

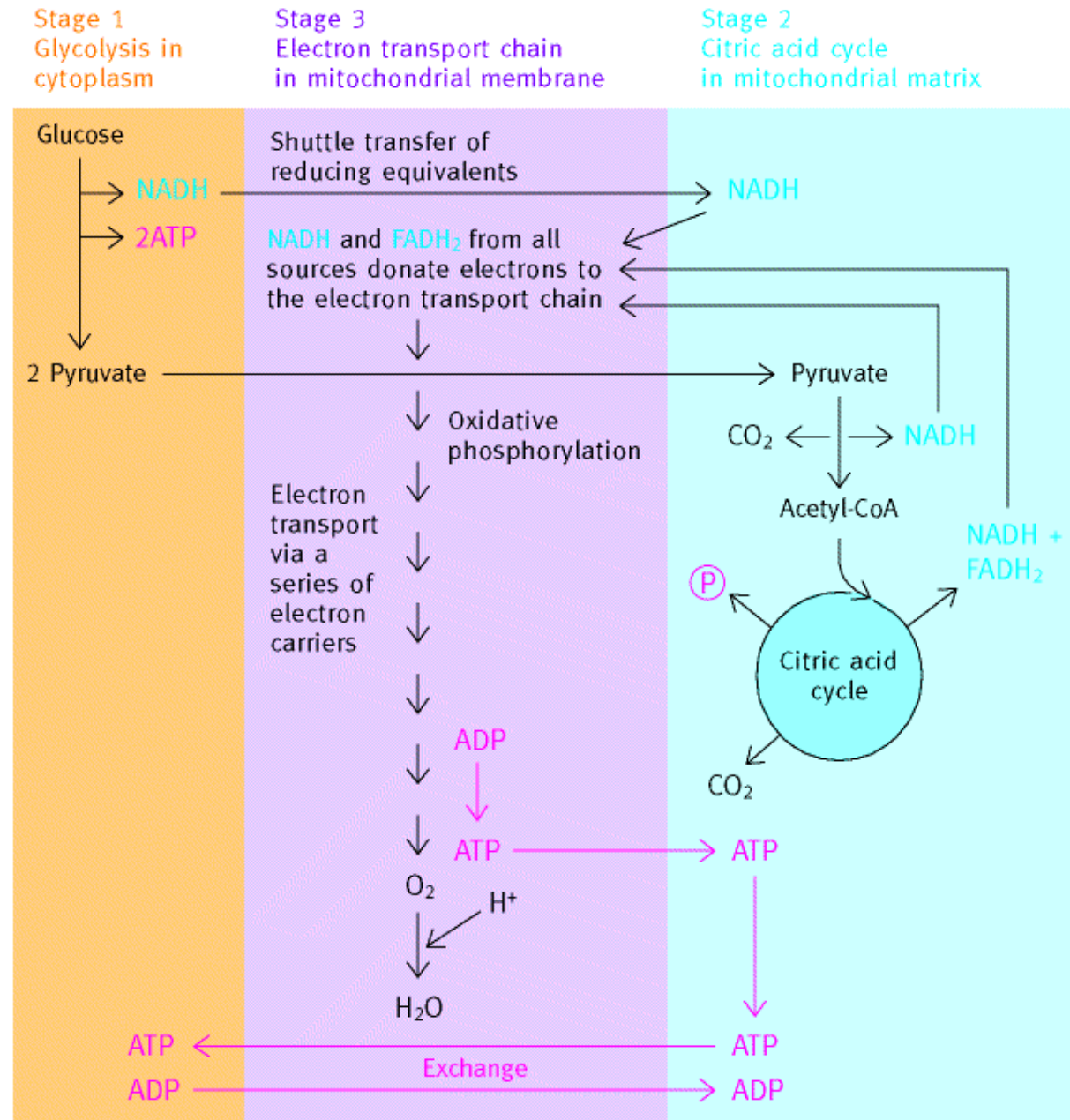
# **Oxidativní dekarboxylace a citrátový cyklus**

## **Dýchací řetězec a oxidativní fosforylace**

Evžen Křepela

Ústav lékařské biochemie 1. LF UK

# Souhrn oxidace glukósy



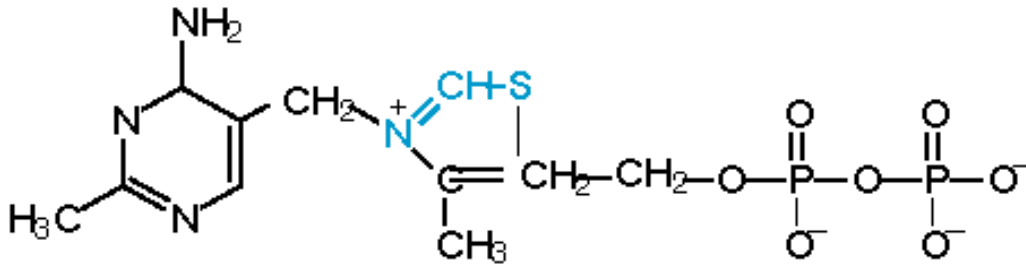
# **Přeměna pyruvátu na acetyl-CoA (oxidativní dekarboxylace):**



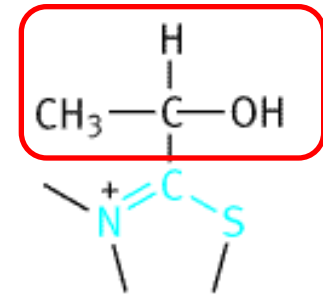
$$\Delta G^{\circ'} = -33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Přeměnu katalyzuje pyruvátdehydrogenasový komplex uvnitř mitochondrií, kam je pyruvát přenesen z cytosolu protonovým symportem.

# Koenzymy pyruvátdehydrogenasy: TPP, lipoát, NAD, FAD

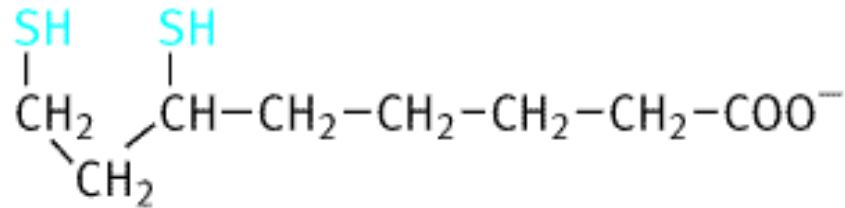


**Thiaminpyrofosfát (TPP)**

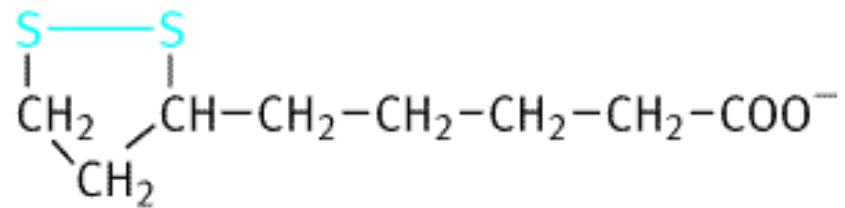


**hydroxyethyl-TPP**

redukovaný lipoát



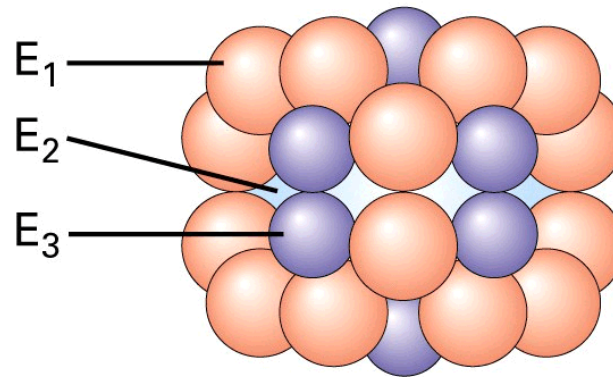
oxidovaný lipoát



**Lipoová kyselina (lipoát)** je připojena amidicky na Lys zbytek

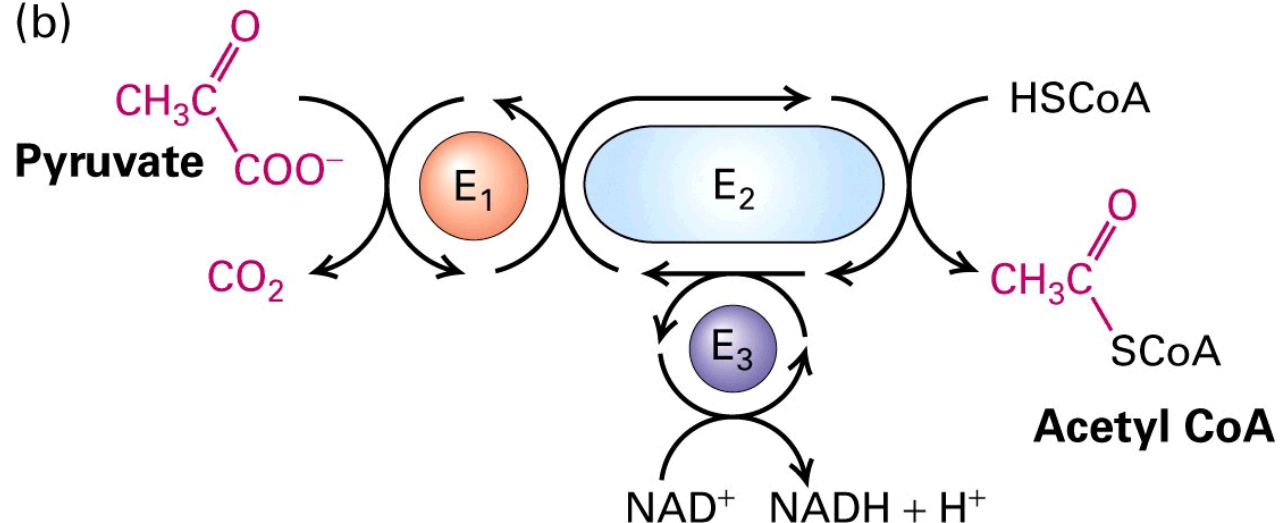
# Pyruvátdehydrogenasový komplex

(a)



E1 = pyruvátdehydrogenasa  
E2 = dihydrolipoyltransacetylasa  
E3 = dihydrolipoyldehydrogenasa

(b)

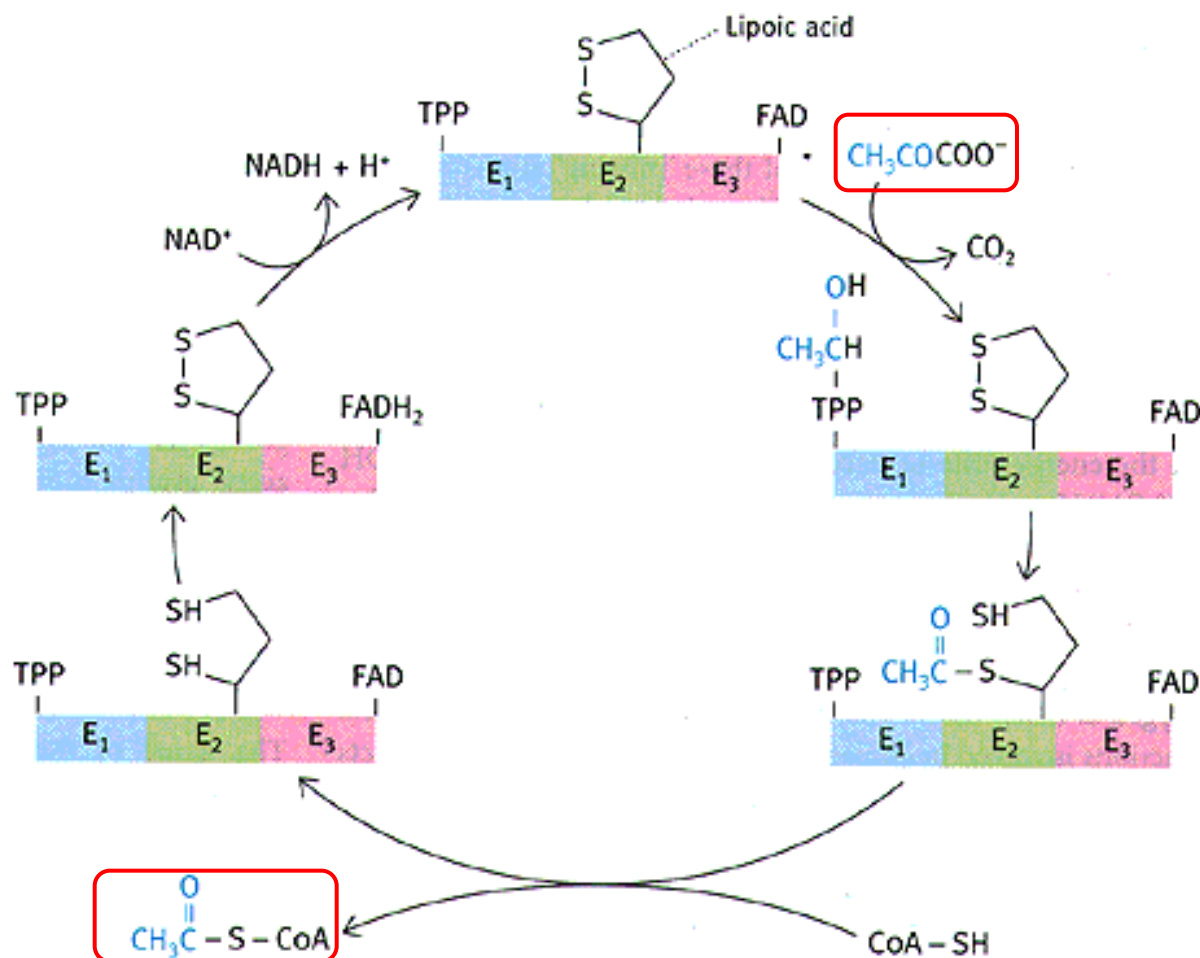


**Net reaction:**

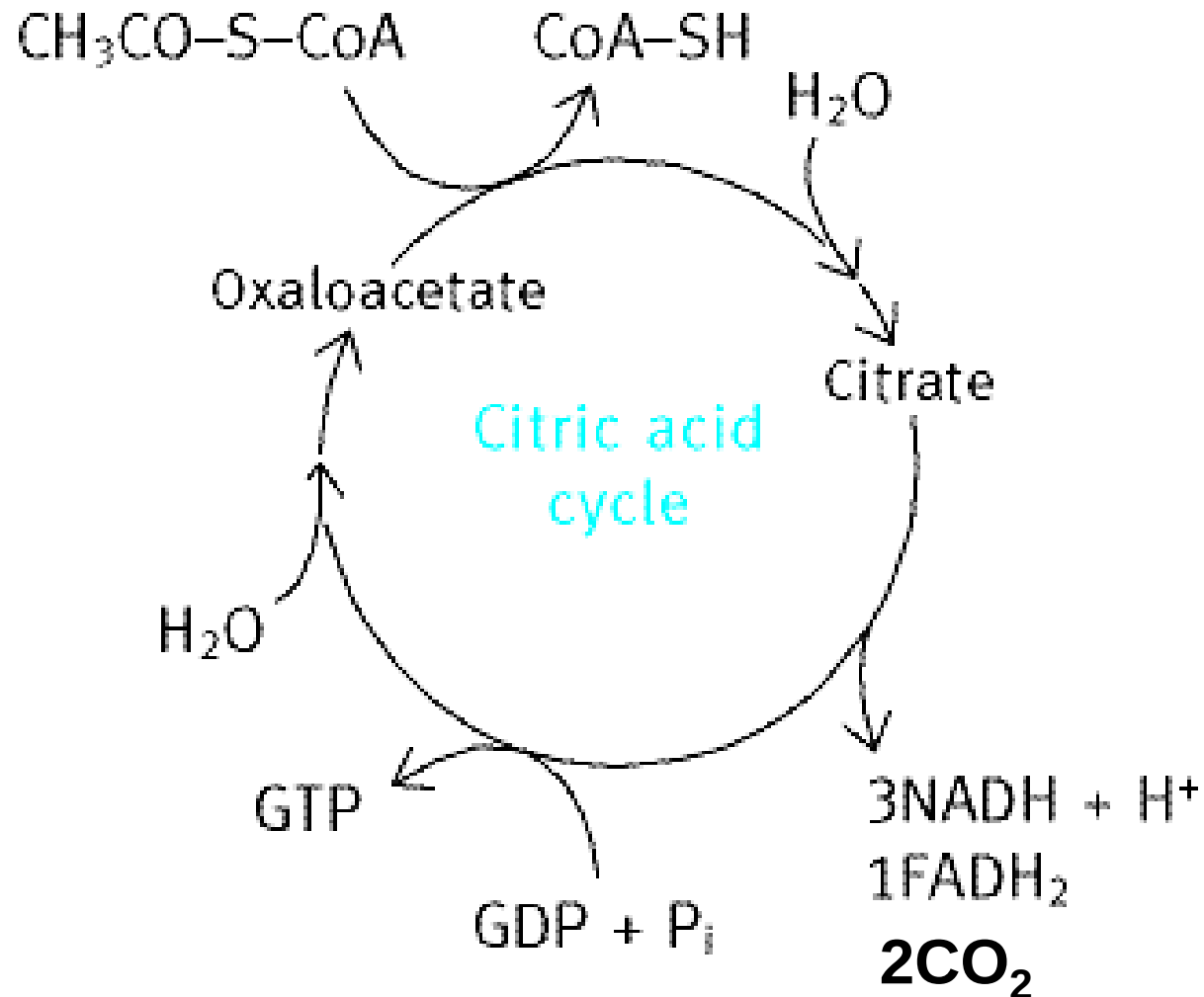


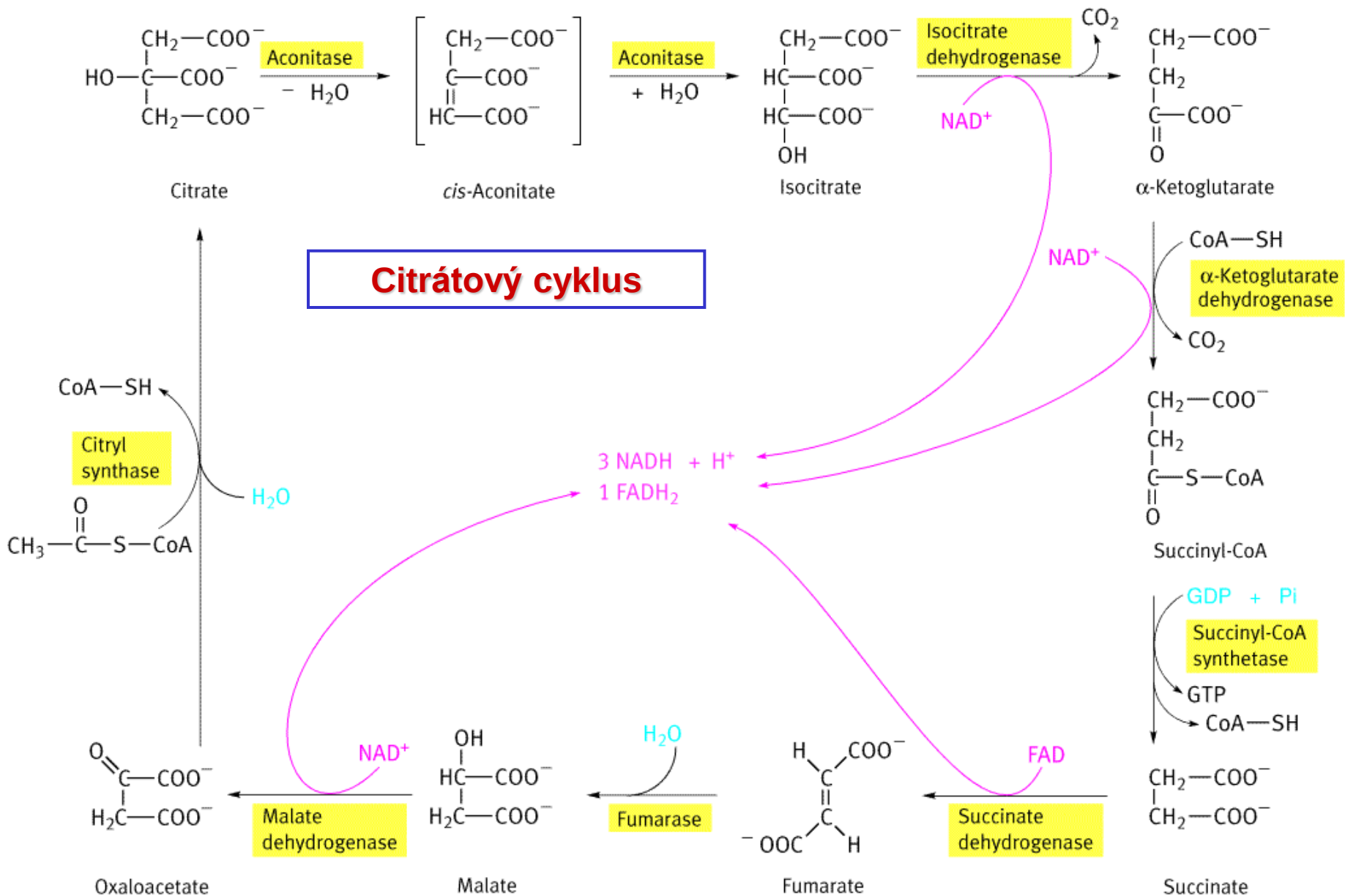
## Mechanismus pyruvátdehydrogenasové reakce:

TPP, thiaminpyrofosfát; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> a E<sub>3</sub>, enzymové složky multienzymového komplexu



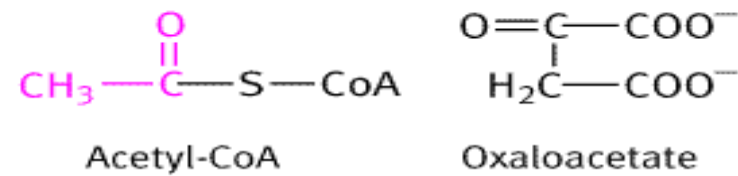
# Cyklus tricarboxylových kyselin (citrátový cyklus, Krebsův cyklus):



