

## **Ciklus limunske kiseline-1** **KOMPLEKS PIRUVAT DEHIDROGENAZE**

Boris Mildner

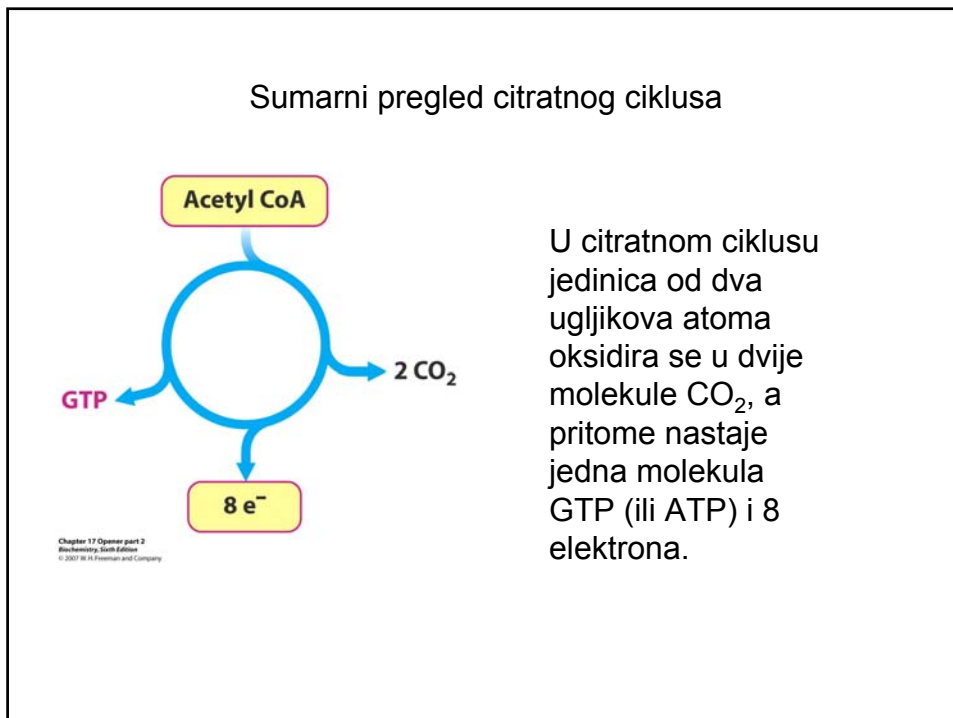
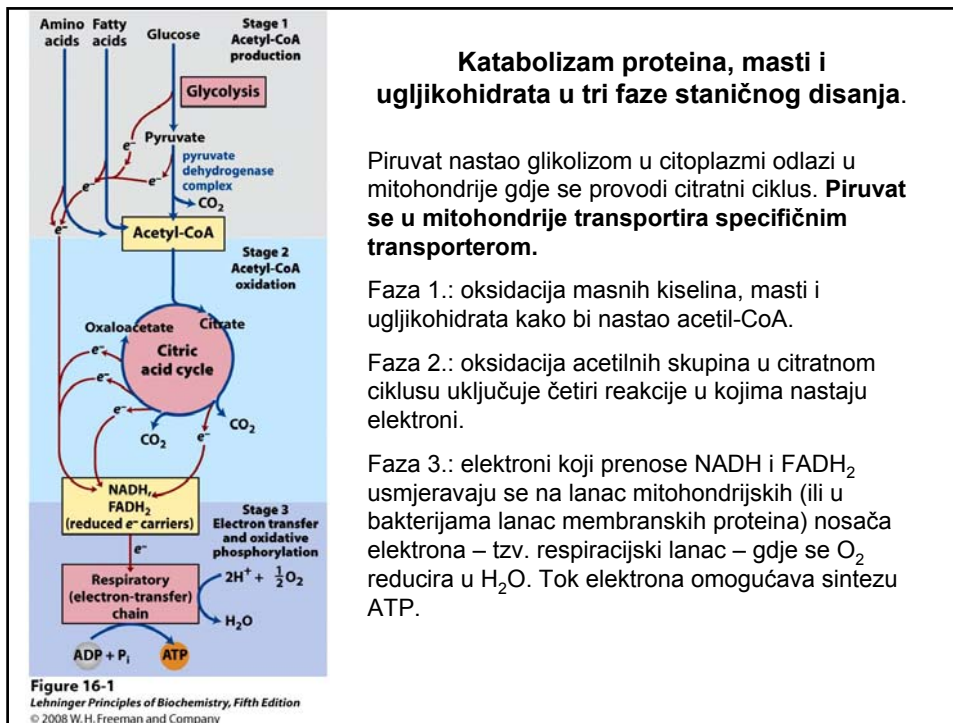
### Citratni ciklus /Krebsov ciklus



