

Лекція 4. Цикл трикарбонових кислот, дихальний ланцюг, транспорт електронів

ЦТК - джерело відновних коферментів НАДН і ФАДН₂

Дихальний ланцюг – як ефективний механізм екстракції енергії відновних коферментів

Хеміосмотична теорія Мітчелла. Формування трансмембранних концентраційного і електричного потенціалів.

Цикл трикарбонових кислот (цикл лимонної кислоти, цикл Кребса) — циклічна послідовність ферментативних реакцій, у результаті яких ацетил – КоА ($\text{CH}_3 - \text{CO} \sim \text{S} - \text{CoA}$) – продукт катаболізму основних видів метаболічного палива (вуглеводів, жирів, амінокислот), окислюється до двоокису вуглецю з утворенням атомів водню, які використовуються для відновлення первинних акцепторів дихального ланцюга мітохондрій — нікотинамідних або флавінових коферментів.

Загальна характеристика циклу трикарбонових кислот

Цикл трикарбонових кислот (ЦТК) — це загальний кінцевий шлях окислювального катаболізму клітини в аеробних умовах. Реакції та ферменти ЦТК локалізовані в матриксі та внутрішній мембрані мітохондрій. Вони функціонально та біохімічно спряжені з мітохондріальними електротранспортними ланцюгами, що використовують для відновлення атомів кисню відновлювальні еквіваленти від НАДН ($\text{НАДН} + \text{H}^+$) та ФАДН₂ або ФМНН₂ і утворюють АТФ у ході окисного фосфорилування.

Схема функціонування ЦТК

Цикл трикарбонових кислот починається з взаємодії (конденсації) двовуглецевої молекули ацетил – КоА (С₂) з чотиривуглецевою (С₄) щавлевооцтовою кислотою (оксалоацетатом), що призводить до утворення шестивуглецевої (С₆) молекули лимонної кислоти (цитрату). В результаті подальшого багатоступеневого перетворення три – та дикарбонових кислот (інтермедіатів ЦТК) відбувається регенерація оксалоацетату (С₄) та виділяються дві молекули двоокису вуглецю (С₂).

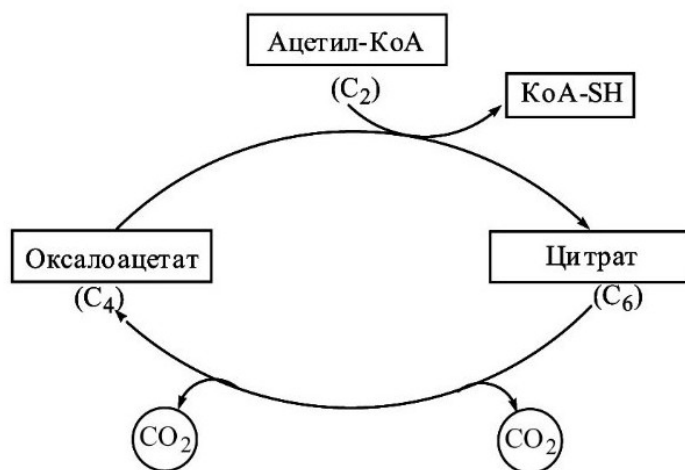


Схема функціонування циклу лимонної кислоти.

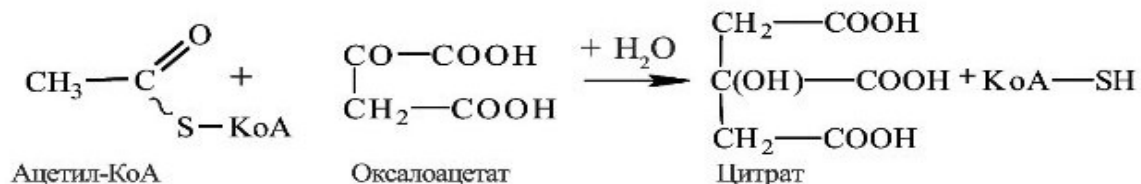
Таким чином, коензим А відщеплюється від ацетил – КоА («активної форми оцтової кислоти») вже в першій реакції ЦТК; у ході функціонування подальших реакцій циклу відбувається відщеплення від цитрату (альтернативна назва ЦТК — цитратний цикл) двох молекул двоокису вуглецю та чотирьох пар атомів водню (4 x 2H), що