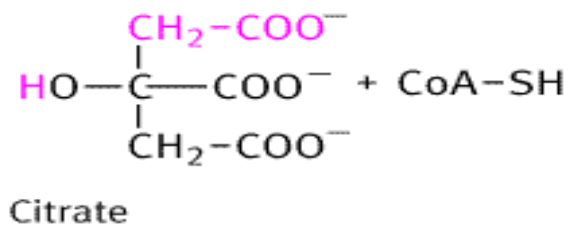
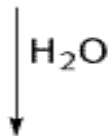
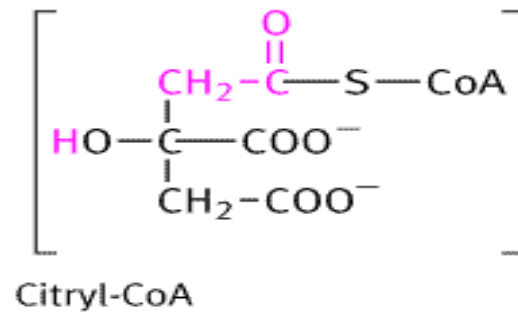




# 1. Biosyntéza citrátu:

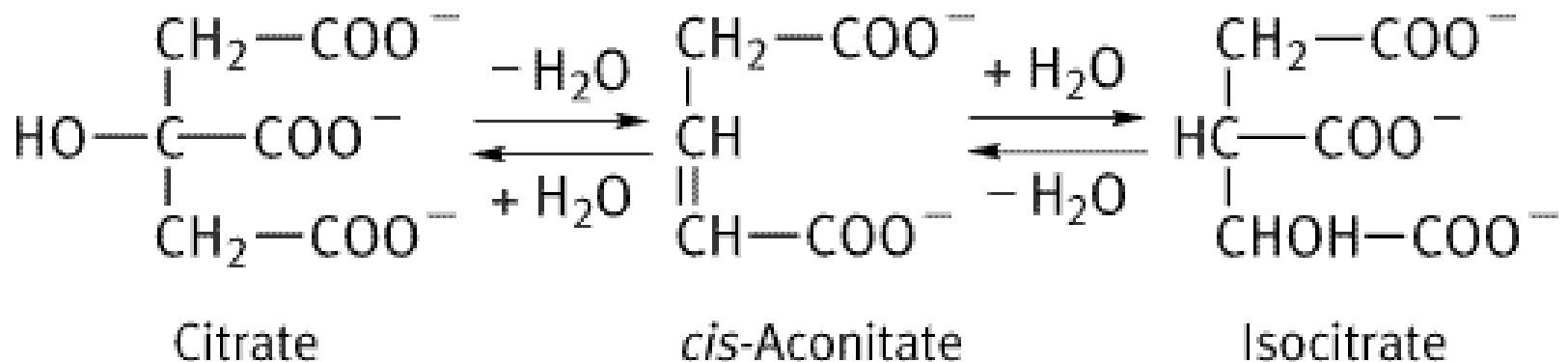
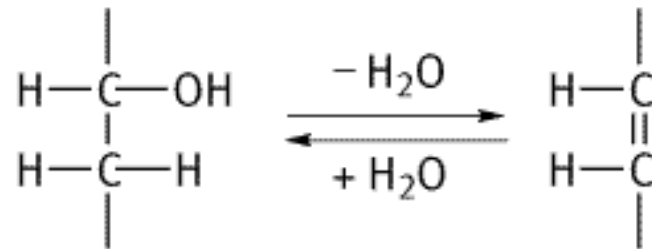


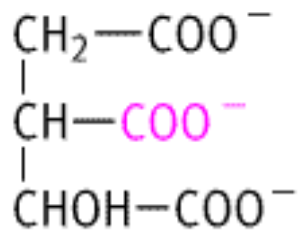
**Citrate  
synthase**



## 2. Přeměna citrátu na $\alpha$ -ketoglutarát:

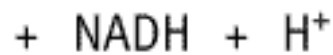
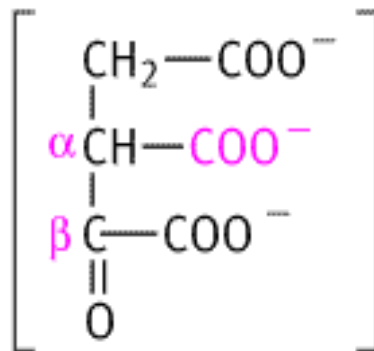
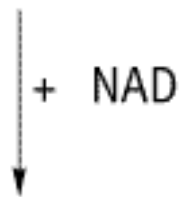
### Aconitase



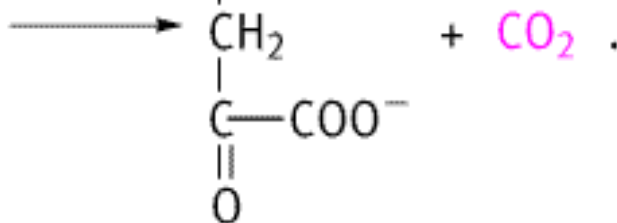


Isocitrate

## Isocitrate dehydrogenase

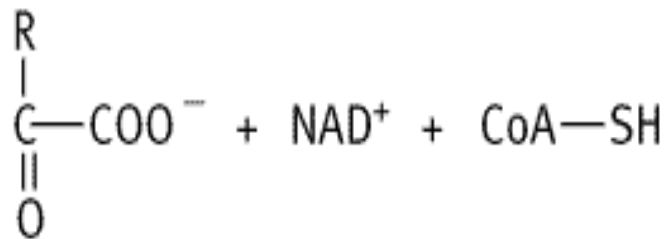


Oxalosuccinate

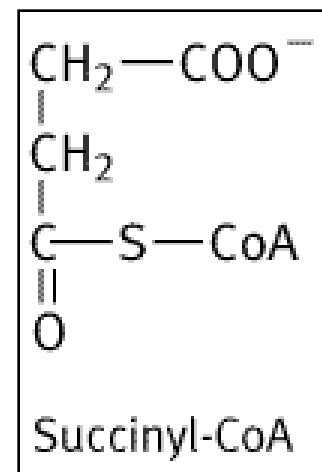
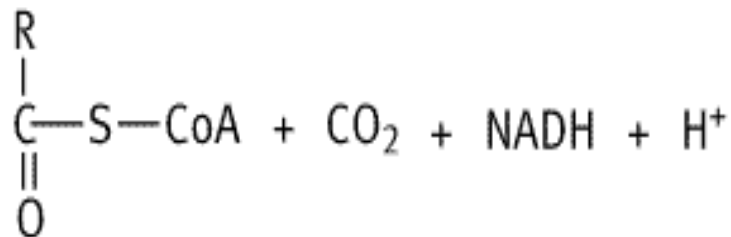


$\alpha$ -Ketoglutarate

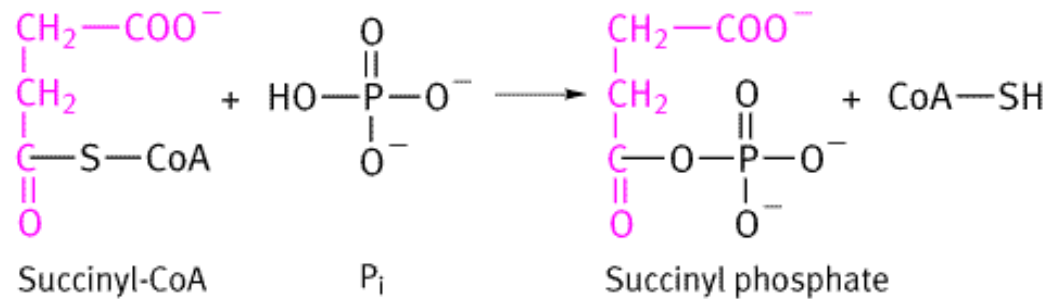
### 3. Oxidativní dekarboxylace $\alpha$ -ketoglutarátu:



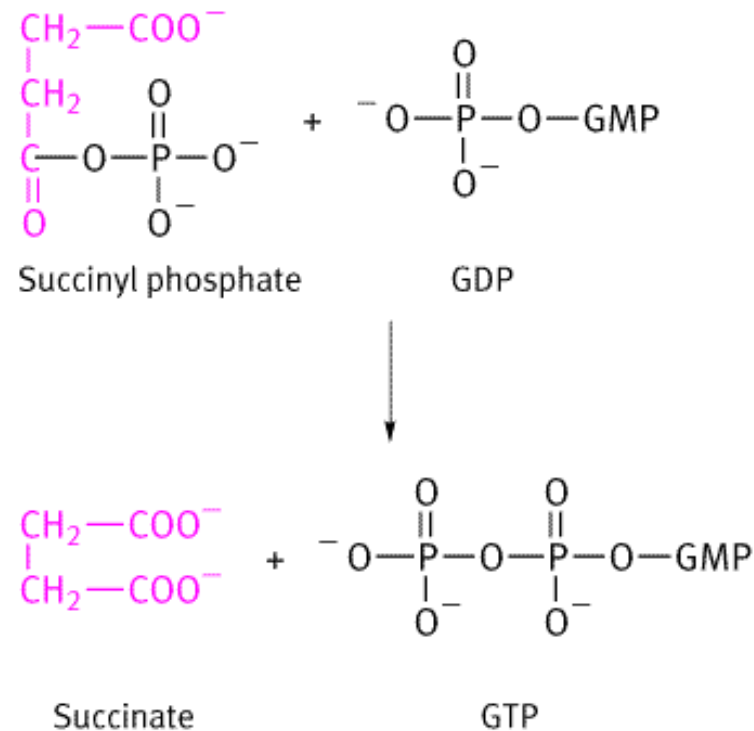
**$\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase**



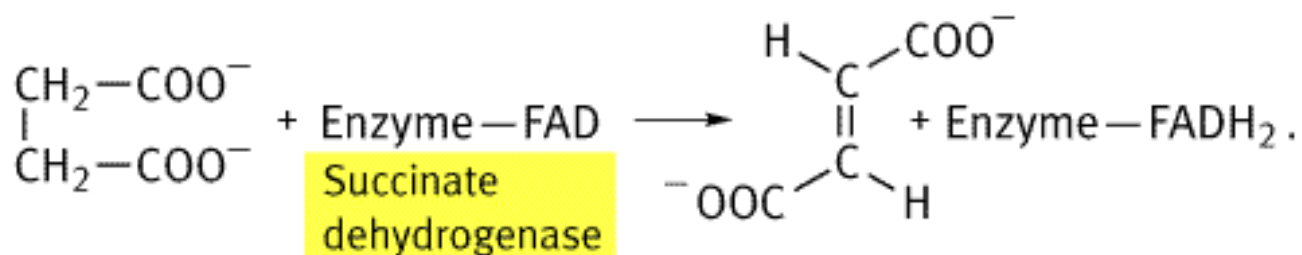
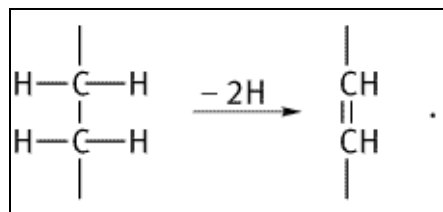
## 4. Štěpení sukcinyl-CoA je spřaženo s tvorbou GTP:



**Succinyl-CoA  
synthetase**

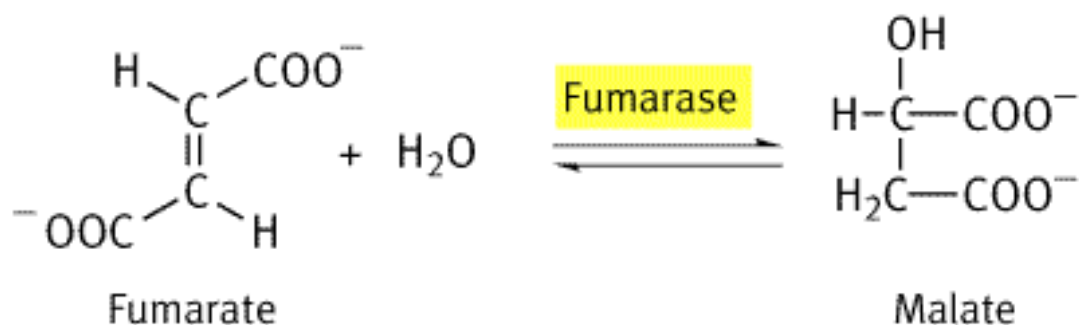


## 5. Přeměna sukcinátu na oxalacetát:



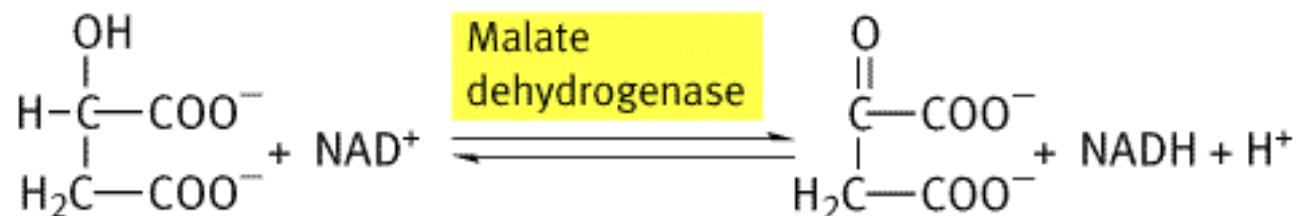
Succinate

Fumarate



Fumarate

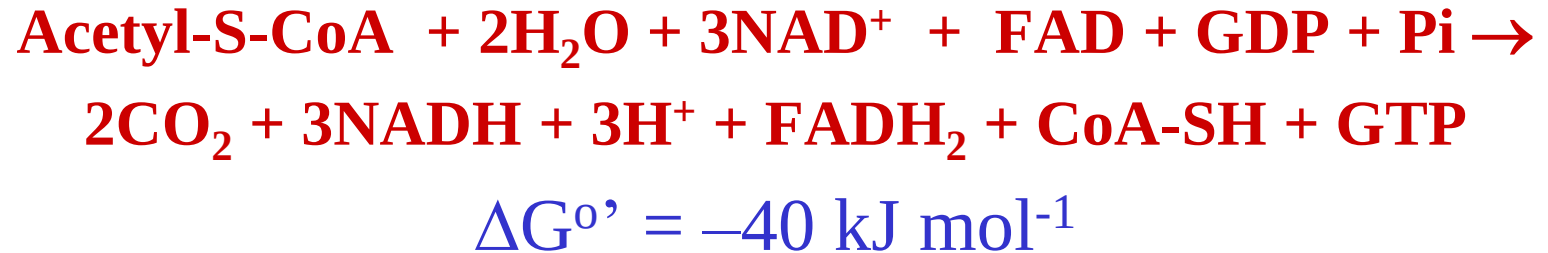
Malate



Malate

Oxaloacetate

# Stechiometrie citrátového cyklu

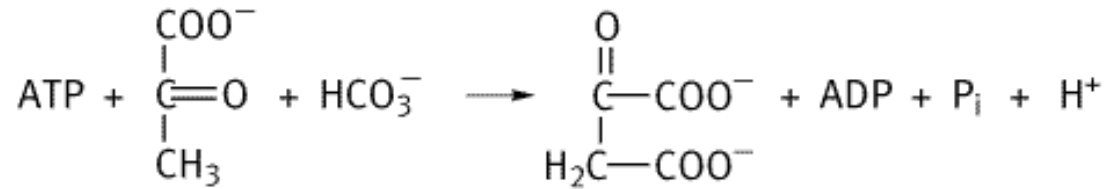


Cyklus jako celek pracuje **jednosměrným způsobem** protože jsou v něm **tři nevratné reakce**:

- syntéza citrátu  $\Delta G^{\circ'} = -32.2 \text{ kJ mol}^{-1}$
- dekarboxylace isocitrátu  $\Delta G^{\circ'} = -20.9 \text{ kJ mol}^{-1}$
- dekarboxylation  $\alpha$ -ketoglutarátu  $\Delta G^{\circ'} = -33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$

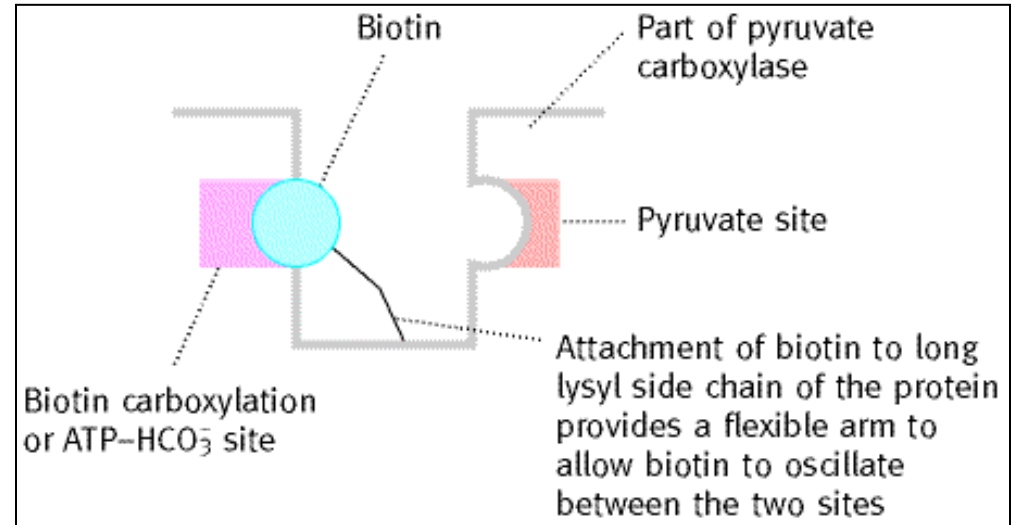
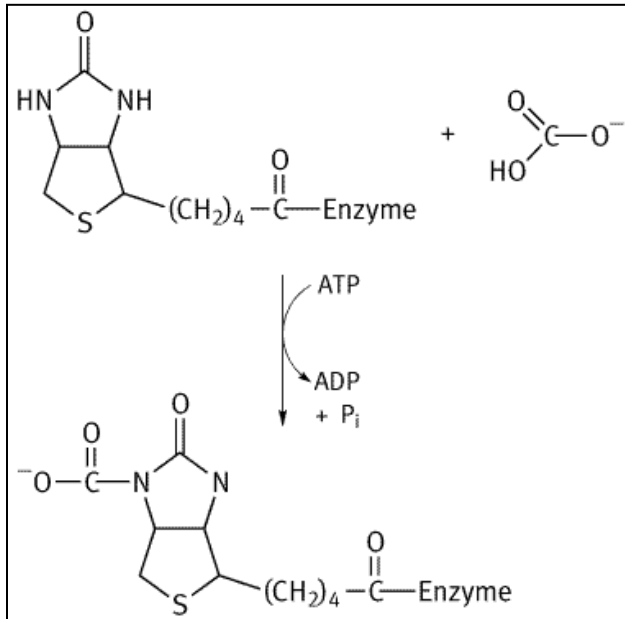
**Anaplerotické reakce** jsou reakce, které vytvářejí meziprodukty citrátového cyklu:

## Pyruvátkarboxylasa



pyruvát

oxalacetát



**Kataplerotické reakce** jsou reakce, které spotřebovávají meziprodukty citrátového cyklu



# Biologické oxidace

- **Oxidace** = ztráta elektronů:



nebo ztráta elektronů + protonů (= odnětí vodíku):

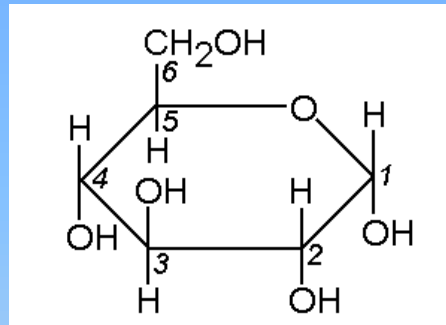


- **Redukce** = získání elektronů (vodíku)
- Oba procesy jsou zpravidla spojeny
- Metabolismus:
  - oxidace živin poskytuje energii
  - redukce vyžaduje dodání energie
- Konečný **akceptor elektronů** v těle je **molekulární kyslík**

# K čemu vlastně potřebujeme kyslík?

Přenos elektronů (oxidace) z organických látek na kyslík uvolňuje obrovské množství energie

Např. glukosa:



$$\Delta G^{\circ'} = -2820 \text{ kJ/mol (180 g glukosy)}$$

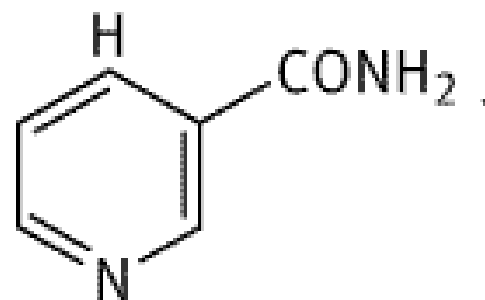
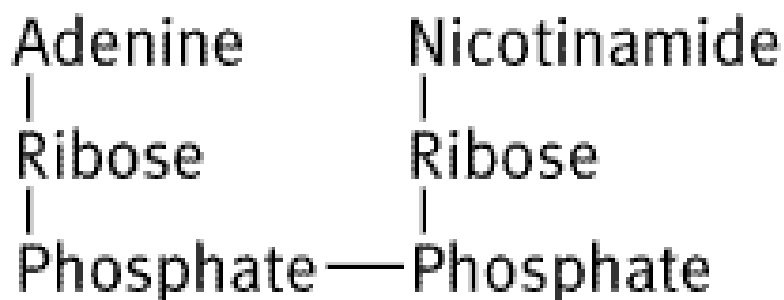
Reaktivitu kyslíku omezuje kinetická bariéra (tzv. spinová restrikce) – nezbytná katalýza přechodnými kovy (železo, měď)

