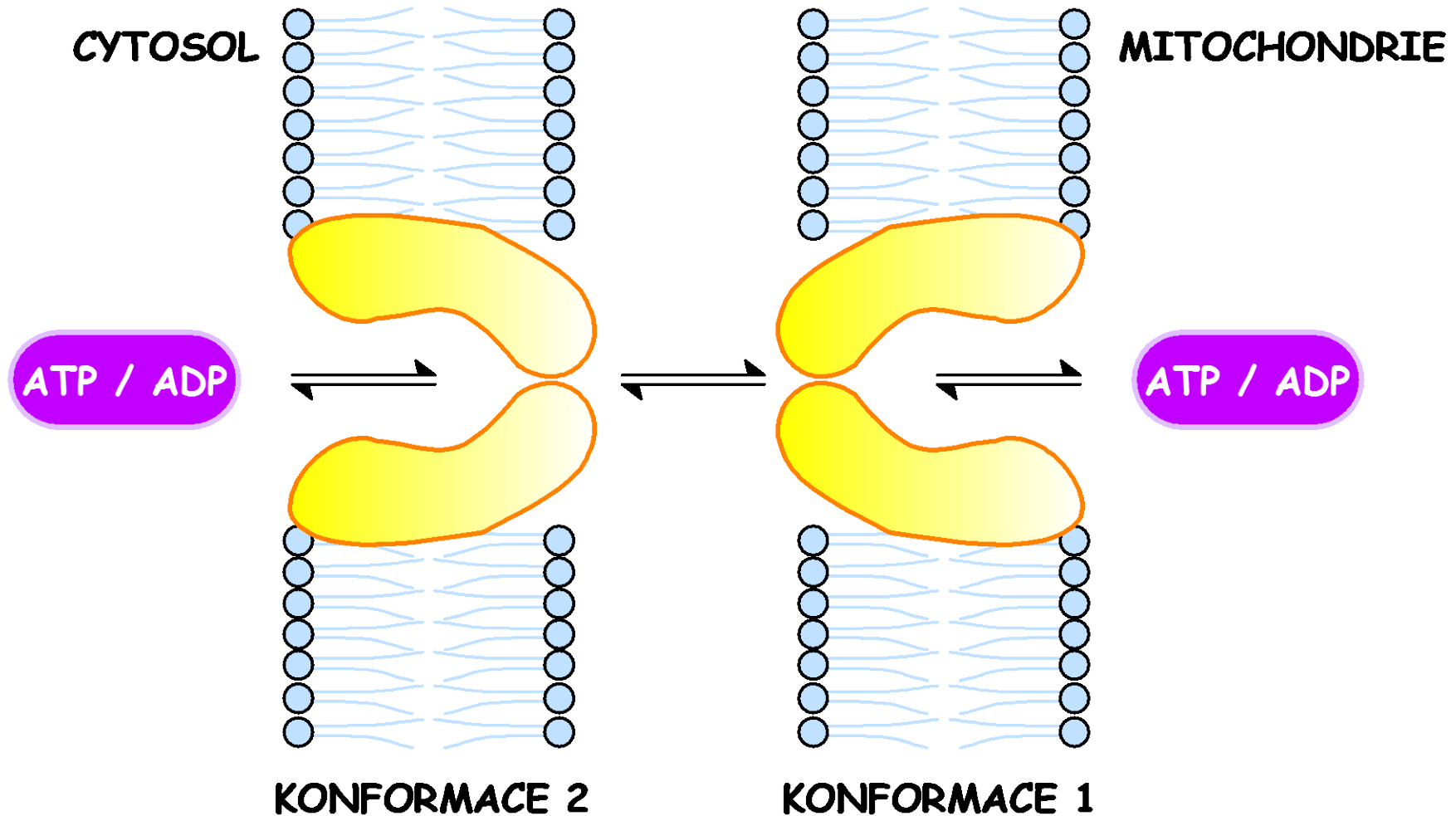
Glycerol-3-fosfátový člunek:



Translokátor ADP - ATP

- Většina v mitochondrii vytvořeného ATP se využívá v cytoplasmě.
- Vnitřní mitochondriální membrána obsahuje ADP-ATP translokátor transportující ATP do cytosolu a ADP z cytosolu do mitochondrie.
- Translokátor je dimer identických 30 kD podjednotek s jedním vazebným místem pro ADP i ATP, které vzájemně kompetují.
- Translokátor mění konformaci při vazbě buď ADP nebo ATP.
- Export ATP (4 záporné náboje) proti importu ADP (3 záporné náboje) je elektrogenní antiport poháněný rozdílem membránového potenciálu.

Konformační změny ADP-ATP translokátoru



Transport fosfátů

- K syntéze ATP z ADP a P_i je nutné transportovat fosfát z cytosolu do mitochondrie.
- Fosfátový nosič - lze charakterizovat jako elektrochemický P_i -H symport poháněný rozdílem (ΔpH) (transmembránový protonový gradient).
- Vytvořený transmembránový protonový gradient nevede pouze k syntéze ATP, ale také k transportu ADP a P_i .

Elektronový transport. Termodynamika.

- Elektronové nosiče přenášející elektrony z NADH a FADH₂ na kyslík jsou lokalizovány ve vnitřní mitochondriální membráně.
- Oxidace NADH je silně exergonická. Měřítkem afinity substrátu k elektronům je standardní redukční potenciál ($\xi^{\circ'}$). Čím vyšší hodnota, tím větší afinita k elektronům.
- Poloreakce oxidace NADH kyslíkem jsou:
- $\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2 e^- \rightarrow \text{NADH}$ $\xi^{\circ'} = -0,315 \text{ V}$
- $\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 e^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ $\xi^{\circ'} = 0,815 \text{ V}$
- NADH je donor elektronů, O₂ akceptor.
- Celková reakce: $\frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$

$$\Delta \xi^{\circ'} = 0,815 \text{ V} - (-0,315 \text{ V}) = 1,130 \text{ V} !!!$$

- Oxidace NADH poskytuje $\Delta G^{\circ} = - 218 \text{ kJ.mol}^{-1}$ volné energie.
- K syntéze jednoho molu ATP z ADP a P_i je třeba $30,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$.
- Energetický rozdíl $\Delta G^{\circ} = - 218 \text{ kJ.mol}^{-1}$ nelze přímo převést na několik ATP.
- Ve vnitřní mitochondriální membráně je soustava tří proteinových komplexů přes které putují elektrony z NADH ke kyslíku.
- Celková volná energie je tak rozdělena na tři menší části z nichž každá se podílí na tvorbě ATP oxidativní fosforylací. Oxidace NADH poskytne přibližně 3 ATP.
- Termodynamická efektivita za standardních biochemických podmínek je 42 %. ($3 \times 30,5 \text{ kJ.mol}^{-1} \times 100 / 218 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

Komplexy sekvence elektronového transportu

- Komplexy jsou řazeny podle vzrůstajícího redukčního potenciálu.
- **Komplex I:** Katalyzuje oxidaci NADH koenzymem Q (CoQ).

$$\text{NADH} + \text{CoQ (oxidovaný)} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQ (redukovaný)}$$

$$\Delta \xi^{\circ'} = 0,360 \text{ V}; \Delta G^{\circ'} = -69,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$
- **Komplex III:** Katalyzuje oxidaci CoQ (red.) cytochromem c.

$$\text{CoQ (redukovaný)} + 2 \text{ cytochrom c (oxidovaný)} \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{CoQ (oxidovaný)} + 2 \text{ cytochrom c (redukovaný)}$$

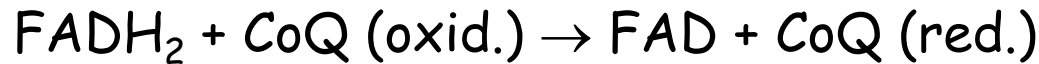
$$\Delta \xi^{\circ'} = 0,190 \text{ V}; \Delta G^{\circ'} = -36,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$
- **Komplex IV:** Katalyzuje oxidaci redukovaného cytochromu c kyslíkem - terminálním akceptorem elektronů.

$$2 \text{ cytochrom c (red.)} + \frac{1}{2} \text{ O}_2 \rightarrow 2 \text{ cytochrom c (oxid.)} + \text{H}_2\text{O}$$

$$\Delta \xi^{\circ'} = 0,580 \text{ V}; \Delta G^{\circ'} = -112 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}.$$

Komplex II.

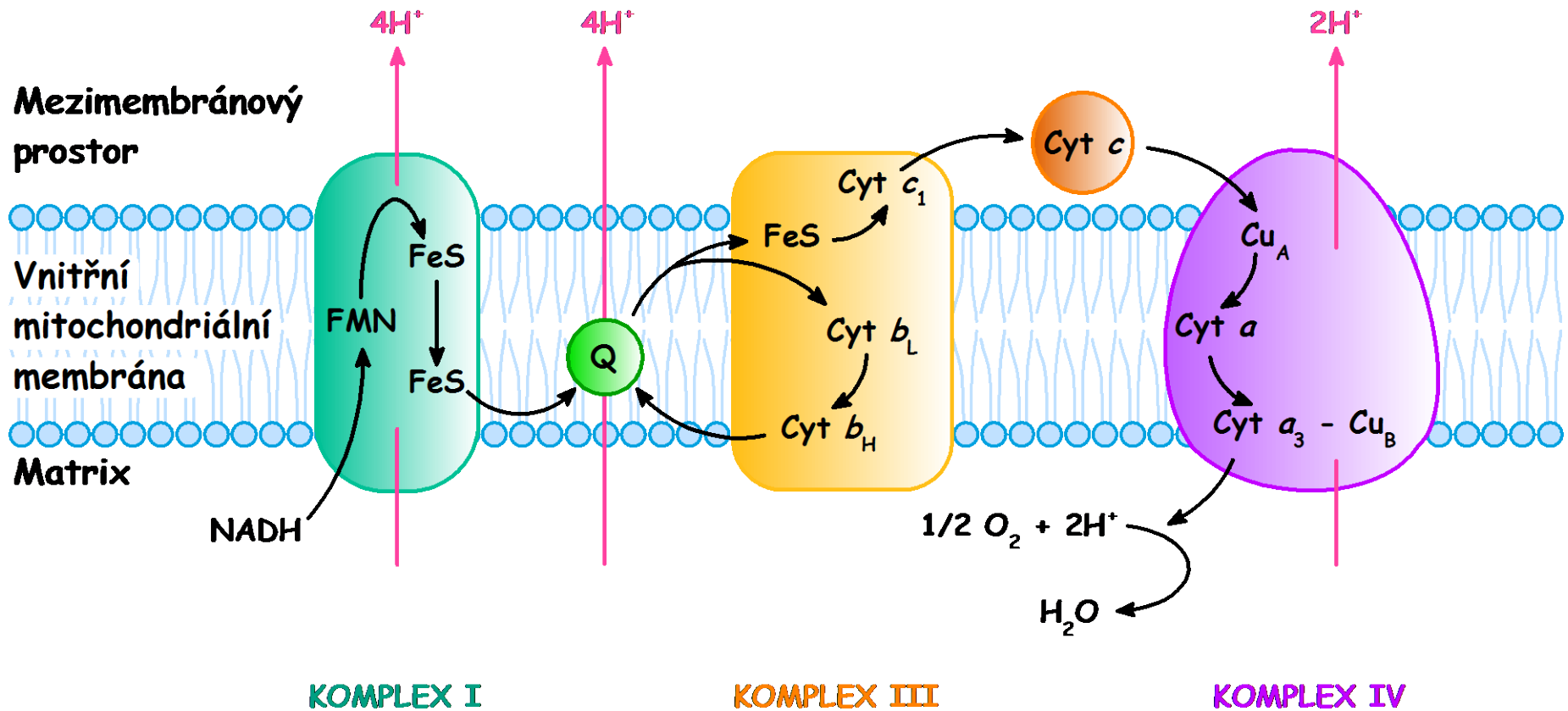
- **Komplex II:** Katalyzuje oxidaci FADH_2 koenzymem Q.



