

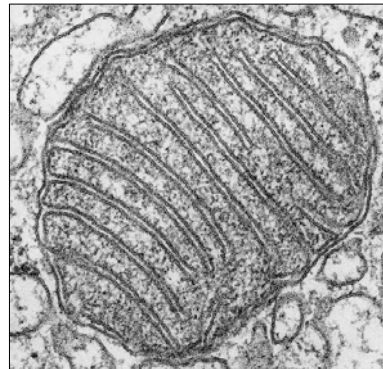
Seminar 14b

Citratni ciklus

B. Mildner

1

**Osnove
biokemije**

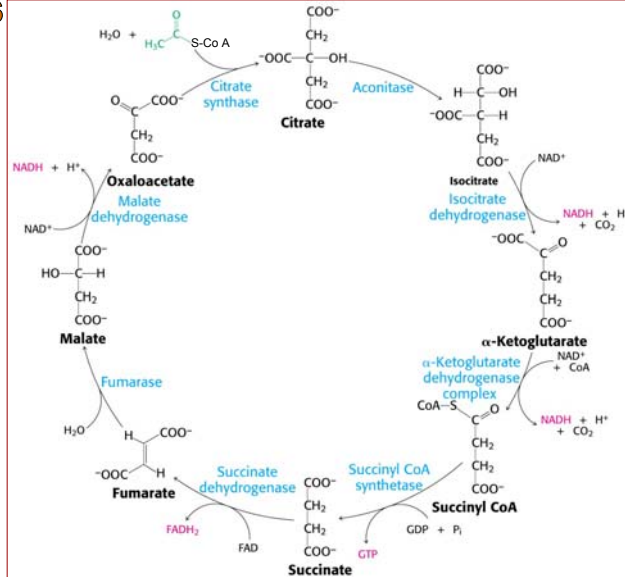


Ciklus limunske kiseline

2

Ciklus limunske kiseline (CLK)

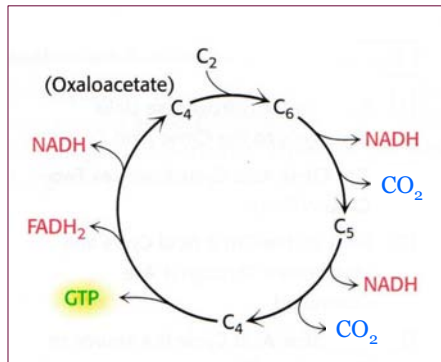
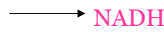
Krebsov ciklus Tricarboxylic acid cycle (TCA)



Ciklus limunske kiseline (CLK)

VAŽNOST CLK

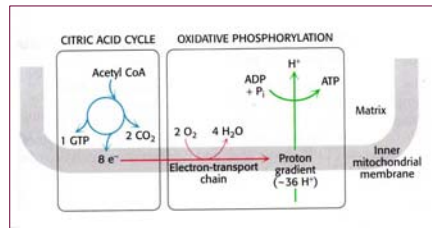
Prevođenje piruvata u acetil Co A.



Ubiranje elektrona velike energije i njihov prijenos u respiratorni lanac putem elektronskih prijenosnika NADH i FADH₂.

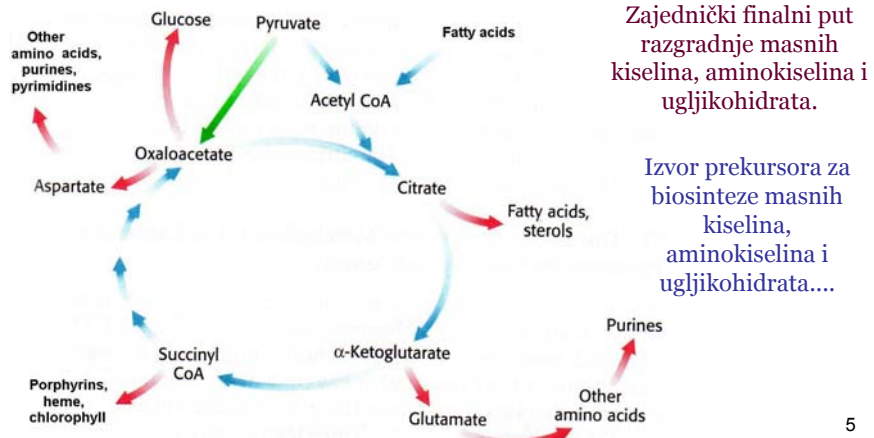
Za 1 mol piruvata dobijemo:

1+3 mola NADH, 1 mol FADH₂, 1 mol GTP.