**Hans Krebs, 1900–1981**

Unnumbered 16 p615  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

Piruvat koji nastaje glikolizom, umjesto da se reducira u laktat, odnosno u etanol, dalje se oksidira do vode i  $\text{CO}_2$ . Ova aerobna faza katabolizma naziva se respiracija. U širem fiziološkom smislu, u višestaničnim organizmima, disanje je korištenje  $\text{O}_2$  i otpuštanje  $\text{CO}_2$ . U biokemiji i staničnoj biologiji proučava se stanično disanje, odnosno kako stanice koriste  $\text{O}_2$  da bi proizvele  $\text{CO}_2$ .

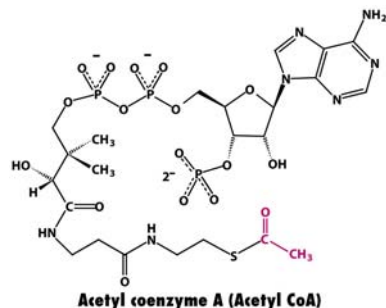


## Sinteza acetil-koenzima A (acetil-CoA)

- U aerobnim organizmima, glukoza i drugi šećeri, kao i masne kiseline te većina aminokiselina oksidiraju se u  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  putem citratnog ciklusa i respiracijskog lanca.
- Prije nego što mogu ući u citratni ciklus, ugljikova okosnica šećera i masnih kiselina razgrađuje se do acetilne skupine, acetil-CoA, tj. do oblika kojim ciklus prihvaća nove metabolite (gorivo).
- Mnogi ugljikovi atomi koji potječu od aminokiselina, u citratni ciklus, također, ulaze kao acetil-CoA (iako se neke aminokiseline razgrađuju i do drugih međuprodukata citratnog ciklusa).

## Koenzim A je aktivni prenositelj acilnih skupina.

**Piruvat koji nastaje glikolizom transportira se u mitohondrij te se tamo, prije nego što uđe u citratni ciklus, pretvara u acetil-CoA**

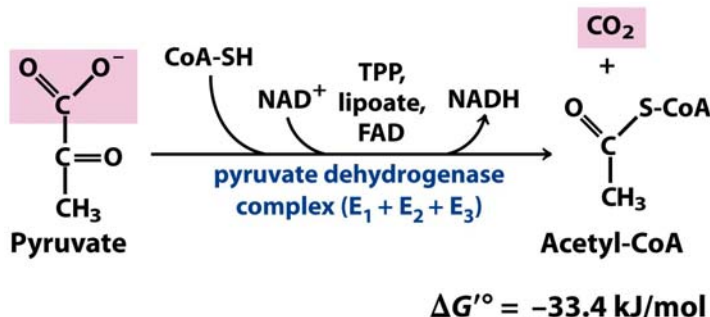


Unnumbered figure pg 475  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2013 W. H. Freeman and Company

Acetil-CoA je prvi supstrat koji ulazi u citratni ciklus.

**Sinteza acetil-CoA provodi se na kompleksu piruvat dehidrogenaze koji se nalazi u mitohondriju.**

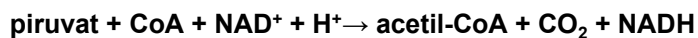
## U kompleksu piruvat dehidrogenaze, piruvat se oksidira do acetil-CoA i CO<sub>2</sub>



**Figure 16-2**  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

**Shema reakcije koju provodi kompleks piruvat dehidrogenaze.** U reakciji sudjeluju tri enzima i pet koenzima. Ovo je reakcija oksidacijske dekarboksilacije pri čemu se uklanja karboksilna skupina s piruvata kao CO<sub>2</sub>, a preostala dva ugljikova atoma postaju acetilna skupina u acetil-CoA. NADH koji nastaje ovom reakcijom, prenosi elektrone u obliku hidridnih iona (:H<sup>-</sup>) na respiracijski lanac, a odatle se elektroni prenose na kisik, ili u anaerobnim organizmima na nitrate ili sulfate. Prijenosom dva elektrona s NADH na kisik nastaju 2,5 molekula ATP.

## U kompleksu piruvat dehidrogenaze sudjeluje pet koenzima



Za provođenje dehidrogenacije i dekarboksilacije piruvata u acetilnu skupinu, acetil-CoA, potreban je slijed reakcija u kojima sudjeluje pet koenzima: **tiamin pirofosfat (TPP)**, **lipoat**, **koenzim A (CoA)**, **flavinadenin dinukleotid (FAD)** i **nikotinamid dinukleotid (NAD<sup>+</sup>)**.