$$\Delta \xi^{\circ} = 0,085 \text{ V}; \Delta G^{\circ} = -16,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

- Redoxní reakce neposkytuje dostatečné množství energie pro tvorbu ATP. Funkcí je, pouze předávat elektrony z FADH_2 do elektronového transportního řetězce.
- **Inhibitory blokuující elektronový transportní řetězec:**
 - Rotenon - rostlinný toxin používaný indiány na Amazonce k lovu ryb, také insekticid)
 - Amytal - barbiturát.
 - Antimycin - antibiotikum.
 - Proč lze inhibici rotenonem zrušit přidávkem sukcinátu??

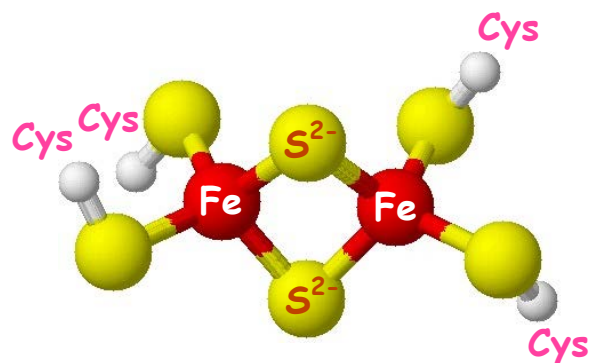
Mitochondriální elektronový transport



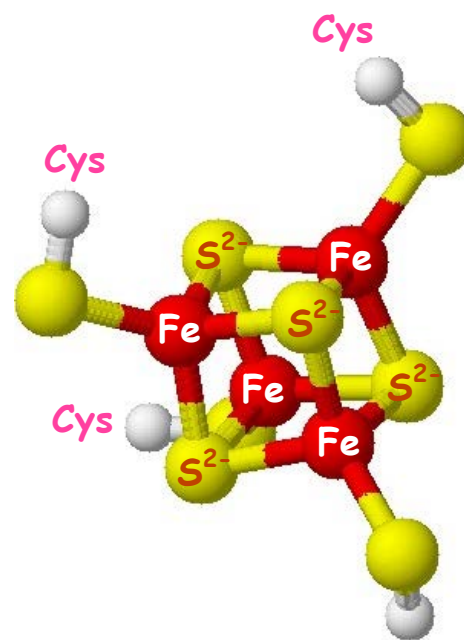
Komplex I - NADH - koenzym Q oxidoreduktasa

- Komplex I je největší protein v mitochondriální membráně - 43 podjednotek o celkové hmotnosti 900 kD.
- Komplex I obsahuje jednu molekulu FMN a 6 až 7 komplexů (klastřů) železo-síra.
- Klastry jsou prostetickými skupinami proteinů železo-síra nebo jinak **nehemové proteiny**.
- FMN je pevně vázaný na proteiny; zatímco CoQ je, díky svému hydrofobnímu isoprenoidnímu řetězci, volně pohyblivý v lipidové dvojvrstvě membrány.
- U savců obsahuje řetězec 10 C₅ isoprenoidních jednotek (Q₁₀).
U některých organismů je kratší - 6 nebo 8 jednotek.

Klastry železo-síra. Přejchod elektronů mezi Fe^{2+} a Fe^{3+} .

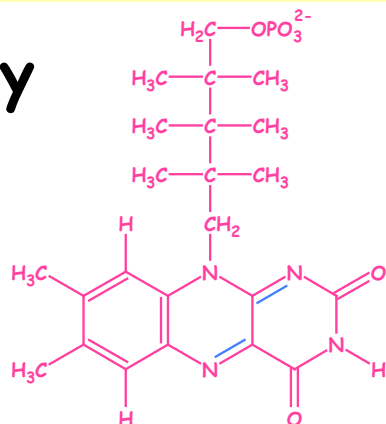


[2Fe-2S]

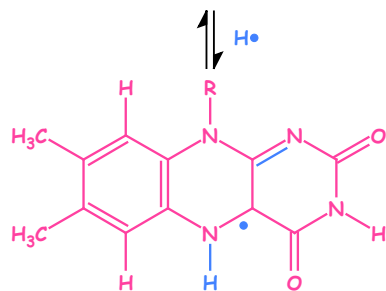


[4Fe-4S] Cys

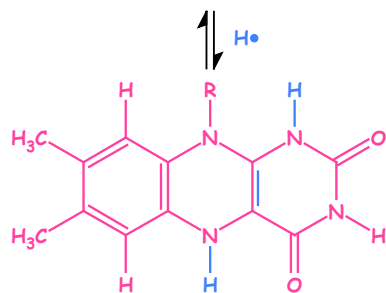
Oxidační stavy



Flavinmononukleotid (FMN)
(oxidovaná nebo chinonová forma)

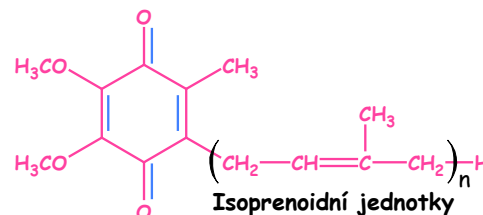


FAMNH• (radikálová nebo semichinonová forma)

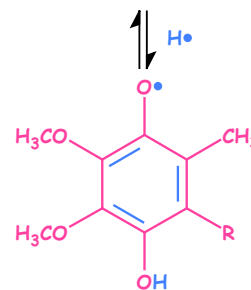


FMNH₂ (redukována nebo hydrochinonová forma)

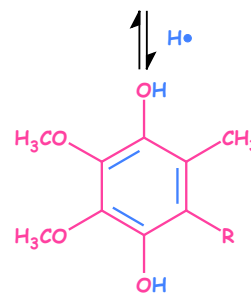
FMN a koenzymu Q (CoQ):



Koenzym Q (CoQ) nebo ubichinon
(oxidovaná nebo chinonová forma)



Koenzym QH• nebo ubisemichinon
(radikálová nebo semichinonová forma)



Koenzym QH₂ nebo ubichinol
(redukována nebo hydrochinonová forma)

Přenos elektronů a translokace protonů v komplexu I.

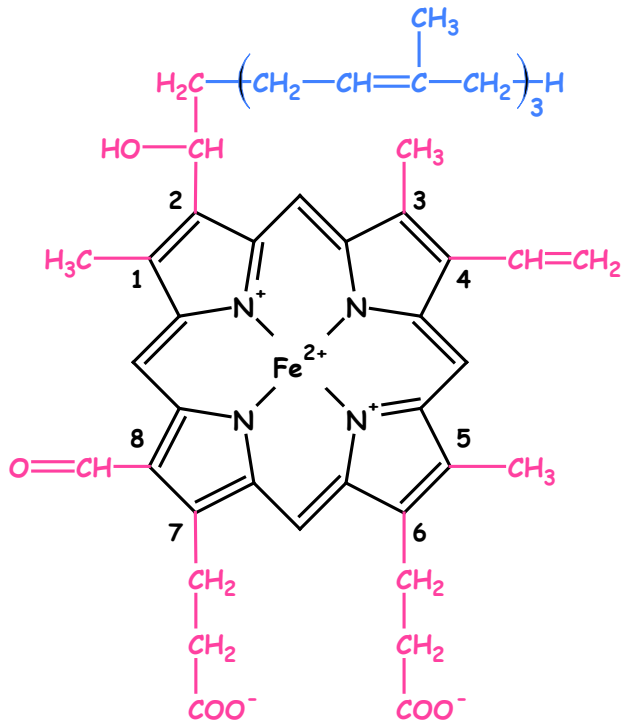
- Tok elektronů z NADH na CoQ probíhá stupňovitě mezi redox centry.
- NADH se účastní vždy jen dvouelektronové výměny. FMN a CoQ mohou přenášet jak dva, tak jeden elektron a proto tvoří elektronovou spojku mezi dvouelektronovým NADH a jednoelektronovými akceptory - **cytochromy**.
- Při toku elektronů mezi redox centry komplexu I jsou transportovány čtyři protony z matrix do mezimembránového prostoru.

Komplex II (sukcinát-koenzym Q oxidoreduktasa).

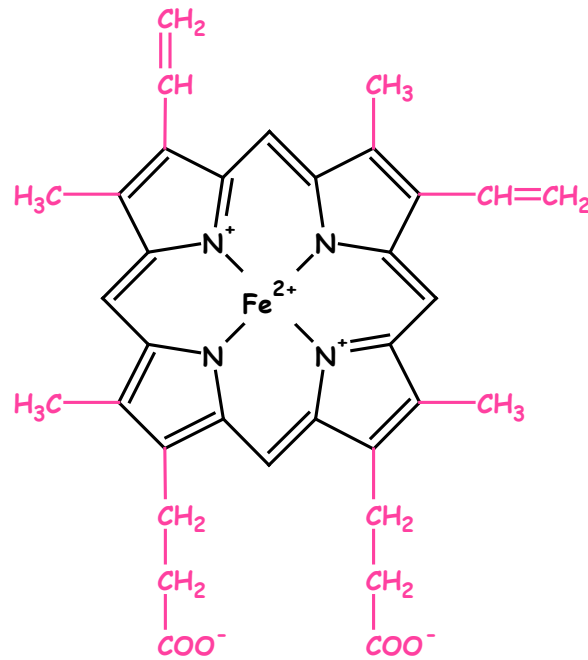
- Komplex II obsahuje enzym citrátového cyklu - sukcinátdehydrogenasu. Přenáší elektrony z FADH_2 na CoQ.
- Komplex II obsahuje sukcinátdehydrogenasu s kovalentně vázaným FAD, několik klastrů Fe-S a jeden cytochrom b_{560} .
- Komplex I a II nejsou v sérii.
- Komplex II přenáší elektrony z sukcinátu na CoQ.
- CoQ je mobilní sběrač elektronů.
- Cytochrom b_{560} slouží pravděpodobně k odstraňování kyslíkatých radikálů vznikajících vedlejšími reakcemi.