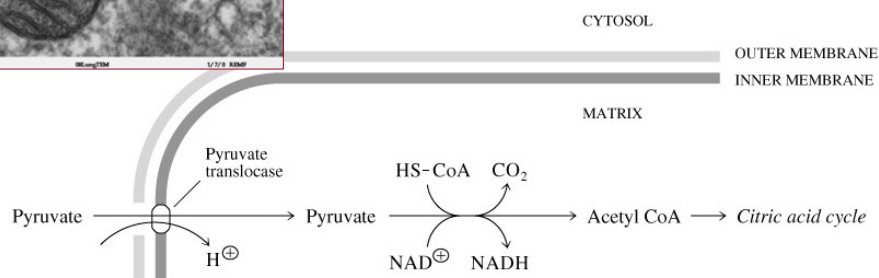
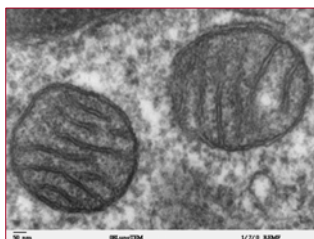
Ciklus limunske kiseline (CLK)

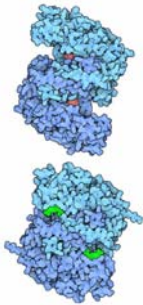
VAŽNOST CLK



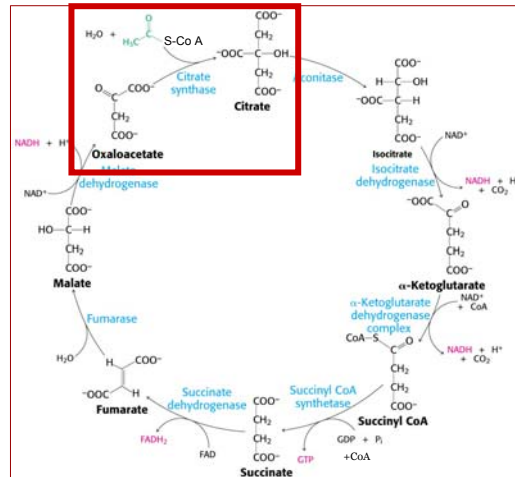
5

Prilprena faza– Piruvat dehidrogenaza kompleks
 u aerobnim uvjetima katalizira nastajanje Acetil CoA iz piruvata i CoA

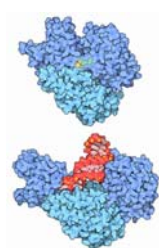




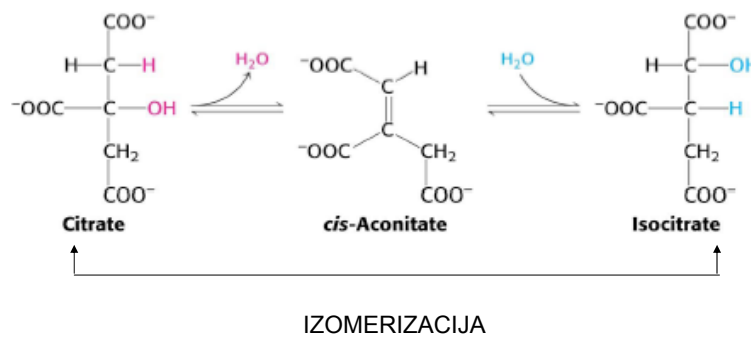
1. – CITRAT SINTAZA
katalizira nastajanje citrata iz acetil CoA i oksaloacetata



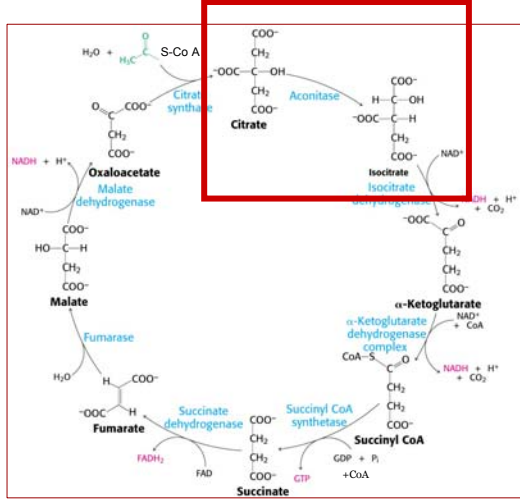
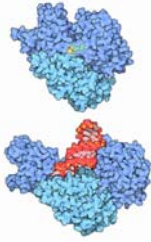
7



2. – AKONITAZA
nadzire stereospecifičnost hidracijskog produkta
DEHIDRACIJA
HIDRACIJA

