

## Úvod do buněčného metabolismu

### Citrátový cyklus

Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.

Ústav lékařské biochemie I. LF UK

## METABOLISMUS

= přeměna látek v organismu - má stránku **chemickou** (látkovou) - reakce anabolické  
- katabolické  
- amfibolické  
- stránku **energetickou** - reakce exergonické:  $\Delta G < 0$   
 $\Delta U(\Delta G) \longrightarrow$  práce + teplo - endergonické:  $\Delta G > 0$

**Anabolické** (skladebné, biosyntetické reakce) jsou *endergonické*,

**katabolické** (rozkladné) reakce jsou *exergonické*,

**amfibolické** reakce slouží k biosyntézám i k biodegradaci (citrátový Krebsův cyklus).

K *endergonickým* reakcím patří kromě **biosyntéz** (redukce, kondenzace) také:

- **osmotická práce** (koncentrační, iontové gradienty),

- **mechanická práce** (svalová kontrakce - konformační změny kontraktilních proteinů).

*Exergonické* reakce jsou :

- **oxidace** (ztráta elektronů, vodíkových atomů, vstup kyslíkových atomů do molekuly),

- **hydrolytické** reakce, zejména anhydridových vazeb (např fosfátových).

$\Delta G$  **oxidoredukční reakce** (exergonické):  $n$  = moly elektronů

$\Delta G' = -n \cdot F \cdot \Delta E'_h$  ;  $F = 96,5 \text{ kJ} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  ;  $\Delta E'_h$  = rozdíl redox-potenciálů ve  $V$ ;  $pH 7$

$\Delta G$  **osmotické práce** (endergonické):

$\Delta G = n \cdot R \cdot T \cdot \ln c_2/c_1$  ;  $c_2 > c_1$  ;  $n$  = moly přenesených částic

pro  $37^\circ\text{C}$  :  $\Delta G = n \cdot 5,9 \cdot \log c_2/c_1$  [  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ]

**Elektrochemický potenciál (gradient) pro ionty** ( $n=1$ ):

$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln c_2/c_1 + Z \cdot F \cdot \Delta V$  ;  $Z$  = náboj částic;  $\Delta V$  = membránový potenciál ve  $V$

### OXIDOREDUKČNÍ POTENCIÁL (REDOX-POTENCIÁL)

$E'_h$   
vyjadřuje míru chemického systému odevzdávat nebo přijímat elektrony. Systém *odevzdávající* elektrony má vlastnosti *redukujícího* poločlánku a má *zápornější* redox potenciál, systém *přijímající* elektrony má vlastnosti *oxidujícího* poločlánku a má *kladnější* redox potenciál. V každém poločlánku existuje oxidovaná a redukovaná forma daného redoxního činidla nebo přenašeče (tzv. *redoxní pár*).  
**Elektrony spontánně postupují od zápornějšího poločlánku ke kladnějšímu poločlánku. Přitom postupně ztrácejí část své energie.**  
Míra energie takto uvolněné ( $\Delta G$ ) je vyjádřena **oxidoredukční rovnicí** a je přímo úměrná počtu *molů* přenesených *elektronů* ( $n$ ) a rozdílu redox-potenciálů  $\Delta E'_h$  ve voltech ( $V$ ), násobeno joulovým ekvivalentem Faradayova náboje  $= F \cdot E'_h$  i  $\Delta E'_h$  závisí na pH (' značí pH 7,0).

### STANDARDNÍ REDOX-POTENCIÁLY $E'_0$

jsou měřeny proti tzv. normální vodíkové elektrodě za standardních podmínek, tj. všechny složky mají koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pH měřené soustavy je 7,0. Výsledný redox-potenciál  $E'_h$  pak závisí ještě na poměru oxidovaných a redukovaných forem obou poločlánků. Redox-potenciály jsou vyjadřovány ve voltech ( $V$ ).

$$E'_h = E'_0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln \frac{[ox]}{[red]} \quad (\text{Nernstova-Petersova rovnice})$$

## ÚČEL A FUNKCE METABOLISMU

1. Získat energii z okolí :

- fototrofní organismy z fotonů fotosyntézou (u živočichů nelze);
- chemotrofní organismy z elektronů oxidací živin (živočichové, člověk).

2. Využít takto získanou energii pro biosyntézu skladebných součástí biomakromolekul a makromolekulárních buněčných struktur .