Cytochromy-hemové transportní proteiny.

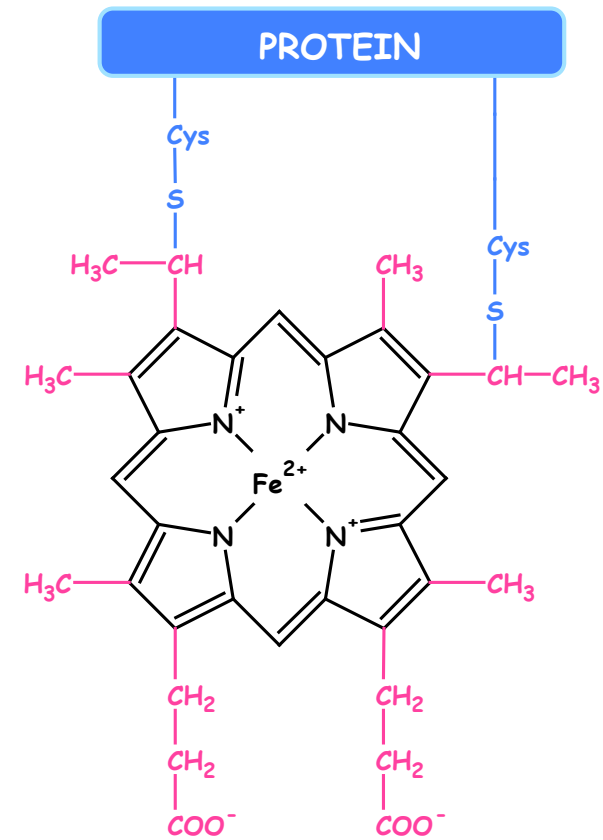
Během transportu elektronů alternují mezi Fe^{2+} a Fe^{3+} .



Hem a

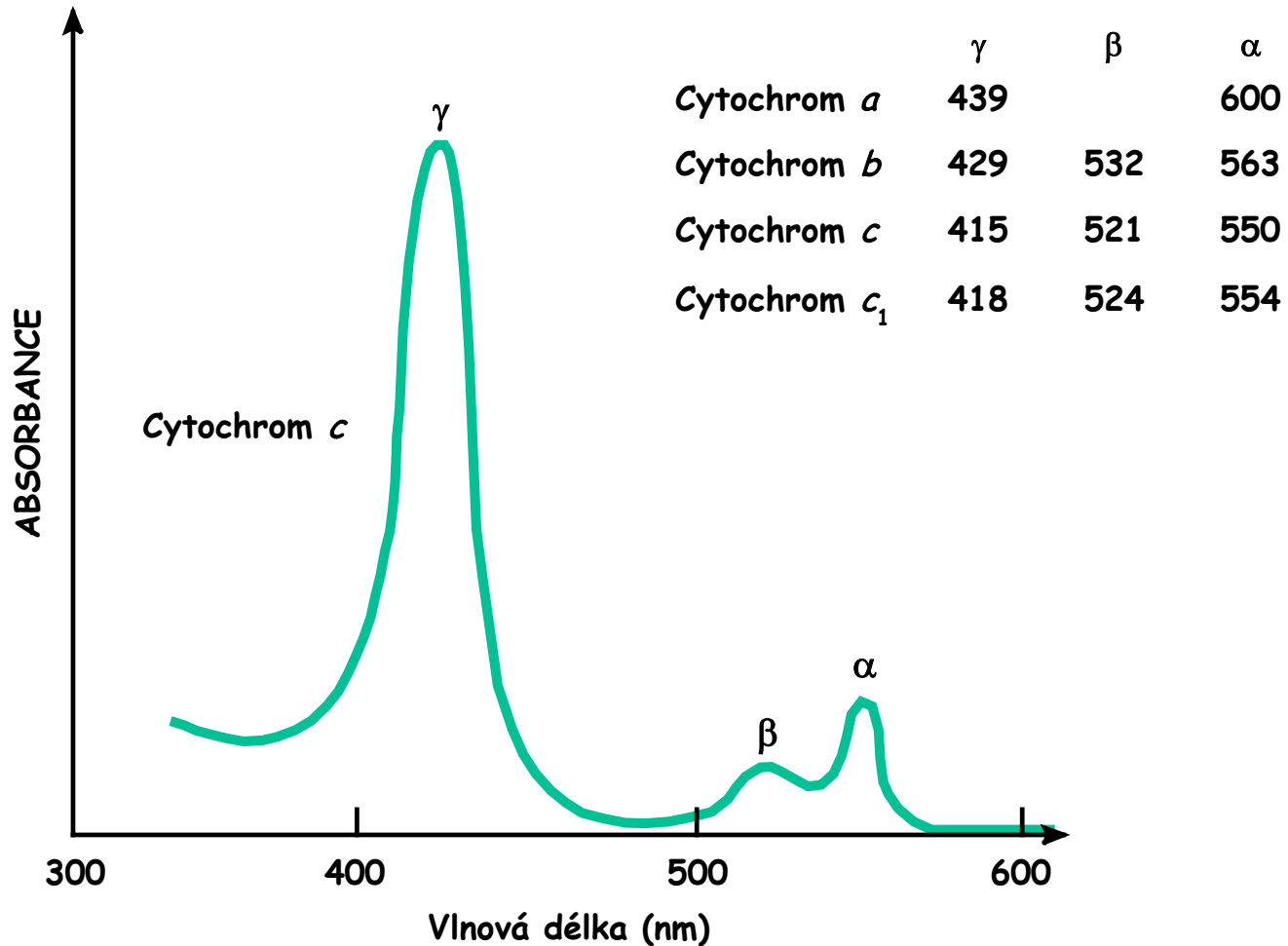


Hem b
(Fe-protoporphyrin IX)



Hem c

Hemové skupiny redukovaných Fe^{2+} cytochromů mají charakteristická absorpční spektra ve viditelné oblasti (Soretovy pásy).

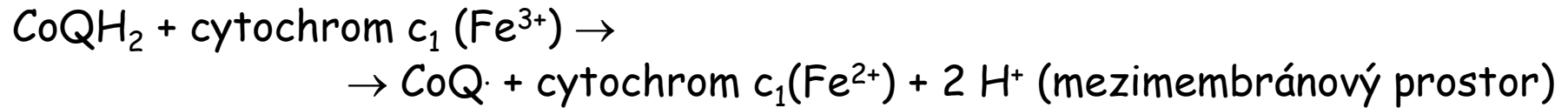


Komplex III (Koenzym Q - cytochrom *c* oxidoreduktasa)

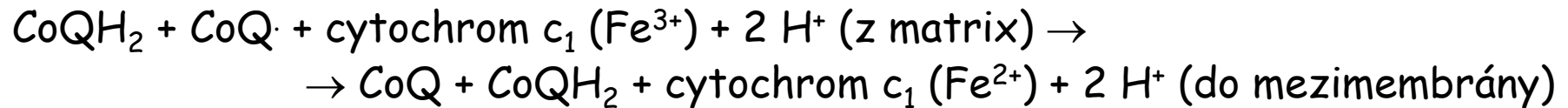
- Komplex III (také jako **cytochrom bc_1**) transportuje elektrony z redukovaného CoQH_2 na cytochrom *c*.
- Obsahuje: Dva cytochromy typu *b*, jeden c_1 a jeden klastr $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, znám také jako Rieskeho centrum.
- Transport elektronů a pumpování protonů probíhá tzv. **Q cyklem**.
- CoQH_2 podstupuje dva cykly reoxidace za tvorby stabilních meziproduktů - semichinonů CoQ .
- Existují dvě nezávislá centra pro koenzym Q: Q_o vážící CoQH_2 (blíže vnější straně membrány - out) a Q_i (blíže vnitřní straně membrány - inner) vážící semichinon CoQ .

Rekce Q cyklu

- První cyklus:

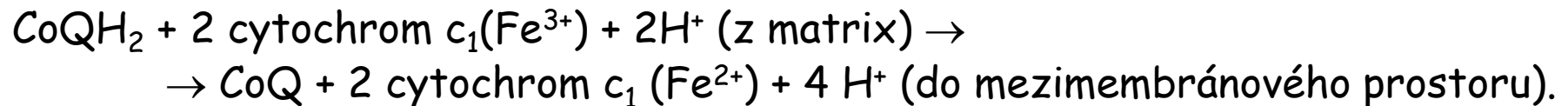


- V druhém cyklu nejdříve další CoQH_2 opakuje první cyklus.