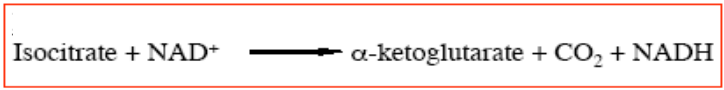
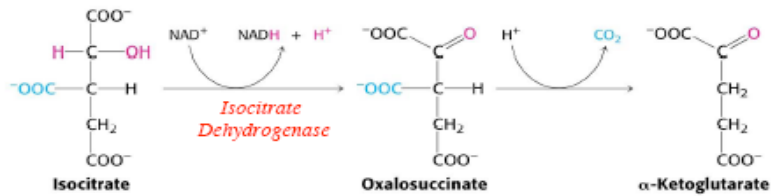
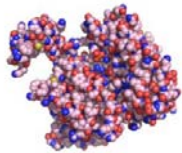


2. – AKONITAZA



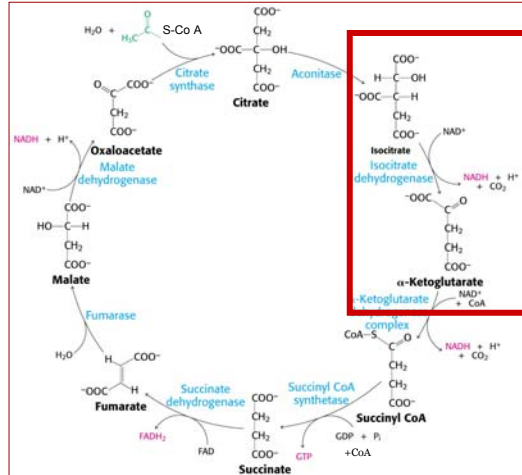
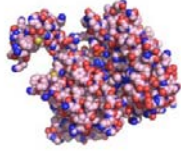
9

3. – IZOCITRAT DEHIDROGENAZA OKSIDATIVNA DEKARBOKSILACIJA



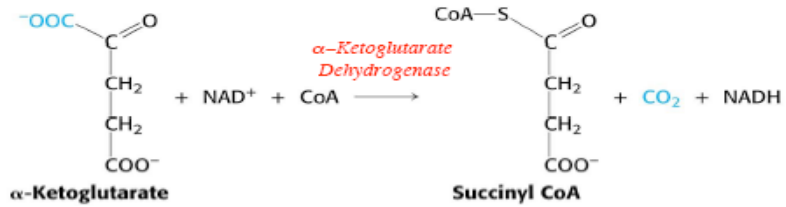
10

3. - IZOCITRAT DEHIDROGENAZA OKSIDATIVNA DEKARBOKSILACIJA



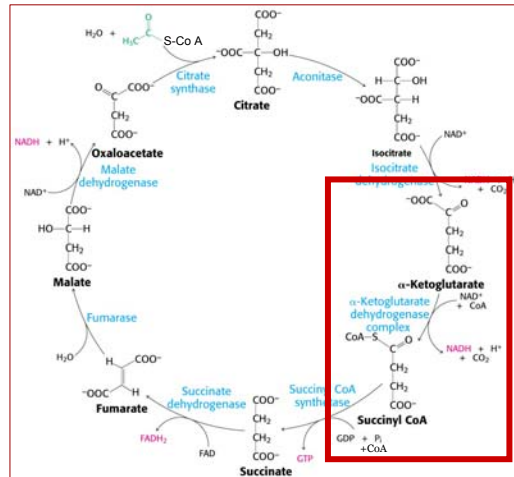
11

4. - α-KETOGLUTARAT-DEHIDROGENAZA OKSIDATIVNA DEKARBOKSILACIJA



12

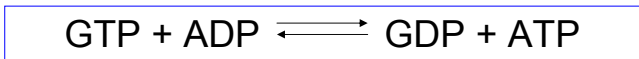
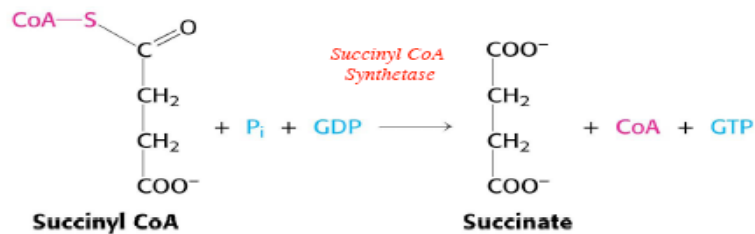
**4. – α-KETOGLUTARAT-DEHIDROGENAZA
OKSIDATIVNA DEKARBOKSILACIJA**