3. Využít takto získanou energii pro konformační změny iontových pump a konformační změny kontraktilních bílkovin.

4. Tyto změny musí proběhnout jako isothermní děje (např. při 37 °C).

**Vzájemná přeměna živin (cukrů, tuků, bílkovin)**

je označována jako *intermediární metabolismus* a využívá omezeného množství *společných* meziproduktů látkové přeměny , tzv. *aktivovaných intermediátů*, *společného* molekulárního *energetického přenašeče* (ATP) a omezeného množství typického sledu reakcí, tzv.

*metabolických cest*, které mohou být *regulovány* společnými nebo nezávislými *regulačními* mechanismy. Využíváním společných postupů klesá nárok na počet potřebných enzymů.

**Živiny jsou zdrojem tzv. redukční síly (redukčních ekvivalentů: elektronů, atomů H, NADPH)**

a jejich oxidace může probíhat cestou *anaerobní*, bez přístupu kyslíku, přenosem elektronů na vhodný akceptor (*glykolýza*), nebo *aerobně*, přenosem až na molekulární kyslík v *dýchacím* (*respiračním*) řetězci ve vnitřní mitochondriální membráně. Molekulární kyslík funguje jako terminální akceptor elektronů podle reakce:  $O_2 + 4 e^- \rightarrow 2 O^{2-}$



Přítom CO<sub>2</sub> vzniká jako vedlejší produkt dekarboxylací a kyslík se do substrátů většinou dostává z molekul vody adicí na dvojnou vazbu. Energetická stránka procesu však spočívá v přenosu elektronů až na molekulární kyslík . Aerobní oxidaci glukosy vzniká asi 15x více ATP než v glykolýze, protože rozdíl redox potenciálů aerobních přenašečů je větší.

Energie získaná z okolí (z *fotonů* u fotosyntezujících organismů a z *elektronů* u chemotrofních organismů) může být převedena v buňce :

1. na *elektrochemický gradient* iontů (protonů);

2. na uložení do tzv. *makroergických sloučenin*, které mají schopnost **posunovat rovnováhy** chemicky spřažených reakcí ve *vodném prostředí* doprava, *na stranu produktů* spřažené reakce (tyto sloučeniny mají *velký potenciál přenosu* nějaké *skupiny*, např. fosfátu, acylu) - *vazba* takové přenášené skupiny bývá značena symbolem ~ (jde o spojení *endergonických* a *exergonických* reakcí);

3. na vytvoření zásoby tzv. *redukční síly* ve formě NADPH

**Změna standardní volné enthalpie (standardní Gibbsovy energie)**

$$\Delta G^{\circ} = - R \cdot T \cdot \ln K_{eq}$$

vyjadřuje změnu **volné energie (volné enthalpie)**, která by nastala za **standardních podmínek**, tj. při koncentraci všech složek 1 mol · l<sup>-1</sup> a standardní teplotě a tlaku (pH 7), po zreagování jednoho molu látky. **Volná energie (volná enthalpie)** je taková, která může **konat práci za isothermních podmínek**. Energetickou bilanci reakce však určuje **vzdálenost od rovnovážného stavu** při daných **koncentracích reagujících látek a produktů**. Ta je vyjádřena hodnotou změny **volné enthalpie ΔG'**.

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ} + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$$

V uzavřené soustavě jsou spontánně možné pouze reakce **exergonické**. Vysoce záporná hodnota **ΔG'** znamená, že reakce je daleko od rovnováhy, na straně reaktantů **[A]** a **[B]**.

V rovnovážném stavu je **ΔG'** rovno **nule**.

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ} + R \cdot T \cdot \ln \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$$

Pro 37 °C a pH 7 lze psát:

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ} + 5,9 \cdot \log \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

$$\Delta G^{\circ} = - 5,9 \cdot \log K_{eq} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