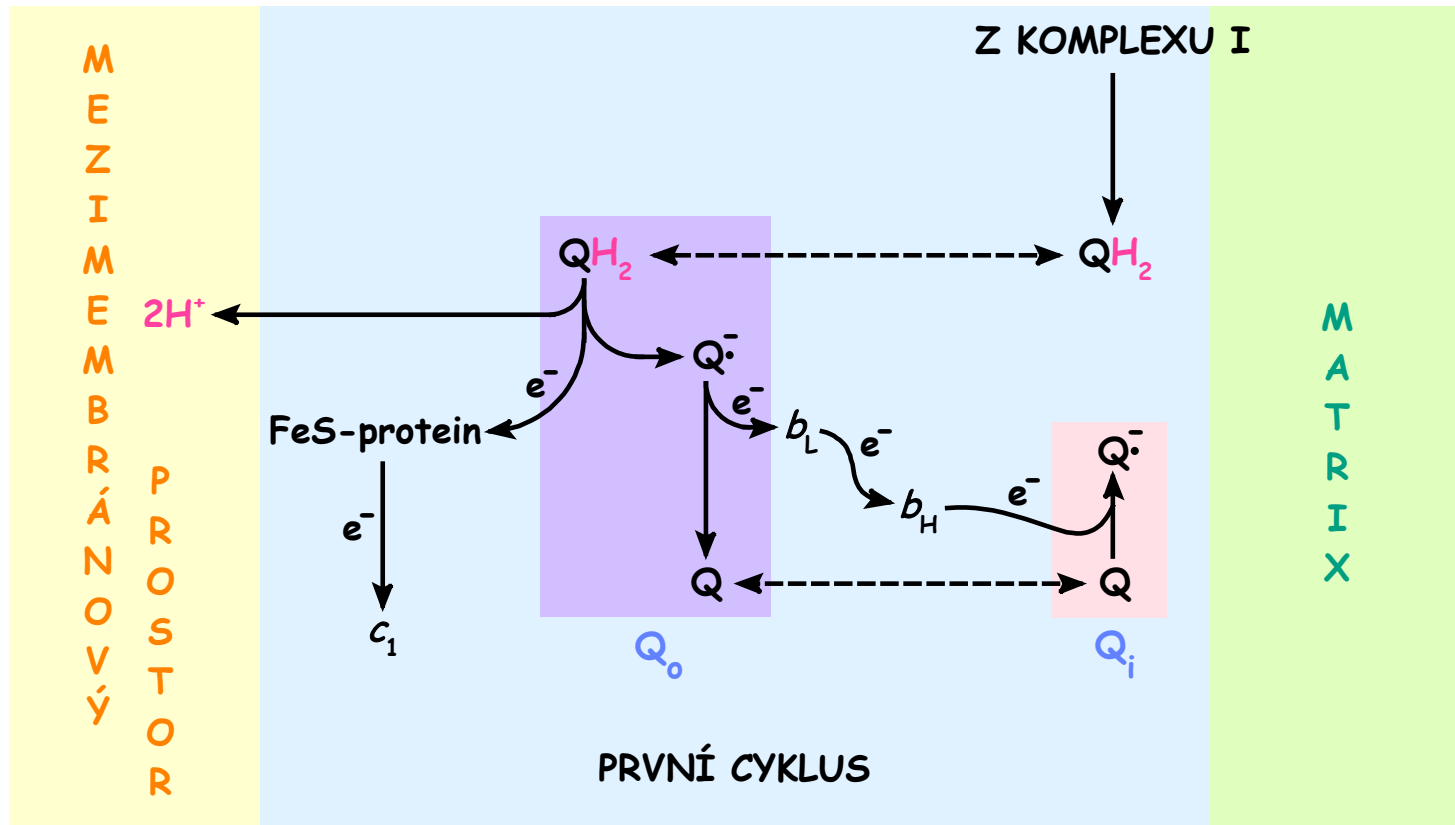
- Z každých dvou CoQH_2 vstupující do Q cyklu, je jeden regenerován.

- Celková reakce:

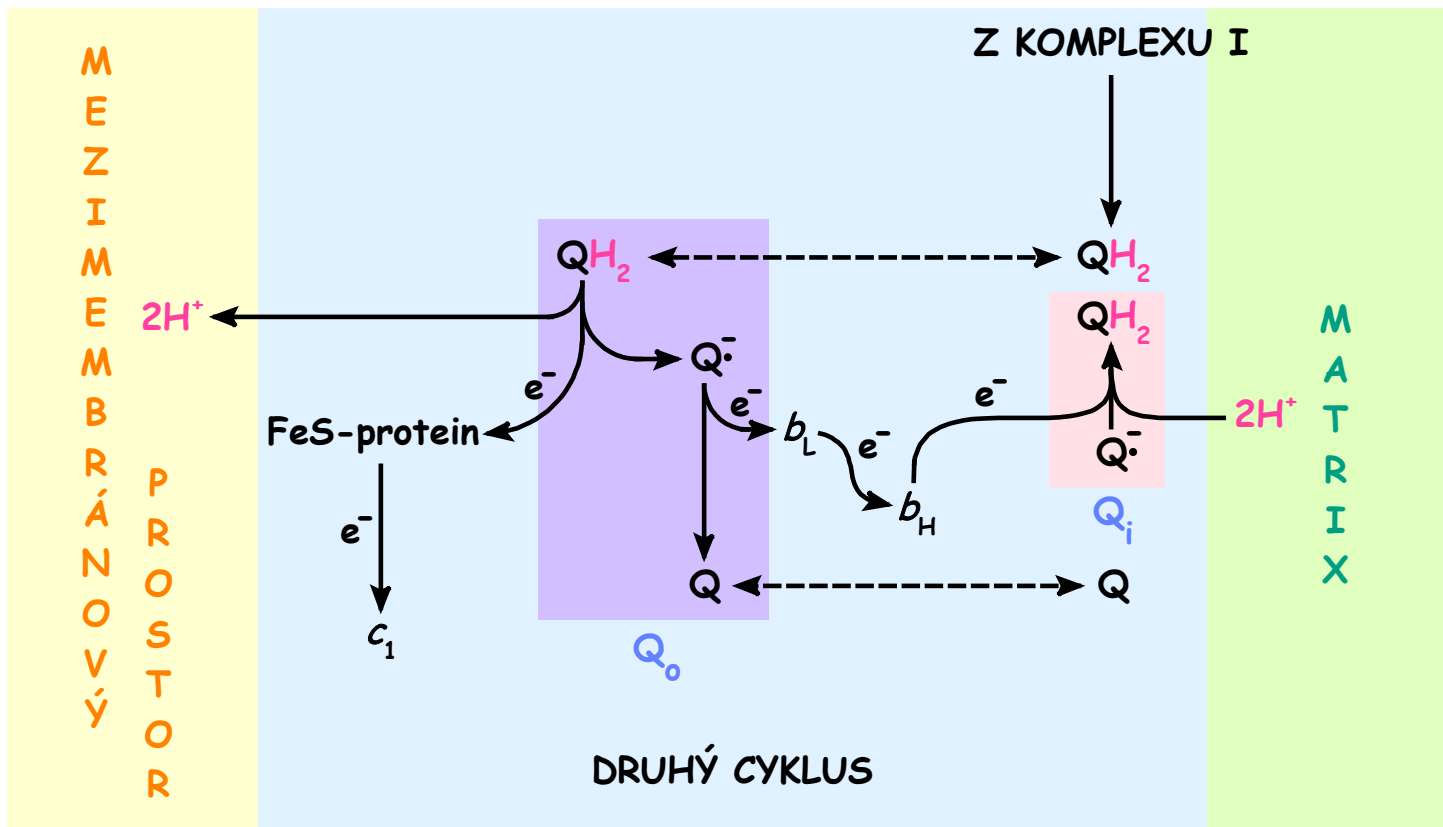


- Elektrony jsou následně přenášeny na cytochrom c , který je transportuje do komplexu IV.

První část Q cyklu.



Druhá část Q cyklu



Komplex IV (cytochrom *c* oxidasa)

- Komplex IV katalyzuje jednoelektronovou oxidaci čtyřech redukovaných cytochromů *c* a současnou **čtyřelektronovou** redukci jedné molekuly O_2 .

$$4 \text{ Cytochrom } c (\text{Fe}^{2+}) + 4 \text{ H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cytochrom } c (\text{Fe}^{3+}) + 2 \text{ H}_2\text{O}$$
- Komplex IV obsahuje čtyři redoxní centra: cytochrom *a*, cytochrom a_3 , atom mědi značený jako Cu_B a dvojici atomů mědi označovaných jako Cu_A centrum.
- Redukce O_2 cytochrom *c* oxidasou je postupný složitý proces.
- Cytochrom *c* oxidasa má dva kanály translokace protonů. Čtyři tzv. chemické nebo skalární protony jsou odňaty z matrix během redukce kyslíku za tvorby dvou molekul vody. Proces je spojen s translokací **čtyř** tzv. **pumpovaných** nebo **vektorových** protonů z matrix do mezimembránového prostoru.
- Při reakci komplexu IV je celkově transportováno přes vnitřní mitochondriální membránu osm protonů.

$$8 \text{ H}^+(\text{matrix}) + \text{O}_2 + 4 \text{ cytochrom } c (\text{Fe}^{2+}) \rightarrow$$

$$\rightarrow 4 \text{ cytochrom } c (\text{Fe}^{3+}) + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+ (\text{do mezimembránového prostoru})$$

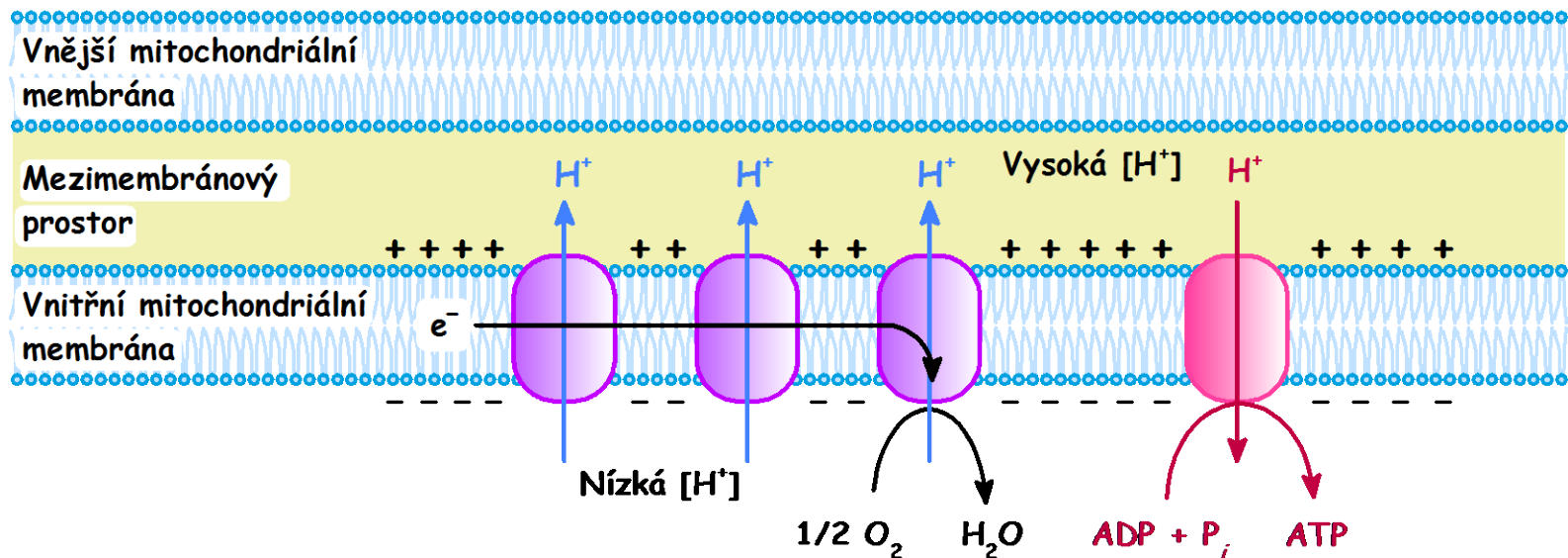
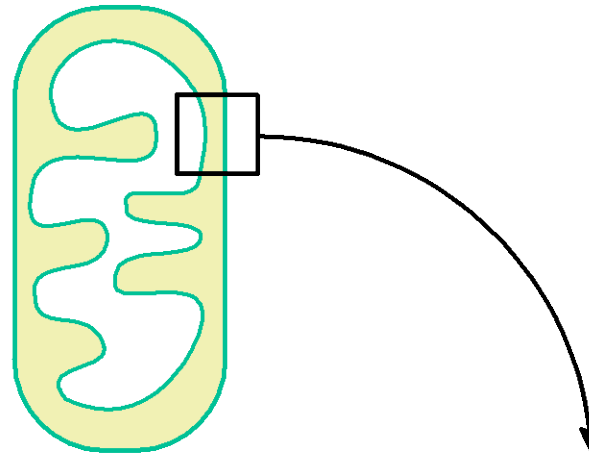
Přenosy energie při oxidativní fosforylaci.