13

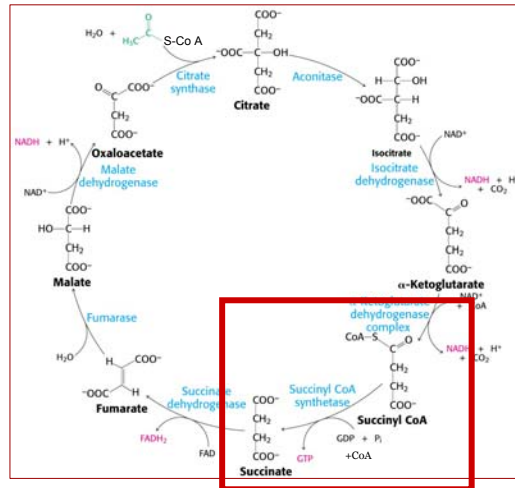
**5. – SUKcinIL-CoA-SINTETAZA
FOSFORILACIJA NA RAZINI SUPSTRATA**

- sukcinil-CoA je bogat energijom
- fosforilna skupina GTP lako se prenosi na ADP i formira ATP



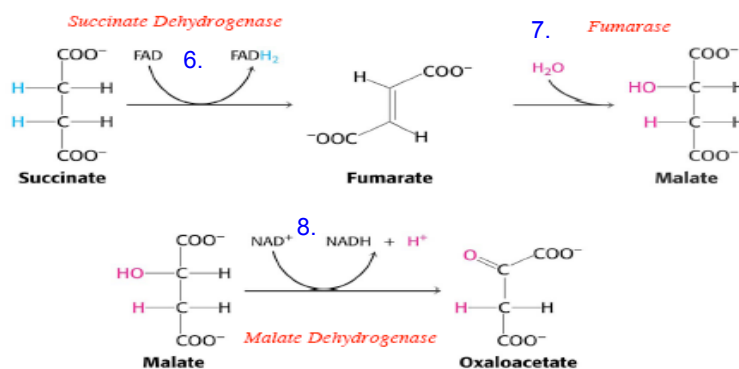
14

**5. – SUKCINIL-CoA-SINTETAZA
FOSFORILACIJA NA RAZINI SUPSTRATA**

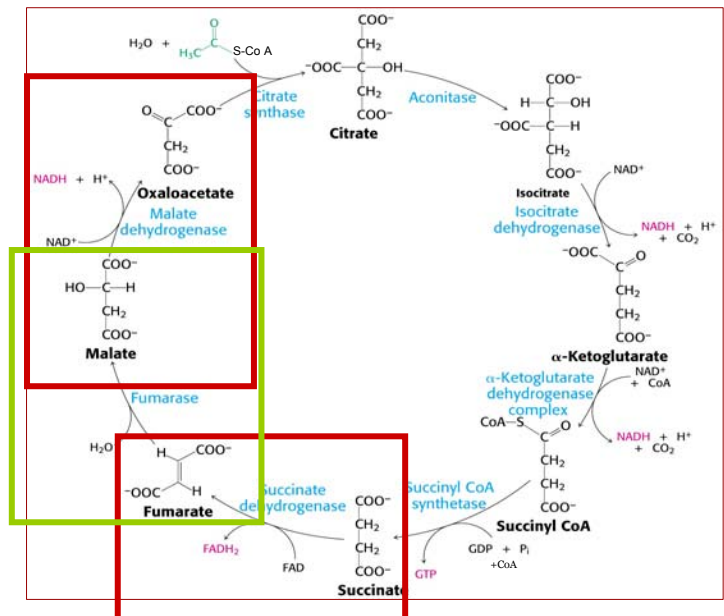


15

**6. – SUKCINAT-DEHIDROGENAZA
DEHIDROGENACIJA
7. – FUMARAZA
HIDRACIJA
8. – MALAT-DEHIDROGENAZA
DEHIDROGENACIJA**



16



17

Sumarna reakcija ciklusa limunske kiseline:



- Izocitrat-dehidrogenaza 1 NADH=2.5 ATP
- α-ketoglutarat dehidrogenaza 1 NADH=2.5 ATP
- Sukcinil-CoA sintetaza 1 GTP=1 ATP
- Sukcinat-dehidrogenaza 1 FADH₂=1.5 ATP
- Malat-dehidrogenaza 1 NADH=2.5 ATP

$$\Sigma = 10 \text{ ATP}$$

18

Kontrole CLK

- 1) Piruvat dehidrogenaza kompleks (*Beri Beri*, kronični alkoholizam, laktatna hemoacidoza)
- 2) Izocitrat-dehidrogenaza
- 3) α -ketoglutarat dehidrogenaza kompleks

19

1. Koja fraza najtočnije opisuje citratni ciklus?
 - a) Kaotični neregulirani prometni kružni tok;
 - b) "svi putovi vode u Rim";
 - c) Najkraća udaljenost između dvije točke na pravcu.

