

Citrátový cyklus

Citrátový cyklus (TCC; jinak též cyklus trikarboxylových kyselin, cyklus kyseliny citrónové nebo Krebsův cyklus)^{[1][2]} je metabolická dráha aerobního metabolismu, ačkoliv jej i většina anaerobních organismů využívá k syntéze jiných metabolitů pomocí **kata-** a **anaplerotických reakcí** (amfibolická povaha TCC, viz dále). Citrátový cyklus slouží u aerobních organismů včetně člověka k získávání NADH + H⁺, které se oxiduje v dýchacím řetězci, kde vzniká proton-motivní silou ATP. Enzymy TCC jsou lokalizované v matrix mitochondrie kromě sukcinátdehydrogenázy, nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně (některé isoformy enzymů TCC jsou i cytozolické, úplný TCC zde však neprobíhá).

Přehled enzymů

1. Pyruvátdehydrogenáza

Pyruvát dehydrogenázový komplex je komplex tří enzymů uvnitř mitochondrie: pyruvát dekarboxylázy, dihydrolipoyltransacetylázy a dihydrolipoyldehydrogenázy. Komplex pracuje jako celek v přítomnosti koenzymů TPP, NAD⁺, lipoátu ve formě lipoamidu, FAD a koenzymu A. Pyruvát dehydrogenáza katalyzuje oxidativní dekarboxylaci pyruvátu s navázáním acetylu na TPP, dihydrolipoyltransacetyláza katalyzuje přenesení acetylu z TPP přes lipoamid na koenzym A a dihydrolipoyldehydrogenáza regeneruje lipoamid pomocí FAD, z něhož vzniká FADH₂, které regeneruje zase pomocí NAD⁺, z něhož vzniká NADH + H⁺. Enzym je inhibován arsenem v oxidačním stavu As^{III} (arsenitan), který blokuje lipoamid.

2. Citrát syntéza

Enzym katalyzuje reakci acetyl-S-CoA a oxalacetátu, která produkuje citrát. Hlavními zdroji acetyl-CoA jsou pyruvát (produkt glykolýzy; viz pyruvát dehydrogenázový komplex) či β-oxidace mastných kyselin.

3. Akonitáza

Katalyzuje přesmyk citrátu na izocitrát přes cis-akonitát. Její aktivní centrum tvoří kuboidní klastr čtyř atomů síry a čtyř atomů železa, vázaného přes síru z postranních řetězců cysteinu. Tento enzym je stereospecifický s ohledem na **prochirální** vlastnosti citrátu (to se dá prokázat izotopicky značeným pyruvátem). Reakci inhibuje např. (2R,3R)-2-fluorocitrát.

4. Izocitrát dehydrogenáza

Katalyzuje oxidativní dekarboxylaci karboxylové skupiny na terciárním uhlíku izocitrátu za současné dehydrogenace hydroxy skupiny, přičemž se redukuje NAD⁺ na NADH + H⁺. Tento enzym využívá **manganaté** či hořečnaté **ionty** jako **koenzym**.

5. α-ketoglutarát dehydrogenáza

Katalyzuje oxidativní dekarboxylaci za současného navázání α-keto uhlíku na koenzym A. Vzniká tak sukcinyl-S-CoA a NADH + H⁺ z NAD⁺.

6. Sukcinylkoenzym A syntetáza

Provádí přesně opačnou reakci, než podle které se jmenuje. Katalyzuje hydrolýzu sukcinylkoenzymu A za současné **fosforylace na substrátové úrovni**, tedy vzniká přímo GTP z GDP (a ne až v dýchacím řetězci).