дозволяє подати таке сумарне рівняння ЦТК:



Ферментативні реакції циклу трикарбонових кислот

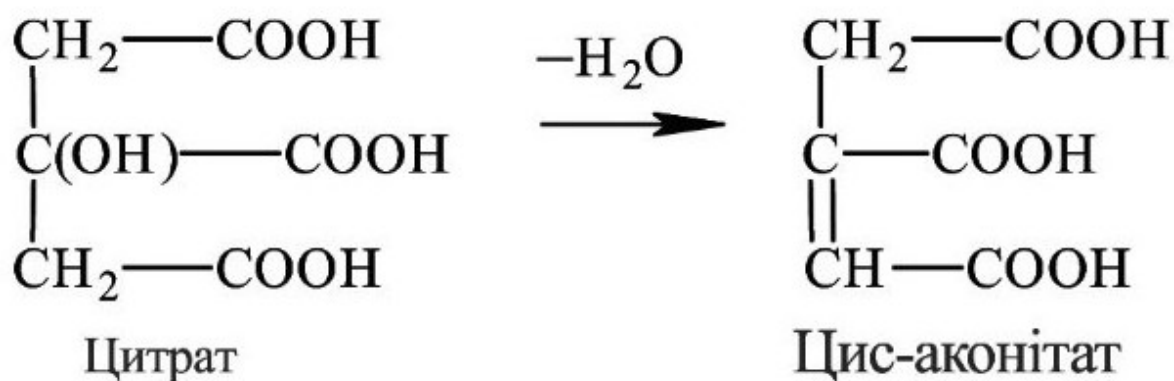
1. Утворення лимонної кислоти (цитрату) за рахунок конденсації ацетил – КоА з щавлевооцтовою кислотою (оксалоацетатом):



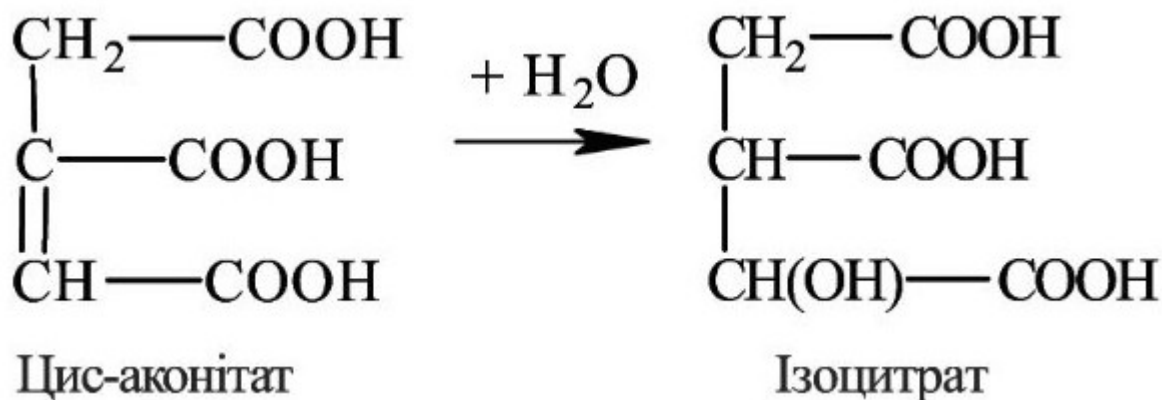
Реакція каталізується ферментом *цитратсинтазою*. Вона є регуляторним ферментом, активність якого гальмується АТФ, НАДН, сукциніл – КоА та довголанцюговими ацил – КоА.