2. Koja su dva enzima citratnog ciklusa alosterički inhibirana s ATP?
 - a) Citrat sintaza i akonitaza;
 - b) Izocitrat dehidrogenaza i α -ketoglutarat dehidrogenaza;
 - c) Fumaraza i malat dehidrogenaza.

20

3. Koji enzim citratnog ciklusa liči piruvat dehidrogenazi obzirom na strukturu, organizaciju i reakciju koju provodi?

- a) Izocitrat dehidrogenaza;
- b) α -ketodehidrogenaza;
- c) Sukcinat dehidrogenaza.

4. Koji se međuprodukt/i citratnog ciklusa koristi/e za biosintezu aminokiselina?

- a) citrat;
- b) Sukcinil-CoA;
- c) α -ketoglutarat i oksaloacetat.

21

5. Na putu od acetil-CoA do sukcinata, dva ugljikova atoma su ušla u ciklus a dva ugljikova atoma u obliku CO_2 su napustila ciklus. Zašto se ciklus ne završava u ovoj točki?

- a) Nije nastalo dovoljno NADH;
- b) Stanici je potreban FADH_2 koji se dobiva u narednim reakcijama;
- c) Oksaloacetat koji se koristi kako bi ciklus započeo mora se regenerirati.

6. Pretpostavite da je piruvat obilježen s ^{14}C na svojem srednjem (keto) ugljiku. Gdje će se pojaviti biljeg nakon jednog okreta citratnog ciklusa?

- a) Kao CO_2 ;
- b) Kao jedna karboksilna skupina oksaloacetata;
- c) Podjednako podijeljen između dvije karboksilne skupine oksaloacetata.

22

7. U reakciji koju katalizira sukcinil-CoA sintaza:

- a) Fosfohistidilni ostatak se koristi za cijepanje CoA sa sukcinata;
- b) Sukcnilfosfat prenosi fosfat na histidilni ostatak;
- c) GDP se fosforilira sukcinilfosfatom.

8. Od svih enzima citratnog ciklusa koji enzim u mitohondriju nije u otopini matriksa?

- a) Citrat sintaza;
- b) Sukcinat dehidrogenaza;
- c) Malat dehidrogenaza.

23

9. Svrha anaplerotskih reakcija je:

- a) Da uklanjaju metabolite iz citratnog ciklusa kako bi se ti metaboliti koristili za biosintetske reakcije;
- b) Da sintetiziraju piruvat kako bi započeo ciklus kada se ne odvija razgradnja glukoze;
- c) Da se nadomjeste metaboliti citratnog ciklusa ukoliko citratni ciklus ostaje bez metabolita koji se koriste za potrebe biosintetskih reakcija.

10. Iako nije prisutan u sisavaca, mnoge biljke i životinje mogu koristiti modificirani oblik citratnog ciklusa koji je poznat kao gliksalatni ciklus. To je korisno zbog toga što:

- a) Gliksalatni ciklus omogućava organizmima koji imaju ovaj ciklus, da rastu na acetatu.
- b) Ovim ciklusom nastaje gliksalat, koji je esencijalna molekula u biosintetskim putovima organizama koji imaju gliksalatni ciklus;
- c) Gliksalatnim ciklusom se ne otpušta CO_2 koji je toksičan za organizme koji aktivno koriste gliksalatni ciklus.

24

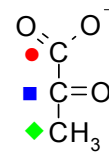
Zadatak 1.

Koja je sudbina radioaktivnog ugljika

- a) na položaju C-1 piruvata
- b) na položaju C-2 piruvata
- c) na položaju C-3 piruvata

