UNIVERZITA PAVLAJOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH
Prírodovedecká fakulta
Technologický a inovačný park

Bioenergetika

Daniel Jancura, Erik Sedlák

Košice 2021

Bioenergetika
Vysokoškolský učebný text

Autori:
doc. Mgr. Daniel Jancura, PhD.
Katedra biofyziky Prírodovedeckej fakulty UPJŠ v Košiciach

doc. RNDr. Erik Sedlák, DrSc.
Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a inovačný park UPJŠ v Košiciach

Recenzenti:
MUDr. Andrej Musatov, Dr.Sc.
Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied, Košice

Ing. Ľudovít Škultéty, Dr.Sc.
Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 - Atribution CC BY NC ND
(„Uveďte pôvod – Nepoužívajte komerčne - Nespracovávajte“)

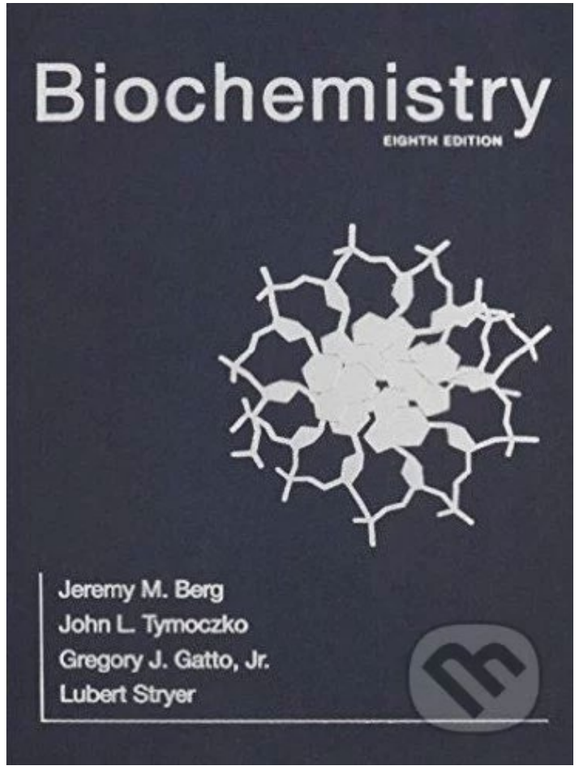
Za odbornú a jazykovú stránku tejto publikácie zodpovedá autor. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

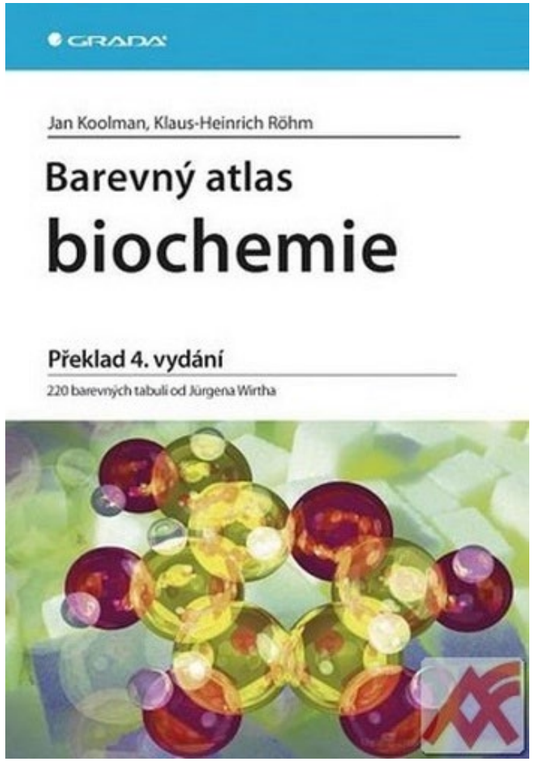
Dostupné od: 10.09.2021
Umiestnenie: ww.unibook.upjs.sk

DOI: https://doi.org/10.33542/BE2021-0022-6
ISBN 978-80-574-0022-6 (e-publikácia)

ODPORÚČANÁ LITERATÚRA

1. D. Nicholls and S. Fergusson. Bioenergetics 4, Academic Press, 2013.
2. M. Wikström (Ed.). Biophysical and structural aspects of bioenergetics, The Royal Society of Chemistry, 2005.
3. D. Harris. Bioenergetics at a glance, Blackwell Science Ltd., 1995.
4. V. Saks (Ed.). Molecular system bioenergetics, Wiley-VCH, 2007.
5. I. Scheffer. Mitochondria (2nd Edition), John Wiley & Sons, Inc., 2008.
6. A.D.N.J. de Grey. The mitochondrial free radical theory of aging, R.G . Landis Company, 1999.
7. J.A.M. Smeiting, R.C.A. Sengers and J.M.F. Trijbels. Oxidative phosphorylation in health and disease, Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2004.
8. N.W.C. Cheetham. Introducing biological energetics, Oxford University Press, 2011.





Obsah učebných textov z Bioenergetiky

1. Základné koncepty bioenergetiky a dizajn metabolizmu
2. Glykolýza
3. Citrátový (Krebsov) cyklus
4. Membrány – Základné vlastnosti
5. Membránové prenášače, pumpy – Prenos iónov/látok cez membrány
6. Mitochondrie – štruktúra a funkcie
7. Oxidatívna fosforylácia – Komplexy dýchacieho reťazca
8. Oxidatívna fosforylácia – ATP-syntáza
9. Fotosyntéza – svetlá fáza
10. Fotosyntéza – tmavá fáza

ÚVOD DO UČEBNÝCH TEXTOV Z BIOENERGETIKY

Predkladaný vysokoškolský učebný text „Bioenergetika“ by mal slúžiť ako úvod do problematiky štúdia v oblasti bioenergetiky. Táto vedná oblast je v súčasnosti vysoko aktuálna, pretože výsledky získané bioenergetickým výskumom v uplynulých rokoch zreteľne ukazujú, že bioenergetické procesy prebiehajúce v živých systémoch neslúžia “len” na transformáciu energie, ale ovplyvňujú aj priebeh procesov ako sú apoptóza, starnutie, vznik a rozvoj mnohých ochorení (predovšetkým neurodegeneratívnych). Tieto skutočnosti jednoznačne naznačujú potrebu existencie kvalitných učebných textov, ktoré by prijateľným spôsobom umožnili študentom získať potrebné informácie a vedomosti v tejto vednej discipline. Z vyššie uvedených dôvodov sme sa rozhodli vytvoriť tieto učebné texty, ktoré sú vo forme desiatich samostatných kapitol, ktoré však na seba prirodzene a logicky nadväzujú. Jedna kapitola predstavuje v podstate jednu prednášku v rámci kurzu Bioenergetiky, ktorý je realizovaný na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach na magisterskom a doktorandskom stupni študijného programu „Biofyzika“. Zároveň tieto texty môžu poslúžiť aj pri výučbe v študijnom predmete Biochémia, ktorý je prednášaný v bakalárskych a magisterských sťupňoch študijných programov “Biochémia” resp. “Biofyzika”. Dovoľujeme si vyjadriť presvedčenie, že tieto učebné texty by mohli byť istým spôsobom nápomocné aj vedeckým pracovníkom pracujúcim v oblasti výskumu týkajúcho sa problematiky transformáci energie v biologických organizmoch a fenoménoch spojených s touto transformáciou.

V týchto učebných textoch sú postupne uvádzané poznatky týkajúce sa základných konceptov bioenergetiky, mechanizmov procesov ako sú glykolýza a Krebsov cyklus (okrem podrobného a uceleného popis týchto procesov je tu uvedený aj všeobecný náhľad o prepojenosti týchto procesov ako aj ich začlenenie do kompaktného pohľadu na celkový proces transformácie energie v biologických organizmoch), zloženia štruktúry a funkčnosti biologických membrán (táto oblast je nevyhnutná pre lepšie pochopenie poznatkov, ktoré sú uvedené v nasledujúcich kapitolách). V nasledujúcich troch kapitolách sa učebný text zaoberá popisom štruktúry a funkcie mitochondrií, pričom veľký dôraz je dávaný na popis vlastností a mechanizmov fungovania štyroch komplexov dýchacieho reťazca a ATP-syntázy. Tieto komplexy vytvárajú podmienky pre existenciu “najdôležitejšieho” bioenergetického procesu, oxidatívnej fosforyláie. V záverečných dvoch kapitolách sú uvedené mechanizmy procesov vytvárajúcich fotosynézu, jej svetlej aj tmavej fázy. Sú tu relevantné informácie o tomto “druhom” najdôležitejšom bioenergetickom procese prebiehajúcom v mnohých biologických organizmoch a poskytujúcom možnosť transformácie enrgie elektromagnetického žiarenia na energiu “ukrytú” v chemických väzbách určitých chmických molekúl.