StryerConcInsights.htm

Oxidativní fosforylace-ATP synthasa (Komplex V).

Energetické spojení. Volná energie transportu protonů se uplatní při tvorbě ATP.



Chemiosmotická hypotéza oxidativní fosforylace - Peter Mitchell (1920-1992), Nobelova cena za Fyziologii a medicínu 1978.

Mitchell, P., Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.

Nature **191**, 144-148 (1961).

Volná energie elektronového transportu je realizována pumpováním H^+ z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru za tvorby elektrochemického H^+ gradientu přes membránu. Elektrochemický gradient je posléze uplatněn při syntéze ATP. Tato volná energie se nazývá **protonmotivní síla**.

Naměřený membránový potenciál přes membránu jaterní mitochondrie je 0,168 V (v matrix negativní). Naměřené pH v matrix je o 0,75 jednotky vyšší než v mezimembránovém prostoru. ΔG pro transport protonů z matrix je 21,5 kJ.mol⁻¹ - endergonní proces. Rušení gradientu, syntéza ATP, je proces exergonní!!

ATP synthasa - protony pumpující ATP synthasa, F_1F_0 -ATPasa.

- ATP synthasa je multipodjednotkový transmembránový protein o celkové molekulové hmotnosti 450 kD.
- ATP synthasa je složena ze dvou funkčních jednotek (komponent), F_0 a F_1 . (F_0 vyslovuj ef ó - o znamená na oligomycin citlivá komponenta).
- F_0 je ve vodě nerozpustný transmembránový protein obsahující více jak osm různých typů podjednotek.
- F_1 je vodě rozpustný periferní membránový protein složený z pěti typů podjednotek, které lze jednoduše oddělit od F_0 působením močoviny.
- F_1 komponenta ATPsynthasy má podjednotkové složení $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$.
- Rozpuštěná F_1 komponenta (oddělená od F_0) hydrolyzuje, ale nesyntetizuje ATP.
- F_0 komponenta je složena z vícečetných podjednotek.
- V E.coli např. existují tři transmembránové komponenty: a , b , a c - ve formě $a_1b_2c_{9-12}$ komplexu.

Model F_1F_o -ATPasy z *E. coli*.

Komplex $\gamma\varepsilon-c_{12}$ je rotor a část $\alpha\beta_2-\alpha_3\beta_3\delta$ komplex je stator.

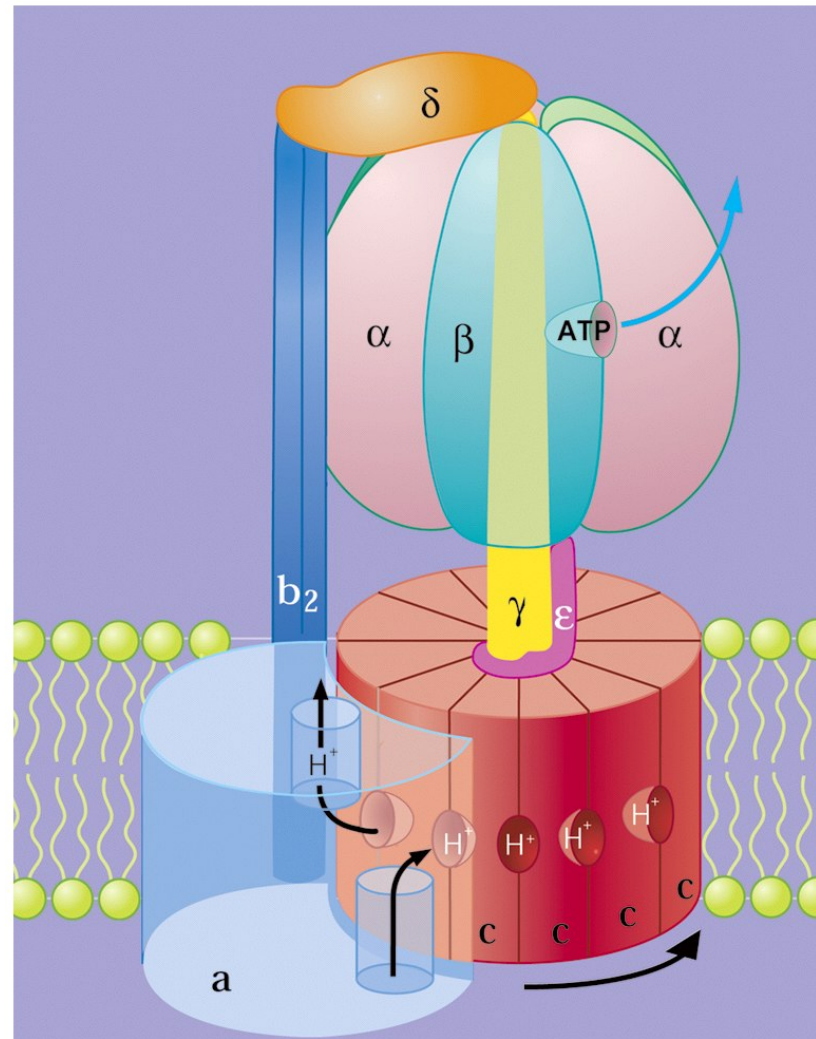
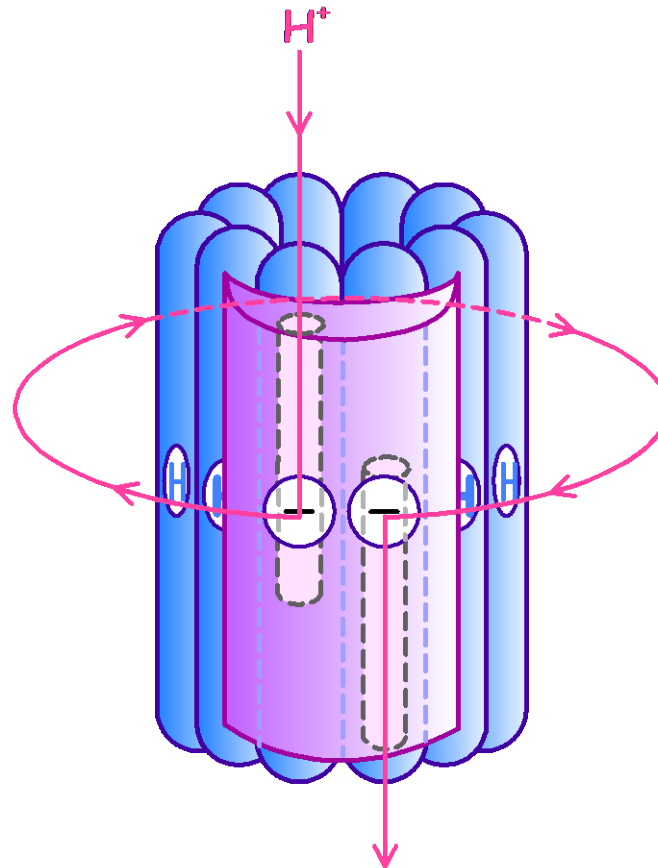


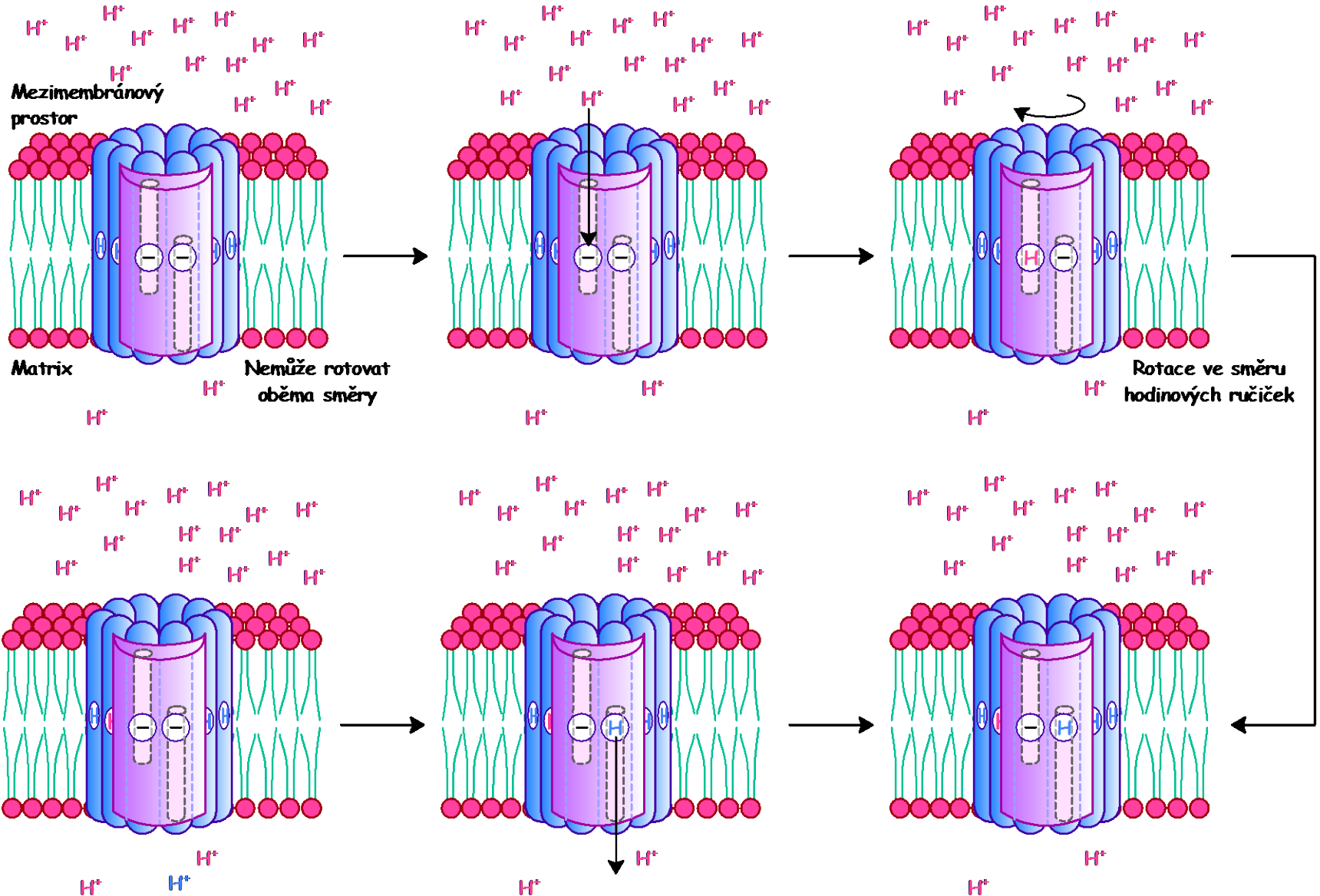
Figure 17-25 Fundamentals of Biochemistry, 2/e