2. Перетворення (ізомеризація) цитрату на ізоцитрат. Реакція каталізується ферментом аконітазою і складається з двох етапів:

2.1. *Дегідратація лимонної кислоти з утворенням цис – аконітової кислоти (цис – аконітату):*

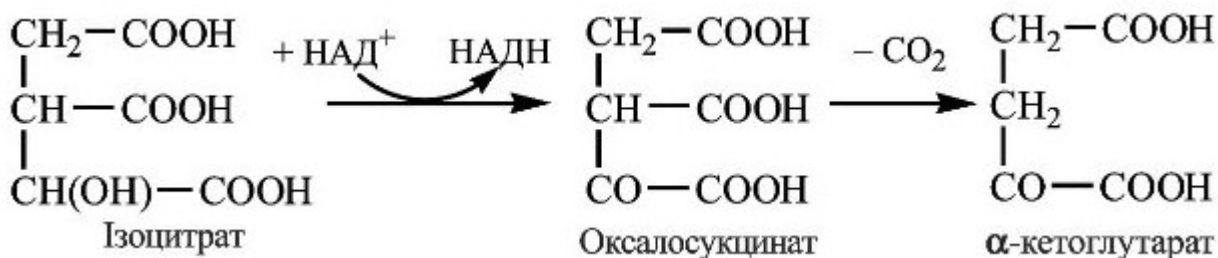


2.2. Приєднання до цис – аконітату молекули води. При приєднанні до подвійного зв'язку в складі цис – аконітату H^+ та OH^- у транс – положенні результатом реакції є утворення ізолимонної кислоти (ізоцитрату):



3. Дегідрування та декарбоксилювання ізоцитрату. Реакція каталізується НАД – залежною ізоцитратдегідрогеназою і призводить до утворення α – кетоглутарової кислоти (α – кетоглутарату).

Ізоцитратдегідрогеназа є регуляторним ферментом, позитивний модулятор якого — АДФ, негативний — НАДН.



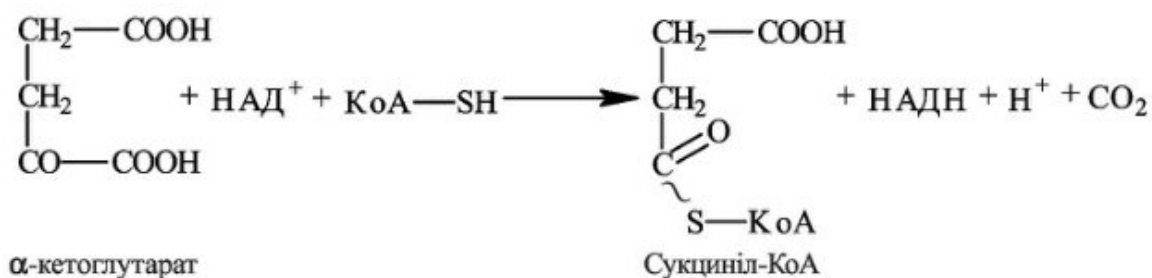
Фермент має дві молекулярні форми — мономерну (молекулярна маса ізоцитратдегідрогенази з мітохондрій серця дорівнює 330 кД) та димерну. В присутності позитивного модулятора АДФ мономери агрегують між собою з утворенням димеру. Негативний модулятор НАДН протидіє індукованій АДФ агрегації мономерних форм ферменту. Обидві молекулярні форми ізоцитратдегідрогенази мають

каталітичні властивості, але за умов низької концентрації АДФ димер значно більш активний.

4. Окислення α – кетоглутарату до сукцинату.