# **Redoxní kofaktory:**

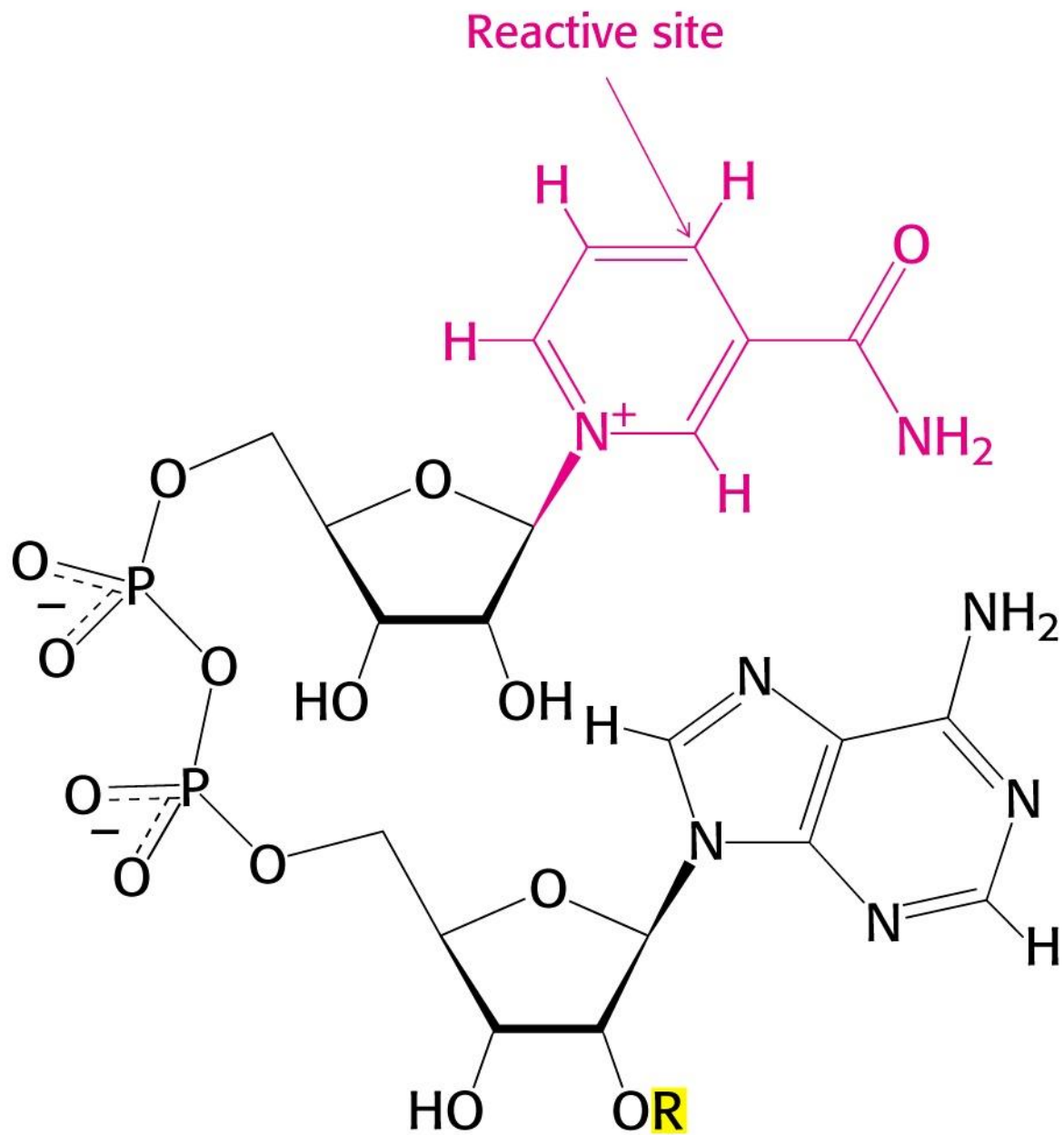
- **Nikotinamidové nukleotidy (NAD, NADP)**
- **Flavinové nukleotidy (FAD, FMN)**
- **Ubichinon (koenzym Q)**
- **Hemové železo (cytochromy)**
- **Nehemové železo se sírou (Fe-S clusters)**

# Redoxní kofaktory:

- **Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>)**



- **Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP<sup>+</sup>)**



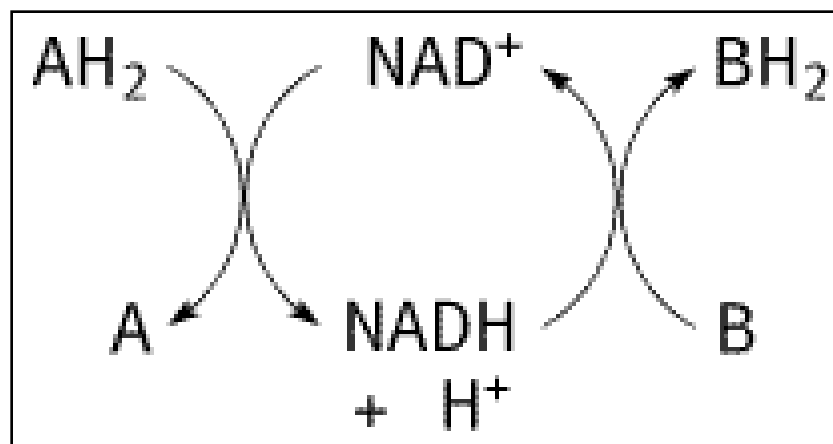
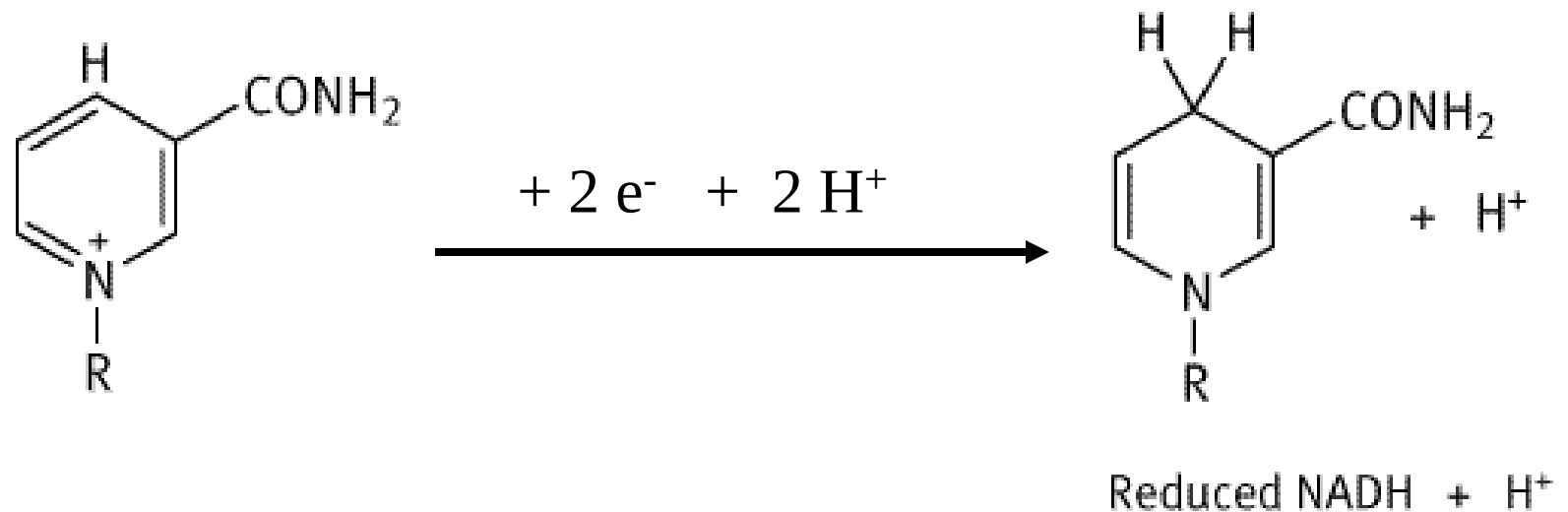
**NAD<sup>+</sup> :**

**R... H**

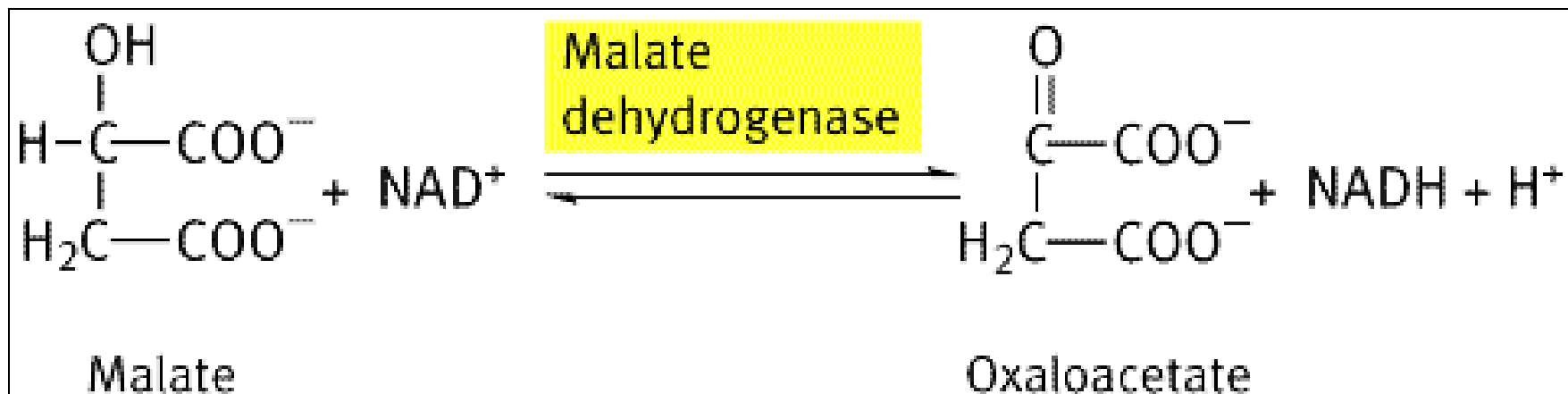
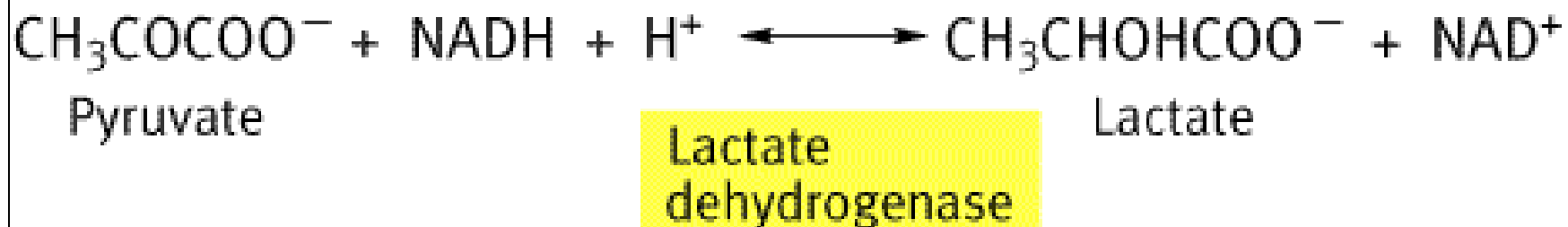
**NADP<sup>+</sup> :**