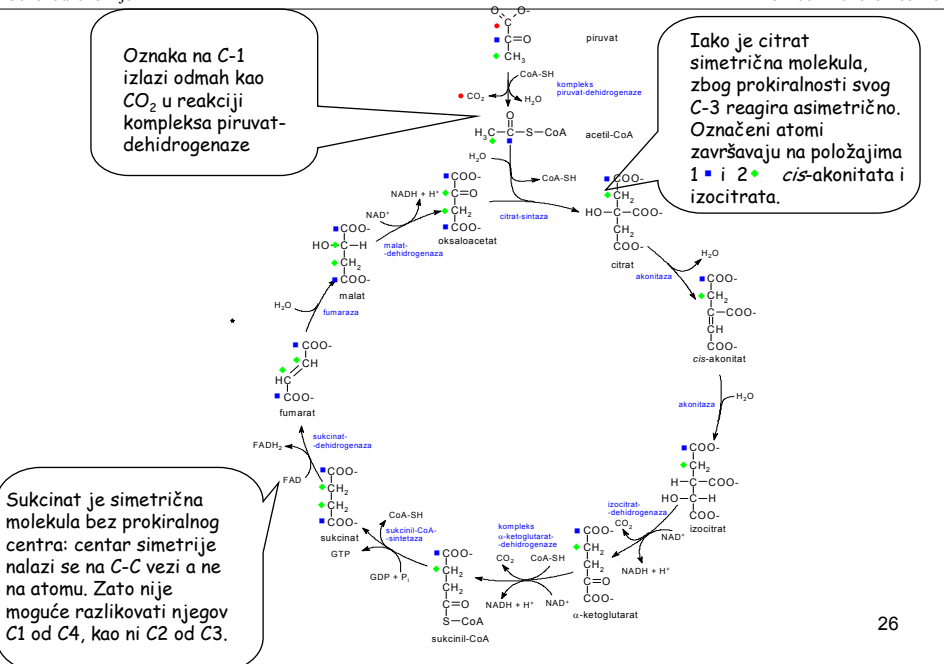
nakon jednog okreta ciklusa limunske kiseline?

Označimo C-atome u piruvatu



Oznaka na C-1 izlazi odmah kao CO₂ u reakciji kompleksa piruvat-dehidrogenaze

Iako je citrat simetrična molekula, zbog prokiralnosti svog C-3 reagira asimetrično. Označeni atomi završavaju na položajima 1 i 2 cis-akonitata i izocitrata.



Sukcinat je simetrična molekula bez prokiralnog centra: centar simetrije nalazi se na C-C vezi a ne na atomu. Zato nije moguće razlikovati njegov C1 od C4, kao ni C2 od C3.

Zadatak 2.

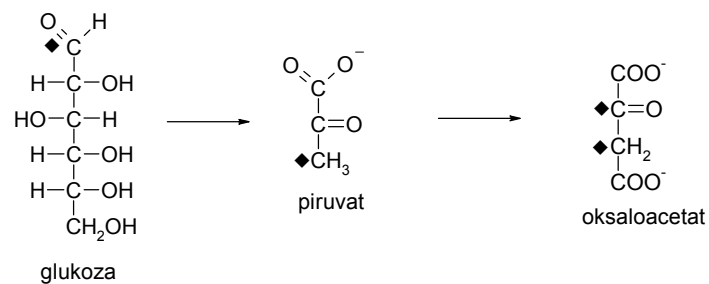
Glukoza obilježena s ^{14}C na C-1 dodana je u ekstrakt koji sadrži enzime i kofaktore glikolize i ciklusa limunske kiseline, te kompleks piruvat-dehidrogenaze. Gdje će se nalaziti radioaktivni atom ugljika u molekuli oksaloacetata:

- nakon jednog okreta ciklusa limunske kiseline
- nakon drugog okreta ciklusa limunske kiseline?

27

Rješenje zadatka 2.

a)



28

Osnove biokemije Ciklus limunske kiseline

Rješenje

b) Pokazati ćemo da su nakon drugog okreta ciklusa limunske kiseline sva 4 atoma ugljika oksaloacetat radioaktivno obilježena i zašto.

29

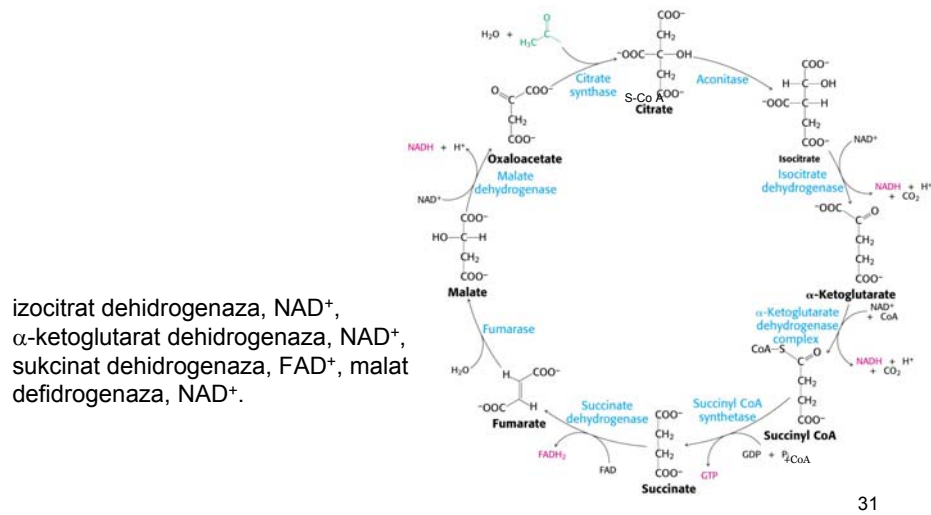
Osnove biokemije Ciklus limunske kiseline

Zadatak 3.