Na záver tohto úvodu chceme vyjadriť naše presvedčenie, že predložené učebné texty “Bioenergetika” budú dobrým “pomocníkom a inšpirátorom” pre mnohých študentov, ktorí sa budú chcieť dozvedieť čo najviac o fascinujúcich štruktúrach a mechanizmoch umožňujúcich transformáciu energie v živých systémoch, bez ktorej by nebola možná existencia života ako ho poznáme. Želáme príjemné a podnetné čítanie a štúdium.

Daniel Jancura a Erik Sedlák

Základné koncepty bioenergetiky a dizajn metabolizmu 1

Metabolizmus
Základné pojmy a definície
Adenozíntrifosfát, ATP
Energetické spriahnutie (coupling)
Rovnovážna konštanta

BIOENERGETIKA

Bioenergetika je vedná disciplína zaoberajúca sa **premenami energie v živých systémoch**. Zahŕňa štúdium transformácie energie v živých organizmoch a štúdium rôznych bunkových procesov, ako je bunkové dýchanie, fotosyntéza a mnohých ďalších metabolických a enzymatických procesov, ktoré vedú k transformácii a využívaniu energie. Cieľom bioenergetiky je popísať ako živé organizmy získavajú a transformujú energiu na vykonávanie biologických procesov.

Štúdium metabolických ciest je preto pre bioenergetiku nevyhnutné.

Pre živé systémy poznáme dva primárne zdroje energie:

- Energia získavaná zo svetelného žiarenia v procese **fotosyntézy**,
- Energia získavaná oxidáciou organických molekúl v procese **oxidatívnej fosforylácie**.

Nositelia Nobelových cien za bioenergetický výskum

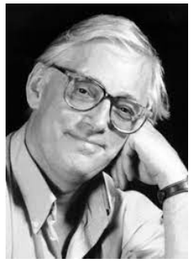
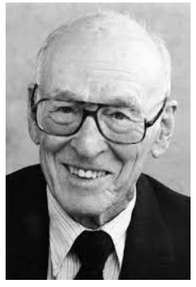
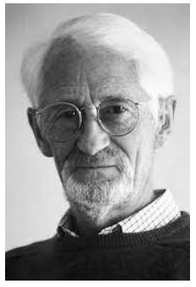
1978 Peter Mitchell (britský biochemik 1920-1992)

za formuláciu **chemiosmotickej teórie**

1988 Johann Deisenhoffer (nemecký biochemik 1943)
Robert Hubert (nemecký biochemik 1937)
Hartmunt Michel (nemecký chemik 1948)

za určenie **štruktúry fotosyntetického reakčného centra** z baktérie *Pseudomonas viridis*

1997 John Walker (britský chemik 1941)
Paul Boyer (americký biochemik 1918-2018)
Jens Skou (dánsky chemik 1918-2018)

za objasnenie **enzýmového mechanizmu syntézy adenozíntrifosfátu**

VŠEOBECNÉ PRINCÍPY METABOLIZMU

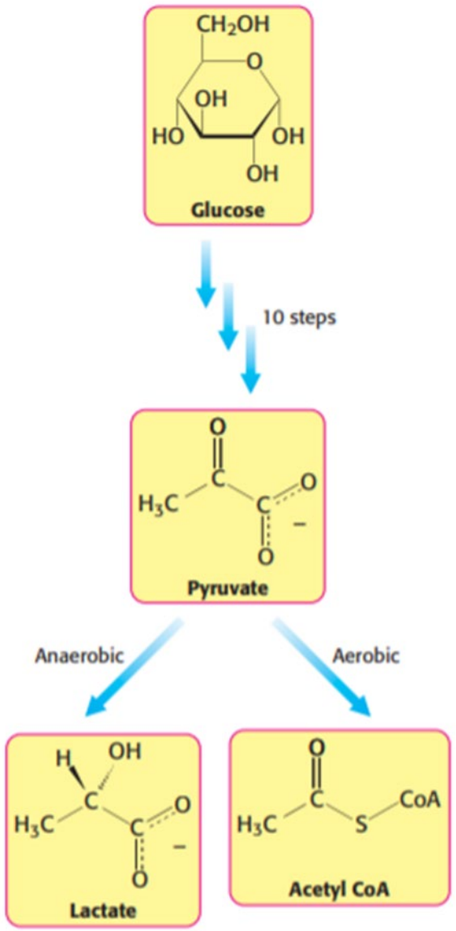
V každej bunke prebiehajú stovky chemických reakcií. Spolu tvoria **látkovú výmenu – metabolizmus**.

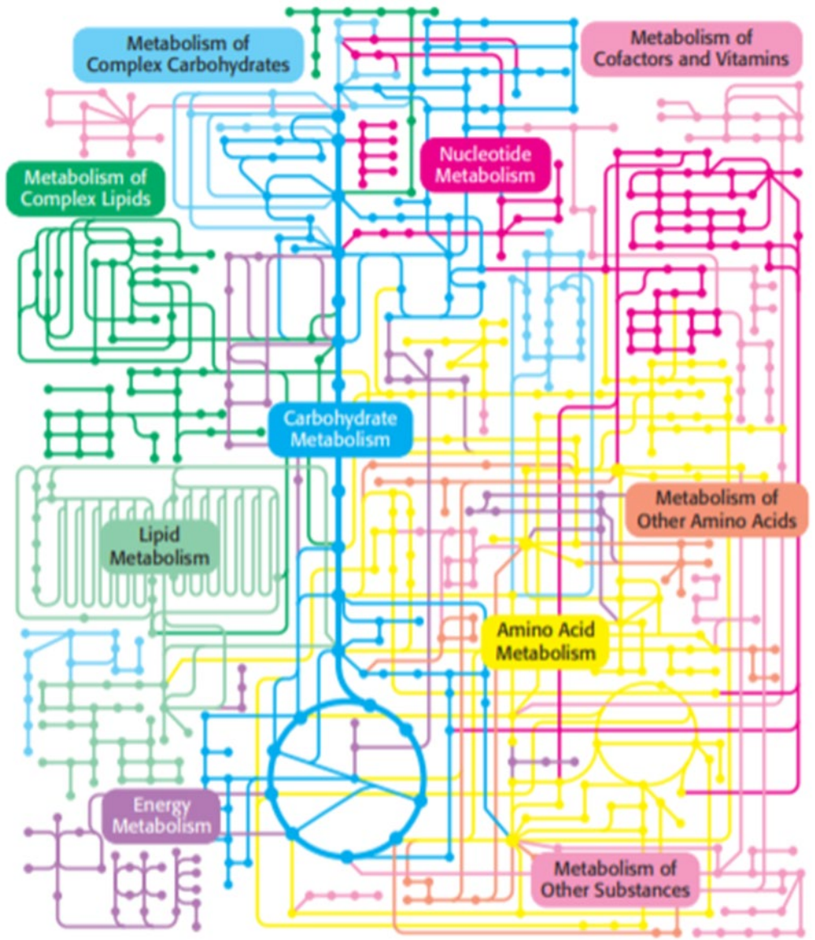
Zúčastnené zlúčeniny sa označujú ako **metabolity**.

Prítomnosť špecifických enzýmov umožňuje vznik usporiadaných sledov reakcií, tzv. **metabolických dráh**.

Mnoho metabolických dráh je spoločných pre väčšinu buniek a organizmov. Tieto dráhy, ktoré slúžia pri tvorbe, odbúravaní a premene dôležitých metabolitov a k uchovaniu energie, označujeme ako **intermediárny metabolizmus.**

Metabolizmus je tvorený súvisiacou sériou chemických reakcií, ktoré sa začínajú s konkrétnou molekulou a prevedú ju na inú molekulu alebo molekuly špecificky definovaným spôsobom.





VŠEOBECNÉ PRINCÍPY METABOLIZMU

1. Molekuly predstavujúce zdroje energie sa odbúravajú a veľké molekuly sa konštruujú krok za krokom v rade prepojených reakcií nazývaných **metabolické dráhy**.
2. Energetická mena spoločná pre všetky formy života, **adenozíntrifosfát (ATP)**, spája dráhy uvoľňujúce energiu s dráhami vyžadujúcimi energiu.
3. Oxidácia uhlík obsahujúcich molekúl predstavujúcich zdroj energie podporuje tvorbu ATP.
4. Aj keď existuje veľa metabolických ciest, obmedzený počet typov reakcií a konkrétnych medziprodukov je **spoločný** pre mnohé metabolické dráhy.
5. Metabolické dráhy sú striktne **regulované**.

Živé organizmy vyžadujú neustály prísun **energie** pre tri hlavné účely:

(1) Vykonávanie mechanickej práce pri kontrakcii svalov a bunkové pohyby.
(2) Aktívny transport molekúl a iónov.
(3) Syntéza makromolekúl a iných biomolekúl z jednoduchých prekurzorov.