**R .... phosphate**

# Oxidace/redukce $\text{NAD}^+$ :

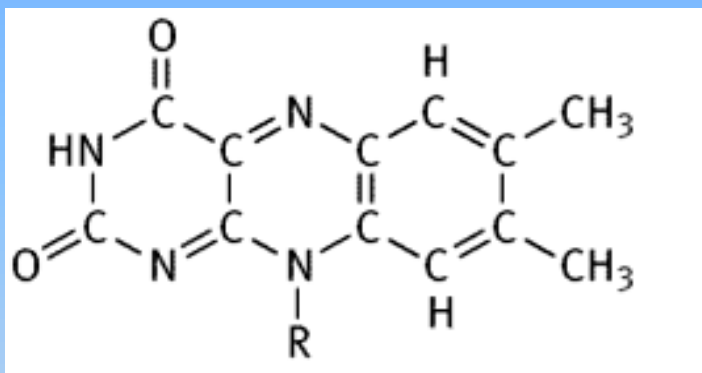


# Příklady biologických oxidoredukcí využívajících NADH:



# Redoxní kofaktory:

- **Flavinadenindinukleotid (FAD)**

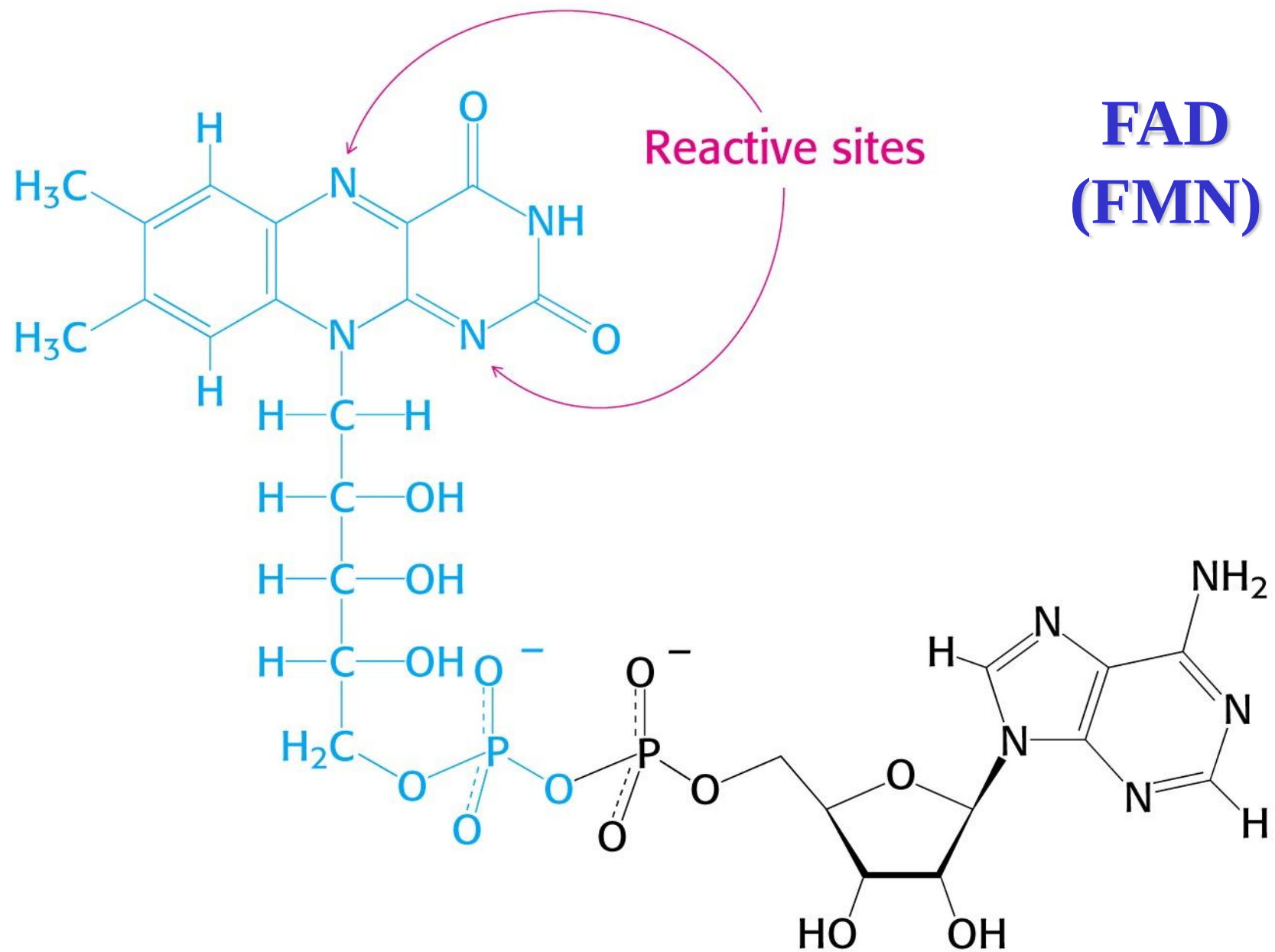


Isoalloxazinový kruh - ribitol - P - P - ribosa - adenin

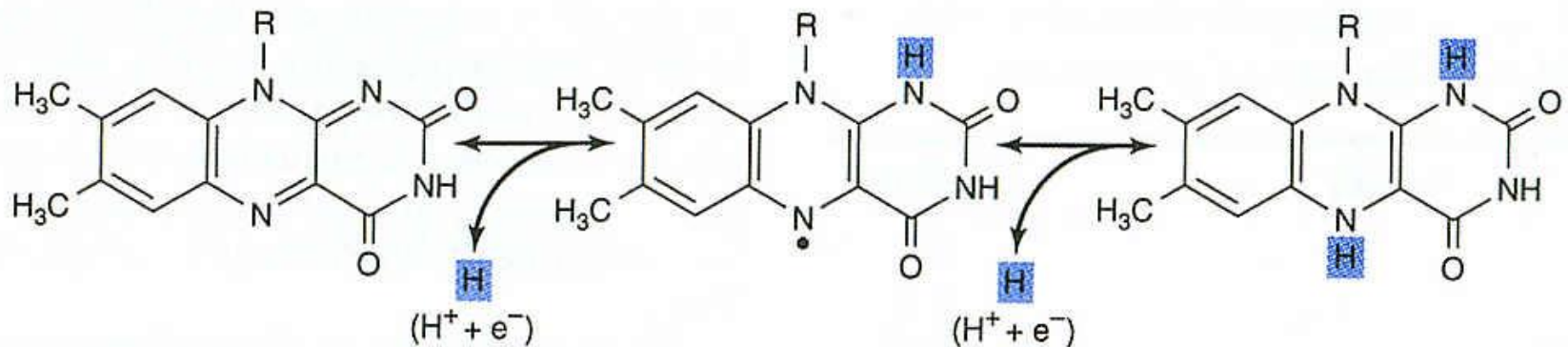
- **Flavinmononukleotidfosfát (FMN)**

Isoalloxazinový kruh - ribitol - P



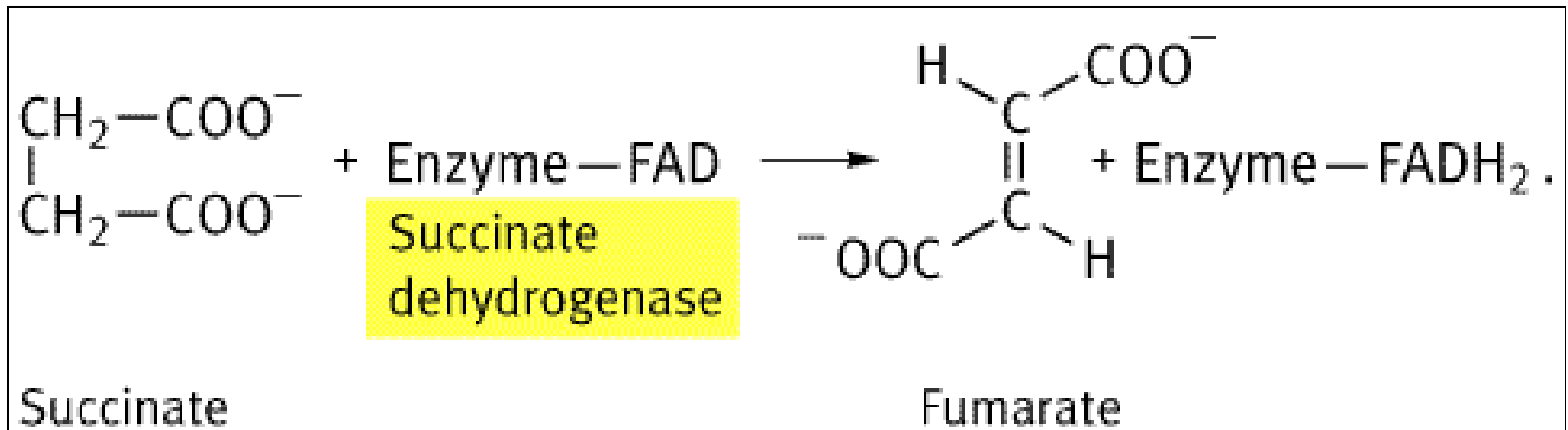


# Oxidace/redukce FAD :

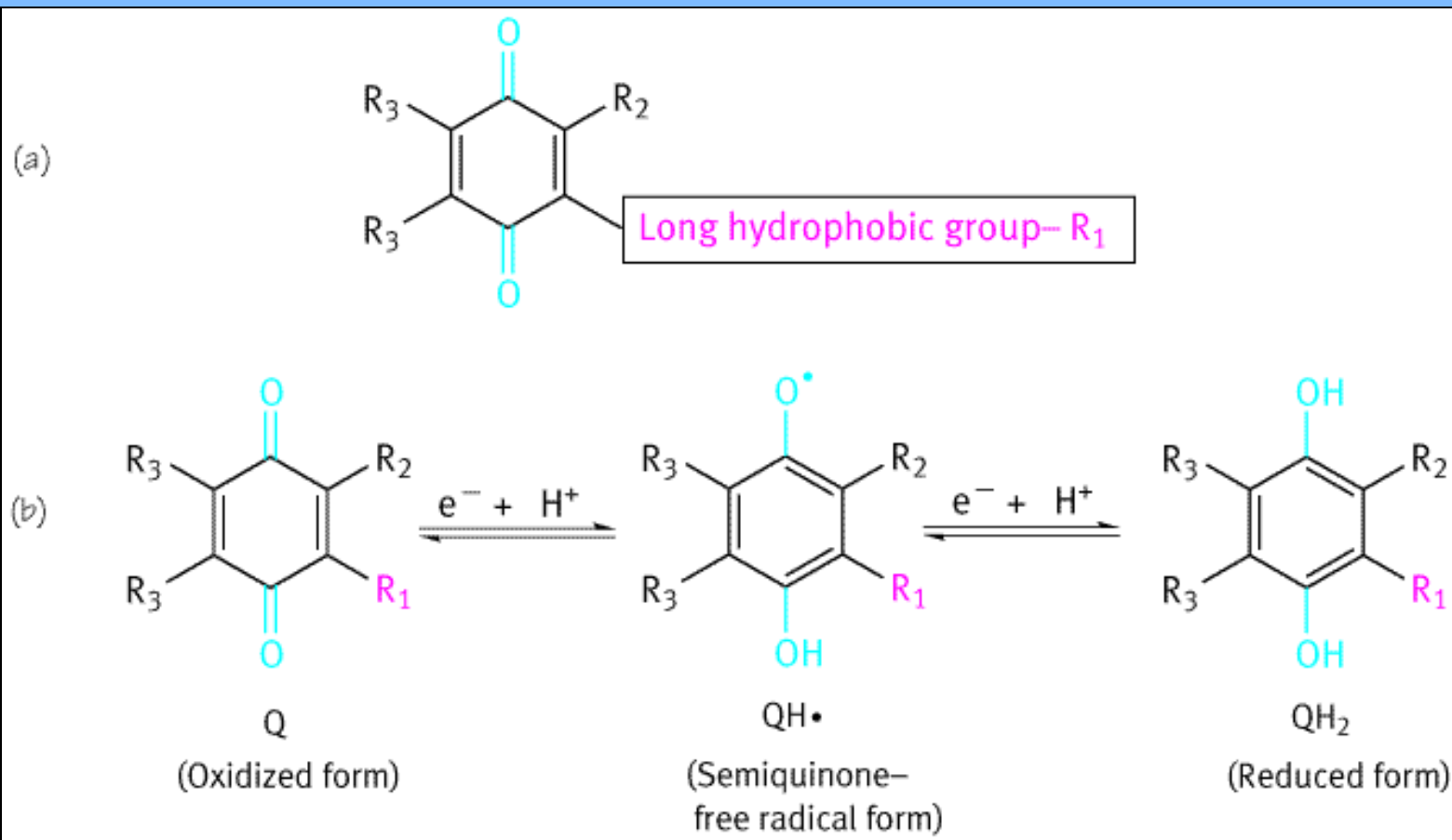
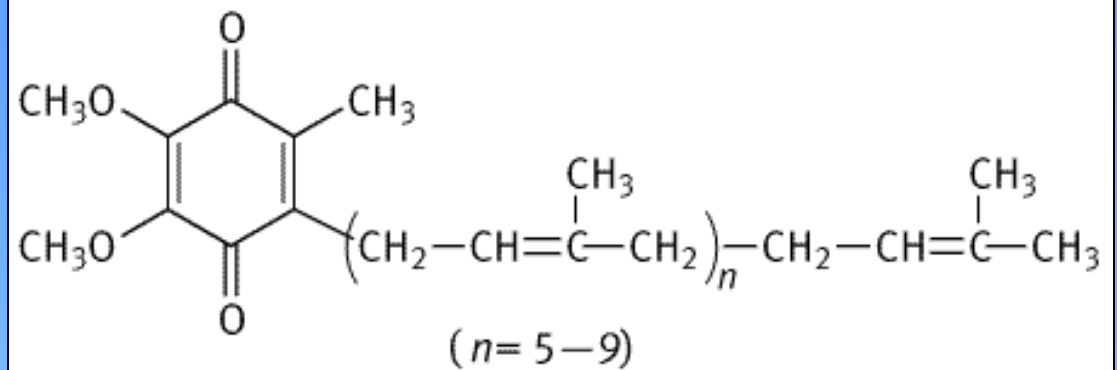


**Figure 11-2.** Oxidoreduction of isoalloxazine ring in flavin nucleotides via a semi-quinone (free radical) intermediate (center).

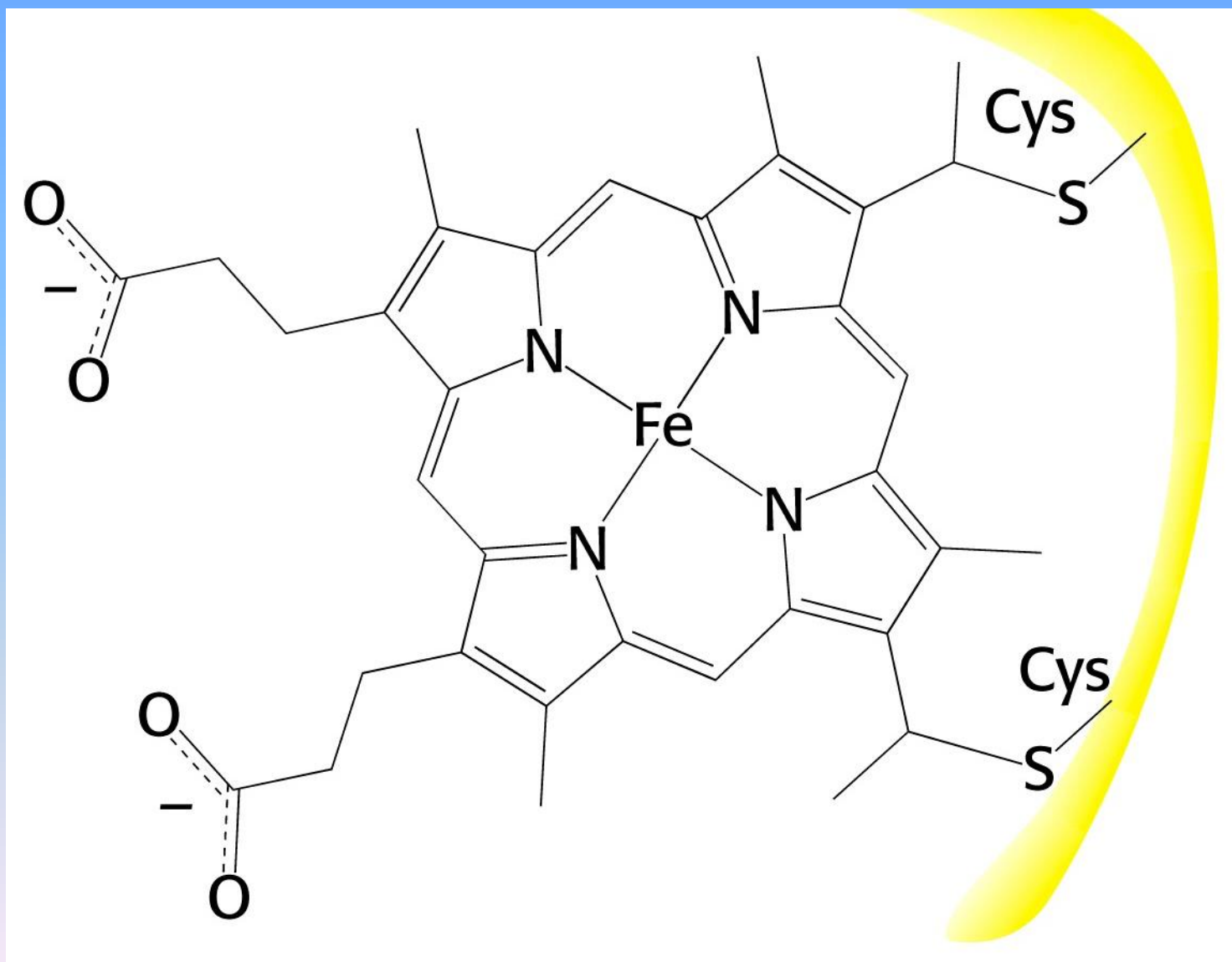
## Příklad biologické oxidoredukce využívajících FAD:



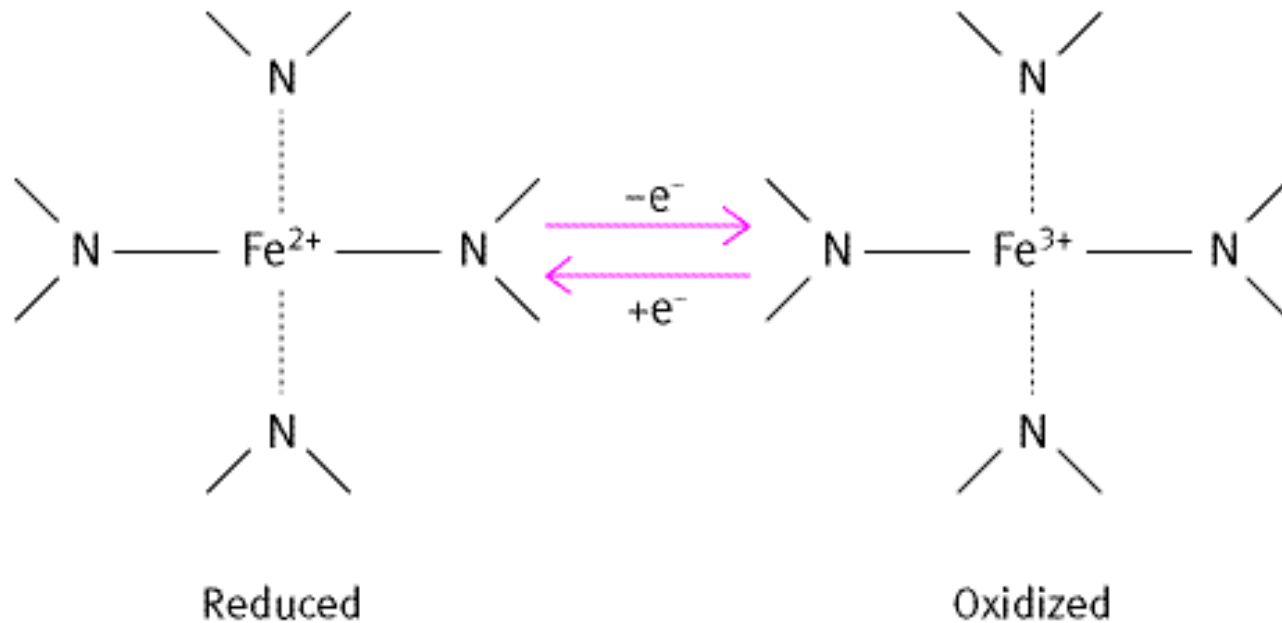
# Ubichinon (Koenzym Q)



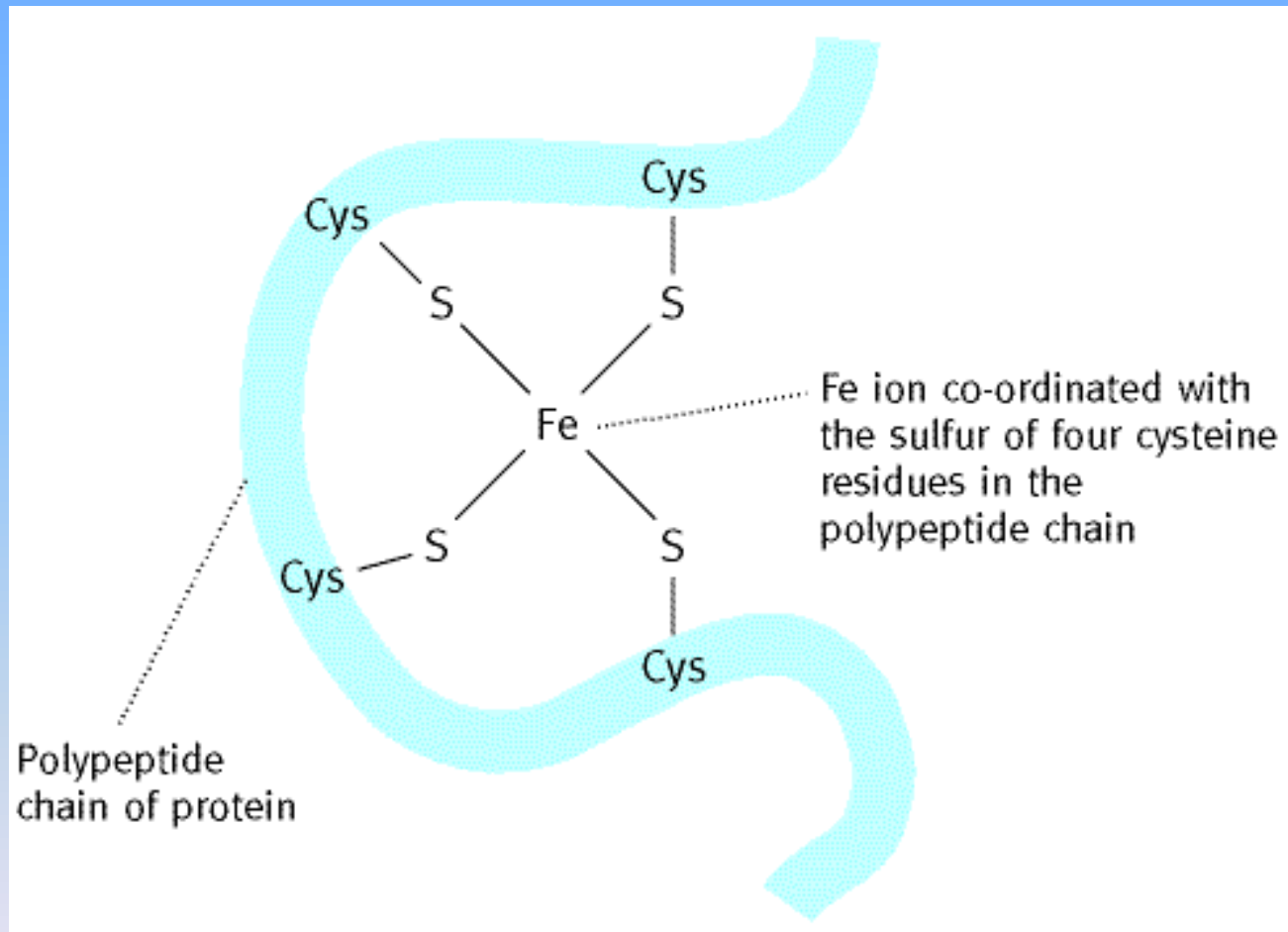
# Hem v cytochromech



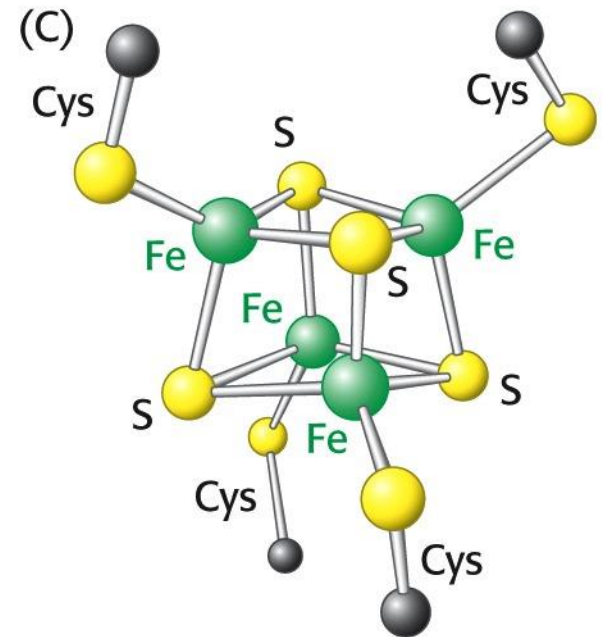
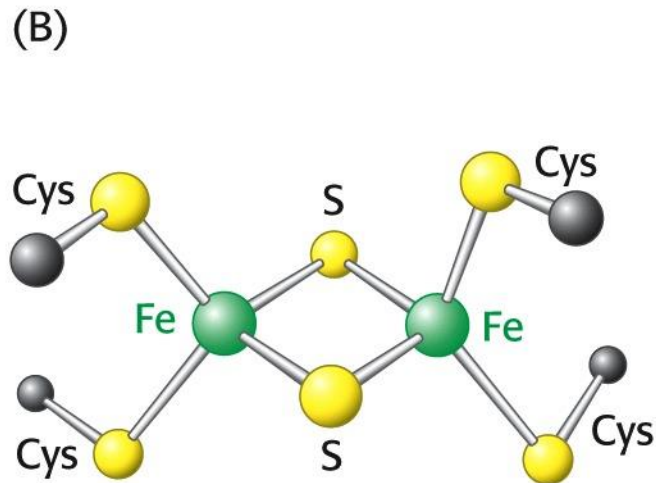
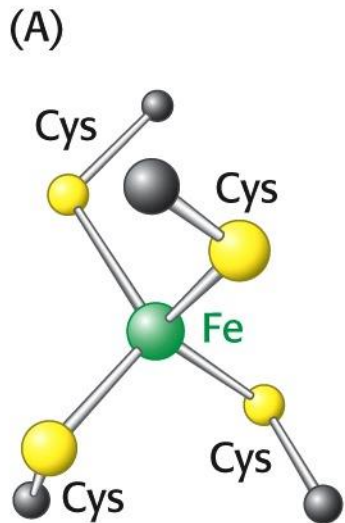
# Hem v cytochromech