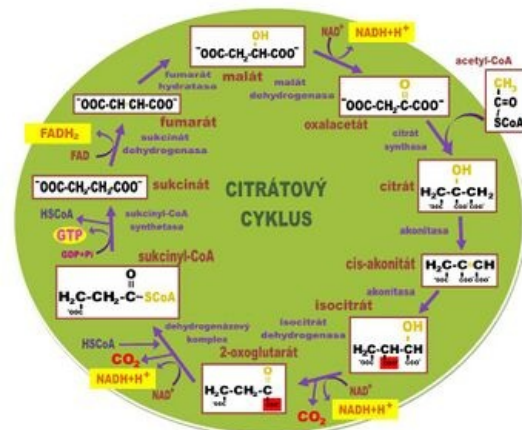
7. Sukcinát dehydrogenáza

Provádí dehydrogenaci sukcinátu. Vzniká FADH₂ z FAD. Dehydrogenace je vysoce stereospecifická a vzniká pouze fumarát (trans-butendiová kyselina), a ne maleinát (cis-butendiová kyselina). Enzym je kompetitivně inhibován malonátem, který je o uhlík kratší než sukcinát, a proto nemůže dojít k dehydrogenaci.

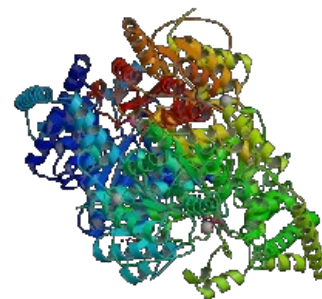
8. Fumaráza

Katalyzuje alkalickou hydrataci fumarátu za vzniku malátu. OH⁻ provádí nukleofilní atak na uhlík, který díky rezonanci π-elektronů získal parciální kladný náboj, čímž vzniká karbanion, na který se naváže H⁺.

9. Malát dehydrogenáza



Reakce citrátového cyklu.



Pyruvát dehydrogenáza

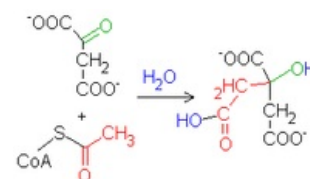
Katalyzuje dehydrogenaci malátu na oxalacetát, čímž se substrát celého cyklu regeneruje. Tento enzym také může být zapojen v malátovém člunku.

Přehled reakcí

Acetyl-CoA + oxalacetát

1. Acetyl-CoA + oxalacetát + H₂O → citrát + HS-CoA

- katalyzuje regulační enzym **citrátsynthasa**

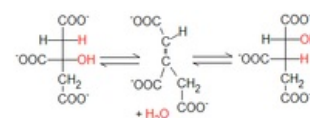


1. Ac-CoA+oxalacetát

Citrát - isocitrát

2. Citrát → cis-akonitát + H₂O → isocitrát

- katalyzuje **akonitasa**



2. citrát - isocitrát

Isocitrát - 2-oxoglutarát

3. Isocitrát + NAD⁺(NADP⁺) → 2-oxoglutarát + **NADH+H⁺**(NADPH+H⁺) + CO₂

- katalyzuje regulační **isocitrátdehydrogenáza**

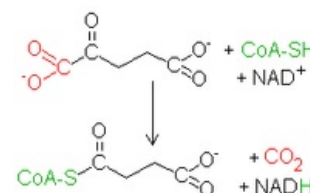
Soubor:Isocitrate-oxoglutarate (reaction).png

3. isocitrát - 2-oxoglutarát

2-oxoglutarát - sukcinyl-CoA

4. 2-oxoglutarát + NAD⁺ + HS-CoA → sukcinyl-CoA + **NADH+H⁺** + CO₂

- katalyzuje regulační **2-oxoglutarátdehydrogenasový komplex**



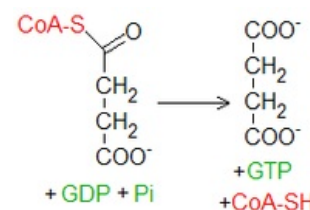
4. 2-oxoglutarát - sukcinyl-CoA

Sukcinyl-CoA - sukcinát

5. Sukcinyl-CoA + GDP → sukcinát + **GTP** + CoA

- katalyzuje **sukcinátthiokináza**

Makroergní sukcinylkoenzym A je hydrolyzován za vzniku sukcinátu a energie je využita k fosforylaci na substrátové úrovni. Jedná se o evolučně starou reakci, proto je zde v přeměně GDP na GTP využít na místo adenosinu guanosin^[3].