Цей процес відбувається у дві стадії:

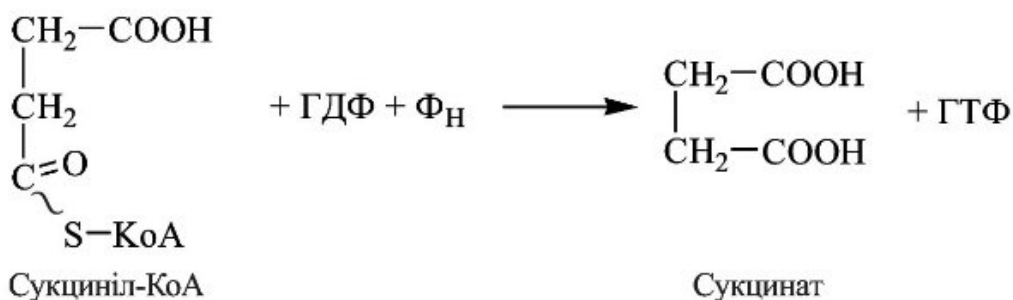
4.1. Окислювальне декарбосилування α – кетоглутарату з утворенням сукциніл – КоА — стадія, що каталізується мультиензимним α – кетоглутарат – дегідрогеназним комплексом. Кінцевий продукт — високоенергетичний тіоестер сукциніл – КоА, в макроергічному зв'язку якого акумульовано хімічну енергію окислювально – відновлювальною реакцією, що мала місце:



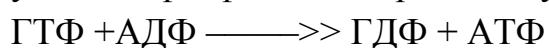
НАДН, що утворився в цій реакції, окислюється в дихальному ланцюзі мітохондрій із генерацією 3 молекул АТФ.

За механізмом реакції цей процес нагадує окислювальне декарбосилування пірувату до ацетил – КоА; як і піруватдегідрогеназний, α – кетоглутаратдегідрогеназний комплекс має у своєму складі коферменти тіаміндифосфат (ТДФ), ліпоєву кислоту (ЛК), КоА, НАД⁺ та ФАД. Молекулярна маса цього комплексу з клітин E.Coli дорівнює $2,1 \cdot 10^6$.

4.2. Деацилювання сукциніл – КоА (перетворення на янтарну кислоту (сукцинат)). Реакція каталізується ферментом сукцинілтіокіназою. У результаті розщеплюється макроергічний зв'язок у молекулі сукциніл – КоА, та за рахунок цієї енергії утворюється нова макроергічна сполука нуклеозидтрифосфат ГТФ:



Потім ГТФ передає свою кінцеву фосфатну групу на АДФ у нуклеозидфосфокіназної реакції з утворенням АТФ:



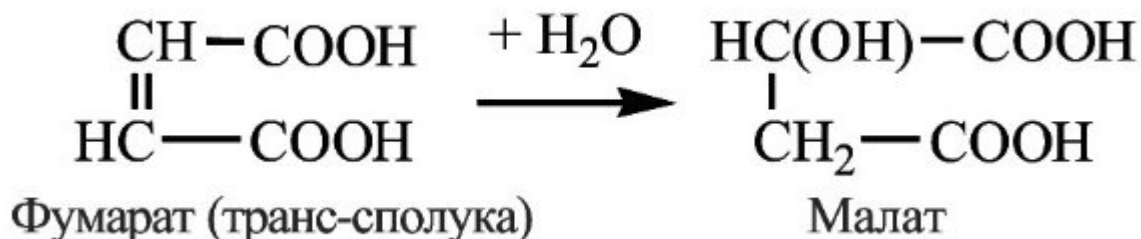
5. Окислення янтарної кислоти до фумарової кислоти (фумарату). Реакція каталізується ФАД – залежним ферментом сукцинатдегідрогеназою:



Окислення відновленого коферменту (ФАДН₂) за допомогою коензиму Q дихального ланцюга мітохондрій призводить до синтезу за рахунок окисного фосфорилування 2 молекул АТФ.