## Metabolismus je umožněn působením enzymů

1. Enzymy jsou výrazem **genové exprese**.
2. Enzymy spojují **různé typy metabolismu** živin prostřednictvím **společných intermediátů**.
3. Enzymy umožňují **průběh endergonických** reakcí, které by samovolně neproběhly, a to **spřažením** s jinou reakcí **exergonickou** prostřednictvím **společných intermediátů**.
4. V **sérii spřažených** reakcí se funkce enzymů **snižovat aktivační energii násobí**, takže biologické oxidace mohou probíhat **isothermně**, jsou rozděleny do **více dílčích kroků** a **uvolněná energie** může být **utilizována s menšími tepelnými ztrátami**.
5. Ovlivněním **rychlosti vstupu a výstupu** metabolitů vytvářejí enzymy v organismu (jako **otevřeném systému**) **stacionární nerovnovážný stav** (dynamická rovnováha, steady state), v němž celková rychlost vstupu se rovná výsledné rychlosti výstupu, a to umožňuje průběh exergonických reakcí směřujících k dosahování **pravé (thermodynamické) rovnováhy**.
6. Regulace klíčových enzymů metabolických cest umožňuje **nezávislé regulace** reakcí katabolických, anabolických, exergonických, endergonických, udržování **metabolické rovnováhy** a stálého vnitřního prostředí.
7. Regulace protichůdných metabolických cest je umožněna jejich lokalizací v buňce do různých oddílů (**kompartmentace**): cytoplasma, organely apod.

## Úloha tzv. makroergických vazeb v metabolismu

Význam tzv. makroergických vazeb ve sloučeninách spočívá v tom, že rovnovážná konstanta hydrolytické reakce příslušné vazby značená  $\sim$  má hodnotu značně vysokou, řádově minimálně  $10^4 - 10^5$ , takže příslušné  $\Delta G^{\circ}$  hydrolytické reakce má hodnotu minimálně  $-25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  a zápornější. Jestliže jsou dvě reakce chemicky spřaženy společnými meziprodukty, pak je výsledná rovnovážná konstanta  $K$  *součinem* dílčích rovnovážných konstant  $K_1$  a  $K_2$ , z čehož plyne, že výsledné  $\Delta G^{\circ}$  je *součtem* dílčích  $\Delta G^{\circ}$

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ}_1 + \Delta G^{\circ}_2$$

Tímto mechanismem může reakce se silně zápornou hodnotou  $\Delta G^{\circ}_2$  převážit kladnou hodnotu  $\Delta G^{\circ}_1$ , takže výsledná hodnota  $\Delta G^{\circ}$  je záporná a reakce je thermodynamicky schůdná. (Při násobení hodnot  $K$  se jejich logaritmy sčítají.)  
Např.:  $-16,5 = +14 - 30,5 \text{ [kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$

Tzv. makroergické sloučeniny, nebo sloučeniny s *vysokým potenciálem přenosu skupiny* (fosfátové), mají rovnovážný stav silně na straně produktů a *strhávají i spřažené endergonické reakce* na stranu fosforylovaných produktů.

## ATP je univerzálním přenašečem volné enthalpie v biologických systémech

Anhydridově vázané fosfátové skupiny mají značně zápornou **standardní volnou enthalpii hydrolýzy  $\Delta G^{\circ}$** .



Rovnovážná konstanta této reakce je

$$K = \frac{[\text{ADP}] \cdot [\text{P}_i]}{[\text{ATP}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]} \quad K = 1,48 \cdot 10^5$$

Tyto hodnoty by však platily za standardních podmínek, kdy koncentrace všech složek by byla  $1 \text{ mol}^{-1}$  (pro vodu se uvažuje aktivita = 1).

V biologických systémech se předpokládá, že látková koncentrace [ATP] převyšuje koncentraci [ADP] nejméně 300-krát a aktuální  $\Delta G'$  činí asi  **$-50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$**

## ENERGIE ZÍSKANÁ BUNĚČNÝMI OXIDACEMI JE UKLÁDÁNA DO SOUSTAVY ATP/ADP

ATP přitom může vznikat dvojím mechanismem:

- 1) Tzv. *substrátovou* fosforylací, kdy je mezi oxidoredukční reakcí a tvorbou ATP vsunut tzv. makroergický intermediát. Tímto mechanismem vzniká ATP v anaerobním procesu glykolýzy v cytoplasmě a pouze v jedné reakci citrátového (Krebsova) cyklu v mitochondriích (sukcinátthiokinasa).
- 2) Mechanismem tzv. *aerobní (oxidativní) fosforylace* prostřednictvím elektrochemického protonového gradientu ve vnitřní mitochondriální membráně, který tam vytvářejí protonové pumpy oxidoredukčních přenašečů. Zdrojem redukčních ekvivalentů (elektronů a H atomů) jsou intermediáty Krebsova cyklu a beta-oxidace mastných kyselin.

