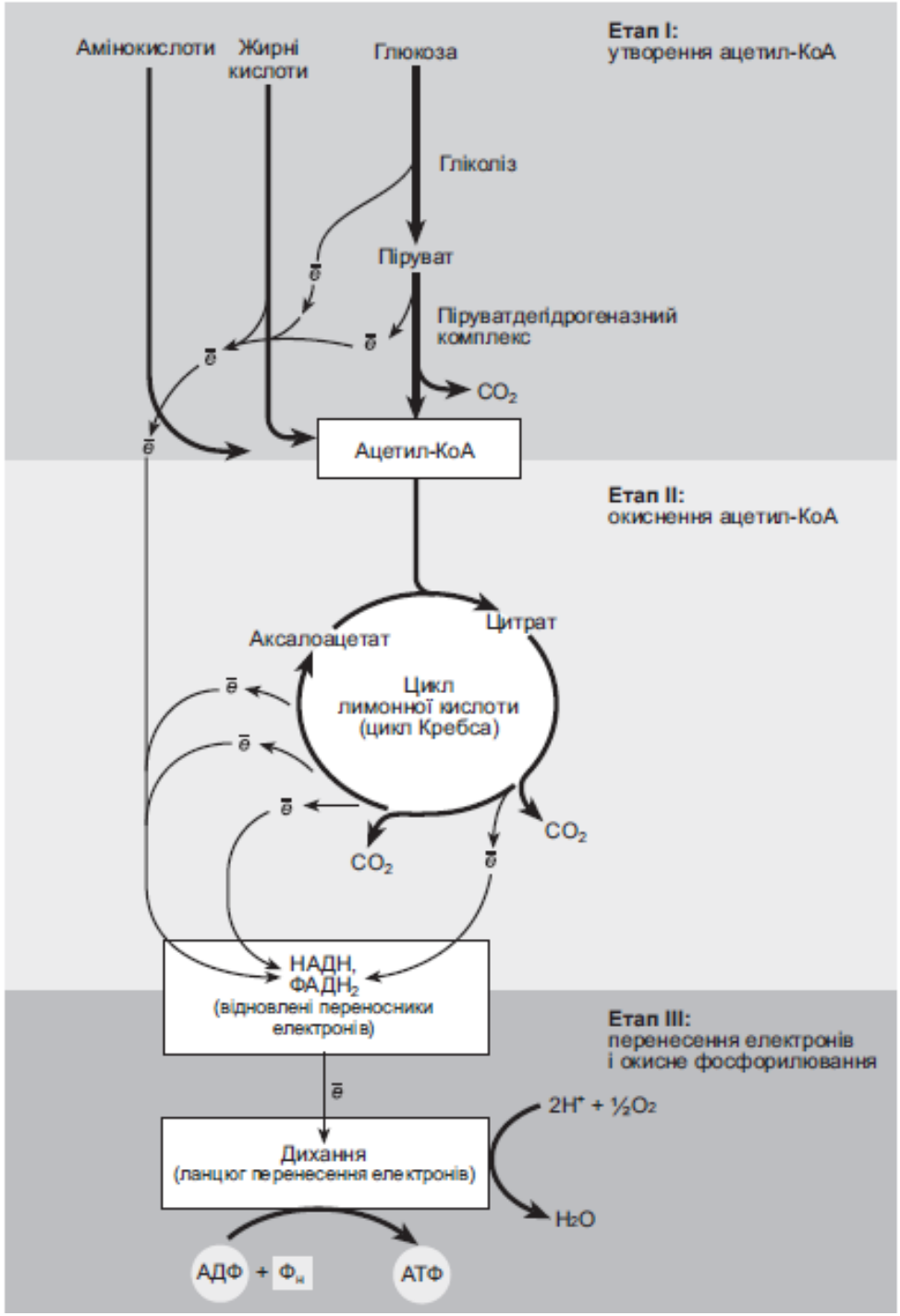
Тема: Цикл лимонної кислоти: класична парадигма

План

1. Піруватдегідрогеназний комплекс
2. Реакції циклу лимонної кислоти
3. Зберігання енергії окислення у циклі
4. Компоненти циклу лимонної кислоти як біосинтетичні інтермедіати
5. Регуляція циклу лимонної кислоти

© Babsky A



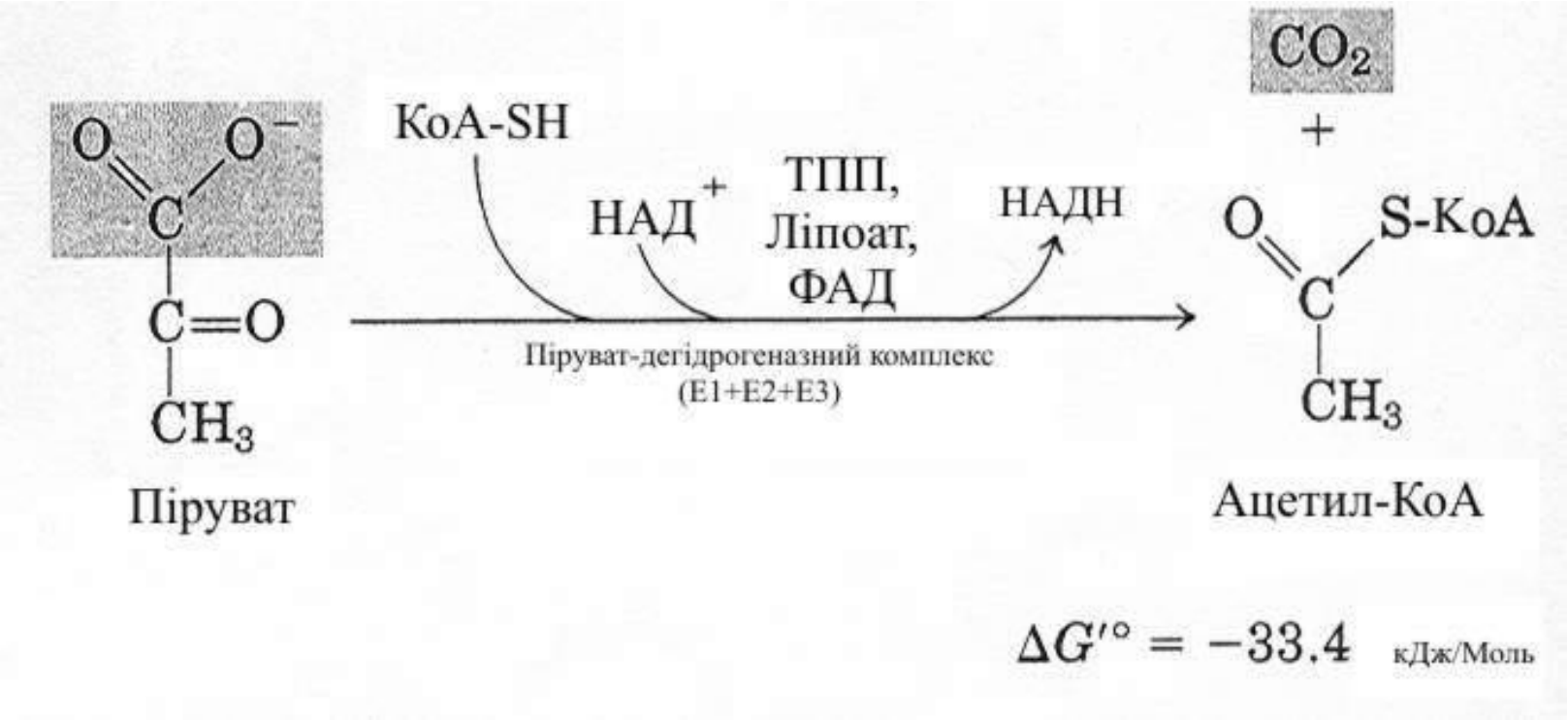
Три основних етапи енергетичних процесів у клітині

(Нельсон і Кокс, 2015)

➢ **Етап II.** Утворені на першому етапі ацетильні групи ацетил-КоА надходять у цикл лимонної кислоти (цикл трикарбонових кислот чи цикл Кребса) де ферментативно окислюються до проміжних метаболітів циклу і CO_2. У цьому процесі вивільняється енергія, яка зберігається у формі відновлених переносників електронів НАДН, $ФАДН_2$ та АТФ.