Oksidacija acetil-CoA u dvije molekule CO₂ uključuje i prijenos četiri elektronska para na redoks koenzime. U kojim se reakcijama ciklusa događaju ovi prijenosi? Koji koenzimi sudjeluju u pojedinoj reakciji?

30

Rješenje zadatka 3.



izocitrat dehidrogenaza, NAD⁺,
 α-ketoglutarat dehidrogenaza, NAD⁺,
 sukcinat dehidrogenaza, FAD⁺, malat
 defidrogenaza, NAD⁺.

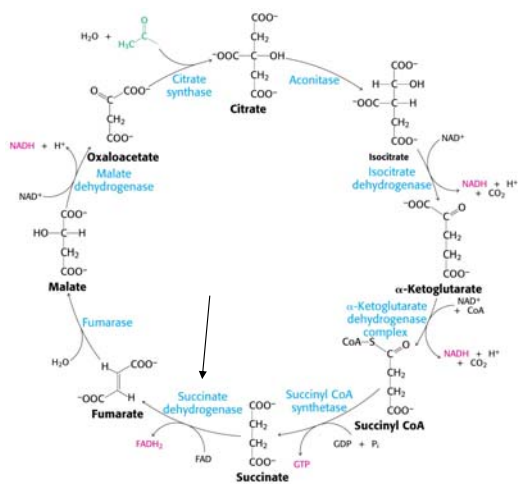
Zadatak 4.

Malonat, $^{-}\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{COO}^{-}$, kompetitivno inhibira jedan enzim TCA ciklusa. Ako se kvasac uzgaja u aerobnim uvjetima i inkubira u malonatu, dolazi do akumulacije sukcinata. Koji enzim je inhibiran malonatom?

- sukcinat dekarboksilaza
- sukcinat dehidrogenaza
- sukcinil-CoA sintetaza
- sukcinil-CoA fosforilaza

Rješenje zadatka 4.

Rješenje: b)



33

Zadatak 5.

S obzirom na saznanje iz prošlog zadatka o inhibiciji ciklusa limunske kiseline malonatom, objasnite Krebsovo opažanje da ta inhibicija može biti prevladana povišenjem koncentracije oksaloacetata!

34

Rješenje zadatka 5.

Pretpostavljajući da ima dovoljno acetil-CoA, povećanje koncentracije oksaloacetata dovest će do povećanja koncentracije svih intermedijera ciklusa limunske kiseline, uključujući i sukcinat. S obzirom da je malonat kompetitivni inhibitor, povišenje koncentracije sukcinata rezultirat će prevladavanjem inhibicije.

35

Zadatak 6.

Koji se od sljedećih metabolita u konačnici oksidira u ciklusu limunske kiseline:

- a) α -ketoglutarat
- b) sukcinat
- c) citrat
- d) acetil-CoA

36

Rješenje zadatka 6.

Samo se acetil-CoA u konačnici oksidira. Svi ostali metaboliti se regeneriraju u jednom okretu ciklusa.

37

Zadatak 7.

Zašto je acetil-CoA izrazito dobar aktivator piruvat karboksilaze?

38

Rješenje zadatka 7.

Piruvat karboksilaza treba se aktivirati samo onda kada su visoke koncentracije acetil-CoA u stanici. Dva su scenarija kada može doći do nakupljanja acetil-CoA: a) kada nisu zadovoljene energetske potrebe stanice i b) kad su zadovoljene energetske potrebe.

Kada nisu zadovoljene energetske potrebe, dolazi do nakupljanja acetil-CoA zbog nedostatka oksaloacetata. U tom slučaju piruvat karboksilaza katalizira anaplerotsku (nadomjesnu) reakciju.

U slučaju kada su zadovoljene energetske potrebe, piruvat će se pretvarati u glukozu putem glukoneogeneze, a prvi korak ovog puta je sinteza oksaloacetata što katalizira piruvat karboksilaza.

39

Zadatak 8.