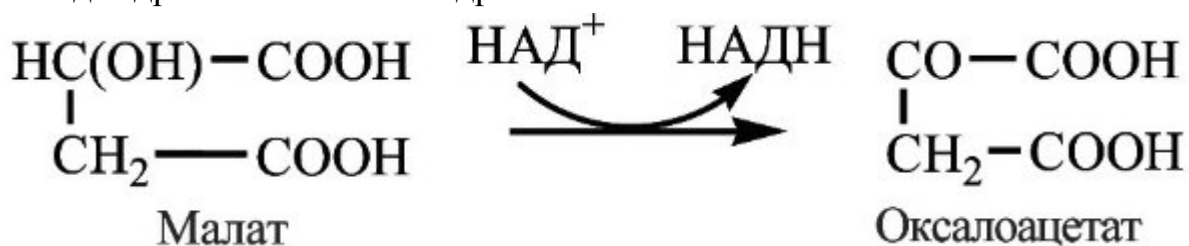
6. Перетворення фумарової кислоти на яблучну кислоту (малат) внаслідок приєднання до фумарату молекули води.

Реакція каталізується ферментом фумаратгідратазою (фумаразою):



7. Окислення малату до оксалоацетату (щавлевооцтової кислоти).

Реакція каталізується НАД – залежним ферментом — малатдегідрогеназою мітохондрій:



Окислення НАДН, що утворився, в дихальному ланцюзі мітохондрій призводить до генерації 3 молекул АТФ.

Малатдегідрогеназна реакція завершує цикл трикарбонних кислот. Оксалоацетат, який є продуктом даної реакції, здатний до взаємодії з новими молекулами ацетил – КоА.

Загальну метаболічну карту циклу трикарбонних кислот подано на рис.

Біохімічні функції циклу Кребса. Цикл Кребса виконує в організмі людини такі найважливіші біохімічні функції:

- а) *інтегративну* – цикл Кребса є своєрідним метаболічним «колектором», який об'єднує шляхи розпаду вуглеводів, ліпідів і білків (рис. 1.2);
- б) *амфіболічну* – цикл Кребса виконує подвійну функцію: катаболічну, оскільки у ньому проходить розпад ацетил – КоА, і анаболічну, оскільки субстрати циклу Кребса використовуються для синтезу інших речовин. Так, оксалоацетат йде на синтез аспарагінової кислоти і глюкози, 2 – оксоглутарат – – глутамінової кислоти, сукцинат – гему;
- в) *енергетичну* – в ході реакцій циклу Кребса утворюється одна молекула ГТФ на рівні субстрату (сукциніл – КоА – синтетазна реакція);
- г) *водневодонорна* — цикл Кребса є основним генератором гідрогену для дихального ланцюга мітохондрій. У циклі Кребса утворюється 4 пари атомів гідрогену, три із яких з'єднані з НАД⁺ і одна з ФАД.

Реакції циклу трикарбонових кислот регулюються на рівні:

- 1) *цитратсинтази* (ацетил – КоА та оксалоацетат є активаторами ферменту);
- 2) *ізоцитратдегідрогенази* (АДФ, АМФ — алостеричні активатори ферменту, АТФ, НАДН — інгібітори);
- 3) *2 – оксоглутаратдегідрогеназного комплексу* (АТФ, ГТФ, НАДН, сукциніл – КоА – алостеричні інгібітори, іони Ca^{2+} – активатори ферментативного комплексу).

Електронний -транспорт та окисне фосфорилування

Шляхи витягу енергії з відновлених коферментів

В цілому, реакції, які отримують всю енергію з молекули в одному кроці неефективні: вони витрачають більшу частину доступної енергії. Шлях, використовуваний для відбору енергії від НАДН, включає кілька етапів, що дозволяє більш ефективно вилучення енергії від молекули. Процес складається з двох фаз: електронного транспорту й окисного фосфорилування.