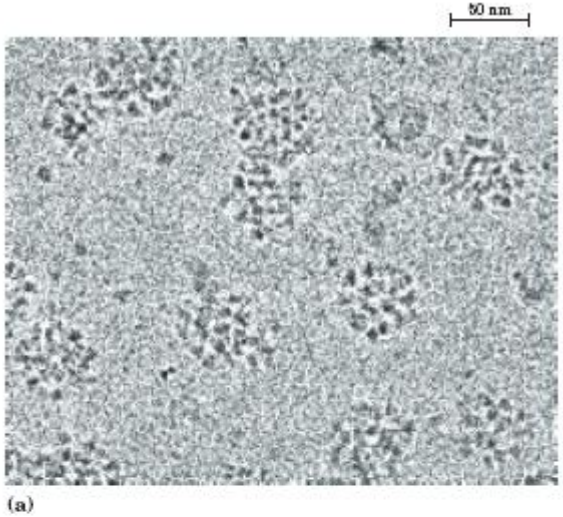
© Babsky A

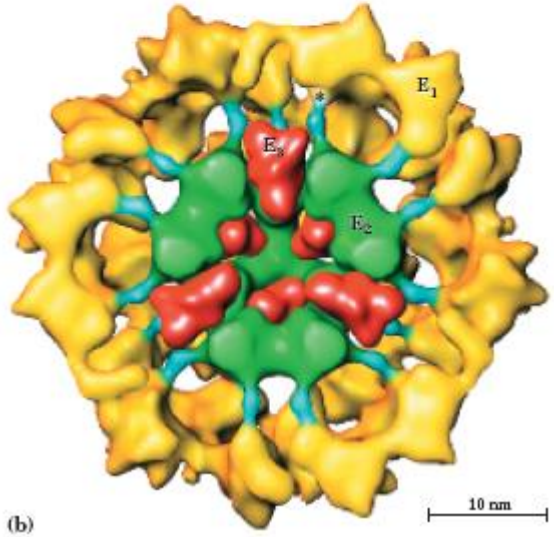
Реакція у піруват-дегідрогеназному комплексі



У цій реакції беруть участь п’ять коферментів і три ферменти, які утворюють ферментний комплекс.

Структура піруватдегідрогеназного комплексу



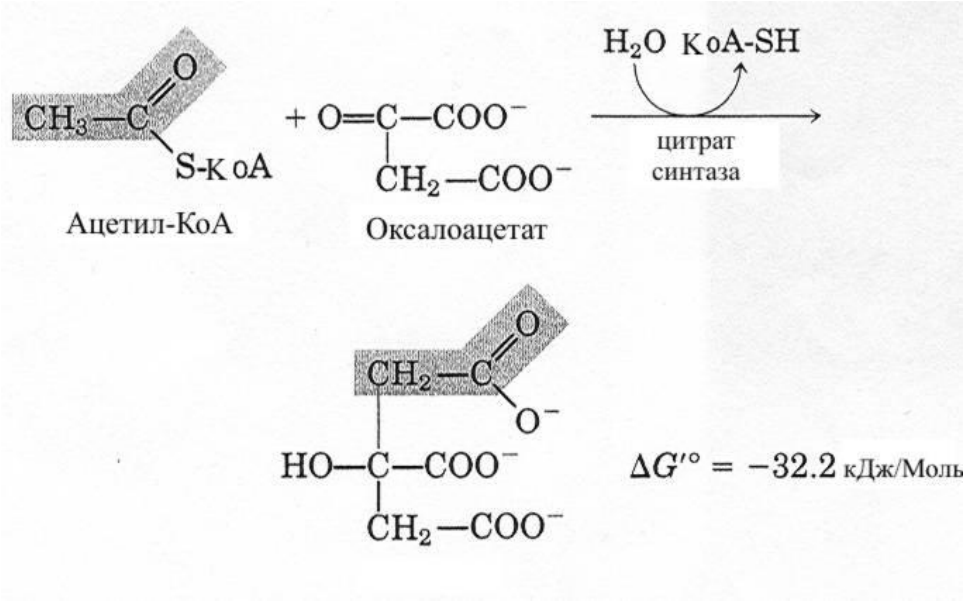


(а) Кріоелектронна мікрофотографія ПДГ-комплексу (коров'яча нирка)

(б) 3D-зображення ПДГ-комплексу: E_1 – піруват-дегідрогеназа, E_2 – дигідроліпоїл-трансацетилаза і E_3 - дигідроліпоїл-дегідрогеназа. Серцевина (зелена) містить 60 E_2 молекул, організованих у 20 тримерів, які формують пентагональний додекагедрон. Ліпоїльний домен з E_2 (синій) ззовні сягає активних центрів молекул E_1 (жовті), які розташовані на E_2 серцевині. Певна кількість E_3-субодиниць (червоні) також приєднані до серцевини, де рухома частина з E_2 може досягти їхніх активних сайтів. Зірочкою позначені місця, де ліпоїльна група приєднана до ліпоїльного домену в E_2. За: *Zhou ZH et al.* (2001).