Spôsoby získavania energie a výživy

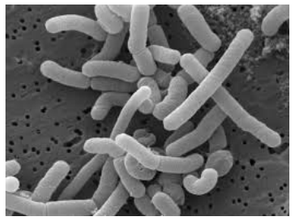
Bunky potrebujú k životu organické a anorganické **látky** a **energiu**. V súčasnosti existujúce organizmy môžeme rozdeliť do väčších skupín podľa spôsobu akým pokrývajú základné energetické a metablické potreby.

Hlavnými **kritériami** sú:

(i) **Zdroj energie** (energia žiarenia alebo chemická energia),
(ii) **Zdroj elektrónov** potrebných pre uchovávanie energie v podobe ATP,
(iii) **Pôvod uhlíkových atómov** (organické zlúčeniny alebo CO_2).

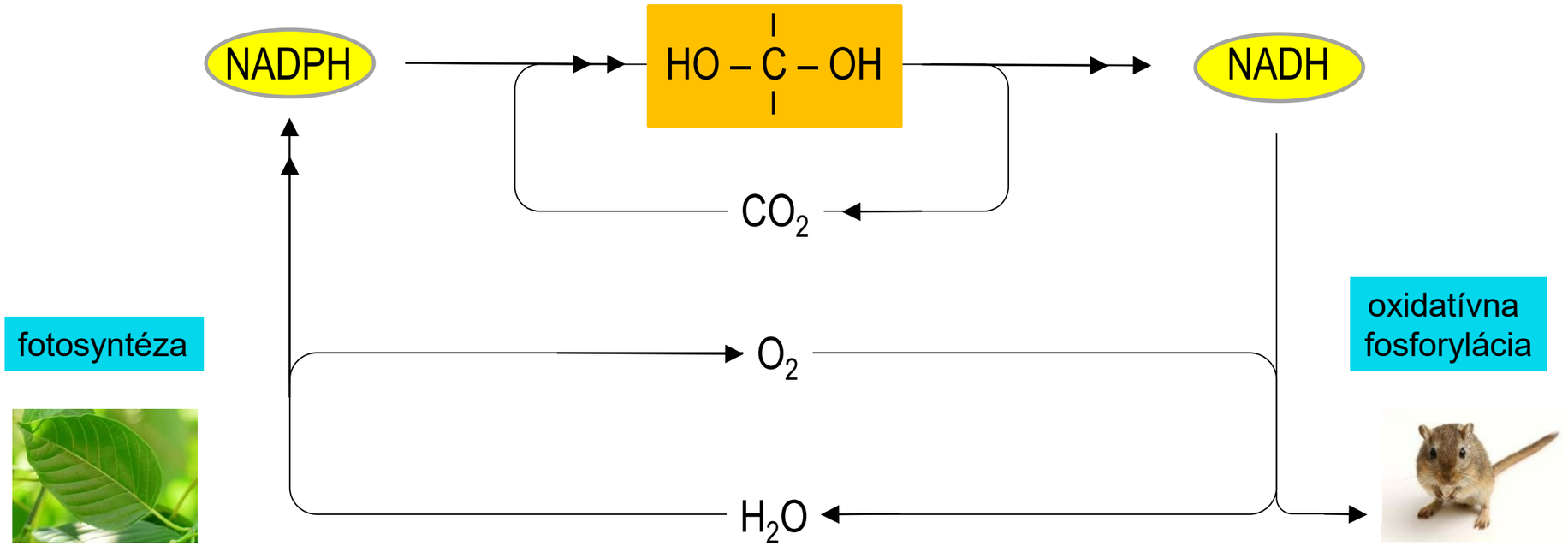
Organizmy, ktoré dokážu z CO_2 vyrábať organické zlúčeniny sa nazývaju **autotrofné** („sami seba živiace“). Do tejto skupiny patria rastliny a mnoho mikroorganizmov (napr. zelené rastliny pokrývajú svoju energetickú potrebu slnečným žiarením a ako zdroj elektrónov používajú vodu. Označujú sa teda ako **fotolitoautrofné** (pozri nasledujúci obrázok).
Živočíchy potrebujú pre všetky tri funkcie organické látky a nazývajú sa **heterotrofné** („živiace sa inými“), presnejšie **chemoorganoheterotrofné**.
Extrémne nenáročné sú niektoré anaerobné archebaktérie, ktorým stačí na pokrytie ich nárokov CO_2 a voda – označujú sa ako **chemolitoautotrofné**.

SPÔSOBY ZÍSKAVANIA ENERGIE A VÝŽIVY

ZDROJ ENERGIE	ZDROJ ELEKTRÓNOV	ZDROJ UHLÍKA	PRÍKLADY
svetlo (foto-)	organický (-organo-)	organický (-heterotrof-)	RASTLINY fotolitoautrofné
		CO_2 (-autotrof-)	
	anorganický (-lito-)	organický (-heterotrof-)	ŽIVOČÍCHY chemoorganoheterotrofné
		CO_2 (-autotrof-)	
molekuly (chemo-)	organický (-organo-)	organický (-heterotrof-)	
		CO_2 (-autotrof-)	
	anorganický (-lito-)	organický (-heterotrof-)	 NIEKTORÉ BAKTÉRIE chemolitoautotrofné
		CO_2 (-autotrof-)	

AUTOTROFNÉ A HETEROTROFNÉ ORGANIZMY

Heterotrofné organizmy môžu spracovávať iba predtým vytvorené organické zlúčeniny, sú teda závislé na **autotrofných** rastlinách. Rastliny im dodávajú nielen organické zlúčeniny, ale tiež kyslík nevyhnutný pre život. Prakticky všetok molekulový kyslík vzniká **fotosyntézou**. V tzv. **svetelnej fáze** fotosyntézy sa voda (H_2O) mení pomocou energie slnečného žiarenia na kyslík a „energeticky bohaté“ elektróny v podobe NADPH. Redukovaný koenzým sa v rastlinách využíva na tvorbu organických látok vrátane glukózy z CO_2 v **tmavej fáze** fotosyntézy. Živočíchy (ale aj rastliny) vo svojom katabolickom metabolizme znovu rozkládajú glukózu na CO_2 a H_2O, pričom získavajú využiteľnú chemickú energiu v podobe ATP. Obidva procesy si môžeme predstaviť ako uzavretý okruh; sumárne nedochádza k ničomu inému, než k premene svetelnej energie na ATP.



METABOLIZMUS JE ZLOŽENÝ Z MNOHÝCH SPOJENÝCH A PREPOJENÝCH REAKCIÍ

Metabolické dráhy môžeme rozdeliť do dvoch širokých tried:

(1) Dráhy, ktoré prevádzajú energiu z molekúl predstavujúcich zdroj energie na biologicky užitočné formy a (2) dráhy, ktoré vyžadujú vstup energie na vykonanie procesu.

Aj keď je toto rozdelenie často nepresné, pri štúdiu metabolizmu je užitočné. Tie reakcie, ktoré premieňajú energiu z molekúl predstavujúcich zdroj energie na bunkovú energiu, sa nazývajú **katabolické reakcie**.

$$\text{Zdroj energie (cukry, tuky)} \xrightarrow{\text{katabolizmus}} CO_2 + H_2O + \text{Využiteľná energia}$$

Tie reakcie, ktoré si vyžadujú energiu - napríklad syntéza glukózy, tukov, alebo DNA – sa nazývajú **anabolické reakcie**.

$$\text{Využiteľná energia + jednoduché prekurzory} \xrightarrow{\text{anabolizmus}} \text{Komplexné molekuly}$$

Niektoré cesty môžu byť buď anabolické alebo katabolické, v závislosti od energetických podmienok v bunke. Tieto cesty sa označujú ako **amfibolické cesty**. Dôležitým všeobecným princípom metabolizmu je, že biosyntetické a degradačné cesty sú takmer vždy odlišné.

Gibbsova energia (G)- termodynamická stavová funkcia umožňujúca predpovedať smer fyzikálno-chemických procesov pri konštantnom tlaku a teplote.

Definícia:

$$G = H - T.S,$$

H – entalpia, T – teplota (v Kelvinoch) a S – entropia.

Pri konštantnom tlaku a teplote platí:

$$\Delta G = \Delta H - T.\Delta S$$

ΔG predstavuje maximálne množstvo neexpanzívnej práce, ktoré môže byť systémom vykonané pri konštantnom tlaku a teplote.

Zmena voľnej energie (ΔG) reakcie determinuje či reakcia prebieha spontánne:

$\Delta G < 0$ – spontánna reakcia (exergonická)

$\Delta G = 0$ – systém je v rovnováhe

$\Delta G > 0$ – neprebieha spontánne (endergonická)

ΔG reakcie závisí len od rozdielu Gibbsovej energie na konci reakcie v porovnaní so začiatkom reakcie (nezávisí od molekulového mechanizmu reakcie) !

ΔG nedeterminuje rýchlosť reakcie !