Механізм отримання енергії з відновлених кофакторів був предметом серйозних дискусій. Хеміосмотична гіпотеза, запропонована Пітером Мітчеллом в 1961 році має найбільш експериментальну підтримку, і, напевно, правильна в його істотних пунктах. По суті, Митчел запропонував, щоб шлях перенесення електронів зберігає енергію від електронів, що транспортуються, шляхом створення протонного градієнта через мембрану мітохондрій, і що цей протонний градієнт потім використовується, щоб забезпечити енергію, необхідну для синтезу АТФ. Як працюють ці процеси вже були предметом численних досліджень.

При передачі електронів від НАДН до кисню звільняється -219,2 кДж / моль. Це значно більше, ніж ΔG гідролізу АТФ (-30,5 кДж / моль). Очевидно НАДН має велику кількість енергії, запасеної в молекулі. Завдання транспортного шляху електрона, щоб зберегти цю енергію у формі, яка може бути використана для синтезу більше одного АТФ.

Структура мітохондрій

Для того, щоб зрозуміти роботу шлів транспорту електронів і окисного фосфорилування, ми повинні дивитися на загальну структуру мітохондрії. Мітохондрія містить дві мембрани: зовнішня мембрана, яка, як видається в значній мірі нести відповідальність за підтримання форми органели, і набагато менш проникною внутрішній мембрані. Зовнішня мембрана містить поріни, білки, які утворюють пори, які дозволяють вільно дифундувати через мембрану досить великим молекулам ~ 10 кДа.

Область між мембранами називається міжмембранним простором.

Міжмембранний простір займають розчинні білки досить велики, так що вони не можуть пройти через поріни. Для малих молекул, цитоплазма і міжмембранний простір, по суті, прилеглі райони.

Внутрішня мембрана діє як бар'єр, щоб запобігти рух більшості молекул. Кілька молекул мають певні транспортери, які дозволяють їм увійти або вийти з мітохондрії. Внутрішня мембрана містить кристи - складки внутрішній мембрані. Функція крист, щоб збільшити площу внутрішній мембрани.

Нарешті, у внутрішній мембрані є матрикс. Матрикс являє собою дуже щільний розчин білка (50% білка за вагою). Ферменти ЦТК розташовані в матриксі, так само як ферменти для кількох інших метаболічних шляхів. Мітохондрії містять невеликий геном (~ 16500 б.п.). Геном містить 22 генів транспортної РНК, 2 гени рибосомальної РНК і 13 генів поліпептидів; поліпептиди все залучені в транспортному шляху електронів або шляху окисного фосфорилування. Зверніть увагу, що ферменти ЦТК (включаючи сукцинатдегідрогеназу) всі зроблені з ядерних генів; мультисубодиничні комплекси транспортного шляху електронів і АТФ-синтази (за винятком сукцинатдегідрогенази) складаються з білків, отриманих з обох ядерних та мітохондріальних генів.