Četiri različita vitamina u ljudskoj prehrani bitne su sastavnice ovog sustava; tiamin u TPP, riboflavin u FAD, niacin u NAD<sup>+</sup> i pantotemat u CoA.

## Struktura koenzima A

Slobodni CoA-SH se tijekom reakcija koje se dešavaju u kompleksu piruvat dehidrogenaze pretvara u acetyl-CoA.

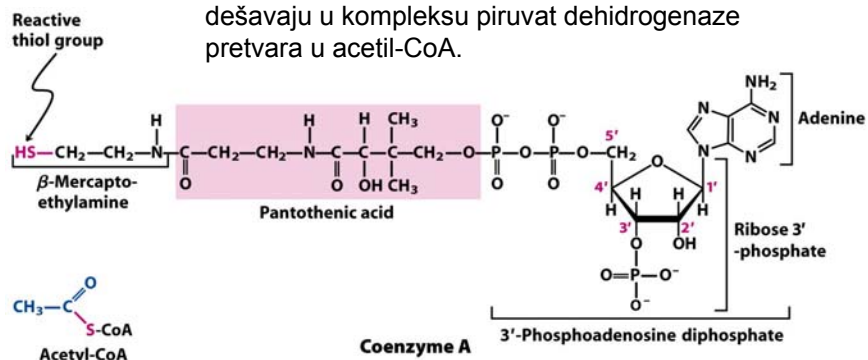


Figure 16-3  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Struktura tiamin pirofosfata

E1, enzim u kompleksu piruvat dehidrogenaze katalizira oksidativnu dekarboksilaciju piruvata. Katalizu omogućava tiazolni prsten TPP.

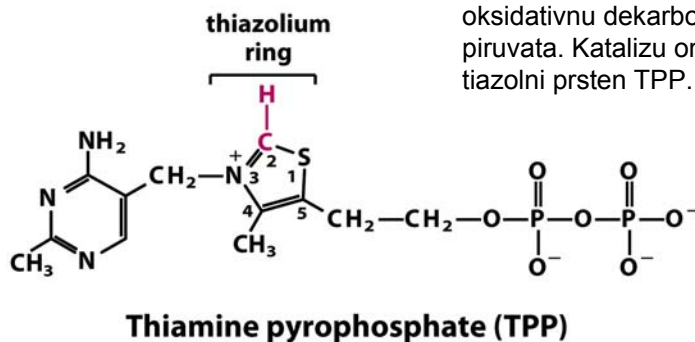


Figure 14-14a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## Struktura lipoata koji se veže za $\epsilon$ -amino skupinu lizina dihidrolipoil transacetilaze

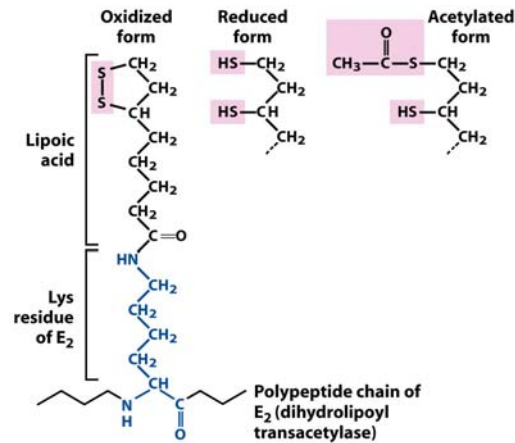


Figure 16-4  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

E<sub>2</sub> (dihidrolipoil transacetilaza) pomoću "ruke" na čijem kraju je lipoamid, omogućava prijenos dekarboksiliranog piruvata (acetata) do CoA, tako da nastaje acetyl-CoA.

## Struktura flavinadenin dinukleotida

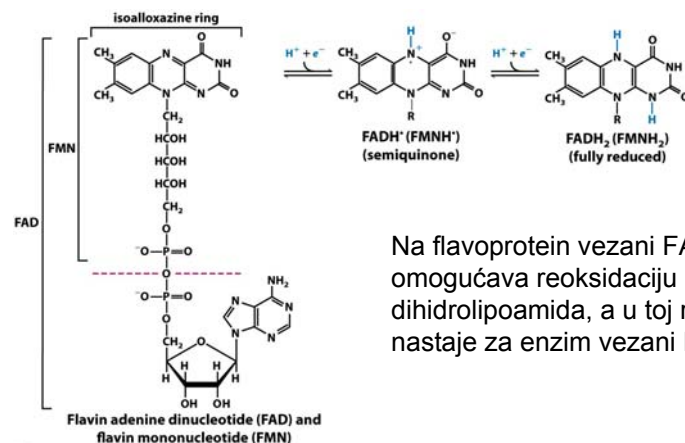


Figure 13-27  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

Na flavoprotein vezani FAD omogućava reoksidaciju dihidrolipoamida, a u toj reakciji nastaje za enzim vezani FADH<sub>2</sub>.