V rovnovážnom stave nadobúda systém minimálnu hodnotu G.
Pre každý spontánny proces pri konštantnom tlaku a teplote je $\Delta G<0$.

Je možné, aby spontánne prebiehala nejaká reakcia s $\Delta G >0$?

$$A + B \rightleftharpoons C + D \qquad \Delta G_1<0$$
$$D + E \rightleftharpoons F + G \qquad \Delta G_2>0$$

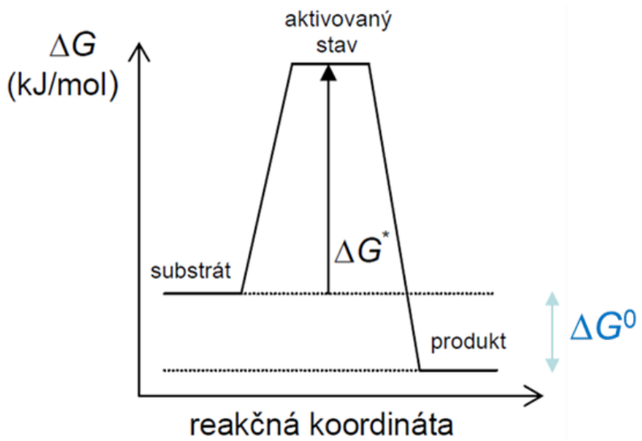
Ak $\mathbf{\Delta G_1+\Delta G_2 <0}$, tak obidve reakcie prebiehajú spontánne. Tieto reakcie sú tzv. spojené a látka D sa nazýva spoločný intermediát. **Termodynamicky nevýhodné reakcie môžu byť poháňané energeticky výhodnými reakciami.**

Metabolické dráhy sú zložené práve zo série takýchto typov reakcií. Reakcie v metabolických dráhach musia spĺňať minimálne dve kritériá:
(1) jednotlivé reakcie musia byť **špecifické**,
(2) celá skupina reakcií, ktoré tvoria metabolickú dráhu, musí byť **termodynamicky výhodná**.

Jednotky: joule (J) a kalória (cal); 1J = 0,239 cal

ROVNOVÁŽNA KONŠTANTA

Dve termodynamické veličiny, ktoré určujú vlastnosti reakcie:
(i) rozdiel voľných energii medzi produktom a substrátom - na obrázku znázornené ako ΔG^0,
(ii) energia potrebná na iniciáciu premeny substrátu na produkt - na obrázku znázornené ako ΔG^*.



$$S \underset{}{\overset{K_{eq}}{\rightleftharpoons}} P$$

K_{eq}-rovnovážna konštanta

$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$$

$$\Delta G = \Delta G^0 + RTln\frac{[P]}{[S]}$$

V rovnovážnom stave $\Delta G = 0$ a preto:

$$\Delta G^0 = -RTln\frac{[P]}{[S]} = -RTlnK_{eq} = -2.3RTlogK_{eq}$$

kde ΔG^0 vyjadruje zmenu štandardnej Gibbsovej energie

Pre všeobecný chemický proces:

$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$$

je možné vyjadriť veličiny K_{eq} a ΔG_0 nasledovne:

$$K_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \qquad \Delta G^0 = -2.3RTlog\frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$$

ROVNOVÁŽNA KONŠTANTA

ΔG^0 pri pH 7 sa označuje $\Delta G^{0'}$

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RTln\frac{[P]}{[S]} \qquad \Delta G^{0'} = -RTlnK'_{eq} = -2.3RTlogK'_{eq}$$

Z hodnoty $\Delta G^{0'}$ je možné určiť hodnotu rovnovážnej konštanty, t.j. pomer koncentrácie produktu a substrátu v rovnovážnom stave:

$$K'_{eq} = 10^{-\Delta G^{0'}/(2.3RT)}$$

Hodnota ΔG závisí od hodnoty $\Delta G^{0'}$ a od pomeru koncentrácie produktu a substrátu. Zatiaľ čo hodnota $\Delta G^{0'}$ je pre dané podmienky (teplota, tlak, pH) konštantná, koncentrácia zlúčenín môže byť ľubovoľná – inými slovami aj reakcia s pozitívnou hodnotou $\Delta G^{0'}$ môže prebiehať spontánne (ΔG je negatívne) pri vhodnom pomere koncentrácie produktu a substrátu, ktoré nie sú v rovnovážnych podmienkach. Mnoho spontánnych reakcií v bunkách prebieha práve vďaka priaznivému pomeru [P] a [S].

Vzťah medzi $\Delta G^{0'}$ a K'_{eq} (25°)

K'_{eq}	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)
10^{-5}	28.53
10^{-4}	22.84
10^{-3}	17.11
10^{-2}	11.42
10^{-1}	5.69
1	0
10	-5.69
10^{2}	-11.42
10^{3}	-17.11
10^{4}	-22.84
10^{5}	-28.53

ATP JE UNIVERZÁLNA MENA ENERGIE V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMOCH

V literatúre sa často uvádza príklad fosfátovej (fosfoanhydrickej) väzby v molekule ATP ako príklad energeticky bohatej väzby (z angl. energy - rich bond).

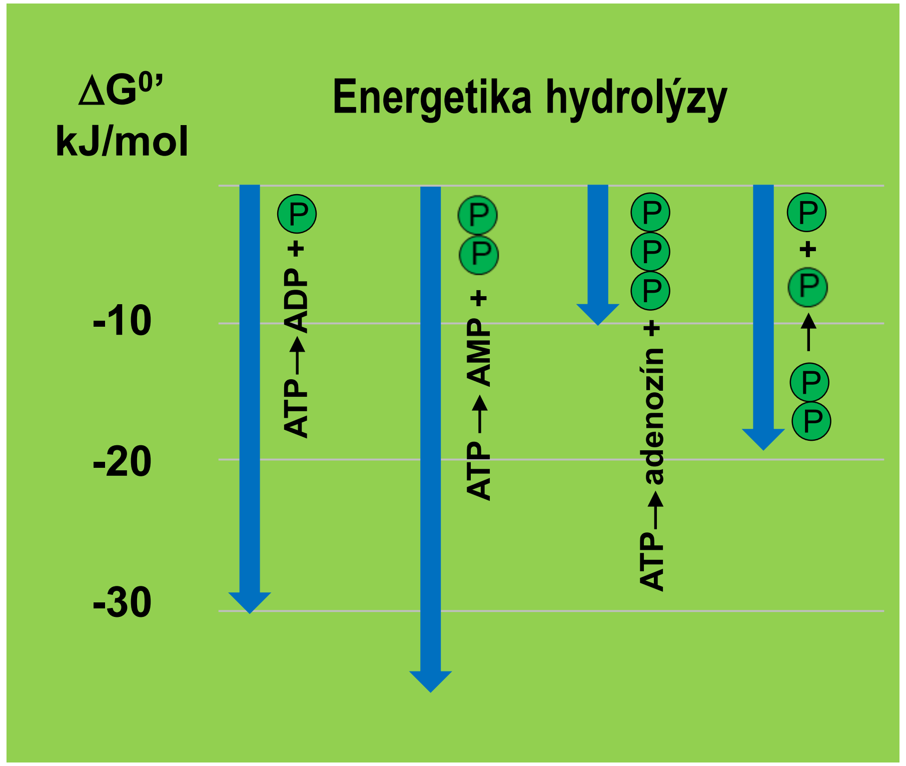
Čo to vlastne znamená? Je na tejto väzbe niečo špeciálne oproti ostatným? Je naozaj energeticky bohatá?

Nukleotidový koenzým ATP slúži vo všetkých bunkách ako najdôležitejšia „**zásobná“ forma chemickej energie**. Hydrolýza ATP je výrazne **exergonická**:

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i \qquad \Delta G^{0'} = -30.5 \text{ kJ/mol}$$

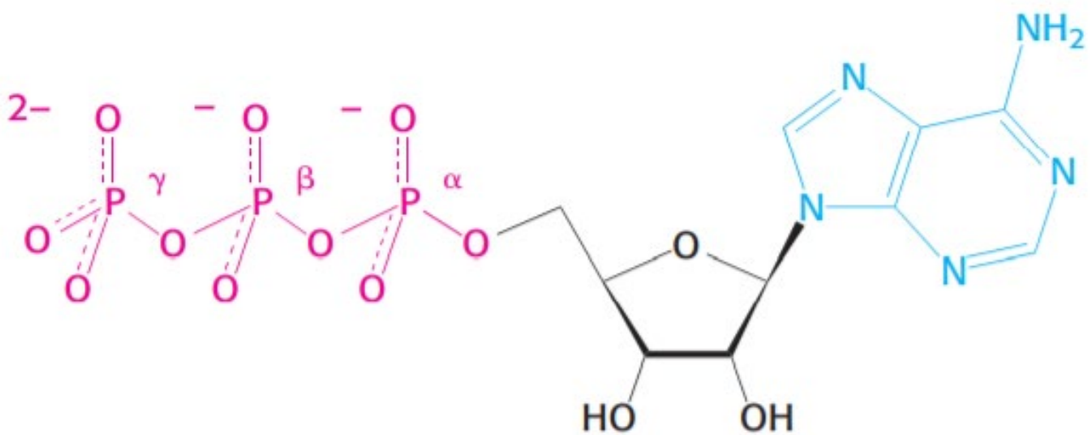
Presná hodnota $\Delta G^{o'}$ pre túto reakciu závisí od iónovej sily media, pH a na koncentráciách Mg^{2+} a iných kovových iónov. Pri typických koncentráciách v bunke (koncentrácie ATP, ADP a Pi sú oveľa nižšie ako za štandardných podmineok (=1 mol/l) a ATP je v nadbytku nad ADP), skutočné ΔG pre túto hydrolýzu je približne -50 kJ.mol^{-1}.