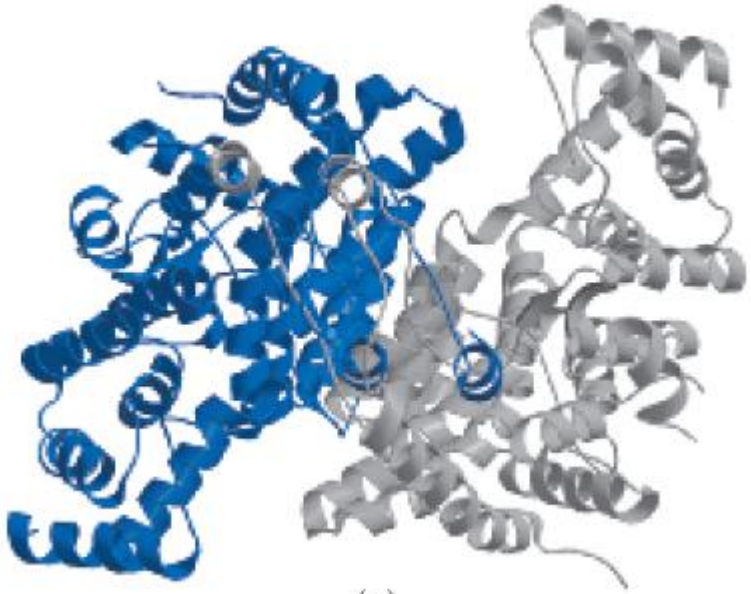
© Babsky A

Утворення цитрату

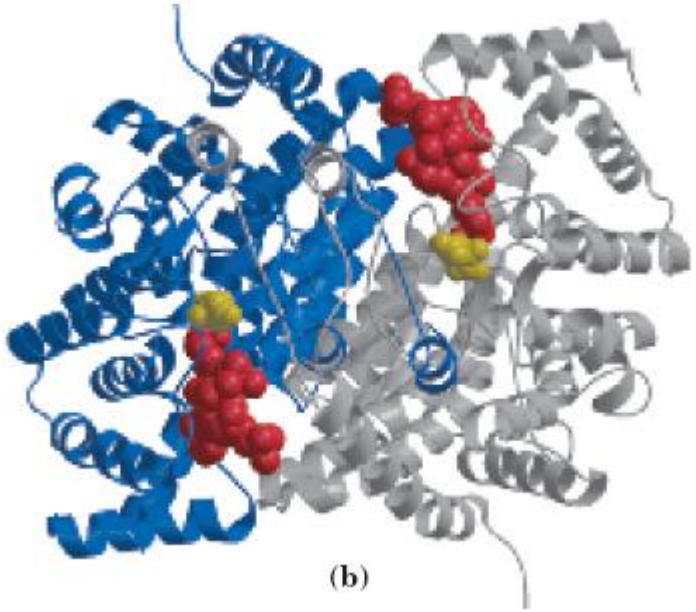


- Першою реакцією циклу є конденсація ацетил-КоА з **оксалоацетатом**, які утворюють **цитрат**. Ця реакція каталізується **цитратсинтазою**.
- Метильний вуглець ацетильної групи приєднується до карбонільної групи (С-2) оксалоацетату.
- Цитроїл-КоА є перехідним інтермедіатом у активному центрі цитратсинтази, який швидко зазнає гідролізу до вільного КоА і цитрату, що вивільняються з активного центру.
- Гідроліз високоенергетичного тіоефірного інтермедіату робить наступну реакцію високоекзергонічною. Високе від’ємне значення зміни стандартної вільної енергії цитрат-синтазної реакції є вирішальним для протікання циклу.

Будова цитрат-синтази



(a)



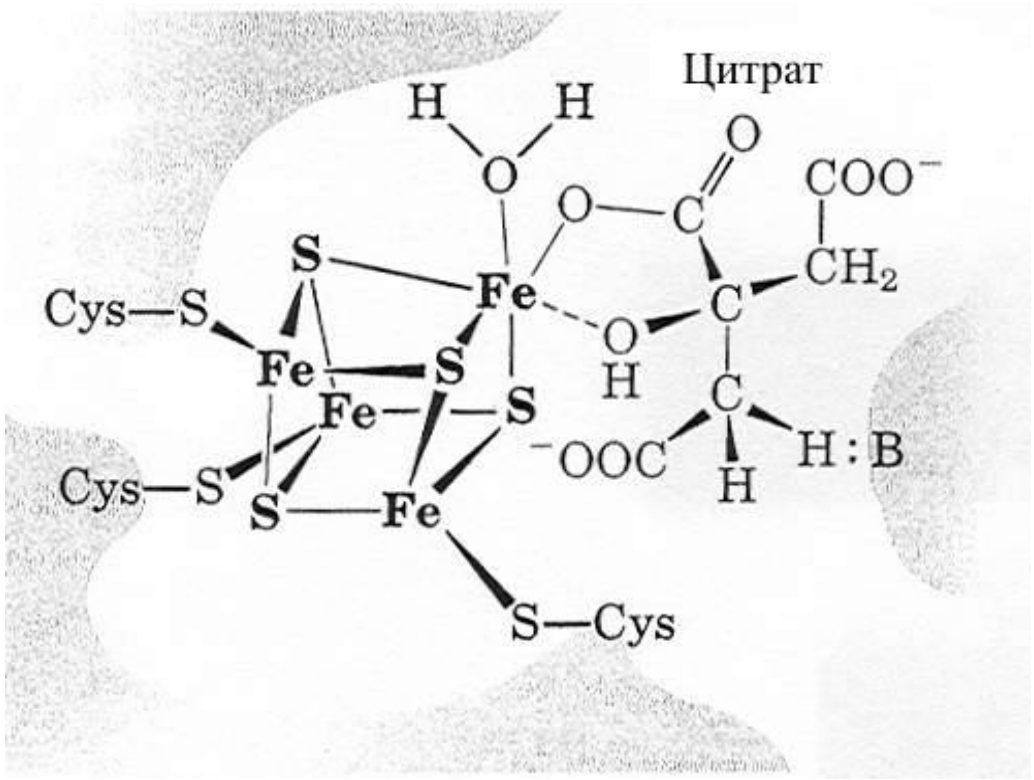
(b)

- Цитратсинтаза з мітохондрій була кристалізована і візуалізована за допомогою рентгенівської дифракції в умовах присутності і відсутності субстратів та інгібіторів цього ферменту.

- Фермент зазнає значної конформаційної зміни при зв’язуванні оксалоацетату: (а) відкрита форма самого ферменту; (б) замкнена форма зі зв’язаним оксалоацетатом (жовтий) і стабільним аналогом ацетил-КоА (карбоксиметил-КоА – червоний).

© Babsky A

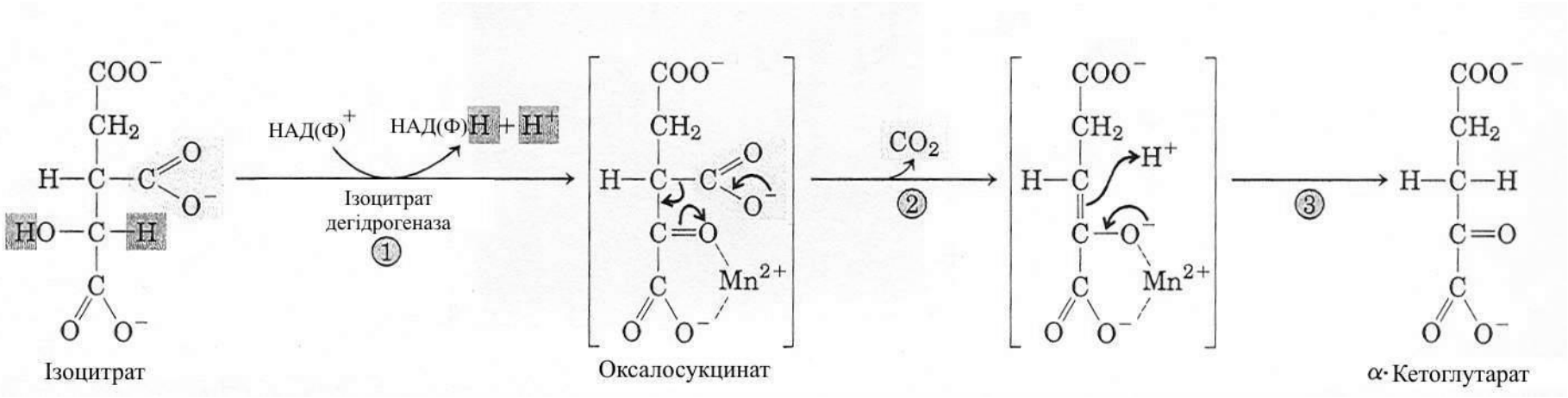
Залізо-сірковий центр аконітази



- Три залишки цистеїну зв’язують три атоми феруму; четвертий атом феруму зв’язаний з однією з карбоксильних груп цитрату.
- Осно́вний залишок (:B) ферменту полегшує просторову орієнтацію цитрату в активному центрі ферменту.
- Залізо-сірковий центр бере участь як у зв’язуванні субстрату, так і в каталітичному перетворенні.