Mechanismus rotace F_1F_0 -ATPasy.

- Protóny z mezimembránového prostoru vstupují do podjednotky c , kde reagují s podjednotkou a a vystupují ven až se c kruh otočí o jednu otočku (černá šipka), kdy se podjednotka c znovu setká s podjednotkou a .



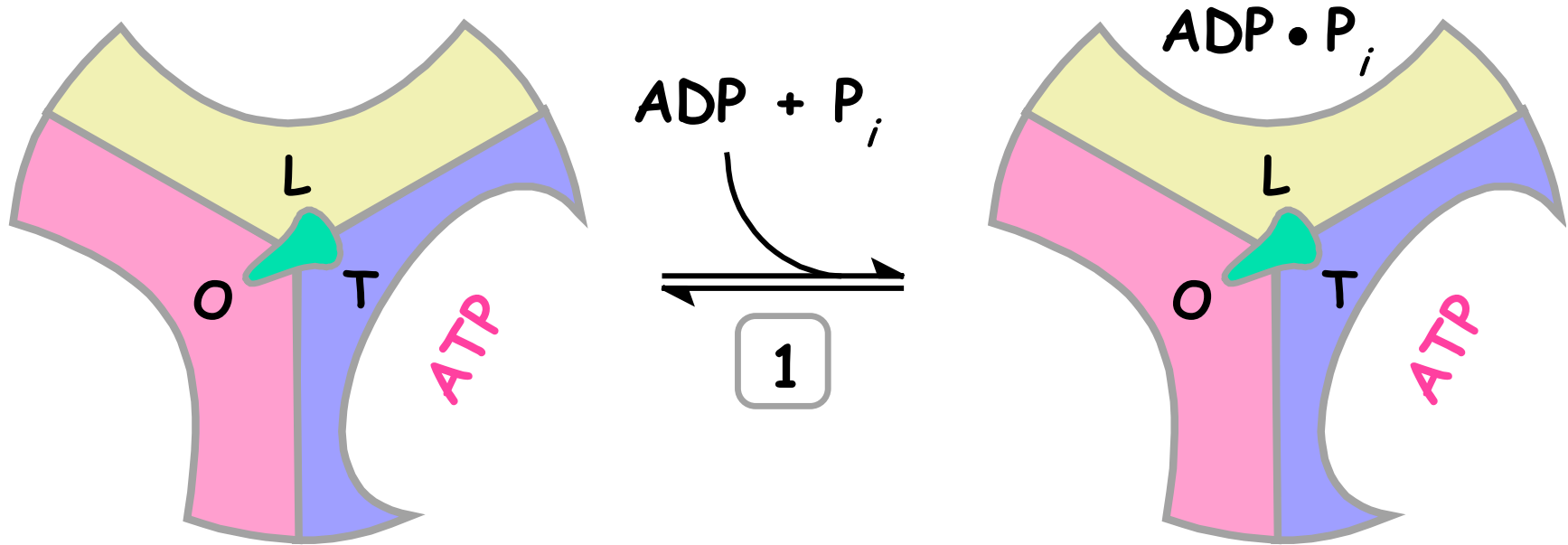
Pohyb protonů přes membránu pohání rotaci ζ kruhu.



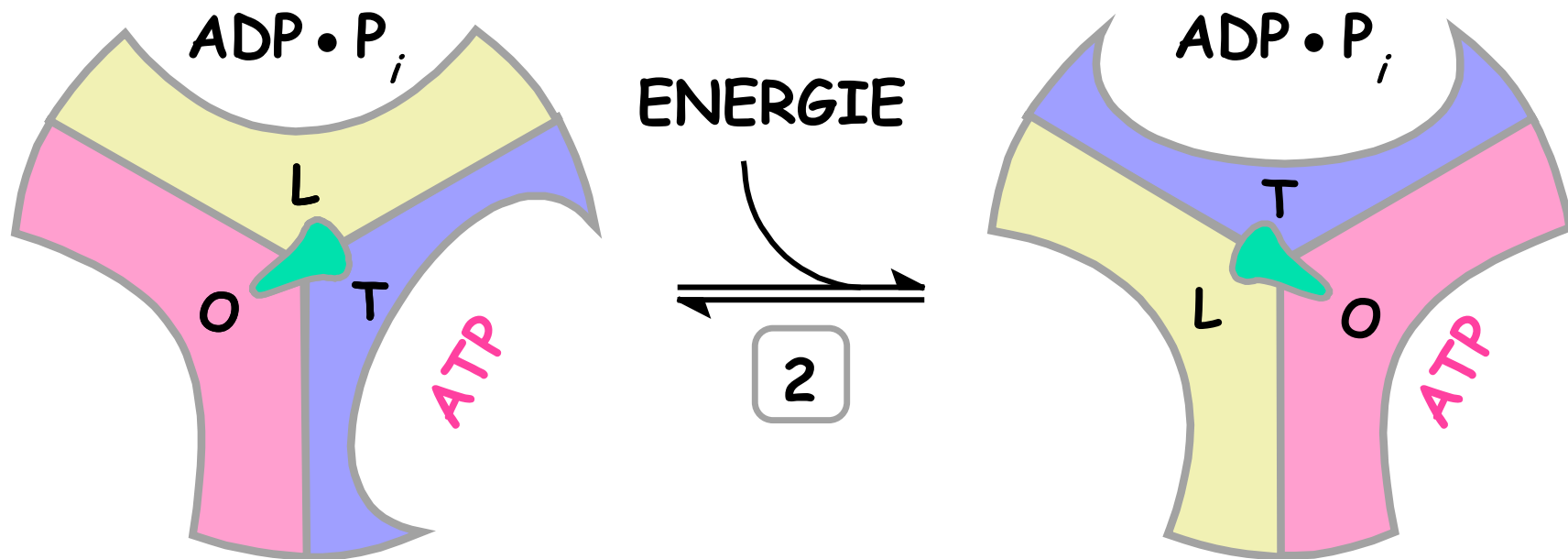
Mechanismus vazebné změny - tvorba ATP z ADP a P_i .

- F_1 komponenta má tři reaktivní katalytické protomery ($\alpha\beta$ jednotky), každý ve jiném konformačním stavu.
- L - váže substrát a produkt slabě (L = loosely)
- T - váže pevně (T = tightly)
- O - neváže vůbec, je otevřený (O = open)
- Uvolněná energie translokací protonů se realizuje přechodem mezi těmito stavy.
- Fosfoanhydridová vazba ATP je syntetizována jen ve stavu T a ATP se uvolňuje ve stavu O.
- Tři stupně:
 - ADP a P_i se váží do stavu L.
 - Průchod protonů mění konformaci L na T.
 - ATP je syntetizované ve stavu T, druhé ATP se dostává pohybem rotoru do stavu O a oddisociuje.

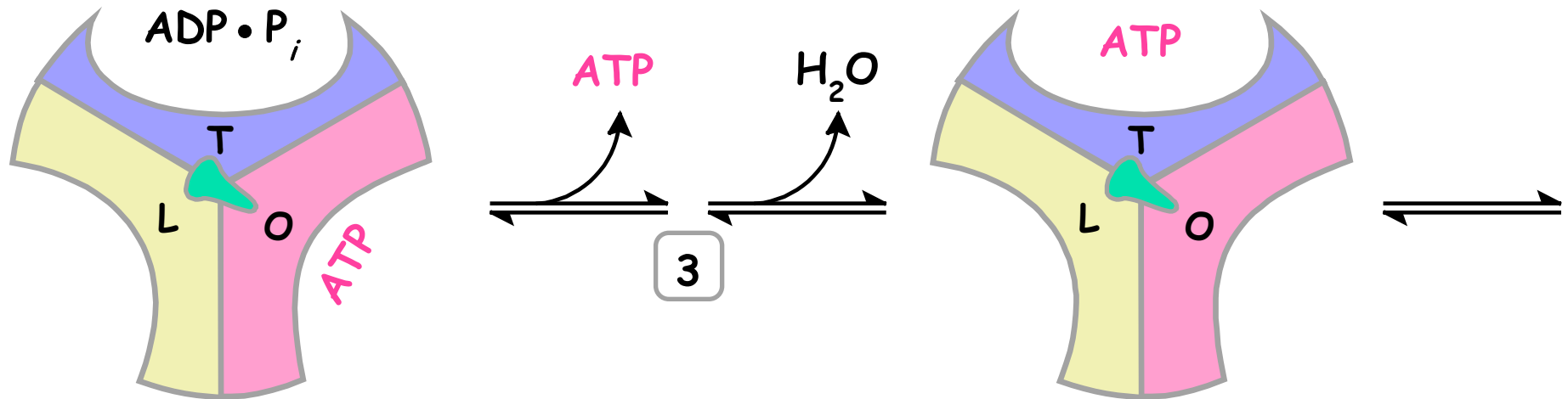
Mechanismus vazebné změny tvorby ATP.



Mechanismus vazebné změny tvorby ATP.