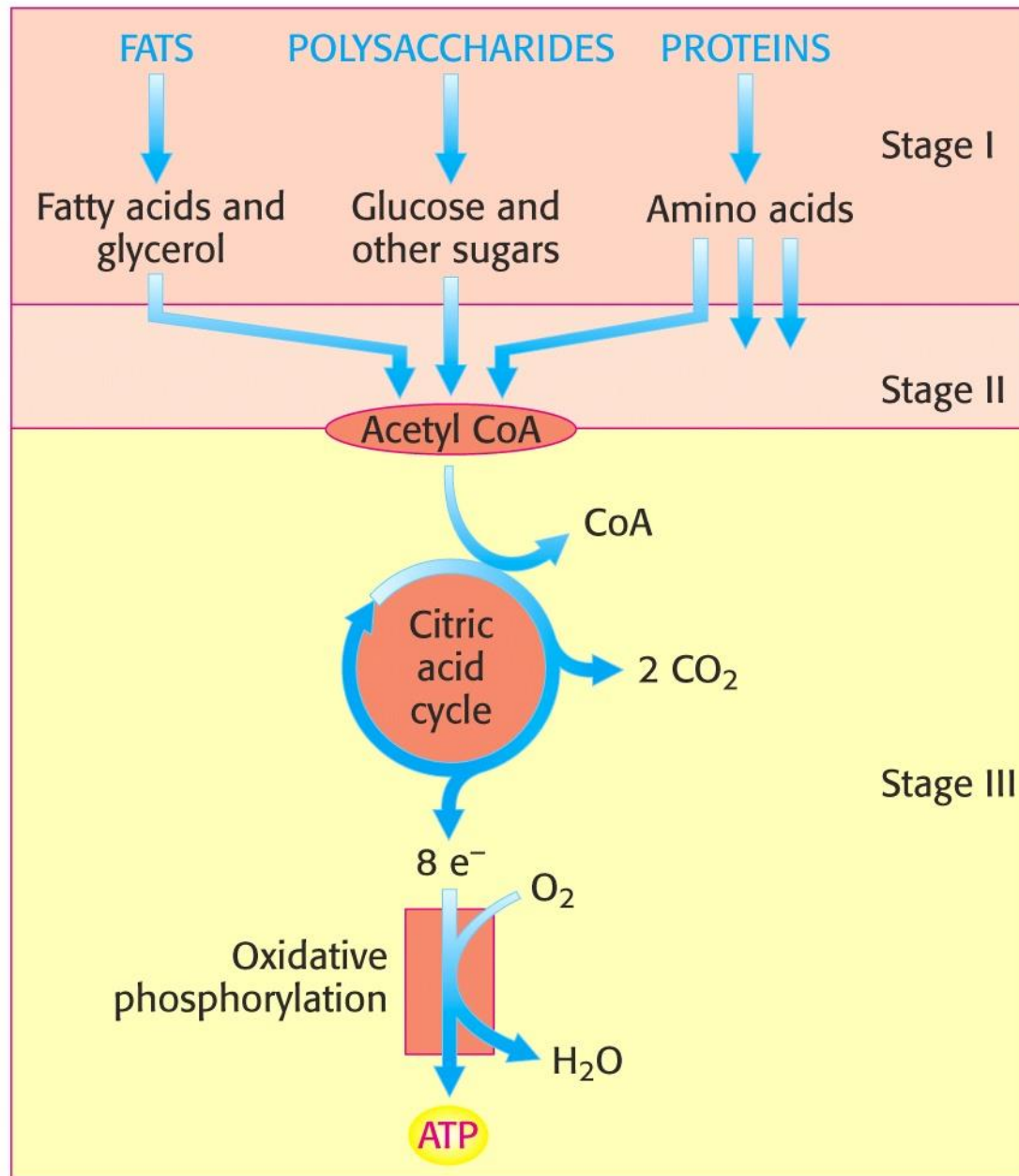
# Fe-S centra



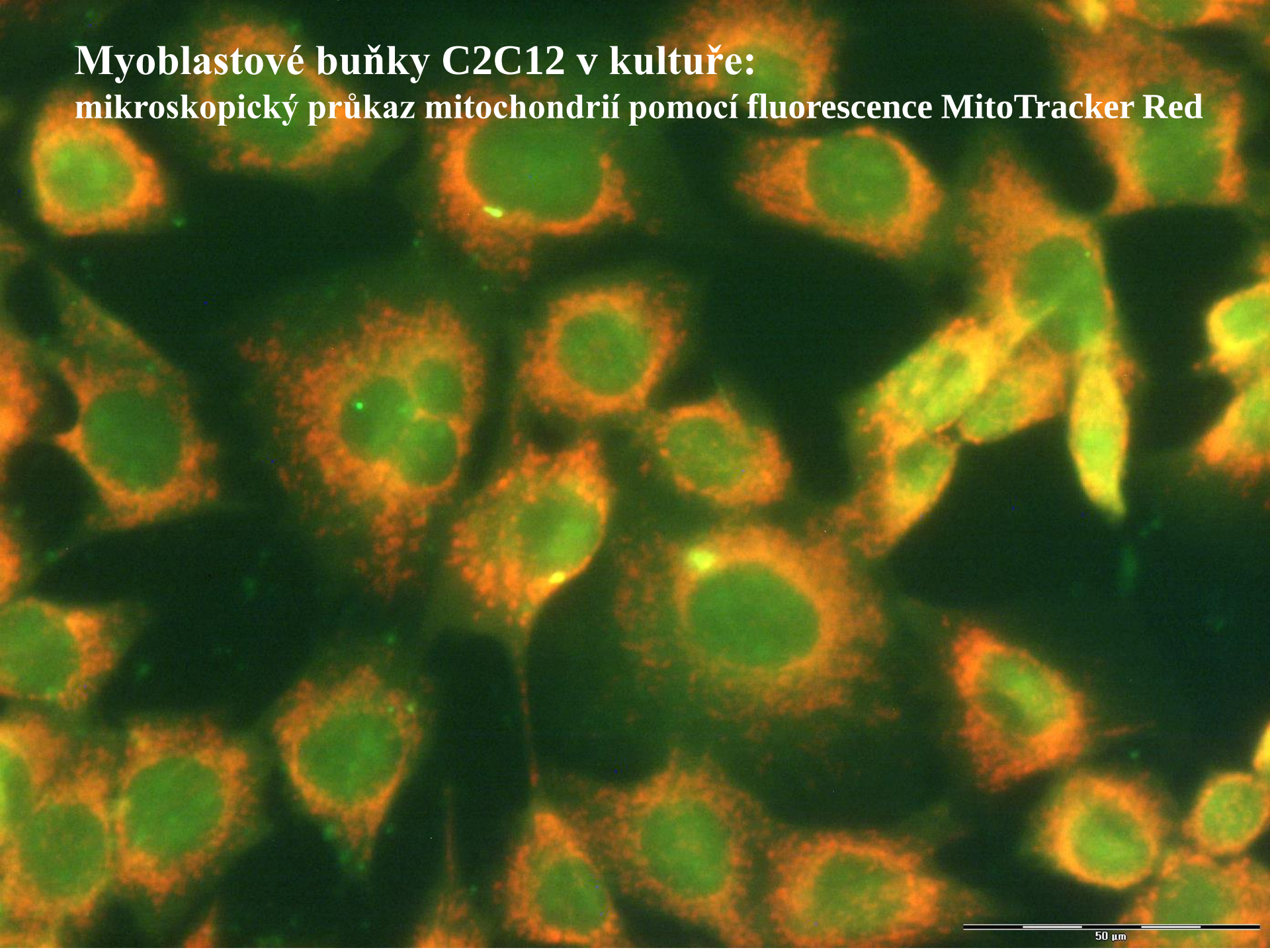
# Fe–S centra



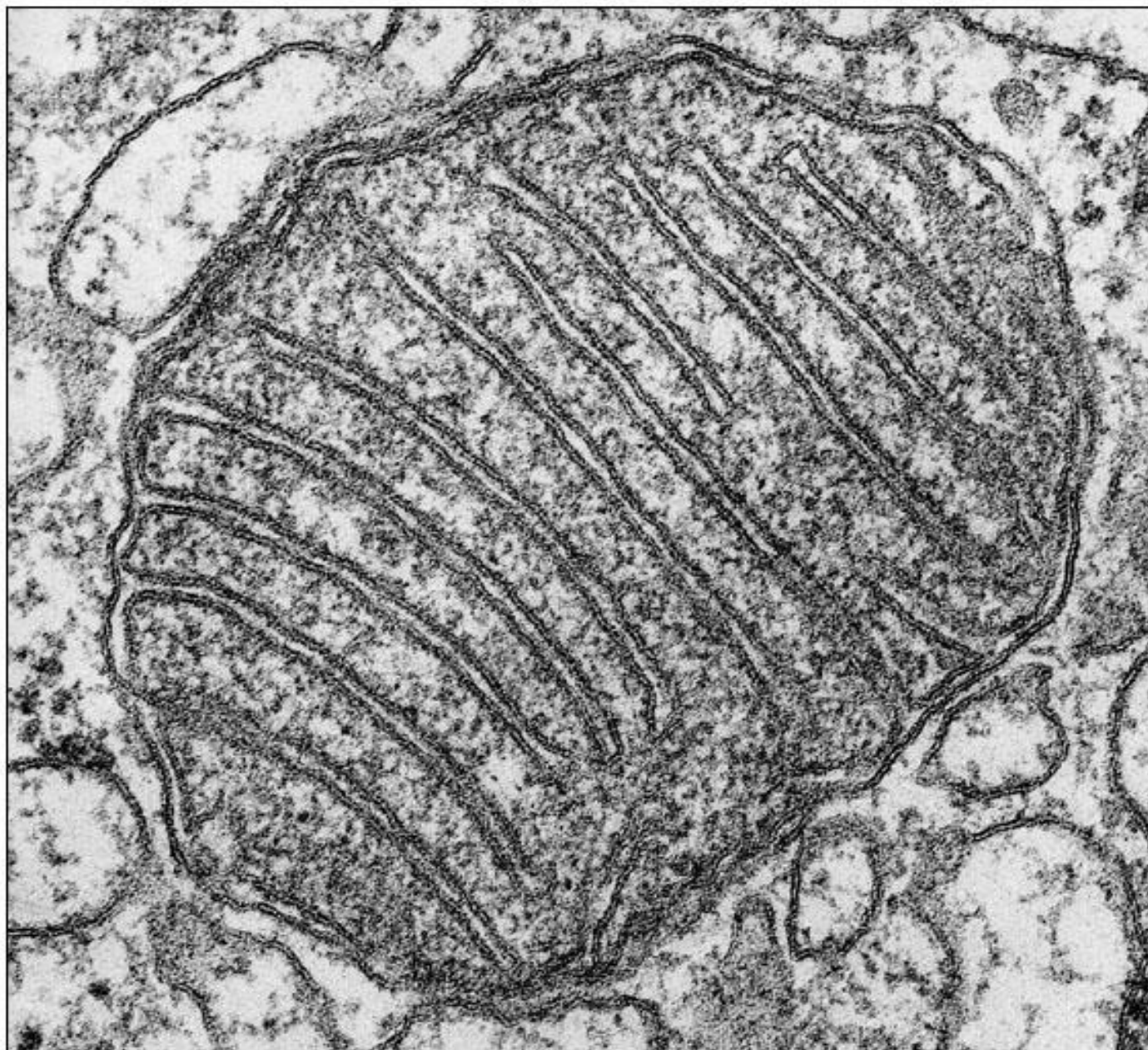




**Myoblastové buňky C2C12 v kultuře:  
mikroskopický průkaz mitochondrií pomocí fluorescence MitoTracker Red**



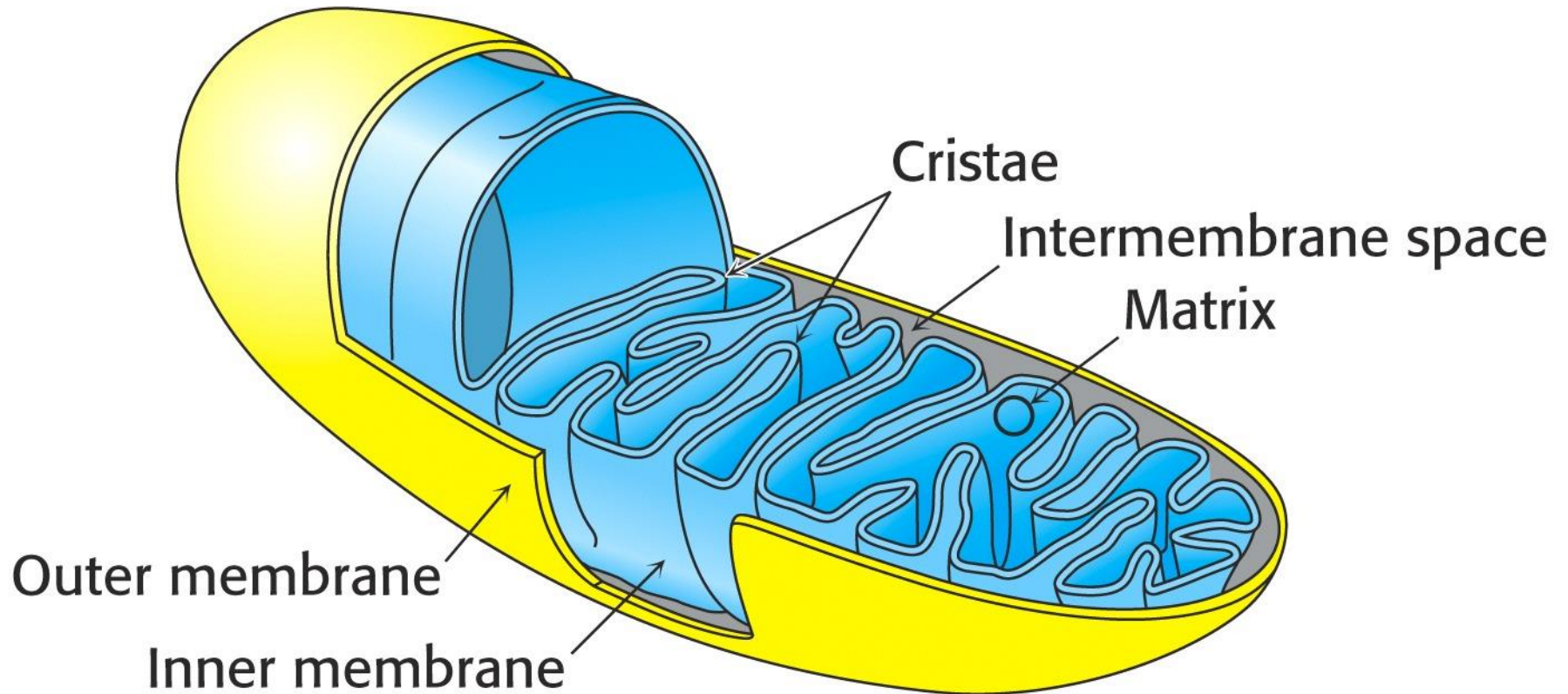




100 nm

**Transmisní elektronogram mitochondrie**

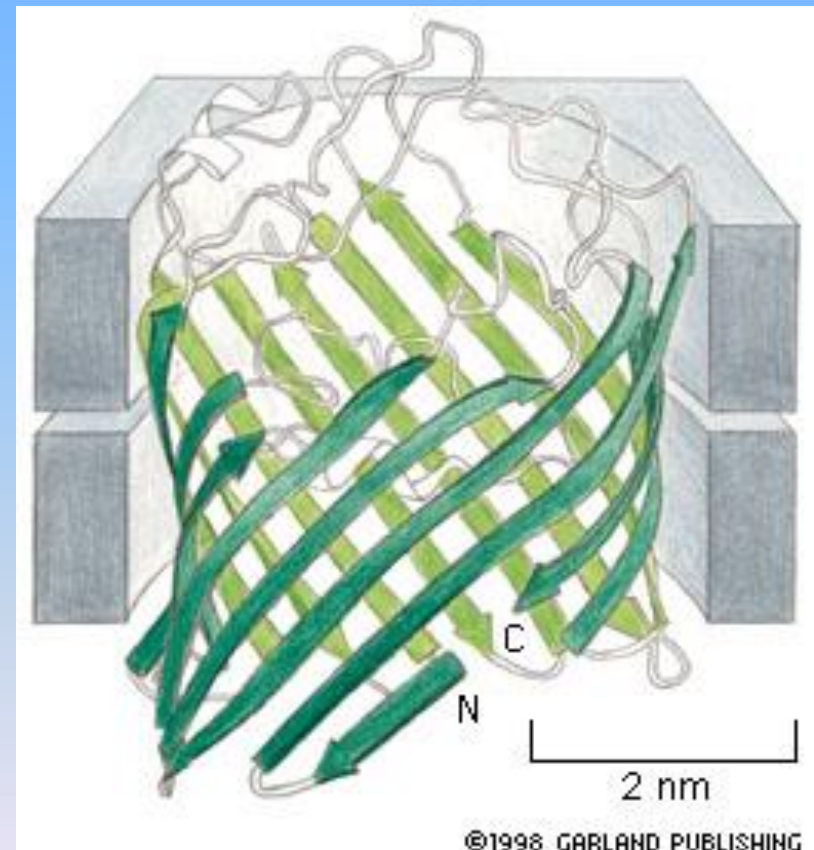
# Schéma mitochondrie





# Vnější mitochondriální membrána

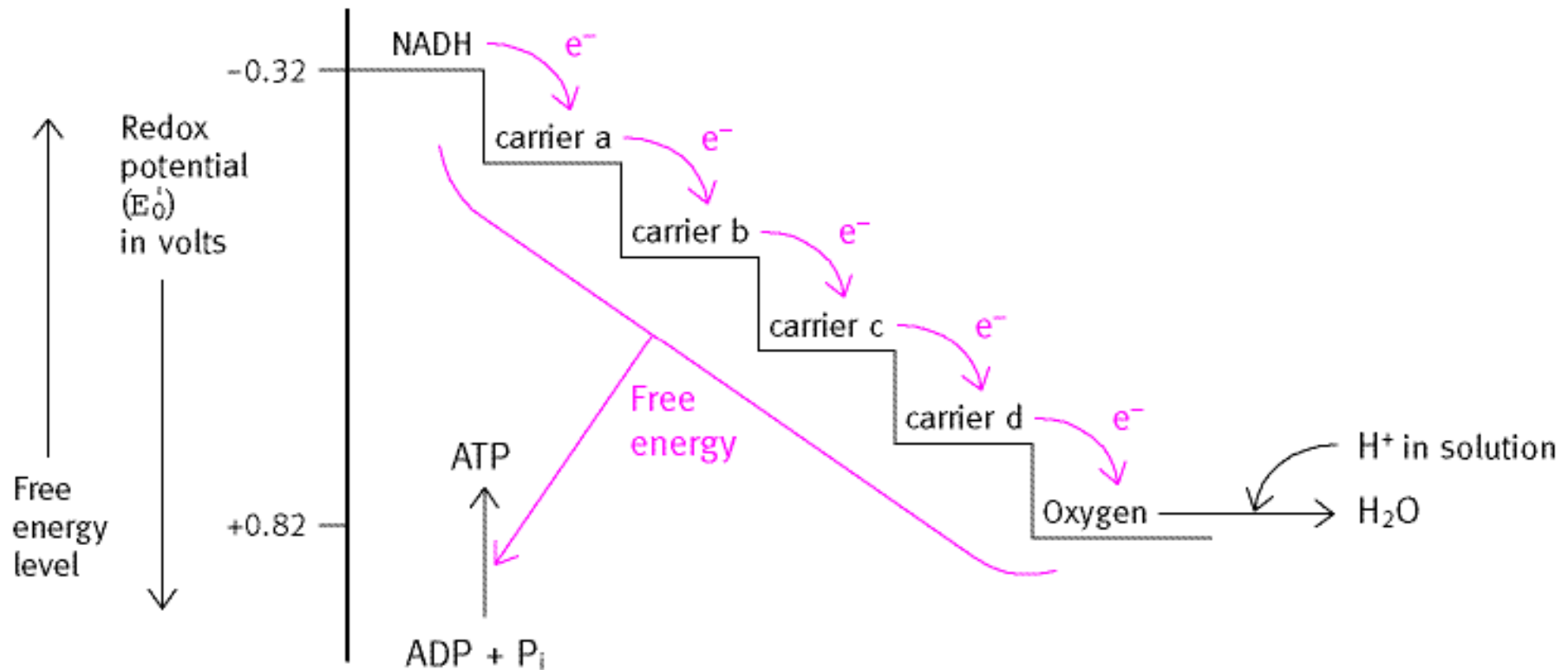
- Obsahuje porin (VDAC)
- Proto je propustná pro všechny látky do asi 5000 Da



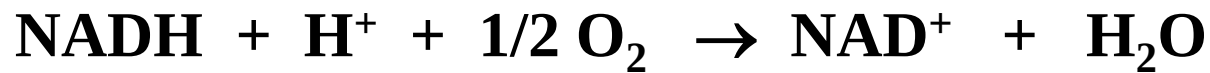
# Vnitřní mitochondriální membrána

- Neobvyklé složení:
  - vysoký obsah proteinů (76%)
  - kardiolipin (difosfatidylglycerol)
- Volně propustná pouze pro
  - nenabitě malé molekuly (voda, kyslík,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ )
  - monokarboxylové kyseliny (3-hydroxybutyrát, acetát, acetoacetát)
- Všechny ostatní látky, které procházejí, potřebují přenašeče

# Dýchací řetězec vnitřní mitochondriální membrány



**Celková reakce:**

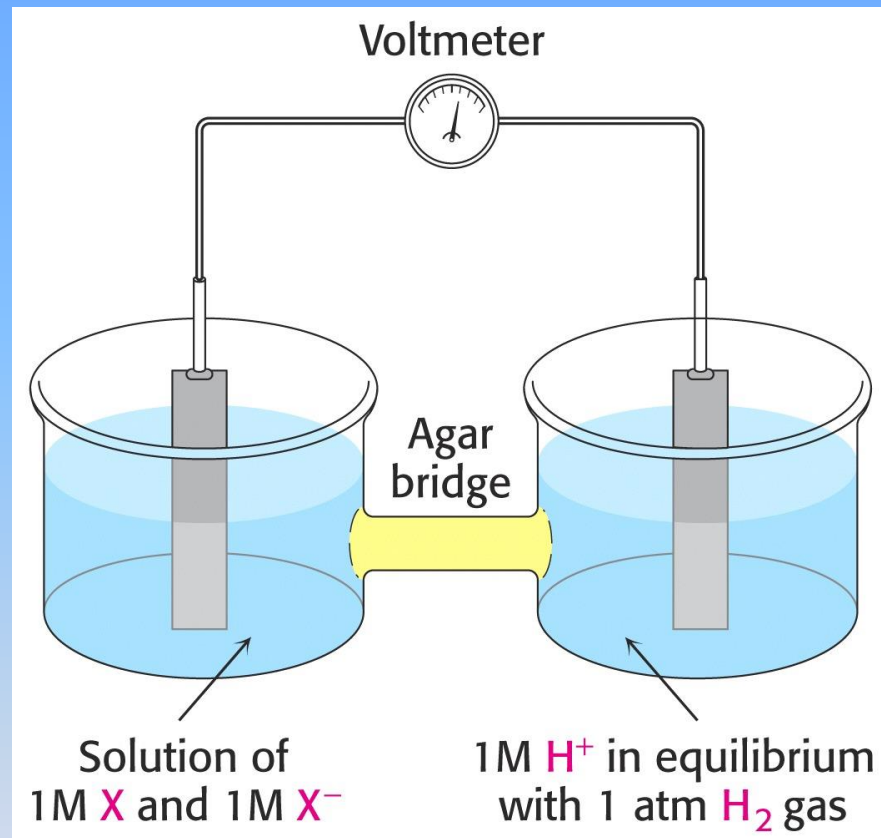


$$\Delta G^{o'} = -219.25 \text{ kJ mol}^{-1}$$

# Redoxní potenciál



Rozdíl afinity k elektronům mezi dvěma redoxními páry se udává ve voltech (V).