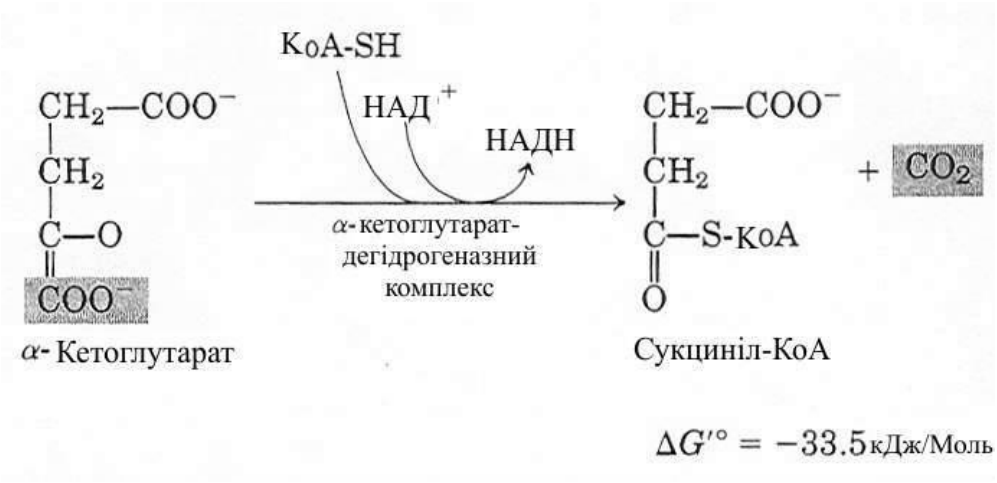
© Babsky A

Ізоцитратдегідрогеназа



- Ізоцитрат втрачає один атом карбону у процесі окисного декарбоксилювання, що відбувається у три етапи.
- **Етап 1:** ізоцитрат зв'язується з ферментом і окислюється перенесенням воднів до НАД$^+$ чи НАДФ$^+$, залежно від ізоформи ферменту.
- **Етап 2:** Утворена карбонільна група відчеплюється. Взаємодія карбонільного кисню зі зв'язаним іоном Mn^{2+} викликає збільшення електронегативності карбонільної групи, що сприяє процесу декарбоксилювання.
- **Етап 3:** Перегрупування енольного інтермедіата з утворенням α-кетоглутарату.

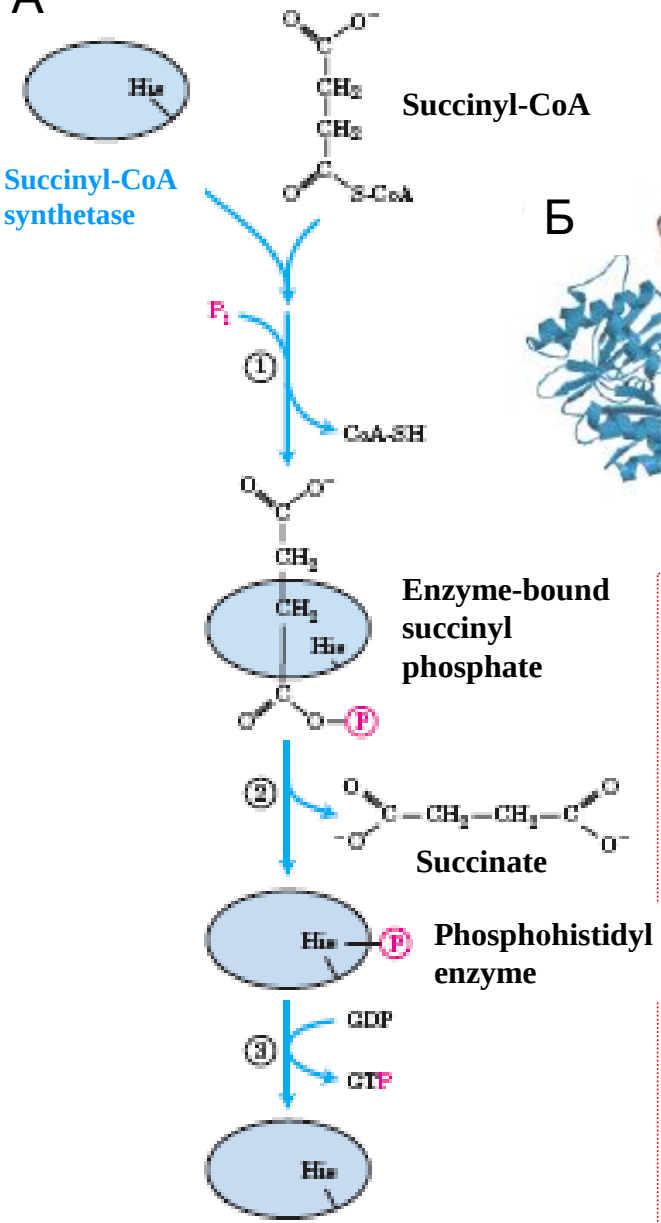
Окислення α-кетоглутарату до сукциніл-КоА і CO_2



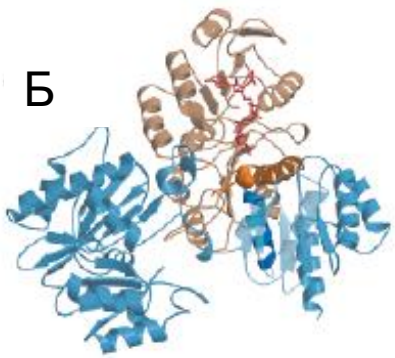
- α-кетоглутарат перетворюється до сукциніл-КоА і CO_2 під дією α-кетоглутарат-дегідрогеназного комплексу
- При цьому $НАД^+$ виконує роль акцептора електронів, а КоА – переносника сукцинільної групи.
- Енергія окислення α-кетоглутарату зберігається у формі тіоефірного зв’язку сукциніл-КоА.