Energia, ktorá sa pri hydrolýze uvoľní, sa vďaka **energetickému spriahnutiu** využije pre **endergonické** procesy akými sú biosyntéza, pohyb a transportné deje.

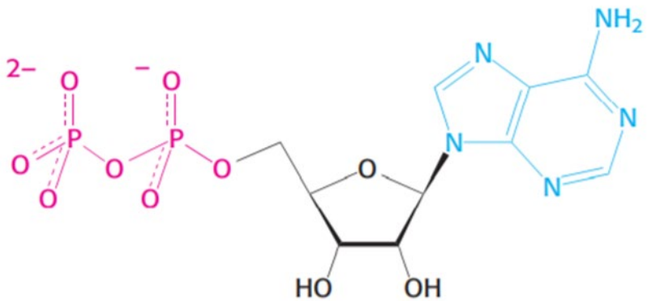


ATP JE UNIVERZÁLNA MENA VOĽNEJ ENERGIE V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMOCH

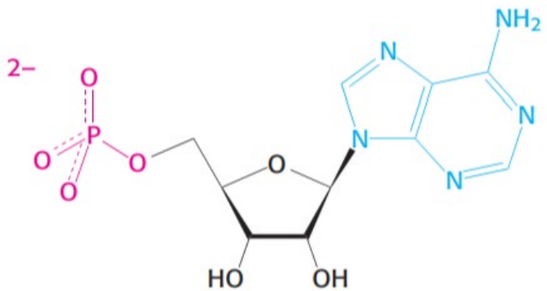
ATP je nukleozidtrifosfát zložený z nukleozidu adenozínu (adenín + ribóza), na ktorého 5'-OH skupinu je pripojený reťazec troch fosfátových zvyškov. Označujú sa ako α, β a γ. Fosfát α je pripojený k ribóze **fosfoesterovou väzbou**. Na druhej strane, väzby medzi fosfátmi sú oveľa labilnejšie, jedná sa o **fosfoanhydridové väzby**. Vlastným účinným koenzymom je komplex ATP s iónom Mg^{2+}, ktorý sa koordinačne viaže na fosfátové zvyšky α a β ($Mg^{2+}.ATP^{4-}$), pre jednoduchosť sa však hovorí iba o ATP. Hydrolýzou ATP vznikajú ADP a AMP.



Adenozín trifosfát (ATP)



Adenozín difosfát (ADP)



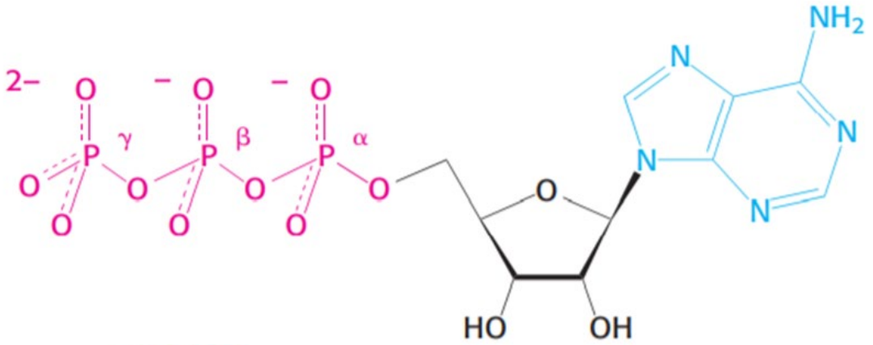
Adenozín monofosfát (AMP)

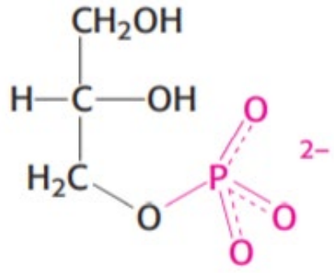
VYSOKÝ FOSFORYLAČNÝ POTENCIÁL ATP JE VÝSLEDKOM ŠTRUKTÚRNYCH ROZDIELOV MEDZI ATP A HYDROLYTICKÝMI PRODUKTAMI

ATP + H_2O ⇌ ADP + P_i $\Delta G^{0'}$ = -30.5 kJ/mol

Glycerol-3-fosfát + H_2O ⇌ Glycerol + P_i $\Delta G^{0'}$ = -9.2 kJ/mol

ATP má väčší fosforylačný potenciál (prenos fosforylovej skupiny) v porovnaní s glycerol-3-fosfátom.

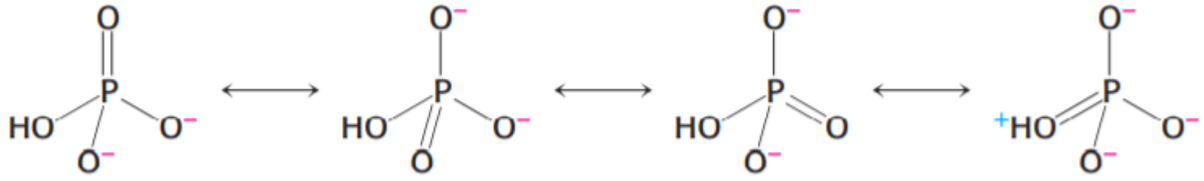




Glycerol-3-fosfát

O fosforylačnom potenciáli rozhodujú 3 faktory:

(1) Rezonančná stabilizácia



(2) Elektrostatická repulzia

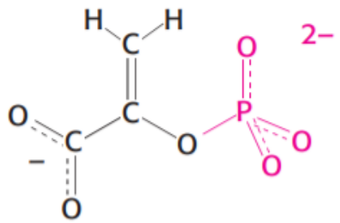
(3) Stabilizácia v dôsledku hydratácie

Dôvody prečo ATP zohráva dôležitú úlohu v bioenergetike

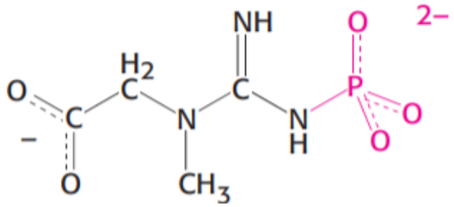
- relatívne vysoká hodnota ΔG^o
- koncentračné pomer ATP/ADP v bunkách, ktorý umožňuje uvoľnenie veľkého množstva energie pri hydrolýze ATP
- stabilita ATP vo vodnom prostredí
- ATP je vhodným zdrojom fosfátovej skupiny (ATP môže byť zdrojom až dvoch fosfátových skupín) v mnohých biochemických reakciách

PRÍKLADY MOLEKÚL S VYSOKÝM FOSFORYLAČNÝM POTENCIÁLOM

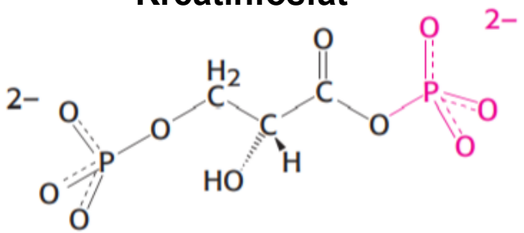
Štandardné Gibbsove energie hydrolýzy poskytujú vhodný prostriedok na porovnanie potenciálu fosforylového prenosu fosforylovaných zlúčenín. Takéto porovnania ukazujú, že ATP nie je jedinou zlúčeninou s vysokým potenciálom prenosu fosforylu. Niektoré zlúčeniny v biologických systémoch majú v skutočnosti vyšší potenciál prenosu fosforylu ako ATP. Tieto zlúčeniny zahŕňajú fosfoenolpyruvát (PEP), 1,3-bisfosfoglycerát (1,3-BPG) a kreatínfosfát. PEP teda môže preniesť svoju fosforylovú skupinu na ADP za vzniku ATP. Tento prevod skutočne je jedným zo spôsobov, ako sa ATP vytvára pri štiepení cukrov. Je príznačné, že ATP má **priemerný** potenciál prenosu fosforylu v rámci biologicky dôležitých fosforylovaných molekúl. Táto medzipoloha umožňuje účinné fungovanie ATP ako nosiča fosforylových skupín.