# Vztah mezi volnou enthalpií a redoxním potenciálem

$$\Delta G = - nF \Delta E$$

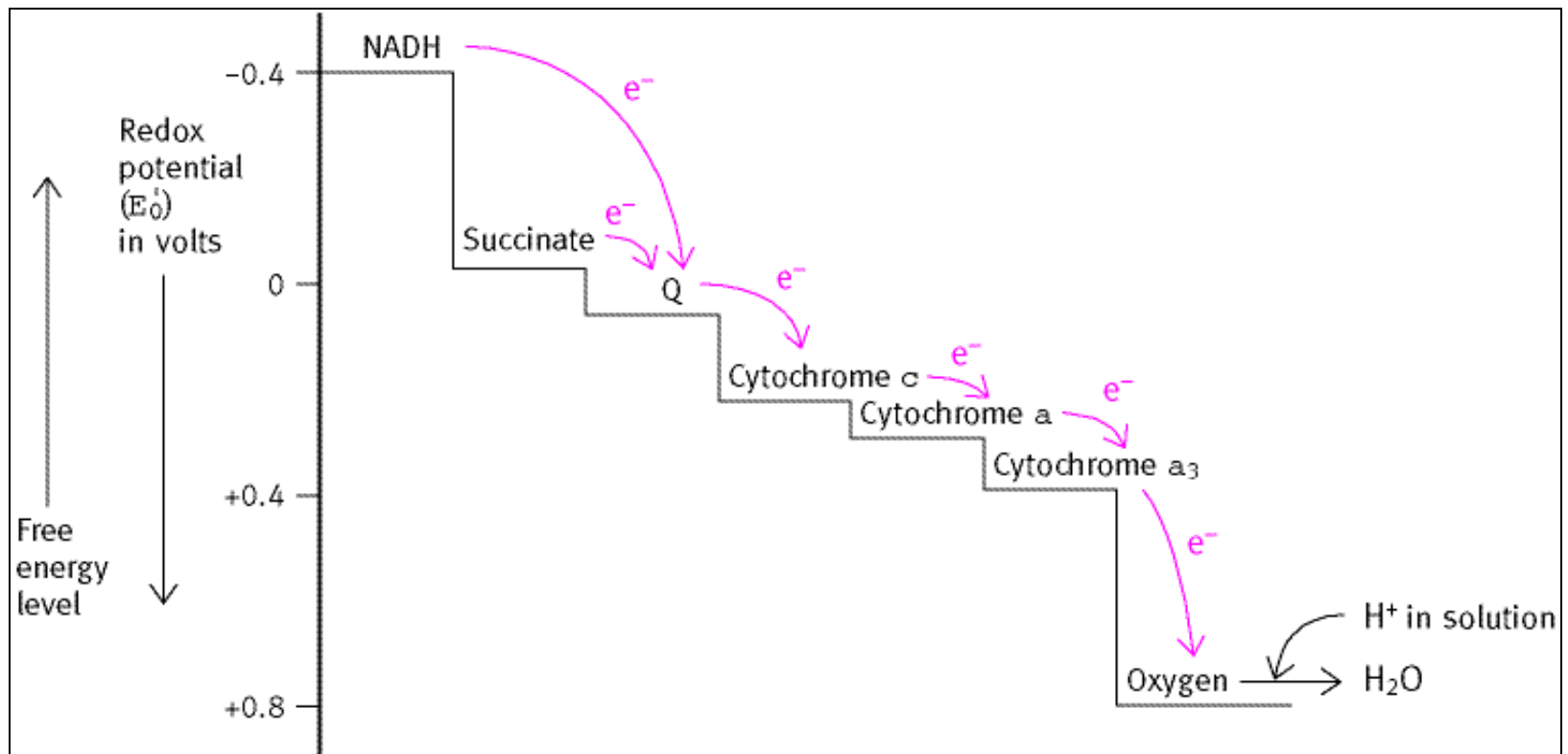
**n .. počet přenášených elektronů**

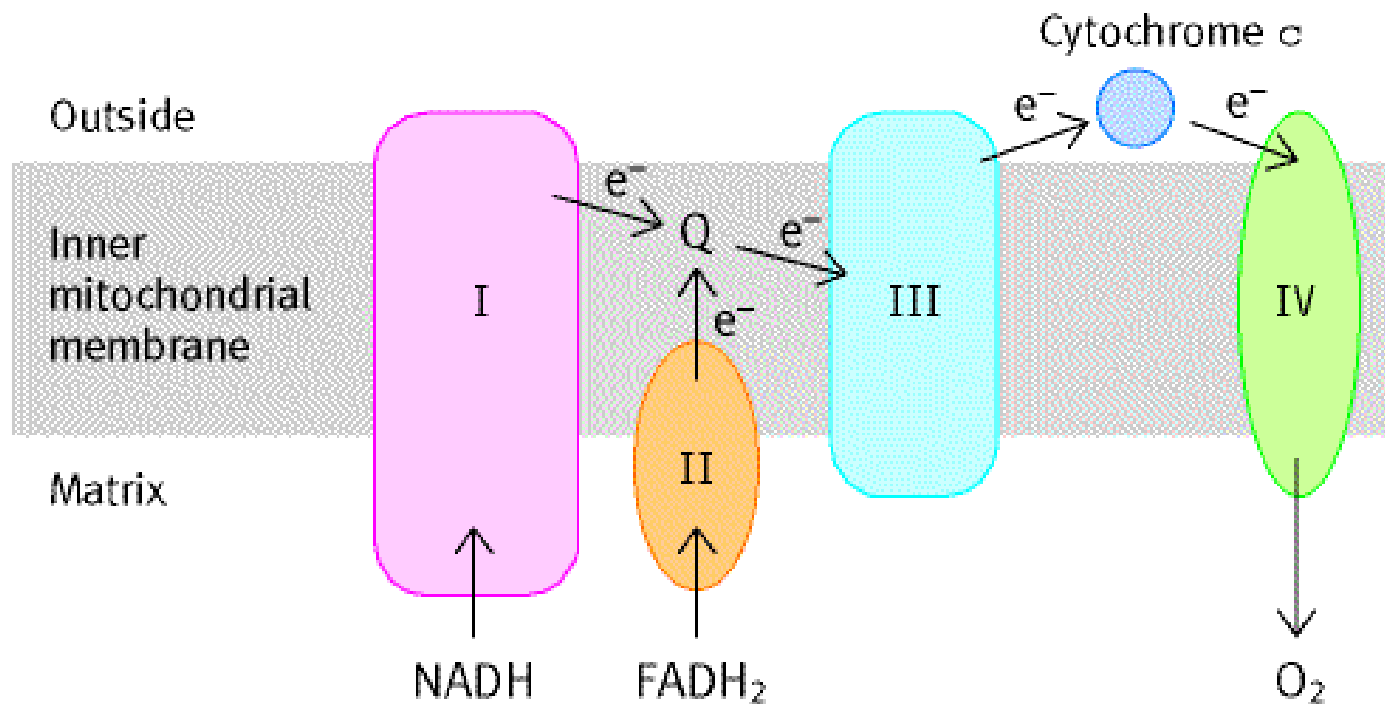
**F ... Faradayova konstanta = 96 485 C /mol**

C (Coulomb) = J/ V

**Proud elektronů je po spádu redoxního potenciálu:**

**NADH  $\rightarrow$  FAD/FMN  $\rightarrow$  Fe-S  $\rightarrow$  Q  $\rightarrow$  cytochromy  $\rightarrow$  O<sub>2</sub>**





## Komplexy dýchacího řetězce:

I .... NADH-CoQ oxidoreduktasa

II ... Sukcinátdehydrogenasa

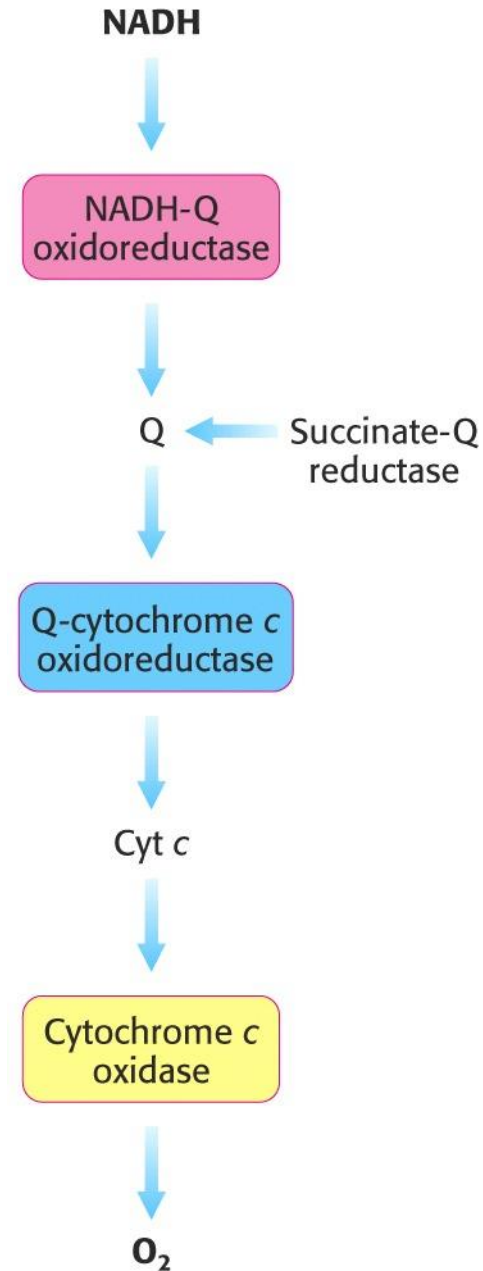
III ... CoQ-Cytochrom c oxidoreduktasa

IV ... Cytochromoxidasa

## Mobilní komponenty dýchacího řetězce:

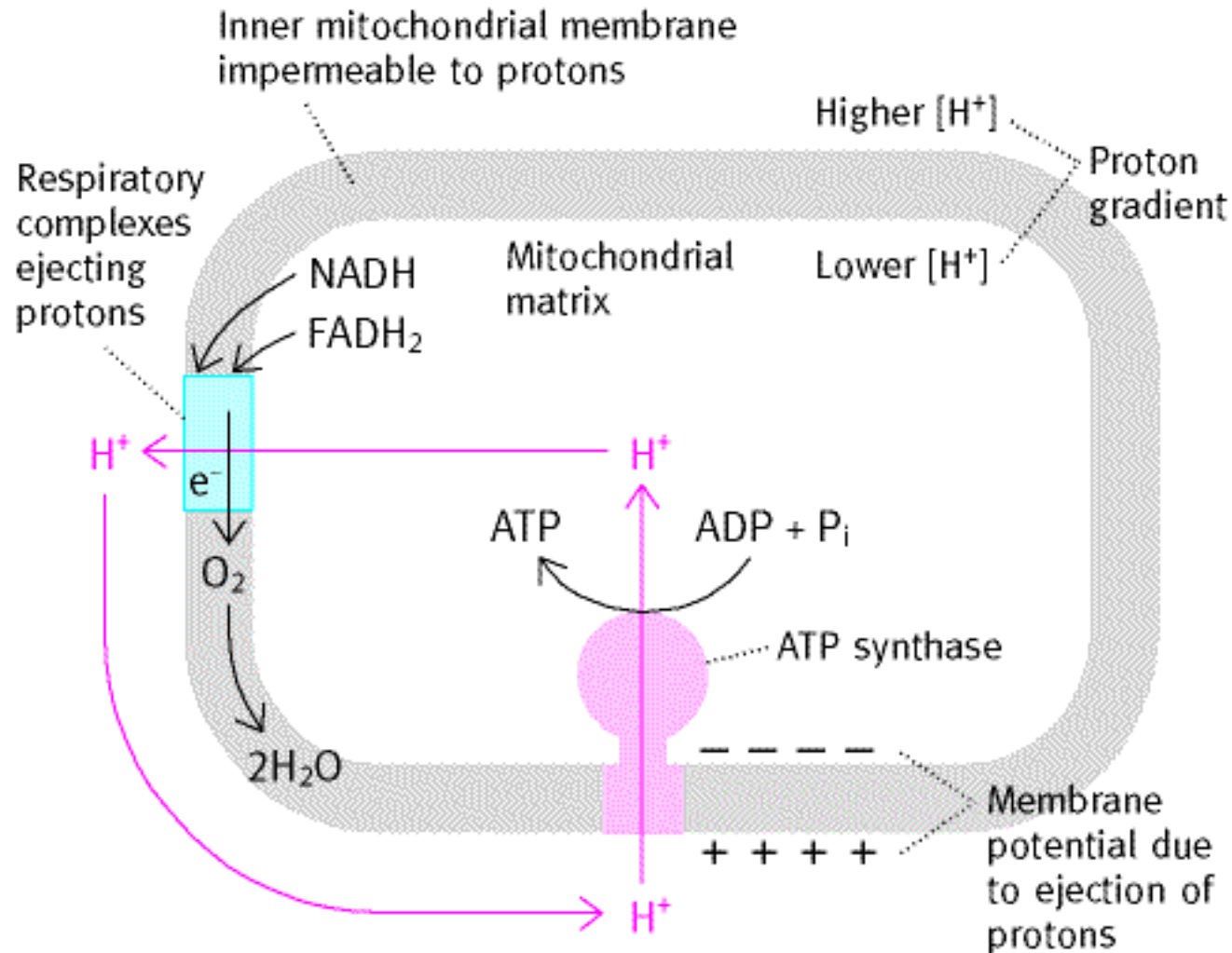
Koenzym Q

Cytochrom c

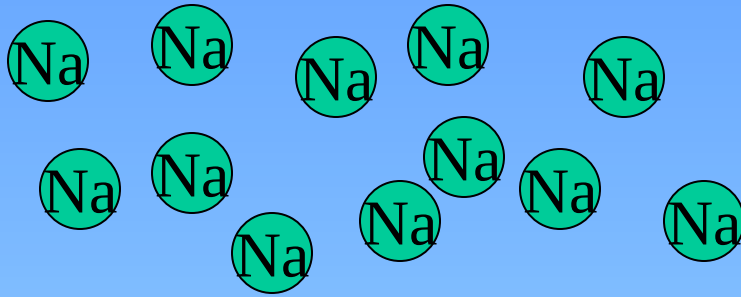


## Chemiosmotická teorie oxidační fosforylace.

**Peter Mitchell**  
**Nobel Prize 1978**



# Iontový gradient na membráně může konat práci



$$c(\text{Na}^+)_1 = 120 \text{ mmol/l}$$



$$c(\text{Na}^+)_2 = 12 \text{ mmol/l}$$

$$\Delta G = -RT \ln \frac{c_1}{c_2}$$

$$\begin{aligned} &= -(8.3143 \times 298.15) \times \ln 10 = \\ &= -5.7 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

Rovnice platí, jestliže  $c_1 > c_2$  (difúze do  $c_2$ ); pro 37 °C je koeficient – 5.9

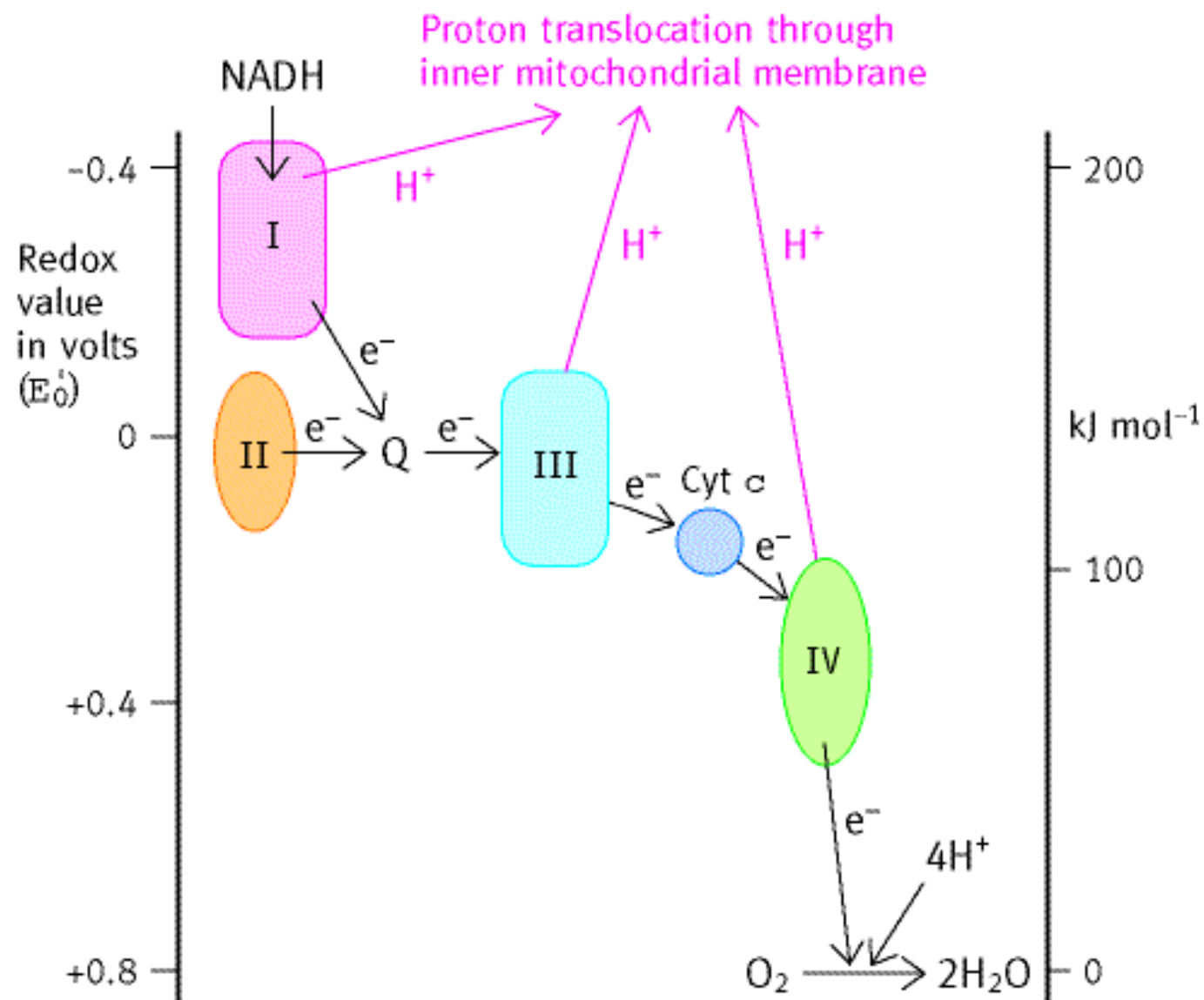
# Protonmotivní síla

$$\Delta p = \Delta \text{pH} + \Delta \psi$$

Rozdíl v  
koncentraci protonů  
asi 1 jednotka pH  
  
... dle Nernstovy  
rovnice odpovídá  
asi 60 mV

Elektrický  
potenciál na  
vnitřní membráně.  
  
Musí se změřit,  
udávaná hodnota  
např. 160 mV

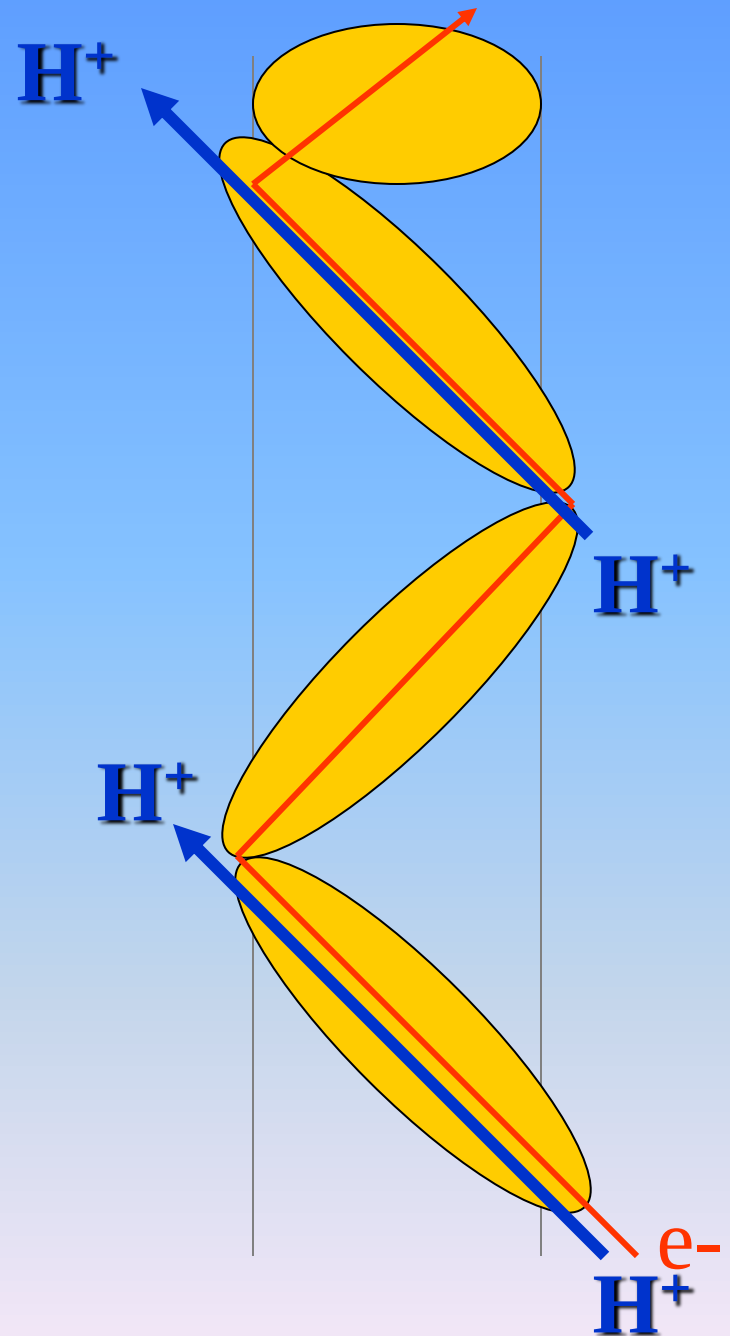
$$\Delta p = 60 \text{ mV} + 160 \text{ mV} = 220 \text{ mV}$$





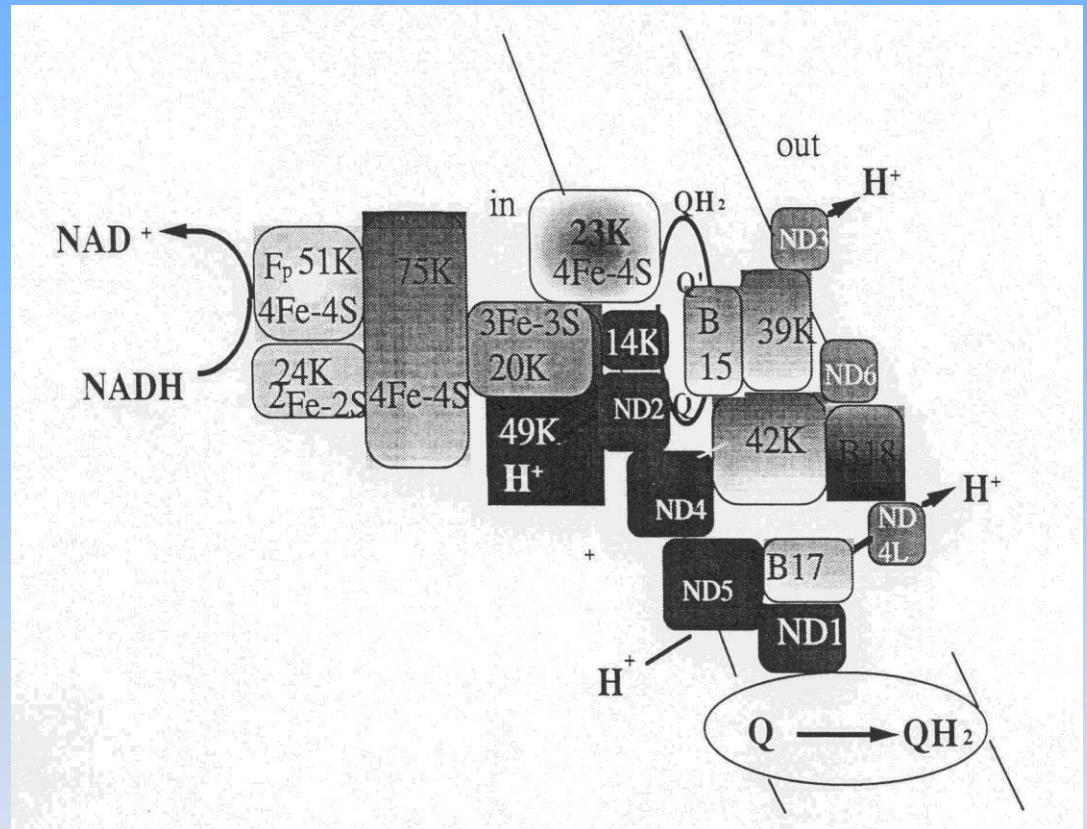
# Redoxní přenašeče v dýchacím řetězci:

- přenášejí vodík (protony+elektrony):
  - $\text{NAD}^+$
  - FAD (FMN)
  - Ubichinon (Koenzym Q)
- přenášejí pouze elektrony:
  - Cytochromy
  - Fe-S centra



# Komplex I: NADH-koenzym Q oxidoreduktasa

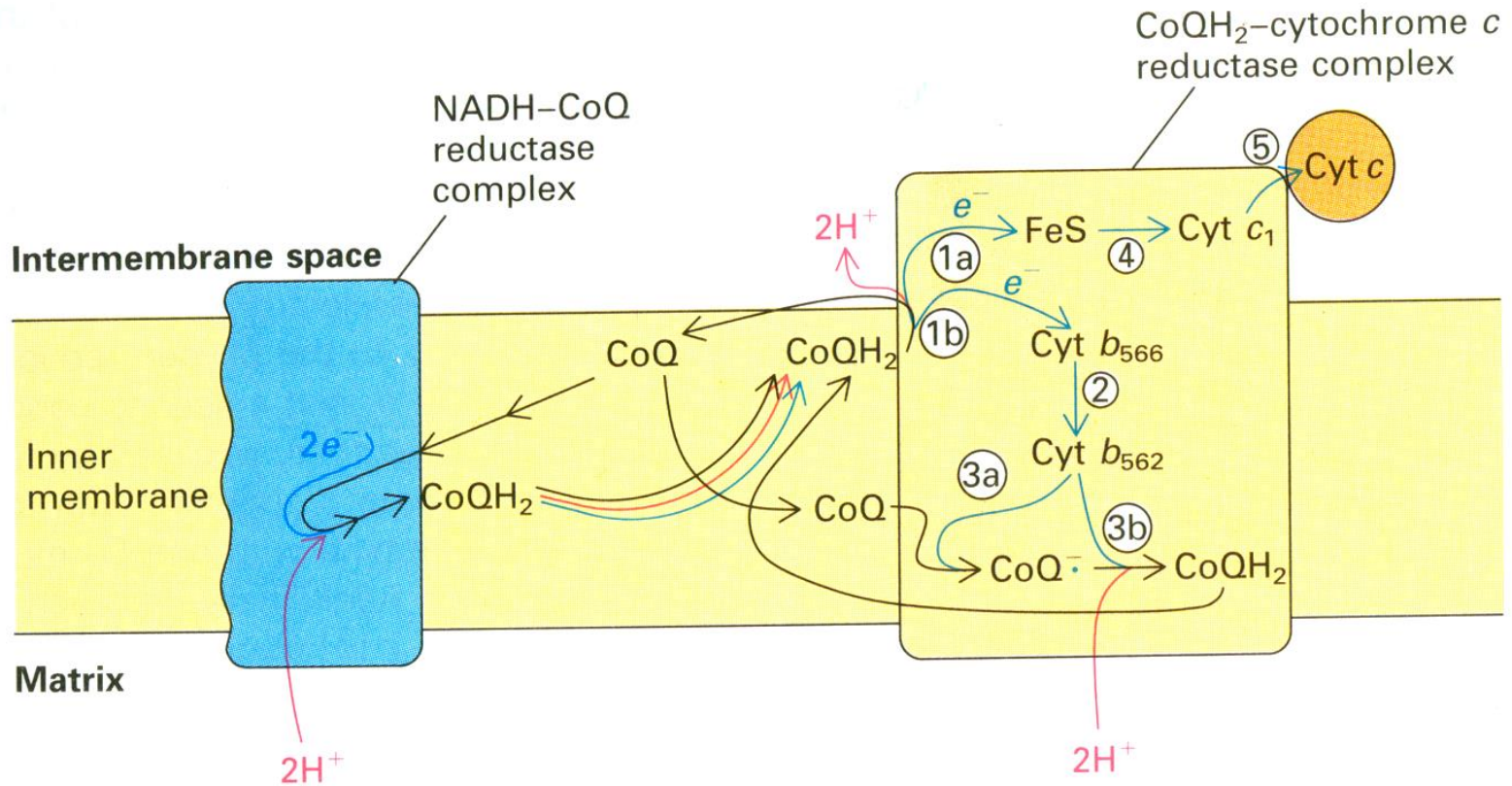
- Nejsložitější,
- 46 podjednotek.
- Obsahuje FMN, Fe-S
- Transportuje 4 protony na každé dva elektrony, přesný mechanismus ?



# **Komplex III: Koenzym Q-cytochrom c oxidoreduktasa**

- 11 podjednotek, dimer.
- Obsahuje hem  $b_L$  , hem  $b_H$  , hem  $c_1$ , Fe-S
- Transportuje 4 protony na každé dva elektrony

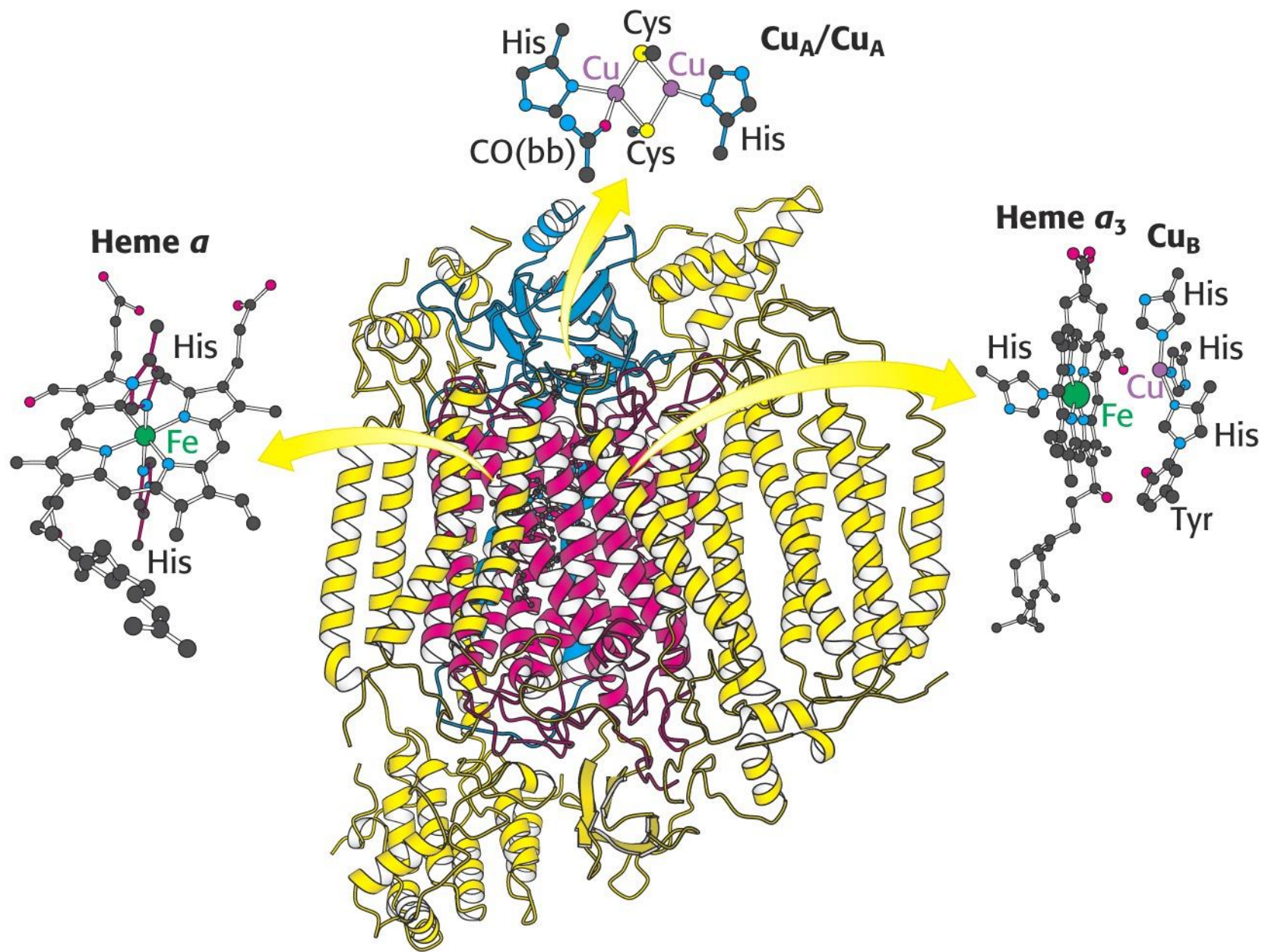
# Komplex III: Q-cyklus

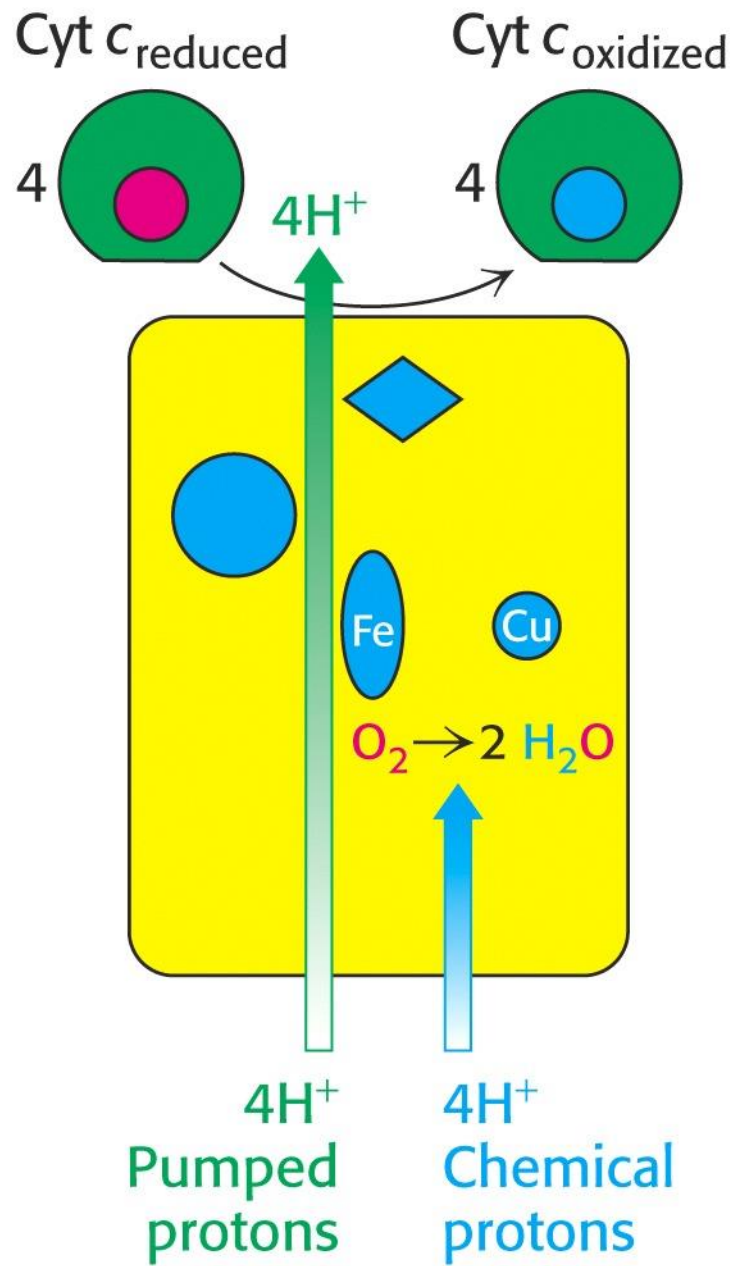


# Komplex IV: cytochromoxidasa

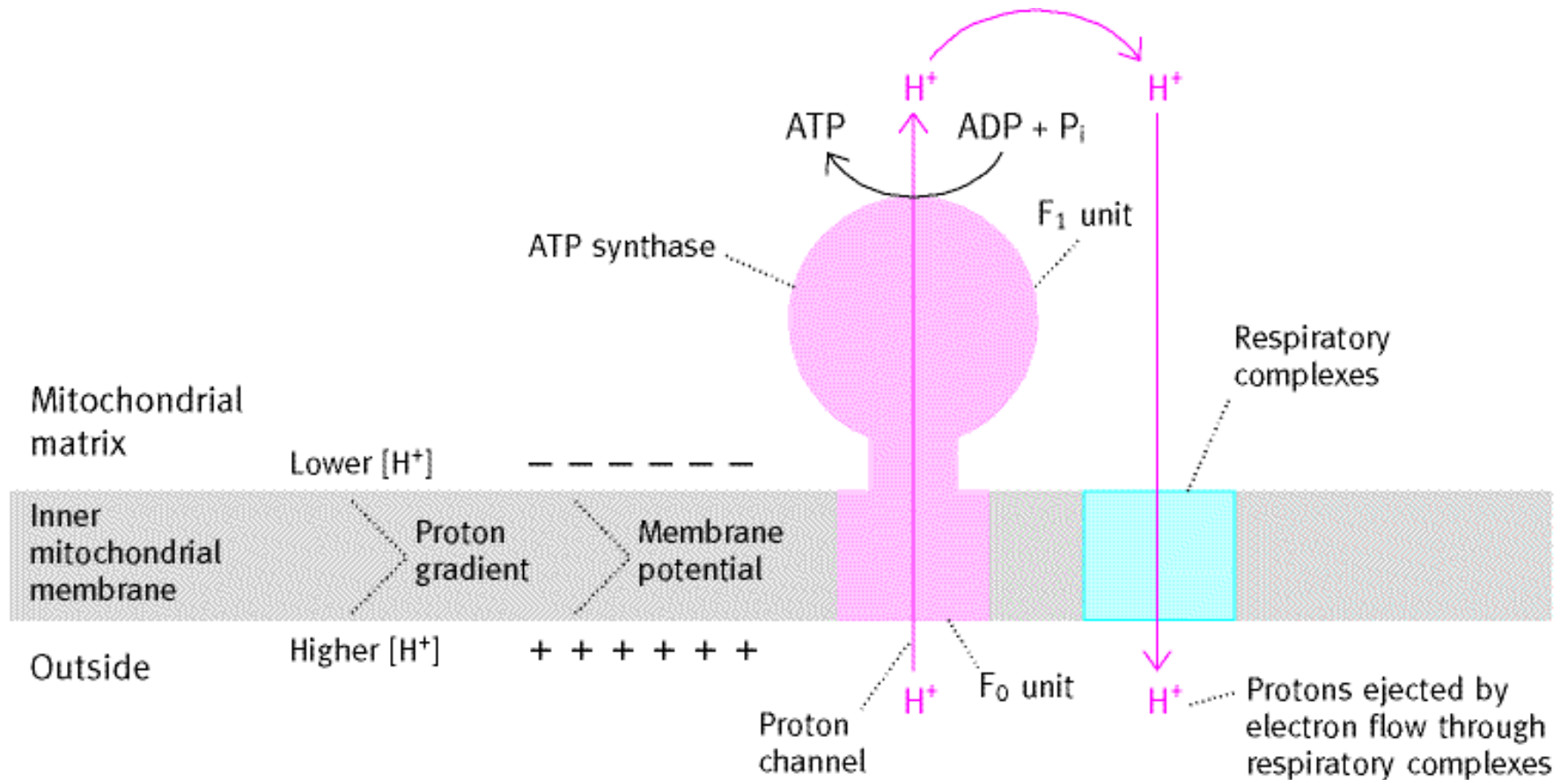
- 14 podjednotek, dimer.
- Obsahuje hem a, hem  $a_3$ ,  $\text{Cu}_A$ ,  $\text{Cu}_B$
- Transportuje dva protony na každé dva elektrony neznámým mechanismem