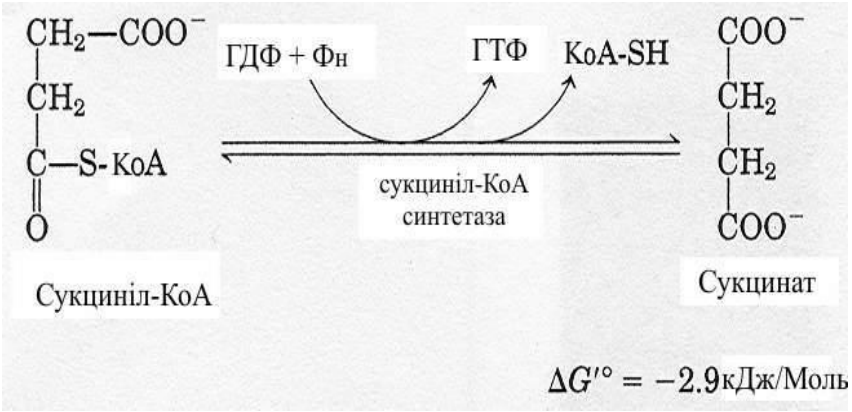
Сукциніл-КоА-синтетазна реакція

А



Б

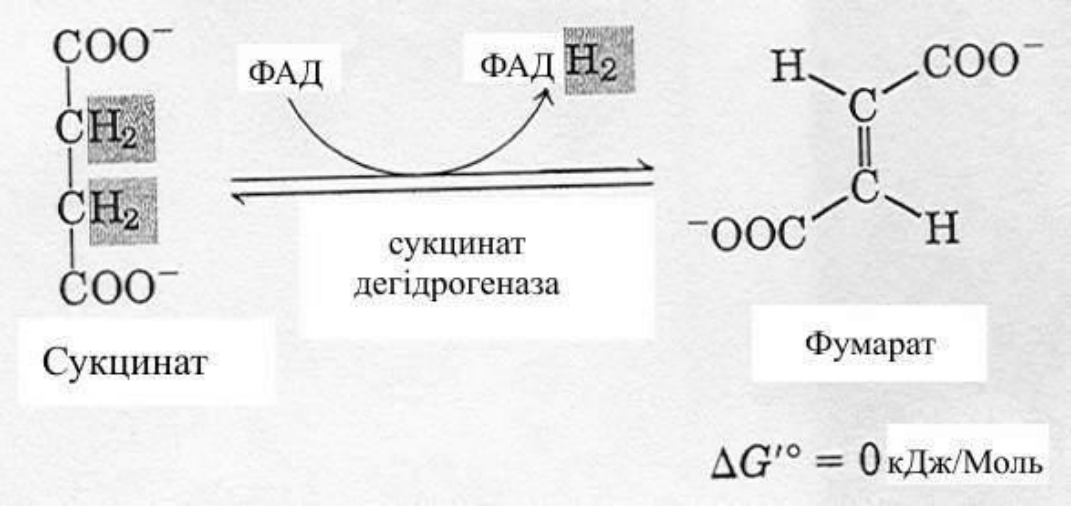


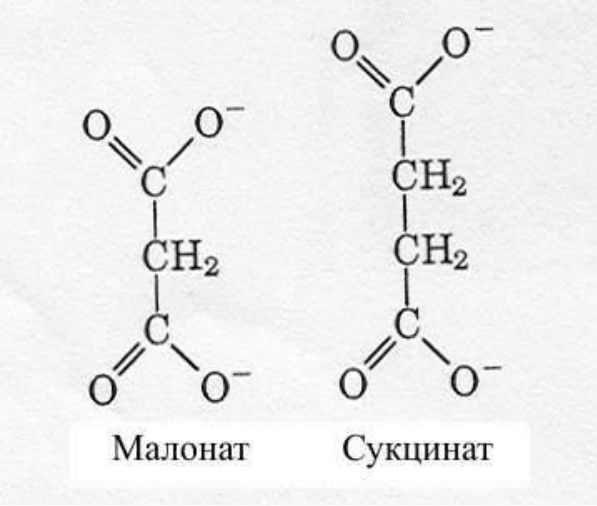


А. ***Етап 1:*** пірофосфатна група заміщає КоА, зв'язаний з молекулою сукциніл-КоА, утворюючи високо енергетичний ацил-фосфат. ***Етап 2:*** сукциніл-фосфат віддає свою фосфатну групу на залишок гістидину у молекулі ферменту, утворюючи високо енергетичний фосфогістидиловий фермент. ***Етап 3:*** фосфатна група переноситься з гістидинового залишку на молекулу кінцевого фосфату, яким є ГДФ (чи АДФ), утворюючи таким чином ГТФ (чи АТФ).

(б) Сукциніл-КоА-синтетаза з *E.coli*. Активний центр включає частину α (синя) і β (коричнева) субодиниць. Кофермент А у формі червоної паличко-подібної структури.

Окислення сукцинату до фумарату

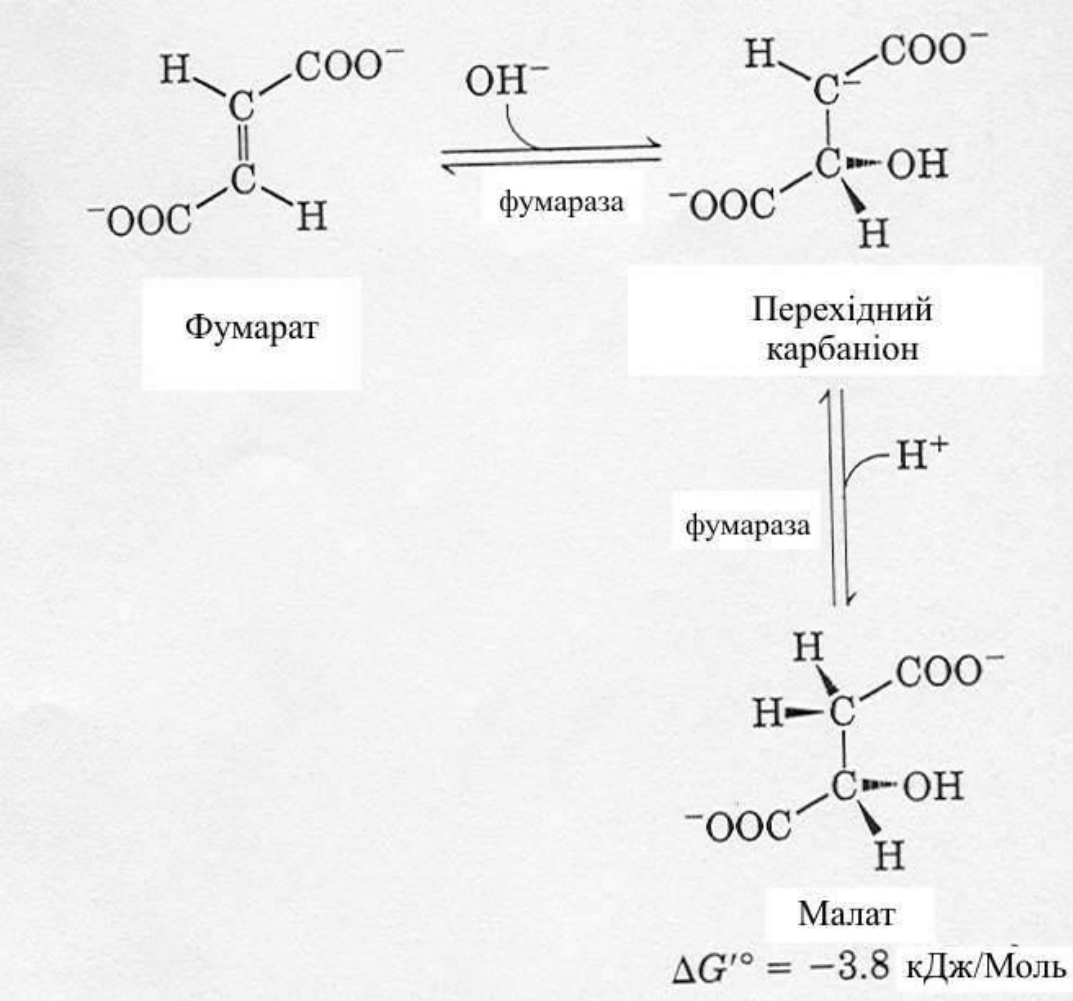




- **Сукцинат**, утворений з сукциніл-КоА окислюється до **фумарату** флавопротеїновою **сукцинатдегідрогеназою** (СДГ).
- У еукаріотів СДГ щільно зв’язана з внутрішньою мітохондріальною мембраною, у прокаріотів – з плазматичною мембраною.
- СДГ містить три різні залізо-сіркові кластери і одну молекулу ковалентно зв’язаного ФАД.
- Електрони, утворені у процесі окислення сукцинату, перед тим як потрапити у дихальний ланцюг проходять через ФАД- і залізо-сіркові центри.
- Потік електронів від сукцинату через ці переносники до кінцевого акцептора електронів – O_2 є спряженим з синтезом близько 1,5 молекули АТФ на пару електронів.
- **Малонат**, як структурний аналог сукцинату, є потужним конкурентним інгібітором СДГ.