Fosfoenolpyruvát (PEP)



Kreatínfosfát



1,3-Bisfosfoglycerát (1,3-BPG)

Štandardné Gibbsove energie hydrolýzy vybraných fosforylovaných zlúčenín

Zlúčenina	kJ/mol
Fosfoenolpyruvát	-61.9
1,3-Bisfosfoglycerát	-49.4
Kreatínfosfát	-43.1
ATP (na ADP)	-30.5
Glukóza 1-fosfát	-20.9
Pyrofosfát	-19.3
Glukóza 6-fosfát	-13.8
Glycerol 3-fosfát	-9.2

Zdroj: Berg, Tymoczko, Stryer, Biochemistry 7th Edition.

PRÍKLADY MOLEKÚL S VYSOKÝM FOSFORYLAČNÝM POTENCIÁLOM

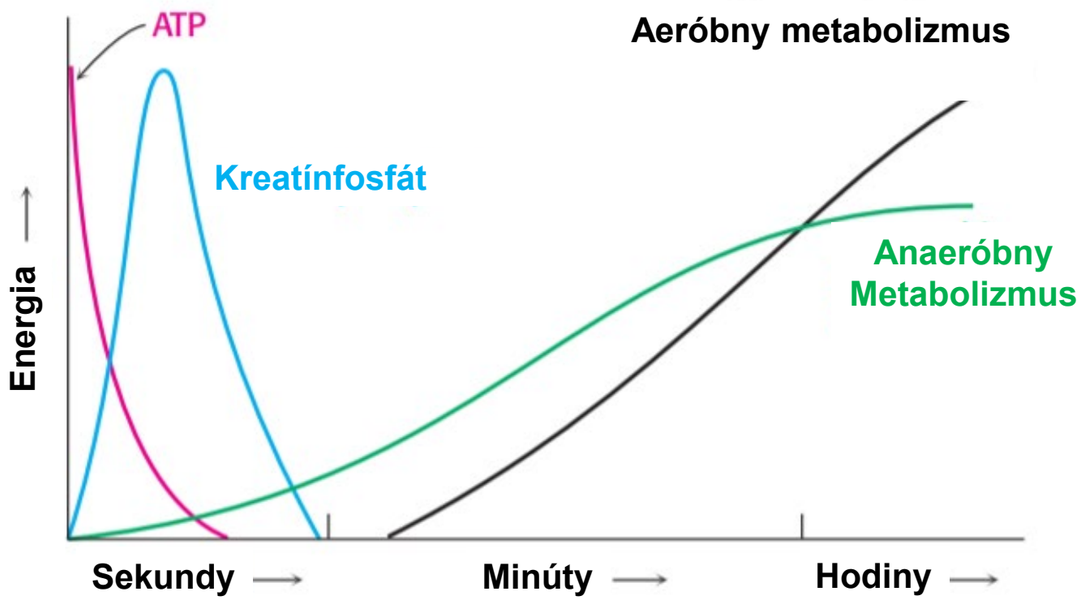
Množstvo ATP vo svale postačuje na udržanie kontraktilnej aktivity na menej ako sekundu.
Kreatínfosfát vo svale stavovcov slúži ako rezervoár fosforylových skupín s vysokým potenciálom, ktoré sa dajú ľahko preniesť do ADP. Na regeneráciu ATP z ADP sa používa kreatínfosfát zakaždým, keď namáhavo cvičíme. Táto reakcia je katalyzovaná **kreatínkinázou**:

Kreatínfosfát + ADP $\rightleftharpoons$ ATP + Kreatín

$$K'_{eq} = \frac{[ATP][Kreatin]}{[ADP][Kreatinfosfat]} = 162$$

V nepracujúcich svalov sú typické koncentrácie týchto metabolitov [ATP] = 4 mM, [ADP] = 0.013 mM, [kreatínfosfát] = 25 mM a [kreatín] =13 mM. Pre svoj nadbytok a vysoký potenciál prenosu fosforylu v porovnaní s ATP je kreatínfosfát vysoko efektívnym pufrom fosfátovej skupiny.

Kreatínfosfát je hlavným zdrojom fosfátových skupín na regeneráciu ATP pre bežca počas prvých 4 sekúnd na 100 metrov šprint.



Zdroje ATP počas cvičenia.
V počiatočných sekundách je cvičenie poháňaný existujúcim prenosom zo zlúčenín s vysokým potenciálom prenosu fosforylu (ATP a kreatínfosfát). Následne sa musí regenerovať ATP metabolickými cestami.

Zdroj: Berg, Tymoczko, Stryer, Biochemistry 7th Edition.

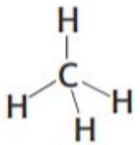
OXIDÁCIA ZDROJA ENERGIE OBSAHUJÚCEHO UHLÍK JE DÔLEŽITÝM ZDROJOM BUNKOVEJ ENERGIE

ATP slúži skôr ako hlavný okamžitý darca energie v biologických systémoch, než ako dlhodobá skladovacia forma energie. V typickej bunke sa molekula ATP spotrebuje do minúty od jej vzniku. Hoci celkové množstvo ATP v tele je obmedzené na približne 100 g, obrat tohto malého množstva ATP je veľmi vysoký. Napríklad oddychujúci človek spotrebuje asi 40 kg ATP za 24 hodín. Počas namáhavého cvičenia je spotreba ATP až 0.5 kg/minútu. Počas 2-hodinového behu sa spotrebuje 60 kg ATP. Je zrejmé, že mať účinné mechanizmy na regeneráciu ATP je nevyhnutné. Tvorba ATP je jednou z primárnych úloh katabolizmu.

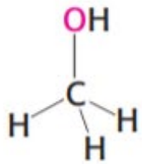
Pohyb
Aktívny transport
Biosyntézy
Amplifikácia signálov

Oxidácia zlúčenín
alebo
Fotosyntéza

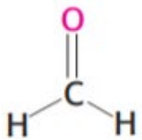
Najviac energie → **Najmenej energie**



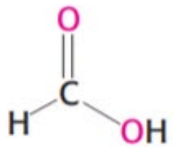
Metán



Metanol



Formaldehyd

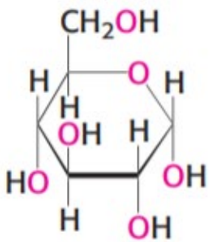


Kyselina mravčia

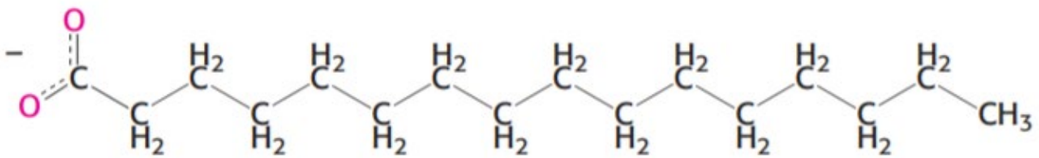
Oxid uhličitý

$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)	**-820**	**-703**	**-523**	**-285**	**0**

Voľná energia oxidácie jednouhlíkovej zlúčeniny



Glukóza



Mastná kyselina

Prominentné palivá. Tuky sú bohatším zdrojom energie v porovnaní s cukrami, pretože tuky sú viac redukované.

Zdroj: Berg, Tymoczko, Stryer, Biochemistry 7th Edition.

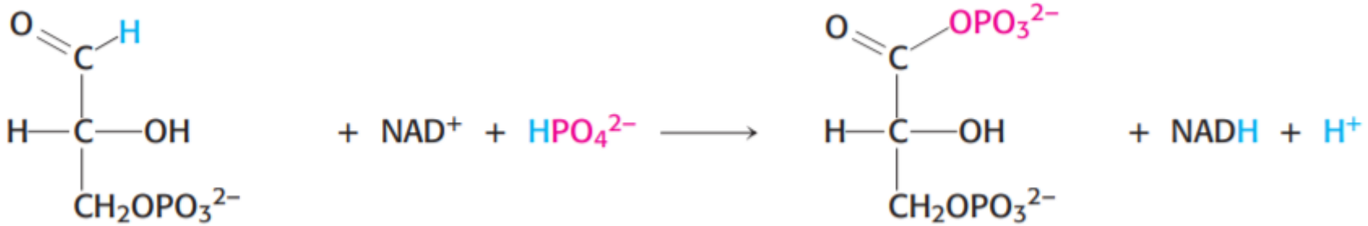
OXIDÁCIA UHLÍKOVÝCH ZLÚČENÍN MÔŽE BYŤ SPOJENÁ SO SYNTÉZOU ATP

Reakcia - oxidácia:

Glyceraldehyde 3-fosfát **3-fosfoglycerová kyselina**

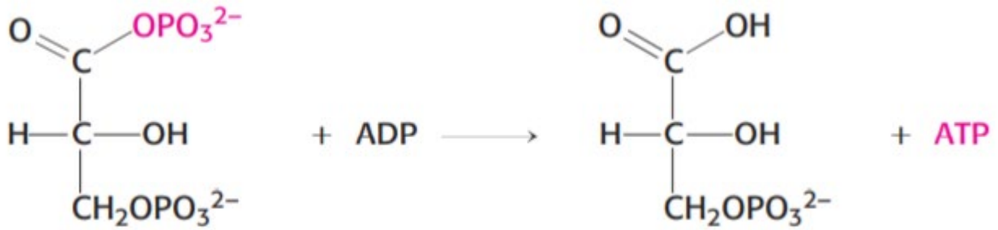
Je zložená z 2 krokov:

1.