**ATP JE ČINIDLO SPŘAHOVJÍCÍ ENERGETICKÉ ZMĚNY  
V BUŇCE (buněčné energetické oběživo, platidlo)**

*Hydrolyza 1 molu ATP může změnit rovnovážný poměr koncentrací: fosforylované produkty / reaktanty ve spřažených reakcích v organismu faktorem cca  $10^8$  - krát. Fosforylovaným produktem může být organický substrát (např. glukosa), protein membránové iontové  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpy nebo molekulární motor kontraktálního proteinu (např. myosin). Fosforylace proteinu vyvolá vznik konformace bohatší energií, která umožní převod chemické energie ATP na tvorbu osmotického (iontového) gradientu nebo mechanickou energii (např. svalová kontrakce).*

**VÝMĚNA VOLNÉ ENTHALPIE MEZI PŘENAŠEČI  
FOSFÁTOVÝCH SKUPIN**

*Za standardních podmínek (koncentrace všech složek  $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) probíhá přenos fosfátových skupin ve vodě od soustav se zápornějším  $\Delta G^{0'}$  k soustavám s méně záporným  $\Delta G^{0'}$  hydrolytické reakce, tedy např. od kreatinfosfátu k ADP.*

*Vysokou koncentrací ATP lze tuto reakci obrátit přenosem fosfátových skupiny z ATP na kreatin. Kreatinfosfát tak ve svalech funguje jako energetický pufr.*

*Reakci katalyzuje v obou směrech enzym **kreatinkinasa**.*

### ZMĚNA ENTHALPIE : $\Delta H$

je změna tepelného obsahu soustavy

$\Delta H < 0$  (záporné) - reakce exothermická (výdej tepla)

$\Delta H > 0$  (kladné) - reakce endothermická (pohlcování tepla)

$\Delta H$  je spalné teplo

např. spalné teplo glukosy :

$\Delta H = - 2870 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

### STADIA KATABOLISMU

- I tuky, polysacharidy a proteiny jsou *hydrolyticky* rozloženy na své *základní stavební součásti*
- II jejich metabolickými přeměnami jsou katabolity převedeny na *společný intermediát* - acetyl-CoA
- III acetylový zbytek je *finálně odbourán* v citrátovém cyklu na  $2 \text{ CO}_2$  (*dekarboxylacemi*) a 8 elektronů odebráno čtyřmi *dehydrogenasovými* reakcemi intermediátům cyklu a přeneseno do *respiračního řetězce* vnitřní mitochondriální membrány, která spřahuje jejich *terminální oxidaci* za vzniku  $\text{H}_2\text{O}$  s *aerobní (oxidativní) fosforylací* za vzniku ATP



## BIOLOGICKÉ OXIDACE JSOU ZAHAJOVÁNY JAKO DEHYDROGENACE

Dehydrogenasy mohou mít jako *koenzym*

1) *pyridinový* nukleotid - NAD<sup>+</sup>, který přenáší 2 elektrony

v reakci:  $\text{NAD}^+ + 2 \text{H} \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{H}^+$

nebo

2) *flavinový* nukleotid - FMN nebo FAD, který přenáší

2 elektrony v reakci:  $\text{FMN} + 2 \text{H} \rightleftharpoons \text{FMNH}_2$

nebo  $\text{FAD} + 2 \text{H} \rightleftharpoons \text{FADH}_2$

V obou případech proces začíná jako *dvouelektronový přenos*.

*Terminální oxidace* 2 redukčních ekvivalentů ve vnitřní mitochondriální membráně přenosem 2 elektronů až na 1/2 O<sub>2</sub> je spojena s vypuzením 10 H<sup>+</sup>, vycházejíc od NADH, ale pouze 6 H<sup>+</sup>, vycházejíc od FADH<sub>2</sub>, do mezimembránového prostoru. (Flavinové přenašeče mají pozitivnější standardní redox-potenciál a rozdíl redox-potenciálů vůči kyslíkovému poločlánku [ΔE] je menší.) Na syntézu 1 ATP *aerobní fosforylací* (membránovou *ATP/ H<sup>+</sup> - synthasou*) je třeba návratu cca 4 H<sup>+</sup> do matrix.