Дихальний або електрон-транспортний ланцюг

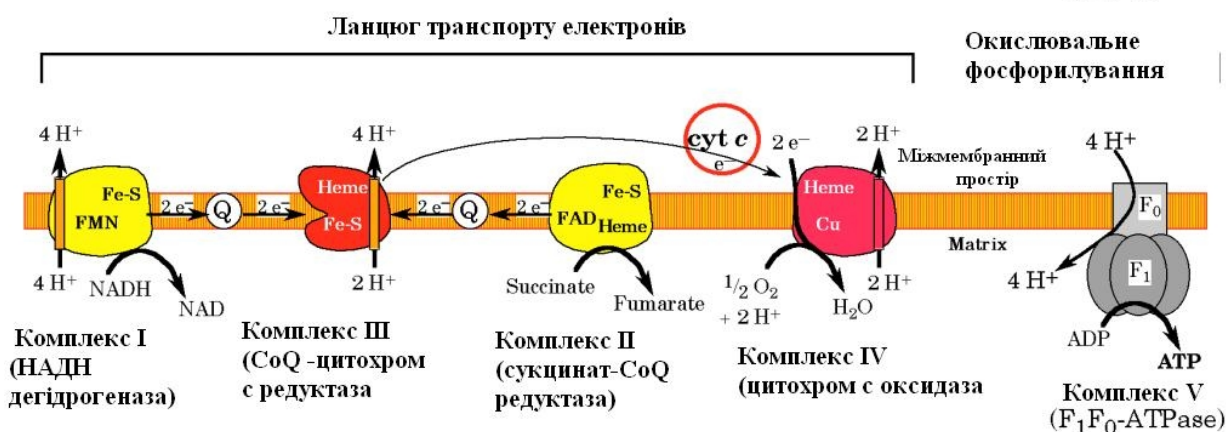
НАДН і ФАДН₂ можуть передати електронні пари спеціального набору білків, які діють в якості електронного каналу до кисню: електронно-транспортному ланцюгу. Як електрони передаються вниз по ланцюжку, вони втрачають значну частину своєї вільної енергії. Деяка частина з цієї енергії може бути захоплена і збережена у вигляді протонного градієнта, який може бути використаний для синтезу АТФ з АДФ, інша частина енергії втрачається у вигляді тепла. Термін "протонний градієнт" означає, що одна сторона мембрани (в даному випадку, сторона внутрішньої мембрани мітохондрій міжмембранного простору) має більш високу концентрацію протонів, ніж з іншого боку. Градієнти концентрації будь-якого виду містять деяку кількість енергії. Протонний градієнт утворюється транспортом електронів і має концентраційний та електричний потенціал. У внутрішній

мембрані мітохондрій знайдено в цілому п'ять білкових комплексів, що задіяні у шляхах транспорту електронів і окисного фосфорилування. Комплекси I, II, III і IV є частиною ланцюга транспорту електронів. Комплекс V є ферментний комплекс, який здійснює реакцію окисного фосфорилування: фактичне перетворення АДФ в АТФ. Всі вони великі мультібілкові комплекси. На додаток до мембранозв'язаних комплексів, ланцюг перенесення електронів вимагає мобільні електронні носії: цитохром с і коензим Q. Коензим Q не є білком, але пов'язаний з мембраною кофактор. Цитохром с є невеликий розчинний білок, що знаходиться в міжмембранному просторі.

Загальна реакція включає окислення НАДН або ФАДН₂ кофакторів, і призводить до відновлення кисню у воду. Цей процес є основною причиною потреби у кисні в більшості організмів. Електронно-транспортний шлях часто називають "дихальний ланцюг", тому що цей шлях є основною причиною для дихання (= дихання у тварин).

Електронно-транспортні комплекси

Комплекси білків. Комплекси I-IV мають різні простетичні групи в тому числі іонів металів, залізо-сірчаних центрів, гемов і флавінів.



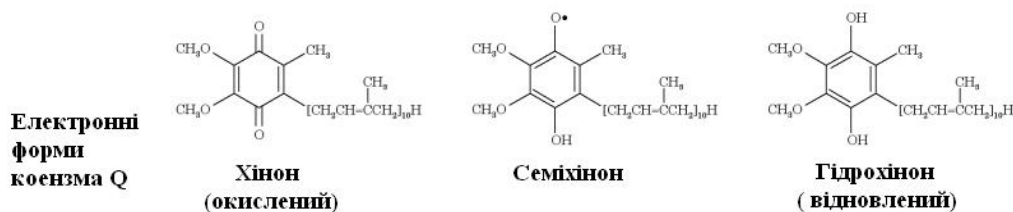
НАДН дегідрогеназа (комплекс I)

Перший пусковий комплекс містить залізо-сер-центр і ФМН. Комплекс I приймає електрони від НАДН, регенерує НАД. Комплекс I також протонний насос: кожна пара електронів призводить до руху близько 4 H⁺ від матриці до міжмембранного простору. Комплекс I віддає електрони коензиму Q.