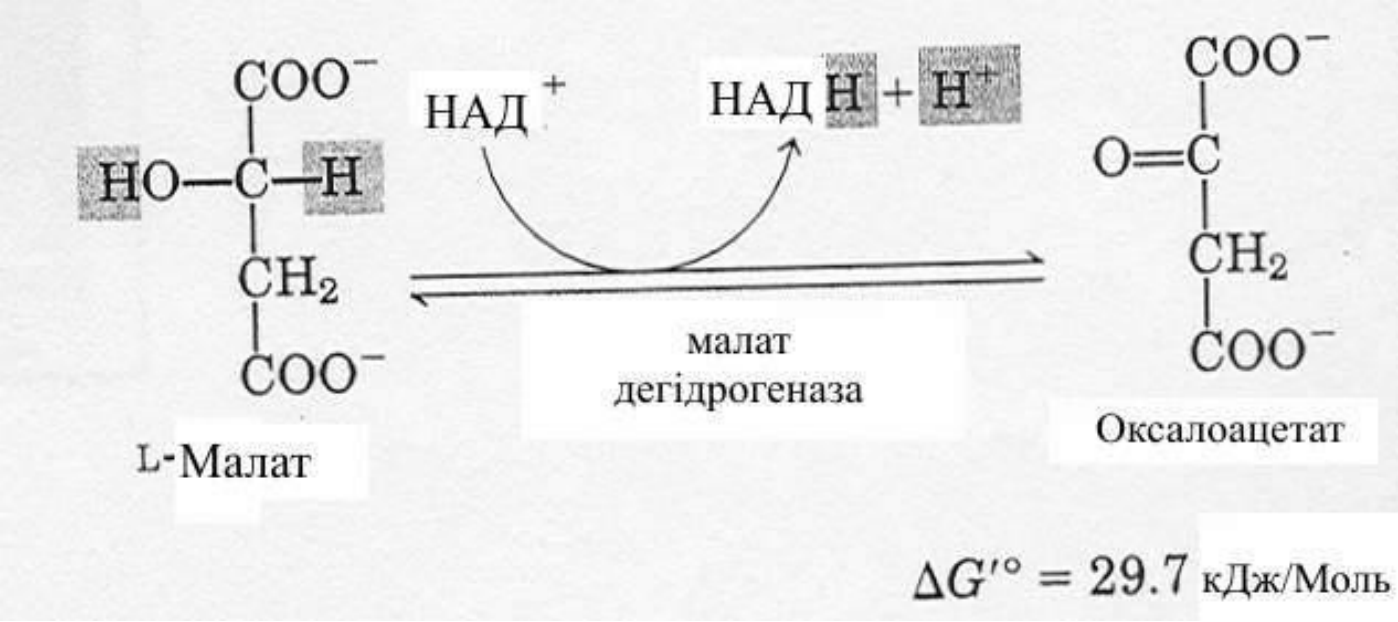
© Babsky A

Гідратація фумарату до малату



- Зворотна гідратація фумарату до малату каталізується **фумаразою**.
- Проміжним етапом в цій реакції є утворення карбаніону.
- Фумараза є високо стереоспецифічний фермент, який каталізує гідратацію подвійного зв’язку *транс*-типу, але не *цис*-конфігурацію, як у малеаті (це *цис*-ізомер фумарату).

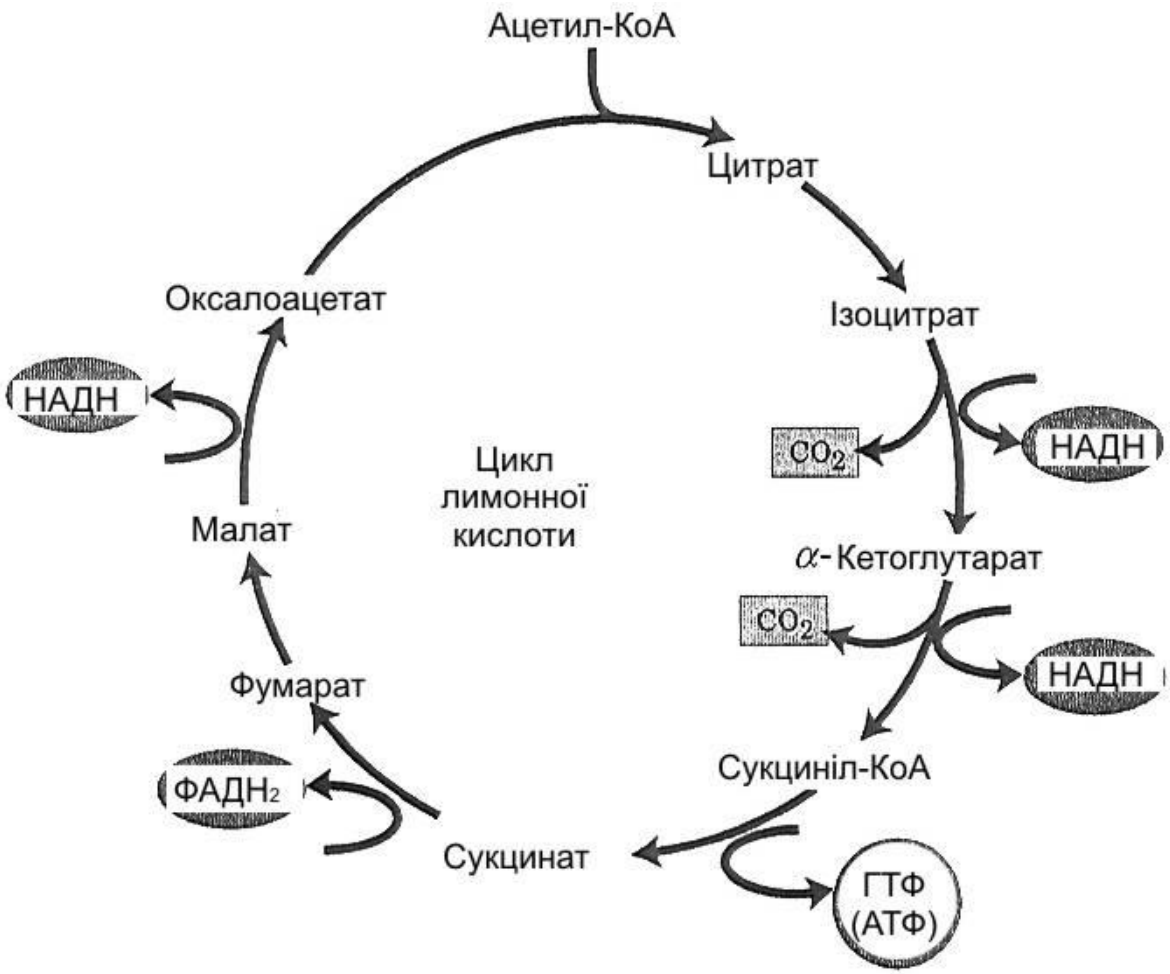
Окислення малату до оксалоацетату



- **НАД-залежна-L-малат-дегідрогеназа** каталізує окислення малату до оксалоацетату.
- Рівновага цієї реакції за стандартних термодинамічних умов лежить далеко зліва, проте в інтактних клітинах оксалоацетат постійно видаляється високо-екзергонічною цитрат-синтазною реакцією.
- Це дозволяє підтримувати концентрацію оксалоацетату у клітині вкрай низькою ($<10^{-6}$ M), сприяючи малат-дегідрогеназній реакції працювати в сторону утворення оксалоацетату.