Glyceraldehyde 3-fosfát **1,3-bisfosfoglycerovát**

2.

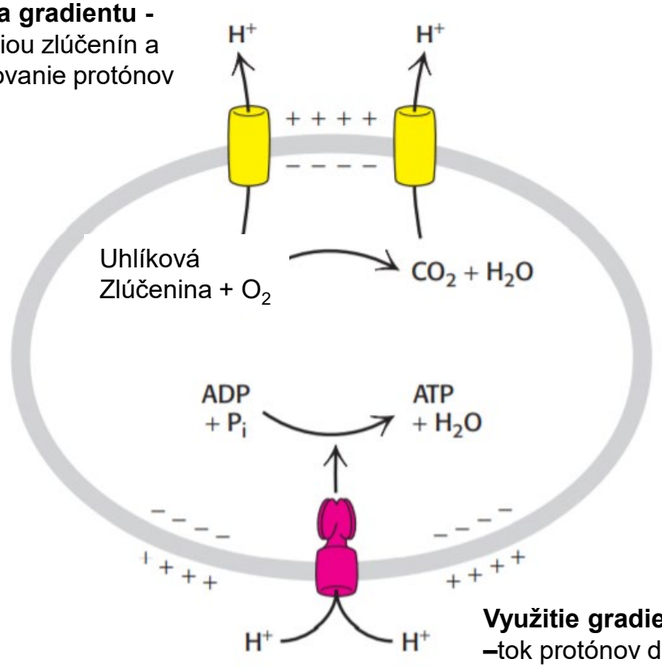


1,3-bisfosfoglycerovát **3-fosfoglycerová kyselina**

Energia oxidácie sa spočiatku zachytáva ako zlúčenina s vysokým potenciálom prenosu fosforylu a potom sa použije na vytvorenie ATP. Oxidačná energia atómu uhlíka sa transformuje na potenciál prenosu fosforylu, najskôr ako 1,3-bisfosfoglycerát a nakoniec ako ATP.

Iónový membránový gradient – dôležitý zdroj energie:

Tvorba gradientu - oxidáciou zlúčenín a pumpovanie protónov von.



Využitie gradientu –tok protónov dnu tvorí ATP.

Elektrochemický potenciál je účinný prostriedok na ukladanie voľnej energie. Elektrochemický potenciál iónových gradientov cez membrány vytvorený oxidáciou molekúl alebo fotosyntézou, v konečnom dôsledku poháňa syntézu väčšiny ATP v bunkách. Iónové gradienty predstavujú spôsob spojenia termodynamicky nepriaznivých reakcií na priaznivé. U živočíchov zodpovedajú protónové gradienty, generované oxidáciou uhlíkových palív, za viac ako 90% tvorby ATP. Tento proces sa nazýva oxidačná fosforylácia.

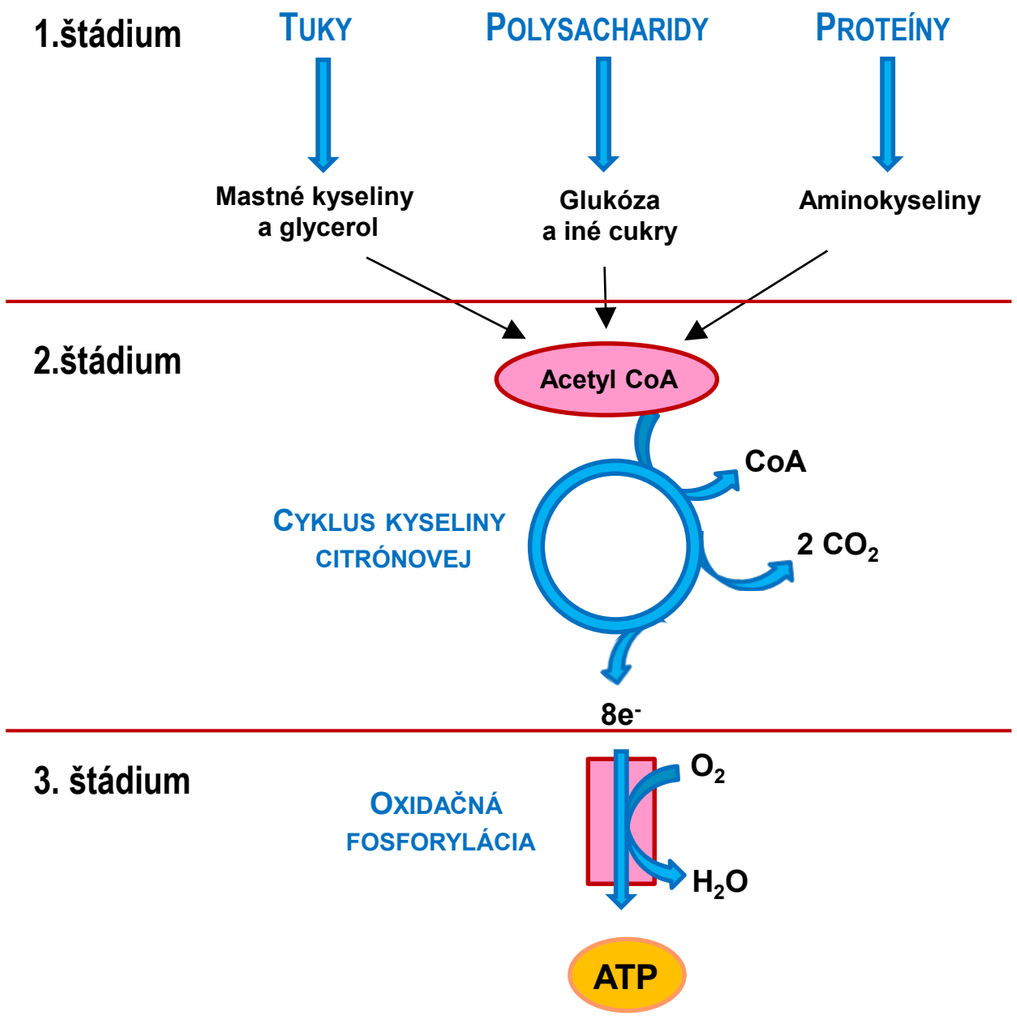
ENERGIA Z POTRAVÍN JE EXTRAHOVANÁ V TROCH ŠTÁDIÁCH

Hans Krebs opísal tri fázy tvorby energie z oxidácie živín.

V prvom štádiu sa rozkladajú veľké molekuly v živinách na menšie jednotky. Tento proces je trávenie. Proteíny sa hydrolyzujú na 20 rôznych aminokyselín, polysacharidy sa hydrolyzujú na jednoduché cukry, ako je glukóza, a tuky sa hydrolyzujú na glycerol a mastné kyseliny.

V druhom štádiu sú tieto početné malé molekuly degradované na niekoľko jednoduchých jednotiek, ktoré zohrávajú ústrednú úlohu v metabolizme. Väčšina z nich - cukry, mastné kyseliny, glycerol a niektoré aminokyselín - sa premieňajú na **acetyl-CoA**.

V tretej etape sa ATP vyrába z úplnej oxidácia acetylovej jednotky v acetyl-CoA. Tretia etapa pozostáva z **cyklu kyseliny citrónovej (Krebsov cykus)** a **oxidatívnej fosforylácie**, ktoré sú finálnymi spoločnými dráhami oxidácie molekúl.