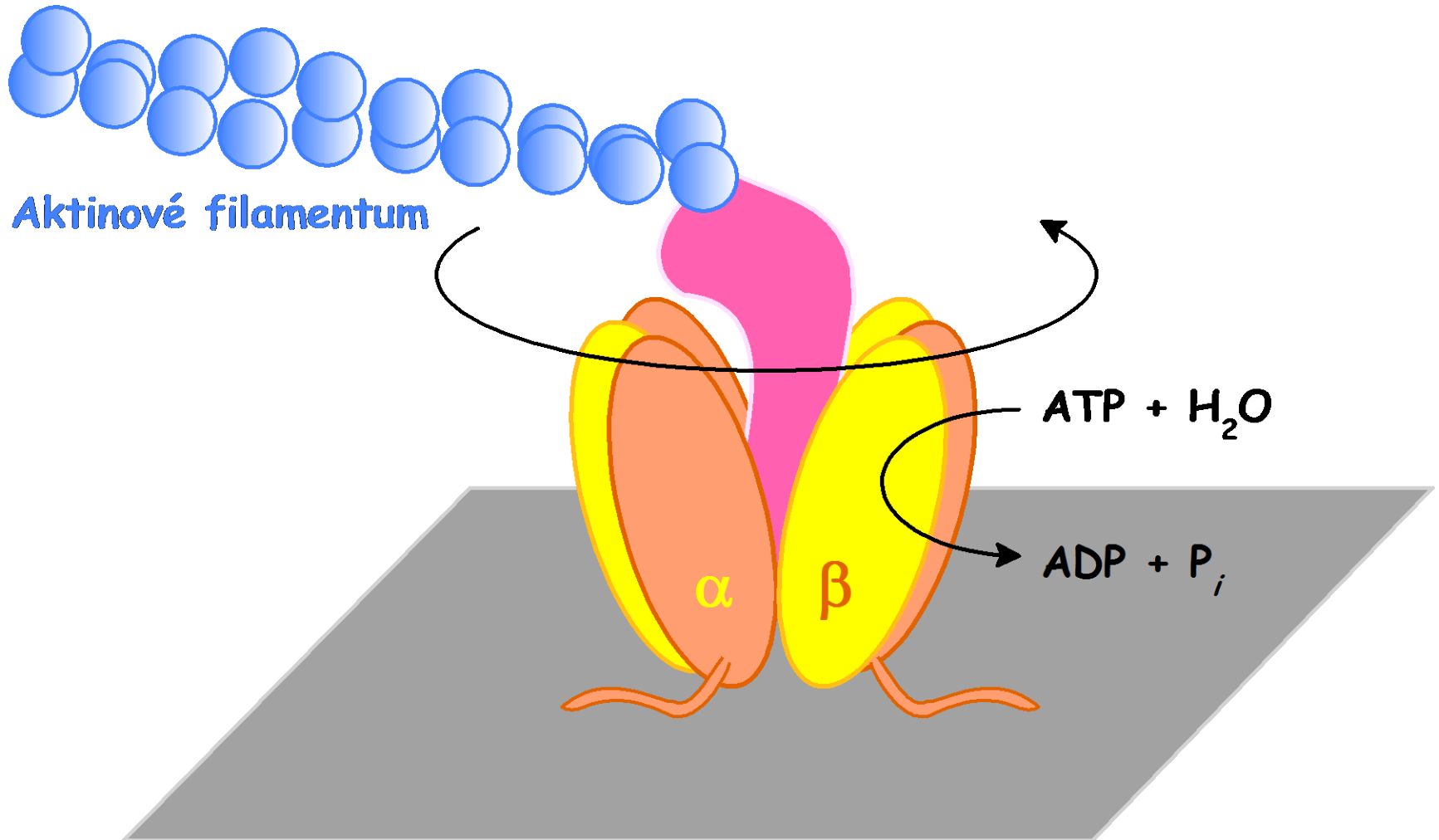
Mechanismus vazebné změny tvorby ATP.



F_1F_0 -ATPasa je točivý stroj.

- **Model Masamitsu Futai.** Sferoid $\alpha_3\beta_3$ z *E. coli* F_1F_0 -ATPasy byl upoután hlavou dolů na skleněnou desku. Šest postupných His zbytků (zvané His-tag) bylo mutagenézí navázáno na N-konec α podjednotky, která je lokalizována na vrcholu $\alpha_3\beta_3$.
- His-tag komplet byl uchycen na povrch skleněné desky potažené křenuvou peroxidasou (přilnavá ke sklu) konjugované s Ni^{2+} -nitriloctovou kyselinou [Ni^{2+} - $N(CH_2COOH)_3$], která váže pevně His-tagy. Část F_0 směřuje nad povrch.
- Glu jedné z podjednotek c byl mutagenézí zaměněn za Cys a ten kovalentně spojen s avidinem. Fluorescenčně značený a biotinylovaný (na jednom konci) filament svalového proteinu aktinu byl navázán na c podjednotku přes můstek tvořený straptavidinem (bakteriální protein, který silně váže biotin ke všem čtyřem vazebným místům).
- Takto sestaven se otáčí rotor opačným směrem, pumpuje protony zevnitř ven na úkor hydrolýzy ATP.
- Pozorováno fluorescenčním mikroskopem v roztoku 5 mM MgATP.
- Takto bylo prokázáno, že γ podjednotka rotuje po 120° .

F_1F_0 -ATPasa je točivý stroj



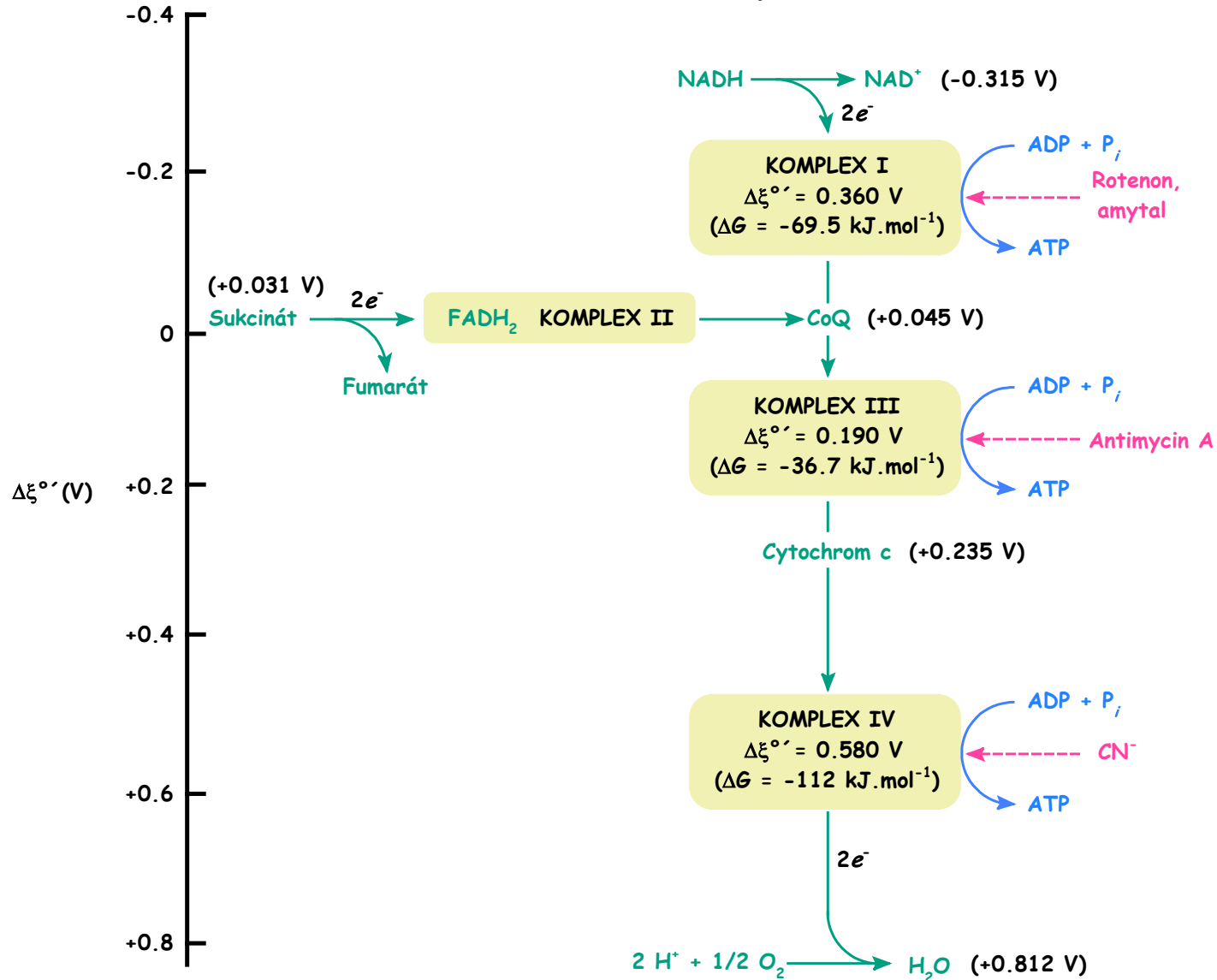
Yoshida&Hisabori Lab.