## Struktura nikotinamid dinukleotida

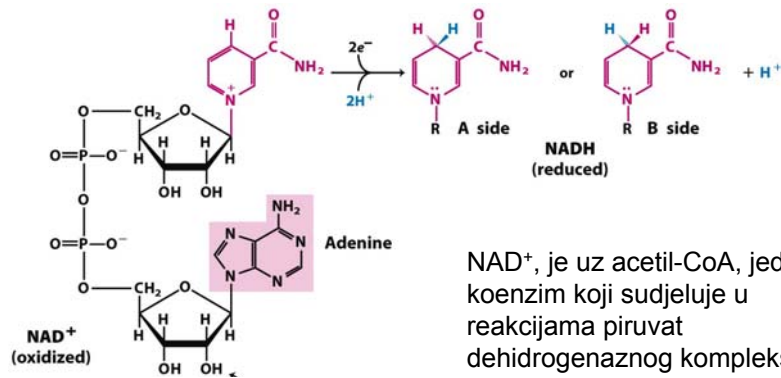


Figure 13-24a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

NAD<sup>+</sup>, je uz acetil-CoA, jedini koenzim koji sudjeluje u reakcijama piruvat dehidrogenaznog kompleksa, koji je topljiv i čiji se reducirani oblik (NADH) dalje prenosi. Redukcijom NAD<sup>+</sup> regenerira se za enzim vezani FADH<sub>2</sub>.

Sinteza acetil-koenzima A u mitohondrijima, koju provodi piruvat dehidrogenaza, je **ireverzibilna** reakcija koja povezuje glikolizu s citratnim ciklusom

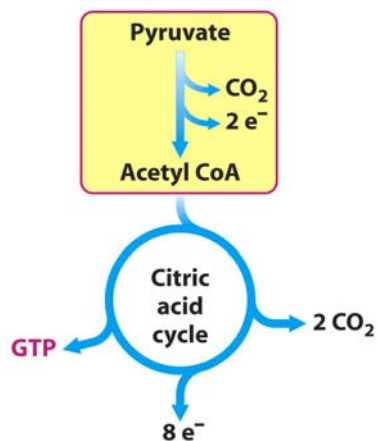


Figure 17-4  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Acetil-CoA nastao reakcijom piruvat dehidrogenaze kompleksa ili se razgrađuje u citratnom ciklusu ili se koristi kao acetil-CoA u biosintetskim reakcijama.

## Tri različita enzima izgrađuju kompleks piruvat dehidrogenaze (PDH kompleks)

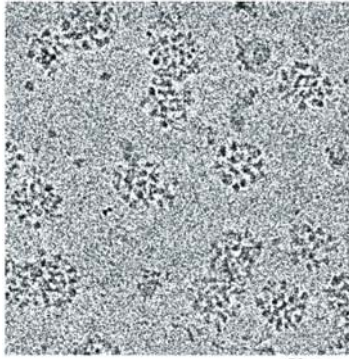


Figure 16-5a

Krioelektronska mikrofografija PDH kompleksa iz slezene goveda.

U kompleksu se nalaze višestruke kopije triju enzima: **piruvat dehidrogenaze (E1)**, **dihidrolipoil transacetilaze (E2)** i **dihidrolipoil dehidrogenaze (E3)**. Broj kopija svakog enzima se mijenja ovisno o vrsti, a time se i mijenja veličina kompleksa.

U eukariota, dio kompleksa čine i dva regulatorna proteina – protein kinaza i protein fosfataza. Ovakva struktura E1-E2-E3 sačuvana je tijekom evolucije pa se slična struktura **koristi za oksidaciju  $\alpha$ -ketoglutarata kao i za oksidacije  $\alpha$ -ketokiselina koje nastaju razgradnjom razgrananih aminokiselina, valina, izoleucina i leucina. U istim vrstama, E3 podjedinica identična je u ovim različitim enzimskim kompleksima.**

## Enzimi koji izgrađuju kompleks piruvat dehidrogenaze

TABLE 17.1 Pyruvate dehydrogenase complex of *E. coli*

Enzyme	Abbreviation	Number of chains	Prosthetic group	Reaction catalyzed
Pyruvate dehydrogenase component	E <sub>1</sub>	24	TPP	Oxidative decarboxylation of pyruvate
Dihydrolipoyl transacetylase	E <sub>2</sub>	24	Lipoamide	Transfer of acetyl group to CoA
Dihydrolipoyl dehydrogenase	E <sub>3</sub>	12	FAD	Regeneration of the oxidized form of lipoamide

Table 17-1  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Ovisno o vrsti, molekulska masa kompleksa iznosi 4 - 10 milijuna D.