© Babsky A

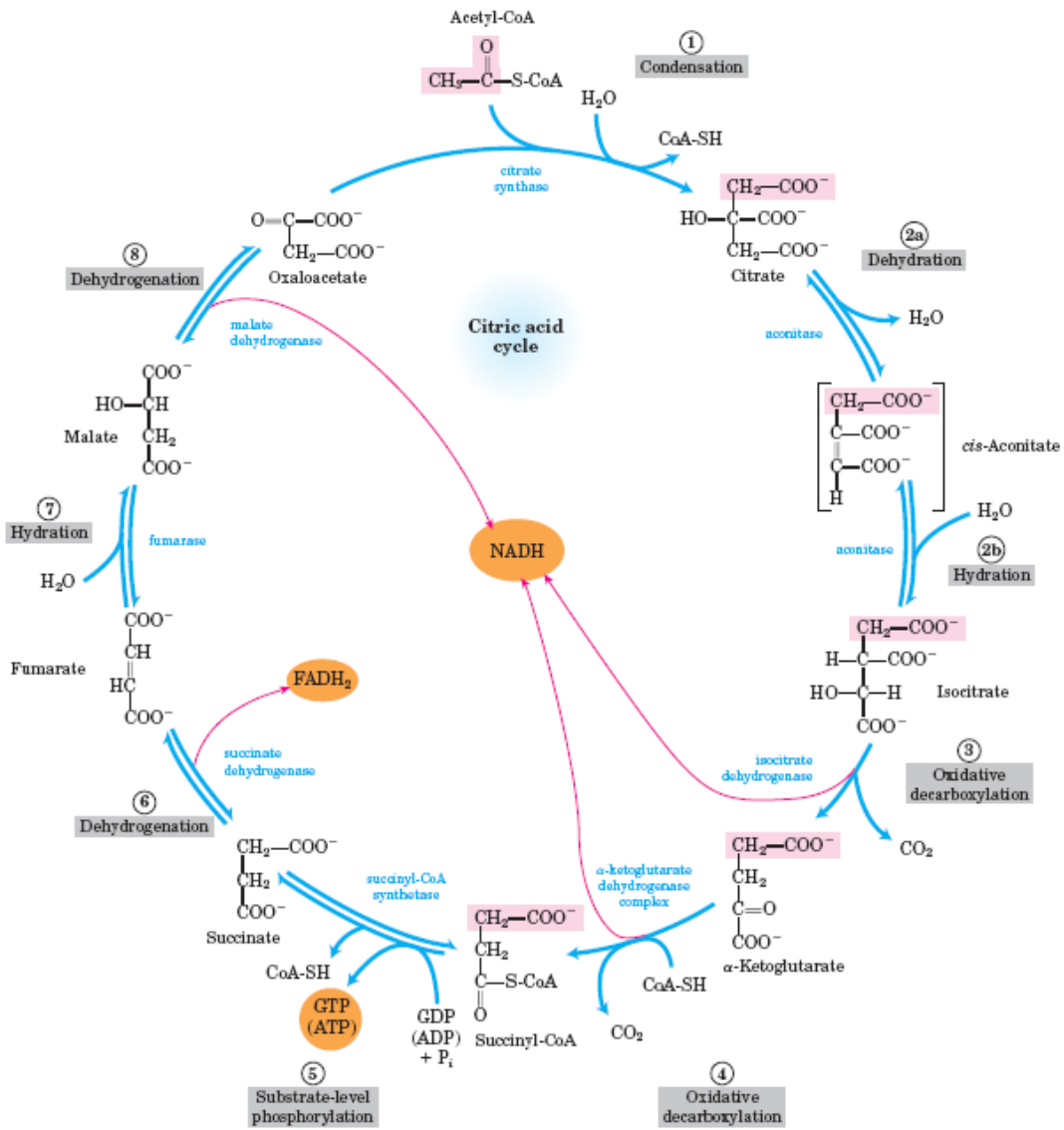
Продукти одного обороту циклу лимонної кислоти



- При кожному обертанні циклу вивільняються три молекули НАДН, одна $ФАДН_2$, одна ГТФ (чи АТФ) і дві молекули CO_2 у реакції окисного декарбоксилювання.
- На цьому рисунку всі реакції циклу показані як такі, що йдуть лише в одному напрямку, проте більшість реакцій є зворотними.

© Babsky A

Реакції циклу лимонної кислоти



- Атоми вуглецю, відтінені рожевим кольором, походять з ацетату в ацетил-КоА при першому оберті циклу.
- Червоними стрілками показано місця запасання енергії через перенос електронів на ФАД чи НАД$^+$, формуючи ФАДН$_2$ чи НАДН + Н$^+$.
- Етапи (1), (3) і (4) є по своїй суті незворотними у клітині, всі інші етапи є зворотними.
- Продуктом етапу (5) може бути як АТФ, так і ГТФ, залежно від того, який ізофермент каталізує реакцію.

© Babsky A

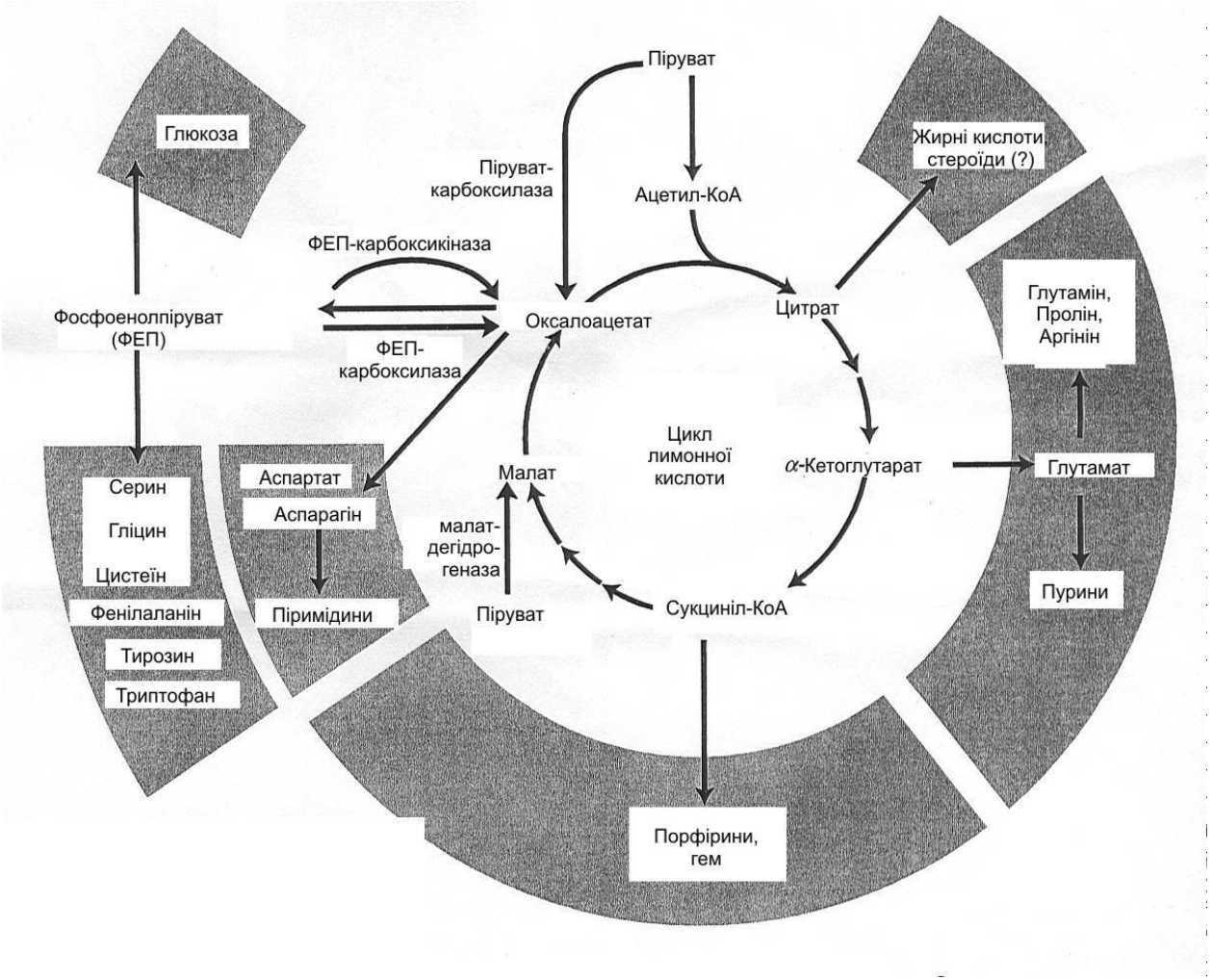
Стехіометрія відновлення коферментів і утворення АТФ при аеробному окисленні глюкози через гліколіз, реакції піруват-дегідрогеназного комплексу, цикл лимонної кислоти і окисне фосфорилювання

Реакція	*Кількість АТФ чи безпосередньо утворених відновлених коферментів*	*Гранично можлива кількість утворення АТФ**
Глюкоза → глюкозо-6-фосфат	- 1 АТФ	- 1
Фруктозо-6-фосфат → фруктозо 1,6 дифосфат	- 1 АТФ	-1
2 (Гліцеральдегід-3-фосфат) → 2 (1,3-дифосфогліцерат)	2 НАДН	5
2 (1,3-Дифосфогліцерат) → 2 (3-фосфогліцерат)	2 АТФ	2
2 (Фосфоенолпіруват) → 2 (піруват)	2 АТФ	2
2 (Піруват) → 2 (ацетил-КоА)	2 НАДН	5
2 (Ізоцитрат) → 2 (α-кетоглутарат)	2 НАДН	5
2 (α-Кетоглутарат) → 2 (сукциніл-КоА)	2 НАДН	5
2 (Сукциніл-КоА) → 2 (Сукцинат)	2 АТФ (чи 2 ГТФ)	2
2 (Сукцинат) → 2 (Фумарат)	2 $ФАДН_2$	3
2 (Малат) → 2 (Оксалоацетат)	2 НАДН	5
Всього		**32**

* Розраховано як 2,5 АТФ на НАДН чи 1,5 АТФ на $ФАДН_2$. Негативне значення означає споживання.