5. sukcinyl-CoA - sukcinát

Sukcinát - fumarát

6. Sukcinát + FAD → fumarát + FADH₂

- katalyzuje **sukcinátdehydrogenáza**

Soubor:Succinate-fumarate (reaction).png

6. sukcinát - fumarát

Fumarát - L-malát

7. Fumarát + H₂O ⇌ L-malát

L-malát

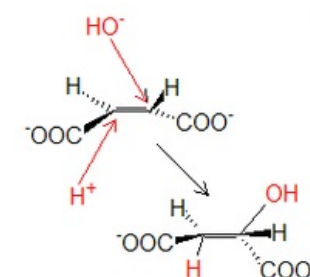
- katalyzuje **fumaráthydratasa**

L-malát - oxalacetát

8. L-malát + NAD⁺ ⇌ oxalacetát + **NADH+H⁺**

oxalacetát + **NADH+H⁺**

- katalyzuje **malátdehydrogenáza**



7. Fumarát - malát

Soubor:L-Malate-oxalacetate.png

8. L-malát - oxalacetát

Celý cyklus je poháněn těmito reakcemi^[3]:

- Dekarboxylace isocitrátu — rovnováha je posunuta ve prospěch α-ketoglutarátu tím, že vznikající oxid uhličitý je odstraňován z buněk a vydycháván.
- Dekarboxylace α-ketoglutarátu — rovnováha je posunuta ve prospěch sukcinylkoenzymu A — stejné jako v předchozím případě.
- Oxidace malátu na oxalacetát — rovnováha je posunuta ve prospěch oxalacetátu tím, že vznikající NADH + H⁺ je spotřebováváno v dýchacím řetězci.

Přehled kataplerotických reakcí

Kataplerotické reakce jsou reakce, které vyčerpávají intermediáty TCC.

1. **Glukoneogeneza;**
2. **Syntéza mastných kyselin a cholesterolu** – vychází z acetyl-S-CoA;
3. **Syntéza aminokyselin** – α -ketoglutarát je zdrojem pro glutamát;
4. **Syntéza porfyrinů** – začíná z acetyl-koenzymu A;
5. **oxidace aminokyselin** – aminokyseliny mohou být metabolizovány na jednotlivé intermediáty TCC, které se přetvoří na oxalacetát, jenž může být degradován pomocí fosfoenolpyruvát karboxykinázy na fosfoenolpyruvát, posléze na pyruvát, pak na acetyl-S-CoA, který se v TCC oxiduje na CO_2 a uhlíky z řetězců aminokyselin jsou vydýchány.

Přehled anaplerotických reakcí

Anaplerotické reakce (řec. ana = vzhůru, pleroein = doplňovat) jsou reakce, které doplňují intermediáty TCC.

1. **Oxidace mastných kyselin s lichým počtem uhlíků** doplňuje sukcinyl-S-CoA.
2. **Degradace izoleucinu, methioninu a valinu** doplňuje sukcinyl-S-CoA.
3. **Transaminace a deaminace** aminokyselin vede k tvorbě α -ketoglutarátu a oxalacetátu.
4. **karboxylace** pyruvatu - oxalacetat
5. **oxidativní dekarboxylace** pyruvatu- Acetyl Co A