## Trodimenzionalna struktura PDH kompleksa

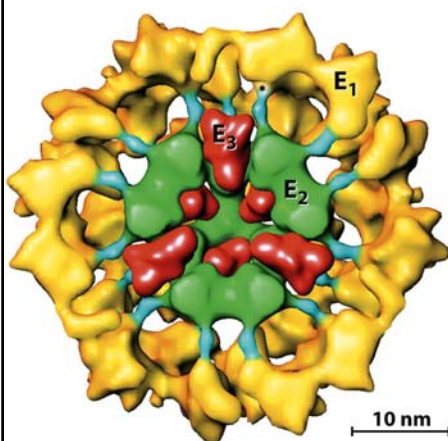


Figure 16-5b  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

**E1-piruvat dehidrogenaza;**

**E2-dihidrolipoil transacetilaza;**

**E3 – dihidrolipoil dehidrogenaza.**

U središtu, zeleno, nalazi se 60 E2 koje su uređene u 20 trimera kako bi nastao pentagonski dodekaedar. Lipoilne skupine, ruke, (plavo) strše na van kako bi se povezale s aktivnim mjestima E1 enzima (žuto) koji su poredani oko središnjih E2. Nekoliko podjedinica E3 (crveno) vezano je u središtu tako da lipoilna ruka može dosegnuti do svih aktivnih mjesta. Zvezdica \* označava mjesto gdje je lipoilna skupina vezana na lipoilnu domenu E2. Zbog bolje preglednosti ovdje je prikazana samo polovica molekule.

## E2-dihidrolipoil transacetilaze u PDH kompleksu

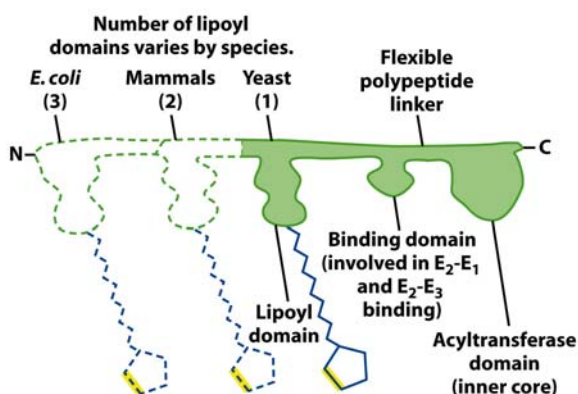


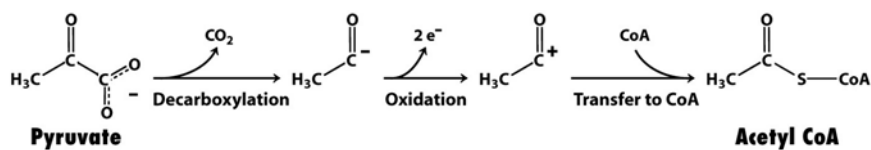
Figure 16-5c  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

E2 se sastoji od tri domene koje su međusobno povezane kratkim lancima. Domene su: katalitička aciltransferazna domena, domena vezanja koja uključuje povezivanje E2 s E1 i E3, te jedna ili više (ovisno o vrsti) lipoilnih domena.

## U sintezi acetil-CoA sudjeluju tri enzima i pet koenzima

Pretvorba piruvata u acetil-CoA provodi se u tri koraka:

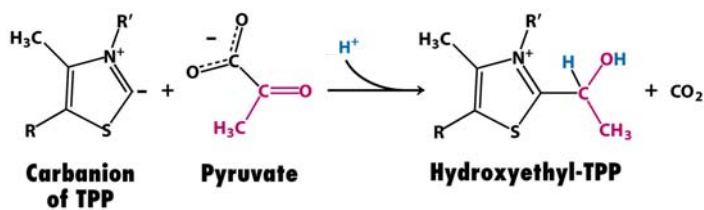
- Dekarboksilacijom
- Oksidacijom
- prijenosom acetilne skupine na CoA



Unnumbered figure pg 478b  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

## U sintezi acetil-CoA sudjeluju tri enzima i pet koenzima

### Reakcija dekarboksilacije



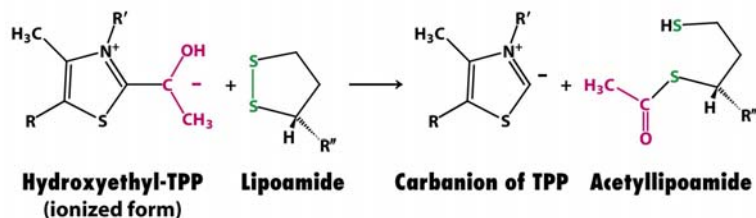
Unnumbered figure pg 478c  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

Piruvat se veže na ionizirani (karbanion) oblik TPP pri čemu se oslobađa  $\text{CO}_2$ , a zaostaje **hidroksietil-TPP**.