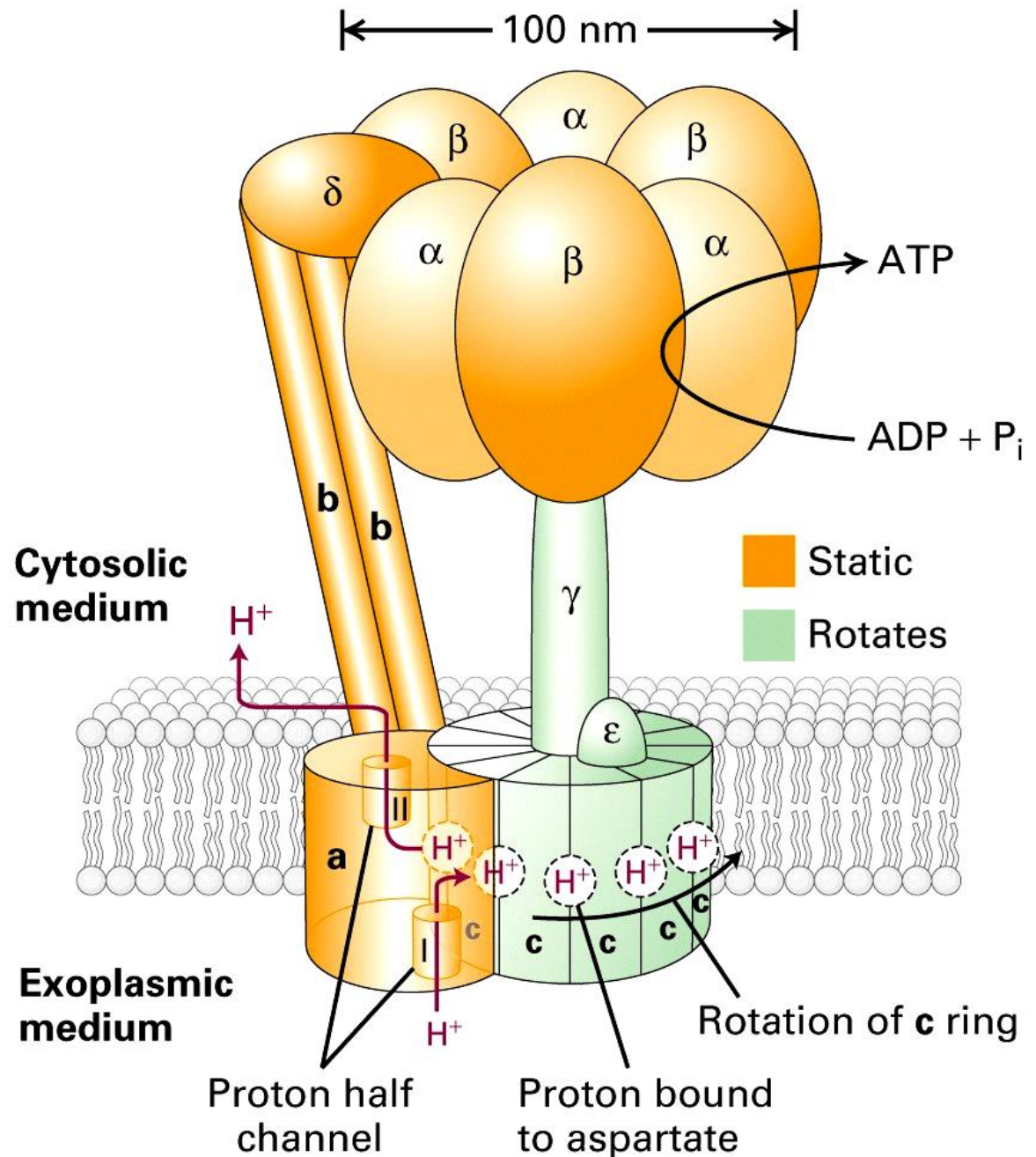


# Komplex V: ATP Synthase

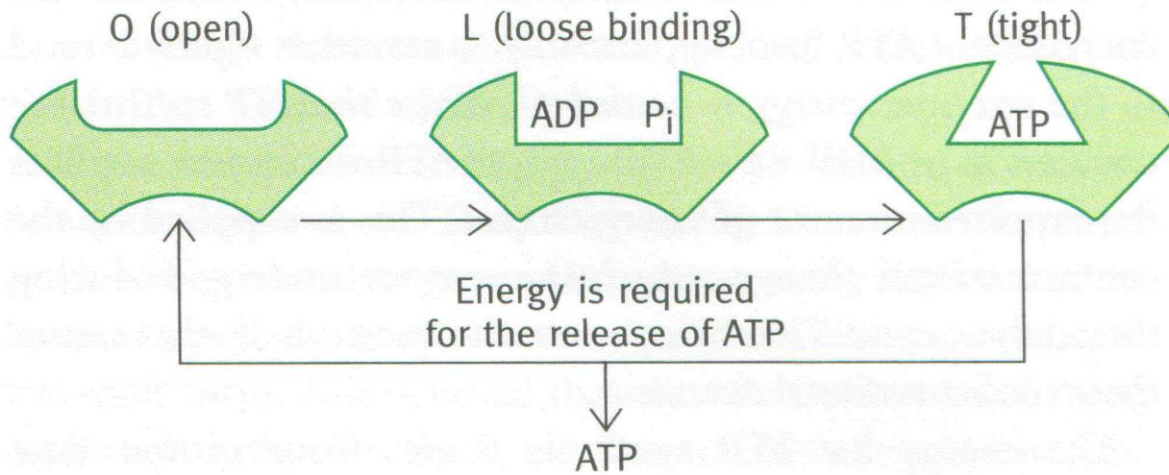




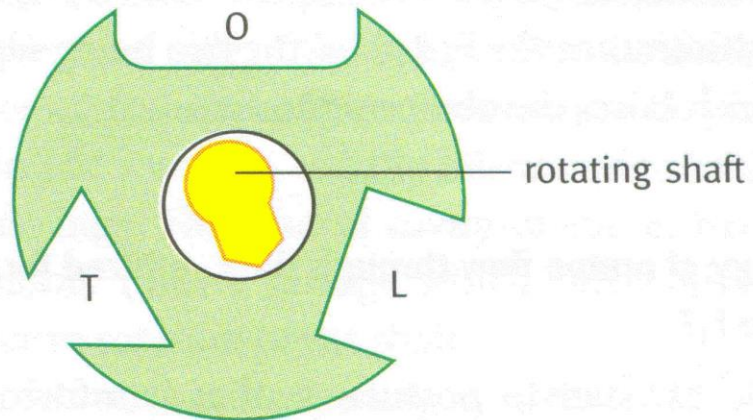
# ATP synthase

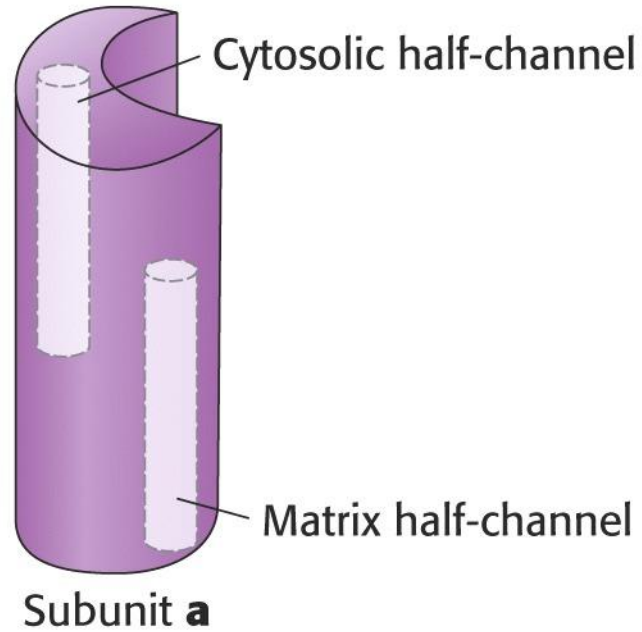


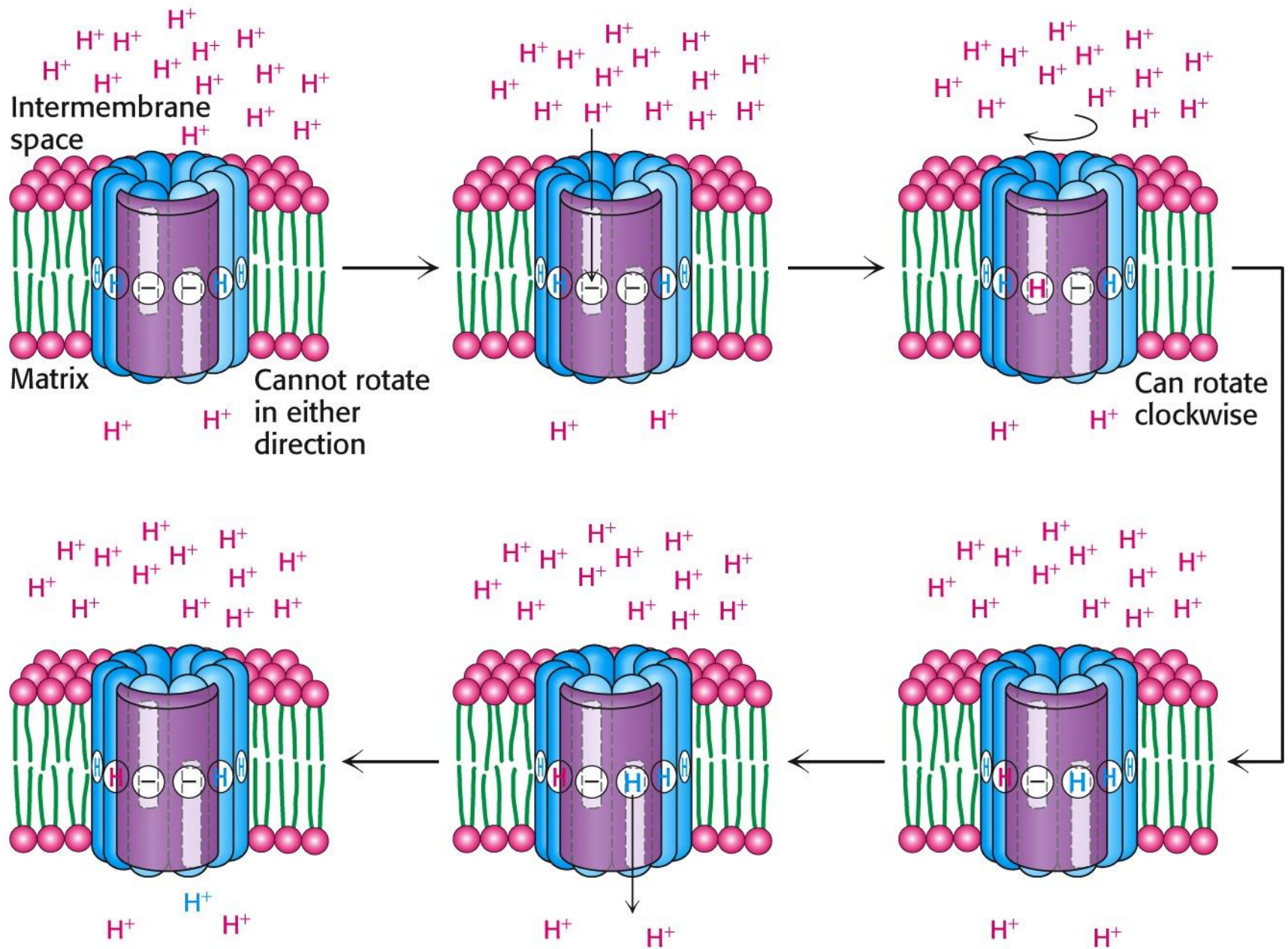
(a)



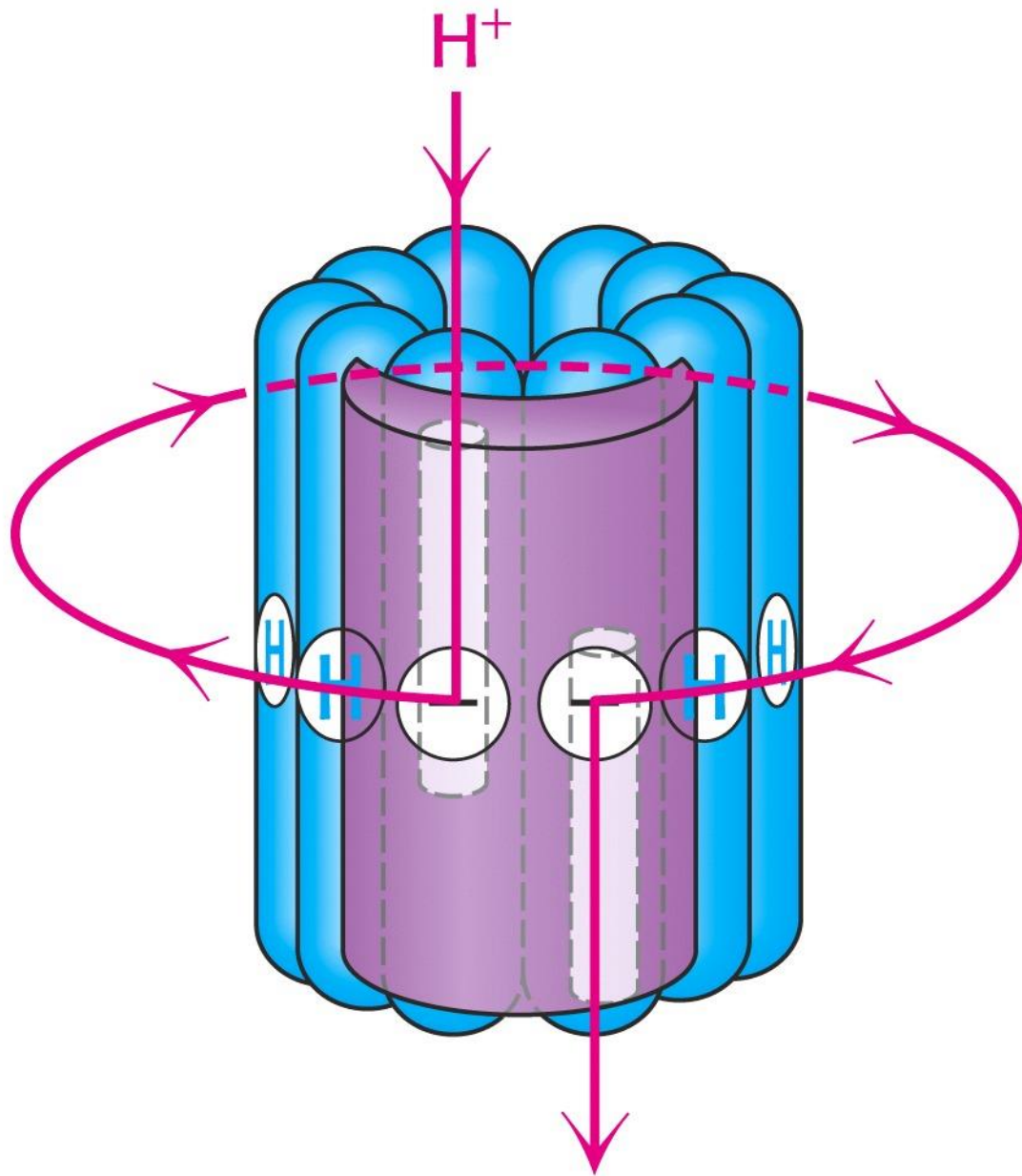
(b)











# ***Dýchací řetězec a oxidativní fosforylace:***

## ***Souhrn***

- \* **Proud elektronů** soustavou redoxních kofaktorů dýchacího řetězce na kyslík
- \* **Přenos protonů** z matrix mitochondrie na cytosolovou stranu vnitřní mitochondriální membrány (protonový gradient).

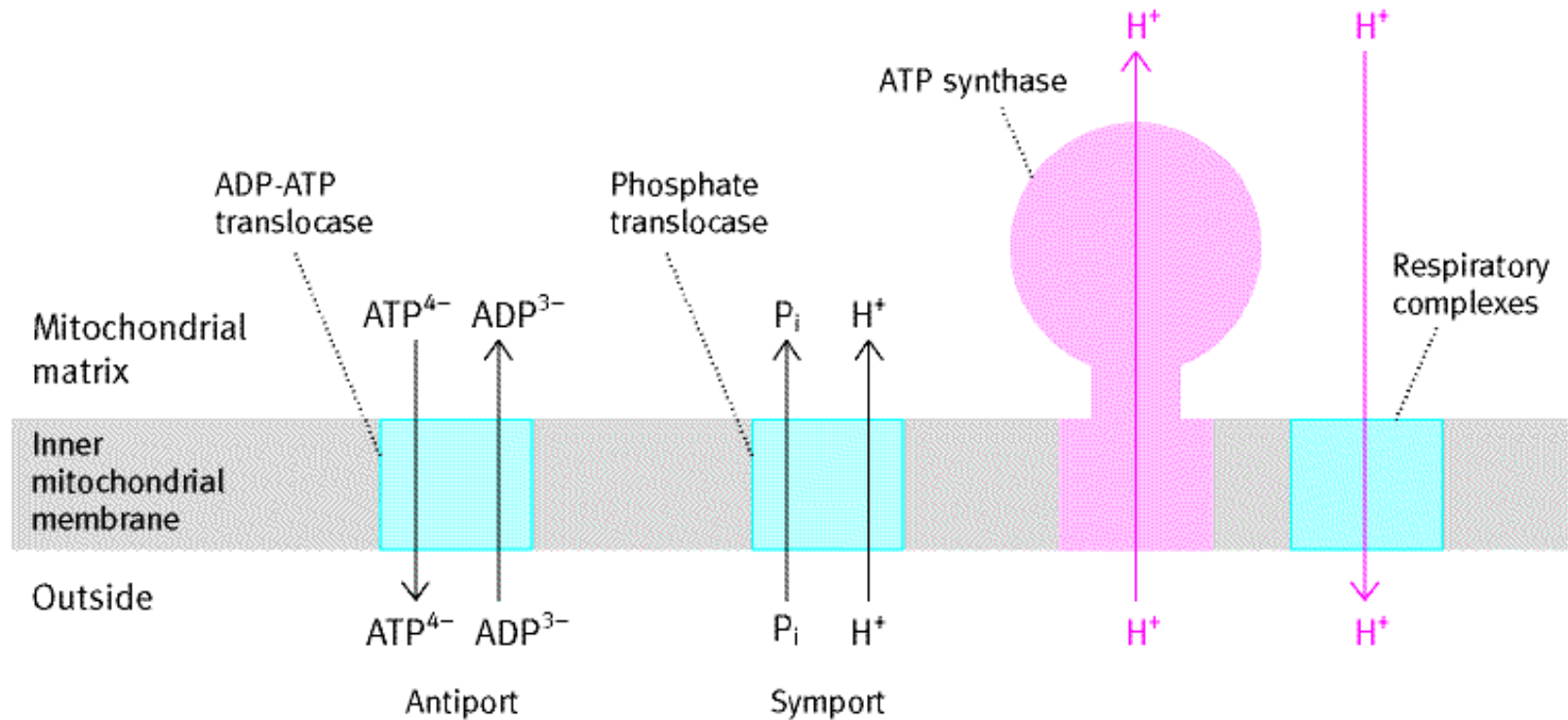
*Protonmotivní síla* = pH gradient + elektrický potenciál

- \* Protony se vrací zpět přes **ATP synthasu** a pohání syntézu **ATP**.

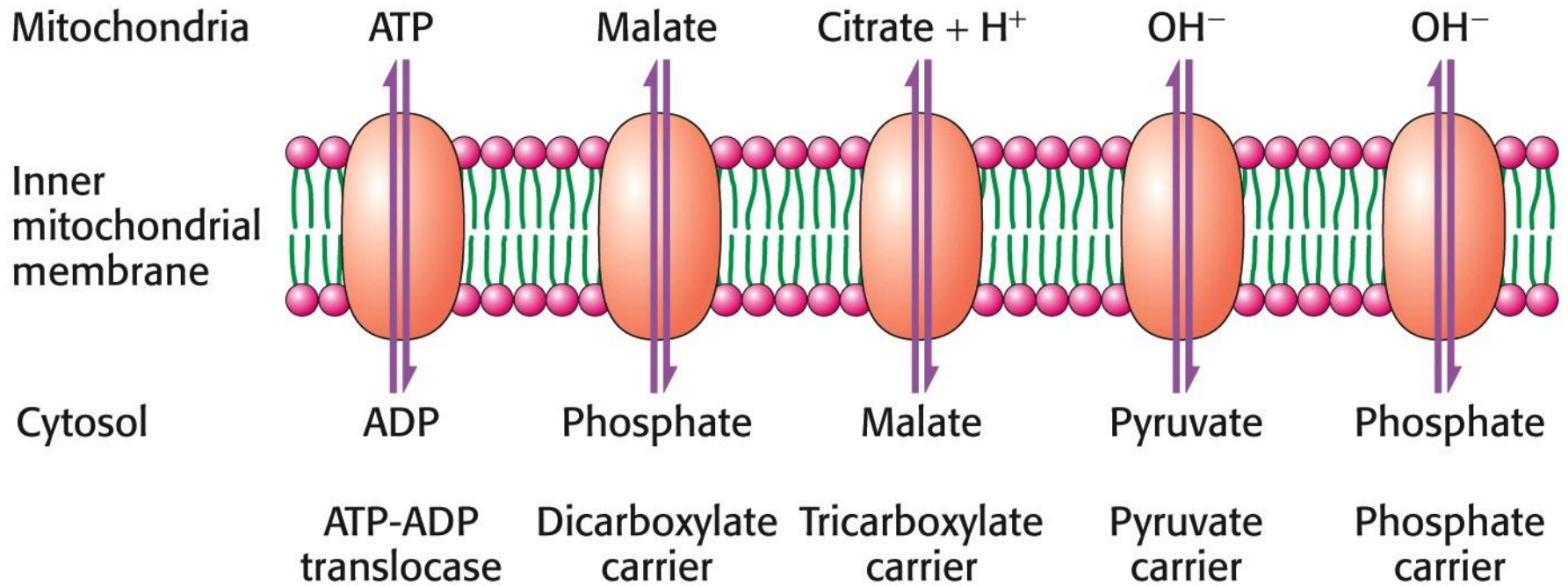
# Bilance oxidační fosforylace

- Pokud  $F_0$  komplex u savců má 10 c podjednotek: jedna otočka znamená průtok 10 protonů.
- $F_1$  část má 3 ATP tvořící místa: jedna otočka znamená syntézu tří ATP from ADP +  $P_i$
- **Nejméně 3  $H^+$  musí být dýchacím řetězcem přeneseny z matrix na výrobu 1 ATP**
- **Další  $H^+$  se spotřebuje na import fosfátu**
- Transport 2 elektronů z NADH na kyslík (komplexy I, III, IV) vypumpuje 10 protonů, z  $FADH_2$  na kyslík (komplexy III, IV) 6 protonů.
- **Oxidace 1 NADH produkuje 2.5 ATP**
- **Oxidace 1  $FADH_2$  produkuje 1.5 ATP**

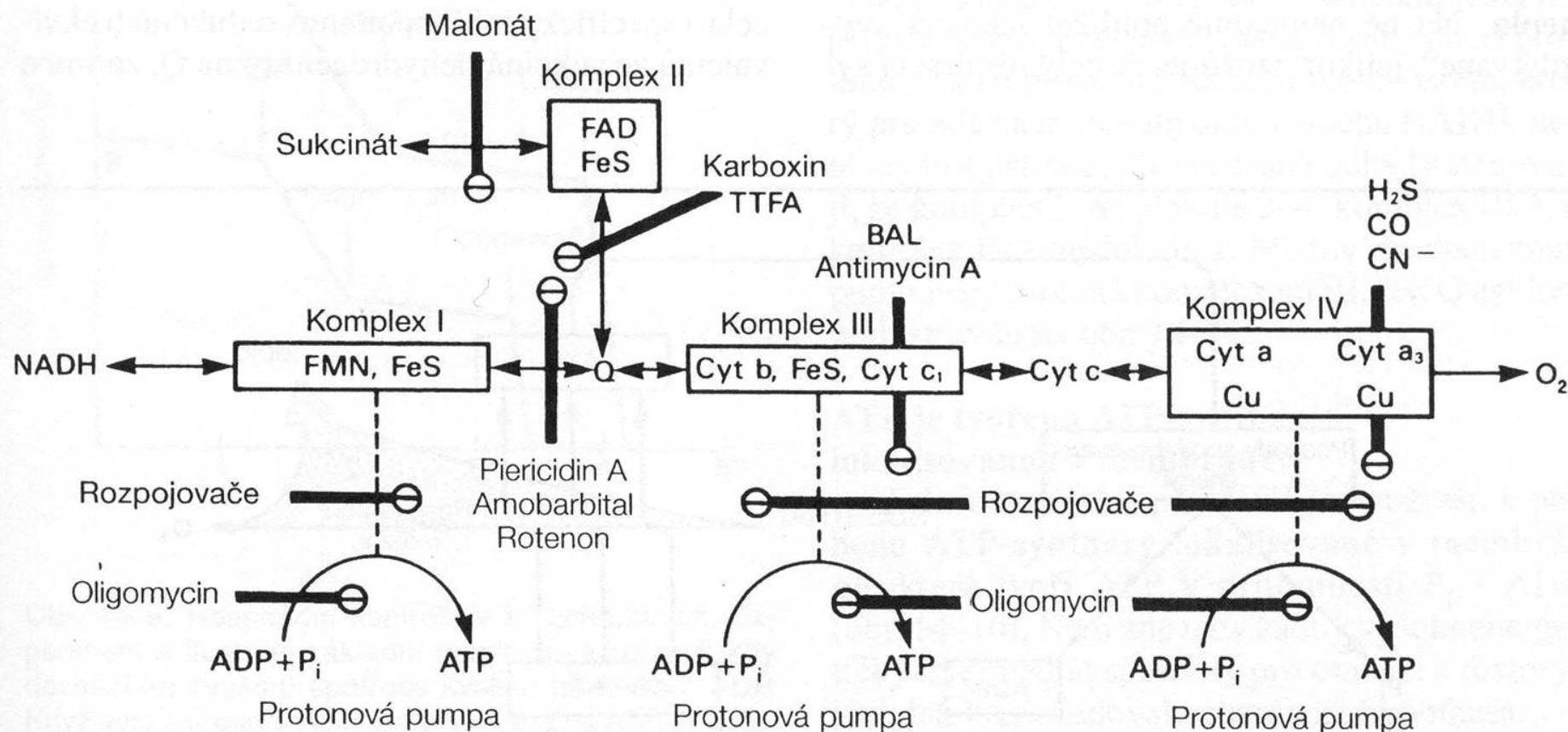
## Protonový gradient pohání také transportní procesy na vnitřní mitochondriální membráně







# Inhibitory buněčného dýchání jsou jedy



**Obr. 14–7.** Navržená místa inhibice (⊖) respiračního řetězce specifickými léky, činidly a antibiotiky. Jsou vyznačena místa, kde dochází k fosforylaci. BAL – dimerkaprol. TTFA je chelátor železa. Komplex I – NADH: ubiquinon-oxidoreduktasa, komplex II – sukcinát: ubiquinon-oxidoreduktasa, komplex III – ubiquinol: ferricytochrom c-oxidoreduktasa, komplex IV – ferocytochrom c: oxygen-oxidoreduktasa. Další zkratky jako v obr. 14–4.

# Termogenin

- Zvláštní protein mitochondrií hnědé tukové tkáně
- Transporter pro protony – zkratuje protonový gradient
- ... produkce tepla
- Hibernující savci
- Lidští novorozenci, ale také (mladší a štíhlejší) dospělí