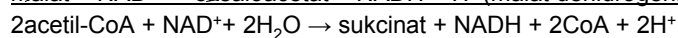
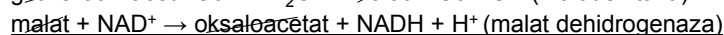
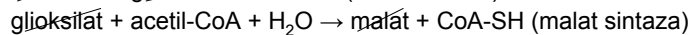
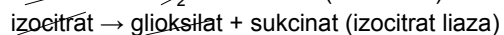
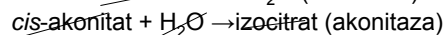
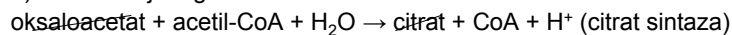
- a) Koji su enzimi potrebni da bi se sintetizirao oksaloacetat iz dvije molekule acetil-CoA? ($C_2 + C_2 \rightarrow C_4$)
- b) Napišite stehiometrijsku jednadžbu ove reakcije.
- c) Da li sisavci imaju potrebne enzime kako bi proveli ovu reakciju?

40

Rješenje zadatka 8.

a) Osim enzima citratnog ciklusa, za provedbu ove sinteze potrebni su enzimi gliksilatnog ciklusa, tj. izocitrat liaza i malat sintaza.

b) Reakcije u gliksilatnom ciklusu:

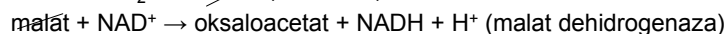
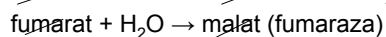
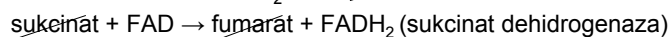
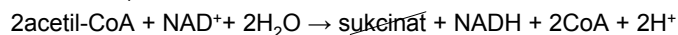


Kako je traženo da se sintetizira oksaloacetat, sukcinat se može reakcijama citratnog ciklusa dalje pretvarati (vidjeti sljedeći dijapozitiv)

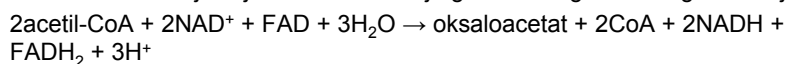
41

Rješenje zadatka 8.(nastavak)

Jednadžba kojom se dobio sukcinat gliksilatnim ciklusom (prethodni dijapozitiv, a sukcinat se dalje pretvara reakcijama ciklusa limunske kiseline):



Sumarna stehiometrijska jednadžba reakcija gliksilatnog i citratnog ciklusa je:



c) Sisavci ne posjeduju enzime gliksilatnog ciklusa i zbog toga se ne može sintetizirati oksaloacetat iz acetil-CoA.

42

Zadatak 9.

Napišite reakcije kojima se iz piruvata može sintetizirati α -ketoglutarat. Navedite koenzime koji su potrebni, te napišite ukupnu stehiometrijsku jednažbu.

43

Rješenje zadatka 9.

Piruvat + CoA + NAD⁺ → acetil-CoA + CO₂ + NADH (piruvat dehidrogenaza)

Piruvat + CO₂ + ATP + H₂O → oksaloacetat + ADP + P_i (piruvat karboksilaza)

Oksaloacetat + acetil-CoA + H₂O → citrat + CoA + H⁺ (citrat sintaza)

Citrat → izocitrat (akonitaza)

Izocitrat + NAD⁺ → α -ketoglutarat + CO₂ + NADH (izocitrat dehidrogenaza)

2piruvat + 2NAD⁺ + ATP + H₂O → α -ketoglutarat + CO₂ + ADP + 2NADH + 2H⁺
+ P_i

44

Zadatak 10.

Fluoroacetat je vrlo toksična molekula i snažno inhibira ciklus limunske kiseline. Fluoroacetat se enzimski *in vivo* pretvara u fluoroacetil-CoA koji se nadalje, pomoću citrat sintaze, pretvara u fluorocitrat. Fluorocitrat je kompetitivni inhibitor narednog enzima u ciklusu. Pretpostavite kako će fluoroacetat utjecati na koncentracije međuprodukata ciklusa. Što bi napravili da prestane inhibicija ciklusa?

45

Rješenje zadatka 10.

Fluoroacetat će inhibirati akonitazu, a to će uzrokovati povećanu koncentraciju citrata, odnosno smanjenu koncentraciju svih ostalih međuprodukata počevši od izocitrata.

Kako je fluorocitrat kompetitivni inhibitor, vrlo visoke koncentracije citrata omogućavale bi da se nadvlada inhibicija akonitaze, a time bi se onda pokrenuo i ciklus.

46