## KLASIFIKACE ENZYMŮ

**1. OXIDOREDUKTASY**

**2. TRANSFERASY**

**3. HYDROLASY**

**4. LYASY**

**5. ISOMERASY**

**6. LIGASY**

KLASIFIKACE ENZYMŮ VYSTIHUJE ZÁKLADNÍ TYPY  
METABOLICKÝCH REAKCÍ

[www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme)

## Acetyl~CoA JE SPOLEČNÝM INTERMEDIÁRNÍM PRODUKTEM RŮZNÝCH TYPŮ ŽIVIN

Aktivovaný acetylový zbytek (jako *acetyl-CoA*) je katabolizován v *citrátovém cyklu* v mitochondriální matrix. Vzniká:

- 1) z *pyruvátu* (jako produktu *glykolýzy* a/nebo *transaminace* tzv. *glukogenních aminokyselin*) nezvratnou *oxidativní dekarboxylací* v *multienzymovém komplexu pyruvátdehydrogenasy*;
- 2) jako konečný produkt tzv.  *$\beta$ -oxidace* *mastných kyselin* a uhlíkového skeletu tzv. *ketogenních aminokyselin*.  
*Koenzym A* funguje jako *aktivovaný přenašeč acylů*.

## KATABOLICKÝ VÝZNAM CITRÁTOVÉHO CYKLU

- 1) *acetyl-CoA* je spojovnicí katabolismu cukrů, lipidů a bílkovin
- 2) *citrátový cyklus* v mitochondriální matrix funguje jako *společný „metabolický mlýn“* a poskytuje *redukční ekvivalenty* (elektrony, vodíkové atomy) respiračnímu řetězci vnitřní mitochondriální membrány
- 3) *respirační řetězec* převádí redukční ekvivalenty až na *molekulární kyslík*, přičemž jeho elektronové přenašeče (komplexy I, III a IV) fungují jako *protonové pumpy*, vypuzující protony do mezimembránového prostoru
- 4) zpětným návratem po koncentračním spádu do matrix *protony pohánějí* činnost tzv.  *$H^+$ /ATP-synthasy*, která tvoří ATP mechanismem *aerobní (oxidativní) fosforylace*

### KATALYTICKÁ FUNKCE METABOLICKÉHO CYKLU

Význam Krebsova citrátového cyklu (jako každého metabolického cyklu, např. ornithinového cyklu močoviny, rovněž objeveného Krebsem) spočívá v tom, že každý jeho člen působí katalyticky.

*Oxalacetát cyklus zahajuje i končí.* Teoreticky jedna molekula oxalacetátu by stačila při plynulé dodávce acetyl-CoA pro neomezený počet cyklů, pokud by se v jiných reakcích oxalacetát nespotřeboval. To platí i pro ostatní členy cyklu.

### ENERGETICKÁ BILANCE CITRÁTOVÉHO CYKLU po spálení 1 acetylového zbytku

isocitrátdehydrogenasa	NAD	2,5 ATP
2-oxoglutarátdehydrogenasa	NAD	2,5 ATP
sukcinátthiokinasa (substrátová fosforylace)		1 GTP (ATP)
sukcinátdehydrogenasa	FAD	1,5 ATP
malátdehydrogenasa	NAD	2,5 ATP

CELKEM ~ 10 ATP

## ENERGETICKÉ ŘÍZENÍ CITRÁTOVÉHO CYKLU

ATP a NADH inhibují:

- pyruvátdehydrogenasu
- klíčové enzymy citrátového cyklu:
  - isocitrátdehydrogenasu
  - 2-oxoglutarátdehydrogenasu

## CITRÁTOVÝ CYKLUS JE ZDROJEM PREKURSORŮ PRO BIOSYNTÉZY (AMFIBOLICKÁ POVAHA CYKLU)

citrát : mastné kyseliny, steroly

2-oxoglutarát: glutamát, aminokyseliny, puriny

sukcinyl-CoA: porfyriny, hem

oxalacetát: aspartát, aminokyseliny, puriny, pyrimidiny

*Oxalacetát je prekursorem fosfoenolpyruvátu*

v **glukoneogenezi**. Reakci katalyzuje za přispění GTP enzym **fosfoenolpyruvátkarboxykinasa**.

### **ANAPLEROTICKÉ REAKCE CITRÁTOVÉHO CYKLU**

Metabolity citrátového cyklu se v průběhu přidružených, zejména *anabolických reakcích spotřebovávají*, a je třeba je proto obnovovat v *doplňujících (anaplerotických) reakcích*.

*Oxalacetát* je doplňován *karboxylací pyruvátu* za spotřeby ATP činností biotin -dependentního enzymu *pyruvátkarboxylasy*.

*V citrátovém cyklu* jako v každém metabolickém cyklu *doplnění kteréhokoli členu přidruženou reakcí má anaplerotický charakter*.