Ovu reakciju katalizira E1, piruvat dehidrogenaza, dio enzimskog kompleksa

## U sintezi acetil-CoA sudjeluju tri enzima i pet koenzima

### Oksidacija



Unnumbered figure pg 478d  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

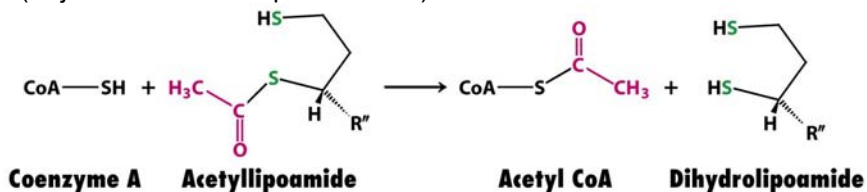
Hidroksietilna skupina koja je vezana za TPP *oksidira* se u acetilnu skupinu vezanjem za lipoamid, derivat lipoične kiseline koji je dio E2 kompleksa. Ovom reakcijom nastaje energijom bogata tioesterska veza u acetylipoamidu.

Ovu reakciju također katalizira podjedinica E1 piruvat dehidrogenaza dio kompleksa piruvat dehidrogenaze.

## U sintezi acetil-CoA sudjeluju tri enzima i pet koenzima

### Sinteza acetil CoA

(Prijenos acetilne skupine na CoA)



Unnumbered figure pg 479a  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

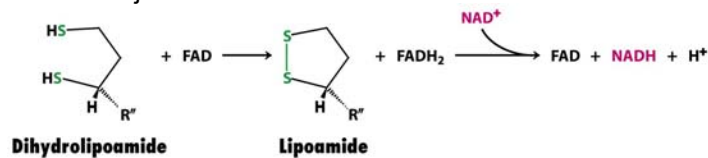
Acetilna skupina se prenosi s acetyl-lipoamida na CoA te nastaje acetyl-CoA.

Ovu reakciju katalizira **dihidrolipoil transacetiliza (E2)**.

Energijom bogata tioesterska veza ostaje sačuvana prilikom prijenosa acetilne skupine na koenzim A.

## U sintezi acetil-CoA sudjeluju tri enzima i pet koenzima

Regeneracija lipoamida, kako bi enzimski kompleks mogao započeti novi ciklus reakcija:



Unnumbered figure pg 479c  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Ovom četvrtom reakcijom reducirani oblik lipoamida (dihidrolipoamid) se oksidira, a reakciju provodi **dihidrolipoil dehidrogenaza (E3)**.

Dva se elektrona prenose na prostetsku skupinu FAD enzima E3, a tada se prenose na NAD<sup>+</sup>.

Prijenos elektrona s FADH<sub>2</sub> na NAD<sup>+</sup> nije uobičajen, jer je uobičajeno pravilo da se elektroni prenose s NADH na FAD. U ovom slučaju je to moguće jer se potencijal prijenosa elektrona s FADH<sub>2</sub> povećao vezanjem prostetske skupine za enzimski kompleks.

## Oksidacijska dekarboksilacija piruvata u acetil-CoA pomoću kompleksa piruvat dehidrogenaze

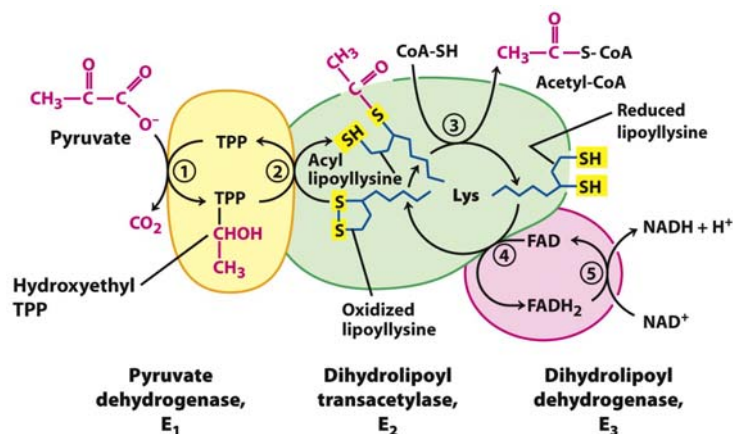
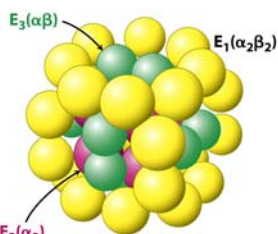


Figure 16-6  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

## Reakcije koje se odvijaju na kompleksu piruvat dehidrogenaze



Shematski prikaz kompleksa piruvat dehidrogenaze.