V průběhu citrátového cyklu nutně dochází k odčerpávání meziproductů. Napojené reakce – tvorba jiných intermediátů stojících mimo cyklus i z cyklu vycházející syntézy – snižují koncentraci meziproductů. Aby se cyklus nezpomaloval, existují reakce, jimiž se množství meziproductů doplňuje. Souhrn těchto cest se nazývá anapleróza. Z několika anaplerotických reakcí je nejznámější ta, která doplňuje obsah *oxalacetátu*. Pro anaplerózu je rozhodující metabolický produkt glukózy – *pyruvát*, který se karboxyluje. Anaplerotické reakce se odehrávají v **mitochondriích**, hlavně ve **svalech a v ledvinách**. Karboxylace *pyruvátu* má endergonní charakter a vyžaduje ATP. Katalyzujícím enzymem je *pyruvátkarboxylasa*, jejíž součástí je biotinový kofaktor, vlastní přenašeč karboxylu. CO_2 se navázal na dusík biotinu a tím se vytvořil *karboxybiotin*; tento faktor karboxyluje i jiné látky. Allosterický enzym *pyruvátkarboxylasa* je aktivován acetylkoenzymem A. Potřebu většího obsahu *oxalacetátu* signalizuje vysoká hladina *acetylkoenzymu A*. Další anaplerotické reakce vedou především ke vzniku *2-oxoglutarátu*, a to zejména transaminací nebo i oxidační deaminací *glutamátu*.

Regulace citrátového cyklu

Regulace Krebsova cyklu je uskutečněna několika způsoby. V první řadě je důležitý **dostatek substrátů** pro jednotlivé reakce, zejména Ac-CoA a oxalacetátu. Množství substrátu je určováno odstraňováním/dodáváním meziproductů - viz. ana- a kataplerotické reakce. Dále dochází k regulaci prostřednictvím **aktivace a inhibice enzymů**.

1. **Citrátsyntáza** je allostericky inhibována vysokou koncentrací ATP, NADH, svým produktem citrátem a jedním z dalších meziproductů cyklu, sukcinyl-CoA. Naopak ADP ji allostericky aktivuje.
2. **Isocitrát dehydrogenáza** je inhibována ATP a aktivována ADP. Dále ji stimulují Ca^{2+} , což souvisí s prací svalů: Ca^{2+} stimuluje kontrakci svalů, k čemuž je potřeba ATP. Takže je logické, že zároveň stimuluje enzym, který povede ke tvorbě NADH a tím ke tvorbě ATP pomocí dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace.
3. **α -ketoglutarátdehydrogenáza** je inhibována svým produktem, sukcinyl-CoA, a NADH. Stimuluje ji opět Ca^{2+} .

Souhrně by se tedy dalo říct, že je cyklus inhibován zvýšeným poměrem **ATP:AMP** a regulován množstvím NADH, které přímo souvisí s aktivitou dýchacího řetězce a tedy s dostupností kyslíku. Mluvíme o **respirační kontrole** mechanismem zvyšování poměru $\text{NAD}^+:\text{NADH}$.^[4]

Odkazy

Související články

- Glykolýza
- Koenzymy
- Acetyl-CoA
- ATP

Externí odkazy

- Citric Acid Cycle (https://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/citric_acid_cycle/index.html)

Reference

1. VOET, Donald a Judith VOET. *Biochemistry*. 3rd vydání. John Wiley & Sons Inc, 2004. 1616 s. s. 765–795. ISBN 0-471-19350-X.

2. NELSON, David L a Michael M COX. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed vydání. 2004. 1130 s. s. 601-623. ISBN 0-71674339-6.
3. LIBERDA, Jiří. *Citrátový cyklus* [přednáška k předmětu Cvičení z biochemie (<https://is.cuni.cz/studium/predmety/index.php?do=predmet&kod=MC250C23>), obor Chemie v přírodních vědách, Přírodovědecká fakulta UK]. Praha. 7.4.2011.
4. ▶ Metabolism | Krebs Cycle (<https://m.youtube.com/watch?v=rr7IRYLqleg&pp=ygULa3JlYnMgY3JlbGU%3D>)

Použitá literatura

- LEDVINA, Miroslav, et al. *Biochemie pro studující medicíny. I. díl*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 0000. 269 s. s. 103-106. ISBN 978-80-246-1416-8.
- MATOUŠ, Bohuslav, et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha : Galén, 2010. 540 s. ISBN 978-80-7262-702-8.

Doporučená literatura

Viz reference.