- <http://www.res.titech.ac.jp/~seibutu/main.html>

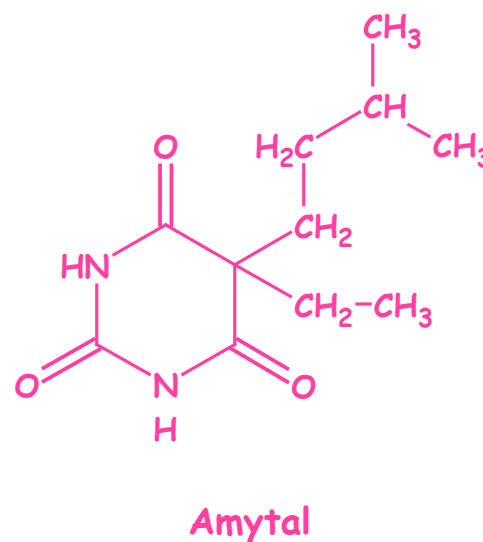
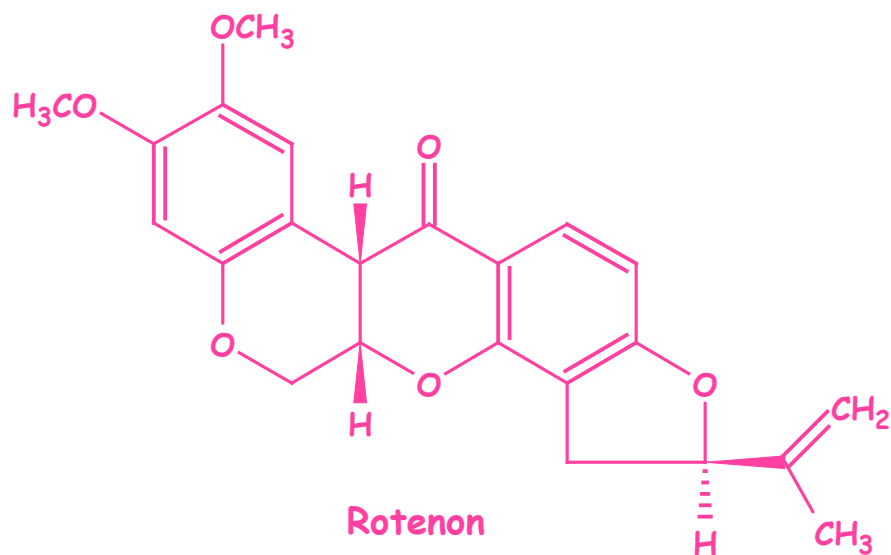
Poměr P/O

- Poměr P/O reprezentuje relaci mezi množstvím syntetizovaného ATP (P) a množství redukovaného kyslíku (O).
- Tok dvou elektronů přes komplexy I, III a IV vede ke translokaci 10 protonů. Zpětný tok těchto protonů pře ATPasu poskytuje 3 ATP.
- Elektrony z FADH_2 , vynechávají komplex I, vedou ke translokaci 6 protonů, což poskytuje jen 2 ATP.
- U aktivně respirujících mitochondrií nebývá poměr P/O celé číslo.
- Peter Hikle prověřoval P/O poměry a prokázal, že aktuální hodnoty jsou blíže číslům 2, 5 a 1, 5 a 1.

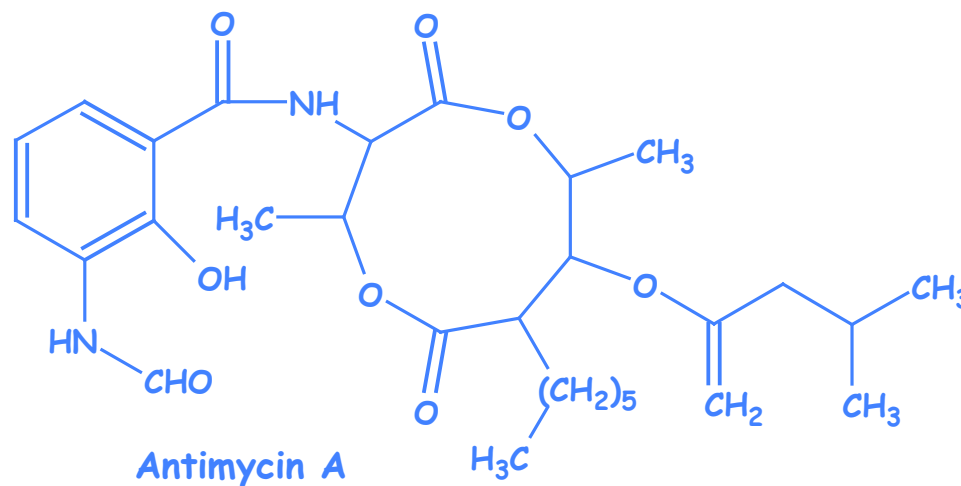
Přehled elektronového transportu mitochondrie



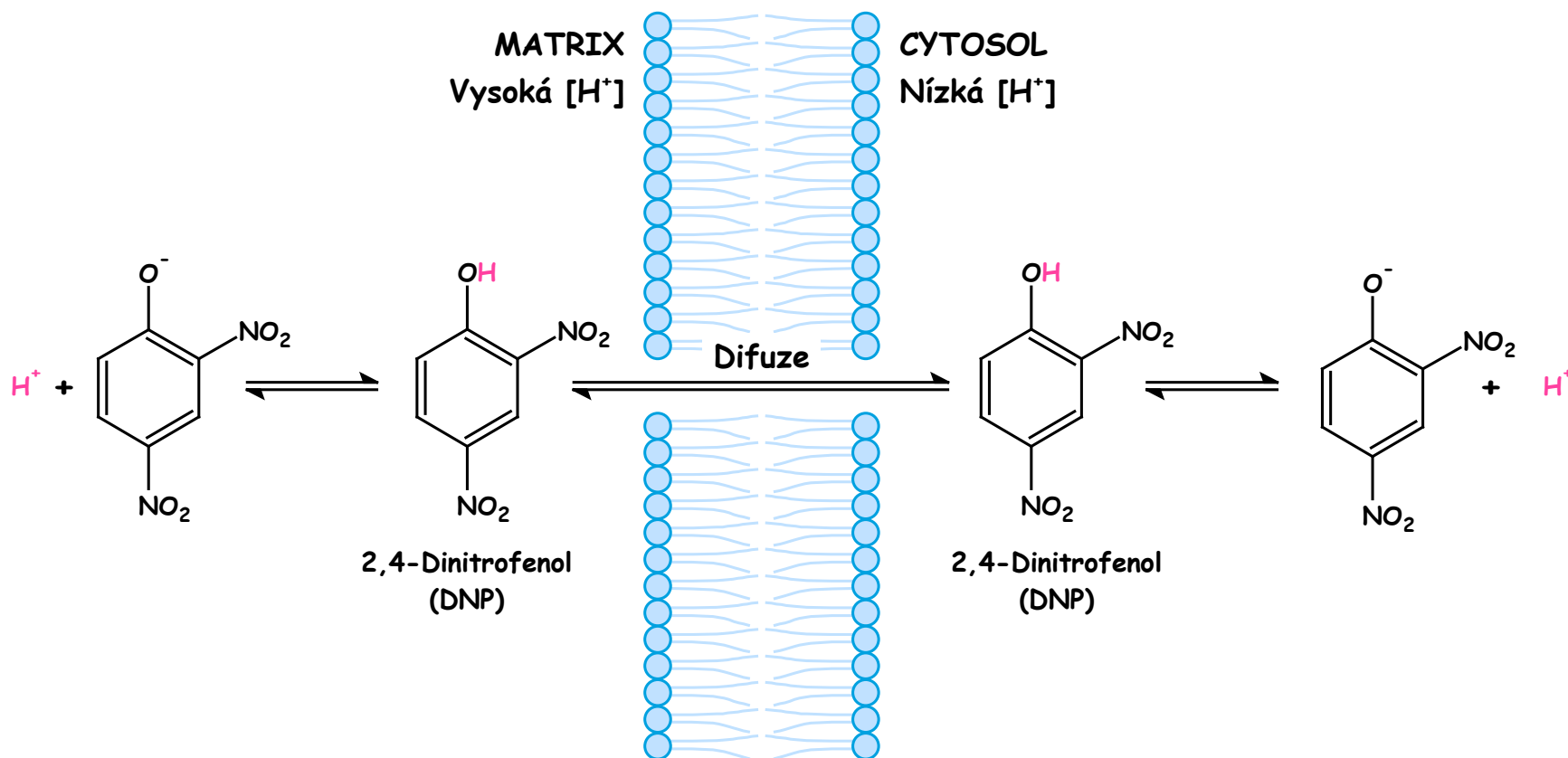
Inhibitory blokuující elektronový transportní řetězec



Kyanid



Rozpojovače oxidativní fosforylace. Probíhá respirace - netvoří se ATP.



Kontrolní mechanismy oxidativní fosforylace.

- Dospělý člověk spotřebuje denně 6 300-7 500 kJ metabolické energie.
To odpovídá volné energii hydrolýzy 200 molů ATP na ADP a P_i.
- Celkové množství v těle přítomného ATP je méně než 0,1 molu !!!
- ATP musí být nutně recyklován a jeho produkce regulována, protože se neprodukuje nikdy více ATP než je potřeba.
- Oxidativní fosforylace (od NADH k cytochromu c) je v rovnováze:
- $\frac{1}{2} \text{NADH} + \text{cytochrom } c (\text{Fe}^{3+}) + \text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \frac{1}{2} \text{NAD} + \text{cytochrom } c (\text{Fe}^{2+}) + \text{ATP} \quad \Delta G' \cong 0$
- $K_{eq} = ([\text{NAD}^+] / [\text{NADH}])^{\frac{1}{2}} \cdot [\text{c}^{2+}] / [\text{c}^{3+}] \cdot [\text{ATP}] / [\text{ADP}] \cdot [\text{P}_i]$
- Reakci nelze ovlivnit přidavkem ATP, protože cytochrom c oxidasová reakce je ireversibilní !!
- Reakce se ovlivní dostupností cytochromu c (c²⁺) a tedy poměry [NADH] / [NAD⁺] a [ATP] / [ADP] · [P_i].
Čím vyšší je poměr [NADH] / [NAD⁺] a nižší [ATP] / [ADP] · [P_i], tím vyšší je koncentrace cytochromu c a vyšší cytochrom c oxidasová aktivita.

Úloha - oxidativní fosforylace:

- Představte si, že máte k dispozici aktivně respirující mitochondrie.
- Jak bude probíhat tvorba ATP v krátkém čase po přidání Q ? Jak bude probíhat tvorba ATP v delším čase po přidání Q ?
- Jak bude probíhat tvorba ATP v krátkem čase po přidání QH₂ ? Jak bude probíhat tvorba ATP v delším čase po přidání QH₂ ?

Reaktivní kyslíkaté radikály (ROS)

- Čtyřelektronová redukce kyslíku cytochrom c oxidasou je rychlá a precizní.
- Přesto vznikají kyslíkaté radikály, které reagují s různými buněčnými součástmi.
- Nejznámější je superoxidový radikál: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \cdot$
- Superoxidový radikál je prekurzorem silnějších oxidačních radikálů jako jsou protonovaný (hydroxoniový) $O_2^- \cdot \rightarrow HO_2 \cdot$ a hydroxylový radikál
- $\cdot OH$
- Antioxidační mechanismus: **superoxiddismutasa** (SOD) přítomná téměř ve všech buňkách. Katalyzuje přechod $O_2^- \cdot$ na peroxid vodíku.
- Vytvořený peroxid vodíku je degradován **katalasou** na vodu a kyslík:

$$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$$
 nebo glutathionperoxidasou:

$$2 GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$$
- Dalšími potenciálními antioxidanty jsou rostlinné sloučeniny jako askorbát (vitamin C) a α -tokoferol (vitamin E). Pravděpodobně chrání rostliny před oxidačním stresem během fotosyntézy, kdy je H_2O fotolýzou rozkládána na O_2 , protony a elektrony.