E1= piruvat dehidrogenaza

E2 = dihidrolipoil transacetilaza

E3= dihidrolipoil dehidrogenaza

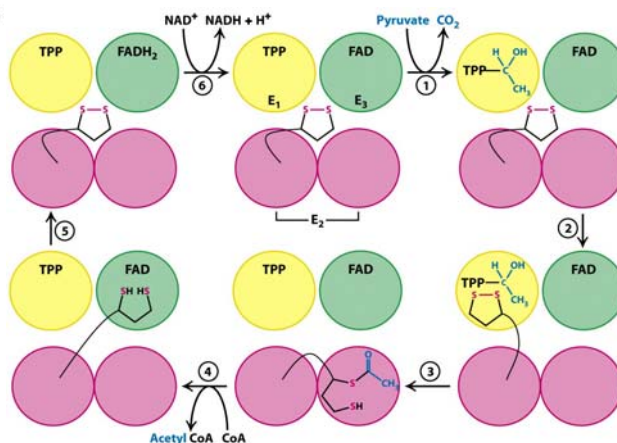


Figure 17-9  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Opis reakcija je na narednom dijapozitivu

## Reakcije koje se odvijaju na kompleksu piruvat dehidrogenaze

1. Piruvat se dekarboksilira u aktivnom mjestu E1, te nastaje hidroksietil-TPP, a otpušta se prvi produkt,  $\text{CO}_2$ . Aktivno mjesto smješteno je duboko u E1 kompleksu, a povezano je s površinom pomoću 20 Å dugačkog hidrofobnog kanala.
2. E2 ubacuje lipoamidnu ruku u duboki kanal koji vodi do aktivnog mjesta E1.
3. E1 katalizira prijenos acetilne skupine na lipoamid. Hidroksietil na reduciranom lipoamidu napušta E1 i ulazi u E2 koji je duboku u kompleksu.
4. Acetilna skupina prenosi se na CoA, te acetil-CoA izlazi iz kompleksa. Istovremeno, reducirana lipoamidna ruka, dihidrolipoamid, seli se u aktivno mjesto E3 flavoproteina koji sadrži oksidirani FAD.
5. U aktivnom mjestu E3 dihidrolipoamid reducira koenzim FAD u  $\text{FADH}_2$ , a reaktivirani, oksidirani lipoamid spreman je za novi reakcijski ciklus.
6. Konačni produkt, NADH nastaje redukcijom  $\text{NAD}^+$  pri čemu se na dihidrolipoil dehidrogenazu vezani  $\text{FADH}_2$  reoksidira u FAD.

**Strukturna organizacija kompleksa i dugačka fleksibilna lipoamidna ruka omogućavaju provođenje ovih reakcija.**

## Oksidacijska dekarboksilacija piruvata u acetil-CoA pomoću kompleksa piruvat dehidrogenaze

- Središnji mehanizam PDH kompleksa su premještanja **lipoilne ruke**. S E1, lipoilna ruka prenosi dva elektrona na E3 a acetilnu skupinu na E2. U kompleksu, svi enzimi i koenzimi su u jednoj nakupini.
- Slijed od 5 reakcija primjer je prenošenja supstrata kanalima unutar enzimskog kompleksa. Međuprodukti nikada ne napuštaju kompleks te je lokalna koncentracija supstrata na E2 vrlo visoka.
- Prijenos supstrata unutar enzimskog kompleksa ne dozvoljava da acetilne skupine koriste i drugi enzimi.

## Biološke "ruke"

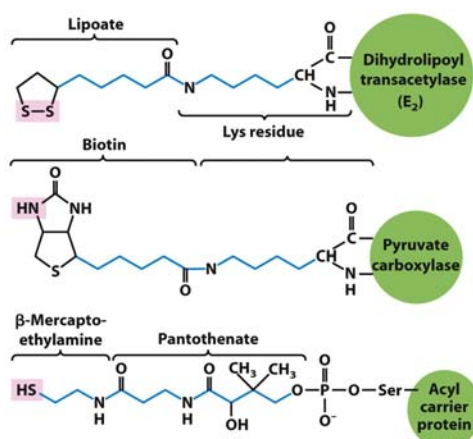


Figure 16-17  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

Kofaktori, lipoat, biotin te kombinacija β-merkptoetilamina i pantotenata, stvaraju duge fleksibilne ruke na enzimima na koje su povezani. Ove biološke ruke sele međuprodukte iz jednog aktivnog mjesta u drugo aktivno mjesto. Skupine koje su označene ljubičastom bojom služe kao aktivne skupine ruke.