Коензим Q

Коензим Q не білковий електронний носій, знаходиться у внутрішній мембрані мітохондрій. Ссавці використовують Q₁₀ (зверніть увагу на бічний ланцюг в наведених нижче структур; у ссавців, з'єднання має десять одиниць ізопрену, в той час як деякі інші види використовують версії з 6 або 8 одиниць ізопрену). Зверніть увагу, що Коензим Q може передавати один або два електрони; наведені нижче структури відповідають повністю окисленій формі, частково відновленій формі, а також повністю відновленій формі

молекули. Коензим Q може приймати електрони від Комплексу I і II (і від інших білків); віддає електрони комплексу III.



Сукцинатдегідрогеназа (комплекс II)

Сукцинатдегідрогеназа є одним з ферментів в ЦТК. Це єдиний фермент ЦТК вбудований у внутрішній мембрані мітохондрій. Перетворення сукцината в фумарат призводить до відновлення пов'язаного з ферментом ФАД. Окислення відновлених флавінів вимагає передачу електронів до коензиму Q; іншими словами, фермент не може каталізувати реакцію якщо електронний транспорт не функціонує. Сукцинатдегідрогеназа не качає протони

Коензим Q-залежна цитохром c-редуктаза (комплекс III)

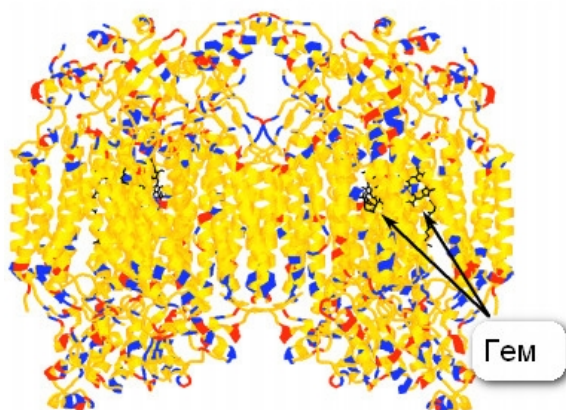
Комплекс III приймає електрони від коензиму Q (і, отже, побічно, і від комплексу I і комплексу II). Як комплекс I, комплекс III також протонний насос. Комплекс III містить кілька простетичних груп гема. Різні домени гема мають різні спектри поглинання. Різні спектральні види іноді називають цитохрому b і цитохром c₁ - це все частини того ж білкового комплексу.

Електрони, що отримує комплекс III, він отдає по одному в розчинний білок-носії електронів, що містить гем, званого цитохром c. Цитохром c знаходиться в міжмембранному просторі. Хоча цитохром c є відносно невеликий білок (12 кДа), він занадто великий, щоб пройти через молекулу порівнів в зовнішній мембрані.

Цитохром c оксидаза (комплекс IV)

Цитохром c оксидаза, як випливає з назви, приймає електрони від цитохрому c. Комплекс IV є термінальною частиною ланцюжка електронів і передає електрони безпосередньо до кисню. Як комплекси I і III, комплекс IV є протонним насосом. Цитохром c-оксидазу іноді називають цитохрому a-a₃ комплекс.

На рис. відображена тривимірна структура цитохром c оксидази. Комплекс містить у цілому чотири гемів, а також іони міді і магнію. На рис. гідрофобні залишки показані жовтим кольором, в той час як заряджені залишки показані червоним кольором (негативні) і синього (позитивні). Зверніть увагу на



жовту смугу через середину структури, яка взаємодіє з гідрофобною внутрішньою частиною мембрани. Електрон-транспортний ланцюг використовує ряд простетичних груп гема; але цитохром c оксидази є єдиною, яка здатна зв'язувати кисень.

Протонні насоси

Точний механізм протонного накачування залишається предметом дискусій. Число протонів, які накачуються на пару електронів, що входять в ланцюжок від НАДН, також залишається предметом дискусій. Згідно з поточними оцінками, еквівалент близько 4 протонів на кожній з трьох протонів насосів (комплекс I, III і IV) – максимум 12 протонів.