© Babsky A

Роль циклу лимонної кислоти в анаболізмі



- Інтермедіати циклу лимонної кислоти використовуються як попередники для багатьох біосинтетичних шляхів.
- Товстими лініями показано чотири анаплеротичні реакції, які поповнюють запаси використаних інтермедіатів циклу.

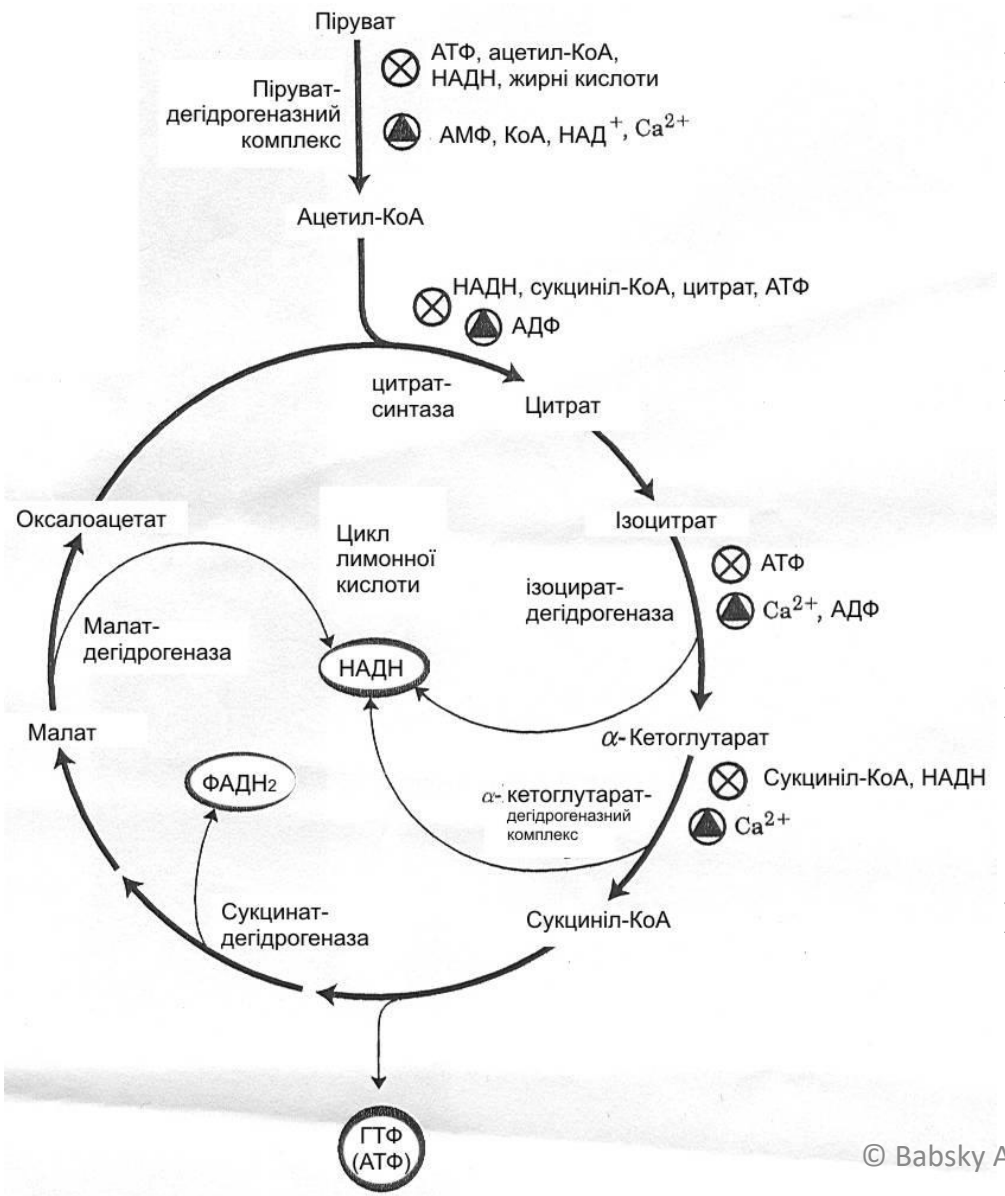
© Babsky A

Анаплеротичні реакції циклу лимонної кислоти

Анаплеротичні реакції

Реакції			*Тканина (и) / організм (и)*
Піруват + HCO_3^- + АТФ	$\overset{\text{піруват-карбоксилаза}}{\rightleftharpoons}$	Оксалоацетат + АДФ + $Ф_н$	Печінка, нирки
Фосфоенолпіруват + CO_2 + ГДФ	$\overset{\text{фосфоенолпіруват-карбоксикіназа}}{\rightleftharpoons}$	Оксалоацетат + ГТФ	Серце, скелетні м’язи
Фосфоенолпіруват + HCO_3^-	$\overset{\text{фосфоенолпіруват-карбоксилаза}}{\rightleftharpoons}$	Оксалоацетат + $Ф_н$	Вищі рослини, бактерії, дріжджі
Піруват + HCO_3^- + НАД(Ф)Н	$\overset{\text{малат-дегідрогеназа}}{\rightleftharpoons}$	Малат + НАД(Ф)$^+$	Широко розповсюджена у еукаріот і прокаріотів

Регуляція метаболічного потоку з ПДГ-комплексу через цикл лимонної кислоти (ЦЛК)



- ПДГ-комплекс алостерично гальмується, коли АТФ/АДФ, НАДН/НАД$^+$ і Ацетил-КоА/КоА є високими. Коли ці співвідношення зменшуються, запускається алостерична активація окислення піруватy.
- Ступінь потоку через ЦЛК може бути обмежений наявністю субстратів цитрат-синтази – оксалоацетату і ацетил-КоА чи НАД$^+$, який вичерпується через перетворення в НАДН у трьох пунктах НАД-залежного окислення.
- Гальмування за принципом зворотнього зв’язку спричиняється через сукциніл-КоА, цитрат і АТФ, які сповільнюють цикл, гальмуючи його на ранніх стадіях.
- У м’язовій тканині сигнали Ca^{2+} викликають скорочення і стимулюють енергетично-відновний метаболізм, щоб поновити запаси АТФ, спожиті для м’язових скорочень.

© Babsky A

Альберт Сент-Дьйордьї
(1893–1986)

Ганс Адольф Кребс
(1900–1981)

Додаткова література

1. Lowenstein JM (1969). *Methods in Enzymology, Volume 13: Citric Acid Cycle*. Boston: Academic Press.
2. Krebs HA, Weitzman PDJ (1987). *Krebs' citric acid cycle: half a century and still turning*. London: Biochemical Society.
3. Lane, Nick (2009). *Life Ascending: The Ten Great Inventions of Evolution*. New York: W.W. Norton & Co.
4. Gest H (1987). Evolutionary roots of the citric acid cycle in prokaryotes. *Biochem. Soc. Symp.* 54: 3–16.
5. Meléndez-Hevia E, Waddell TG, Cascante M (1996). The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution. *J. Mol. Evol.* 43 (3): 293–303.
6. Lehninger Principles of Biochemistry (2012). Fourth Edition. David L. Nelson, Michael M. Cox.