### Ukupna (stehiometrijska) reakcija kompleksa piruvat dehidrogenaze



Ostale promjene dešavaju se u kompleksu piruvat dehidrogenaze, a gore prikazani produkti ostaju u matriksu mitohondrija.

Ukupna reakcija, tj. pretvorba piruvata u acetil-CoA je jako egzergona, pa prema tome i **ireverzibilna reakcija**.

### Kompleks piruvat dehidrogenaze reguliraju dva mehanizma: inhibicije proizvodima i kovalentne modifikacije

- Kompleks piruvat dehidrogenaze regulira se inhibicijom enzima produktima, a glavna regulacija je kovalentnim modifikacijama (fosforilacijom i defosforilacijom).

#### Visoke koncentracije reakcijskih produkata inhibiraju piruvat dehidrogenazu.

Acetil-CoA inhibira transacetilazu, tako da se direktno veže za E2, a NADH inhibira dihidrolipoil dehidrogenazu.

Visoke koncentracije NADH i acetil-CoA znak su da je dovoljno energije u stanici te da enzim ne mora provoditi katalizu.

**Kompleks piruvat dehidrogenaze reguliraju dva mehanizma: inhibicije proizvodima i kovalentne modifikacije**

- Glavni način regulacije kompleksa piruvat dehidrogenaze u stanicama eukariota je pomoću fosforilacije i defosforilacije.

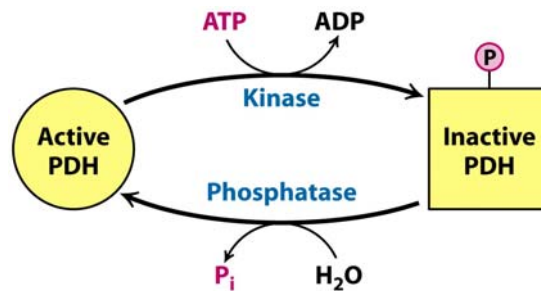


Figure 17-17  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Fosforilacijom E1 pomoću specifične kinaze, aktivnost kompleksa se inhibira. Ponovnu aktivaciju kompleksa provodi fosfataza. I kinaza i fosfataza fizički su vezane za transacetilaznu komponentu (E2) kompleksa, pa to dodatno ističe važnost povezivanja enzima u kompleks.

**Kompleks piruvat dehidrogenaze reguliraju dva mehanizma: inhibicije proizvodima i kovalentne modifikacije**

Regulacija piruvat dehidrogenaze pomoću energetske naboja

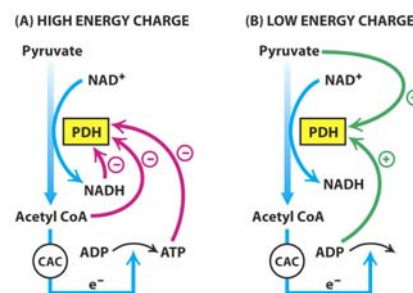


Figure 17-18  
Biochemistry, Sixth Edition  
© 2007 W. H. Freeman and Company

Kompleks piruvat dehidrogenaze reguliran je tako da može reagirati na energetske promjene u stanici.

- (A) Kompleks inhibiraju neposredni produkti, NADH i acetil-CoA, kao i krajnji proizvod oksidativne respiracije, ATP.
- (B) Kompleks se aktivira piruvatom i ADP-om. ADP inhibira kinazu koja fosforilira PDH, a aktivira fosfatazu.



- **Sinteza acetil-CoA iz piruvata je ireverzibilan proces u životinja i zbog toga životinje ne mogu pretvarati acetil-CoA u glukozu.**
- Zbog toga, oksidativnom dekarboksilacijom piruvata ugljikovi atomi mogu se ili
  - oksidirati do CO<sub>2</sub> u citratnom ciklusu
  - ili, iskoristiti za sintezu masnih kiselina

### **Pogreške u metabolizmu piruvata vode do bolesti, najčešće neuroloških bolesti**

- Pogreške u regulaciji piruvat dehidrogenaze
- Mutacije gena podjedinica PDH kompleksa.
- Nedostatak TPP. Deficit tiamina u hrani izaziva bolesti. To je naročito važno za mozak koji svu energiju dobiva oksidacijom piruvata. Nedostatak tiamina izaziva beriberi.

## Dihidrolipamid je podložan trovanju arsenom i pomoću organskih arsenikih spojeva

### •Trovanje arsenitom

Arsenit inhibira PDH tako što inhibira dihidrolipoamid transacetilaze. Dimerkaptopropanol i slični spojevi mogu napraviti reverzibilnu reakciju.