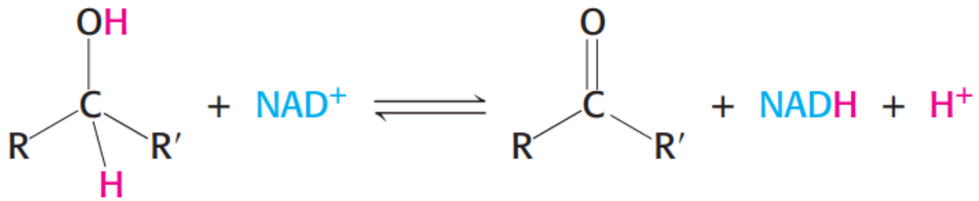


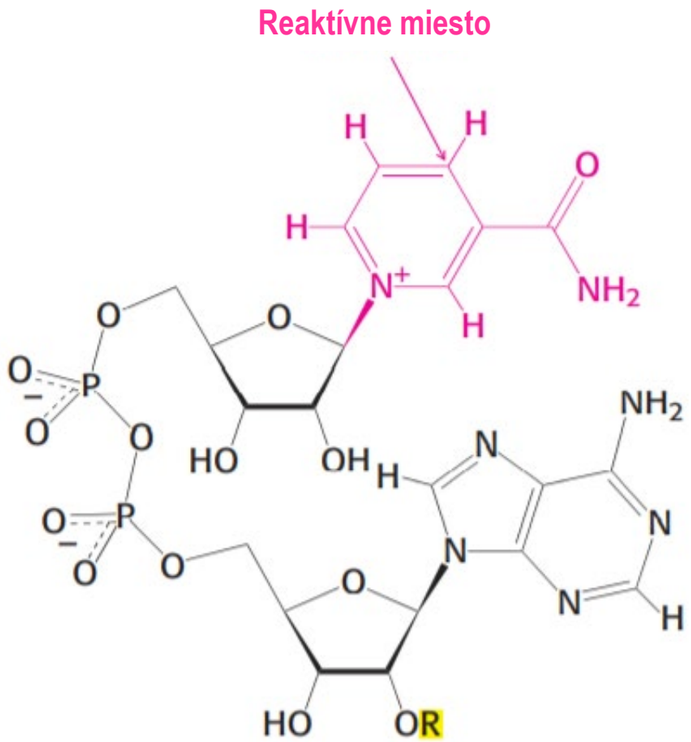
METABOLICKÉ DRÁHY OBSAHUJÚ MNOHÉ OPAKUJÚCE SA MOTÍVY

Aktivovaný nosič elektrónov z oxidácie molekúl.

V aeróbnych organizmoch konečným akceptorom elektrónov pri oxidácii molekúl je O_2. Elektróny sa však neprenášajú priamo do O_2. Na prenos elektrónov slúžia špeciálne nosiče, ktorými sú buď **pyridínové nukleotidy** alebo **flavíny**. Redukované formy týchto prenášačov potom sprostredkovajú transfer „vysoko-energetických“ elektrónov na O_2.

Nikotínamid adenín dinukleotid je hlavným prenášačom elektrónov pri oxidácii molekúl. Reaktívna časť NAD^+ je jeho nikotínamidový kruh, pyridínový derivát syntetizovaný z vitamínu niacín. Pri oxidácii substrátu akceptuje nikotínamidový kruh NAD^+ vodíkový ión a dva elektróny, ktoré sú ekvivalentné s hydridovým iónom ($H:^-$). Redukovaná forma tohto nosiča sa nazýva NADH. V oxidovanej forme atóm dusíka nesie kladný náboj (NAD^+). NAD^+ je akceptorom elektrónov v mnohých reakciách typu:



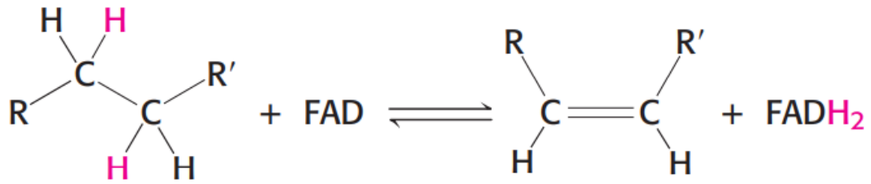


Štruktúry oxidovaných foriem elektrónových prenášačov odvodených od nikotínamidového prenášača. Nikotínamid adenín dinukleotid (NAD^+) a nikotínamid adenín dinukleotid fosfát ($NADP^+$) sú významní prenášači „vysoko-energetických“ elektrónov. V NAD^+ R = H; v $NADP^+$, R = PO_3^{2-}

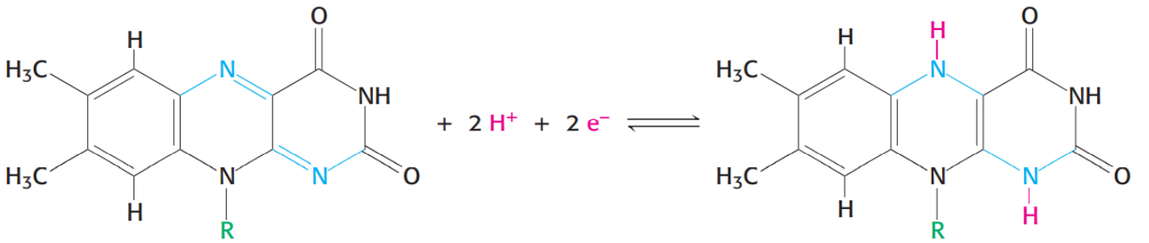
METABOLICKÉ DRÁHY OBSAHUJÚ MNOHÉ OPAKUJÚCE SA MOTÍVY

Aktivovaný nosič elektrónov z oxidácie molekúl.

Ďalším hlavným nositeľom elektrónov pri oxidácii molekúl je **koenzým flavín adenín dinukleotid**. Skratky pre oxidované a redukované formy tohto nosiča sú FAD a $FADH_2$. FAD je akceptor elektrónov pri reakciách tohto typu:

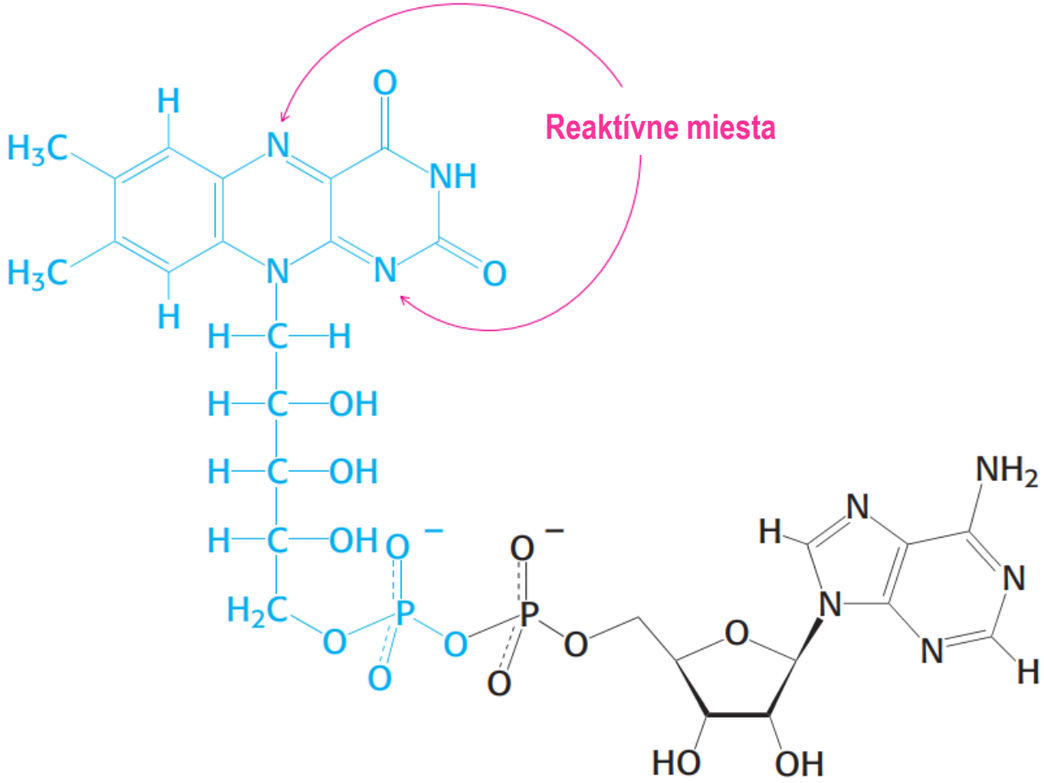


Reaktívnou súčasťou FAD je jeho izoalloxazínový kruh, derivát vitamínu riboflavín. FAD, rovnako ako NAD^+, prijíma dva elektróny, avšak na rozdiel od NAD^+ prijíma taktiež dva protóny.



Oxidovaná forma (FAD/FMN) **Redukovaná forma ($FADH_2$/$FMNH_2$)**

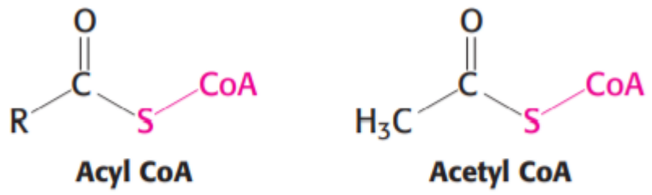
Štruktúry reaktívnych častí FAD/FMN a $FADH_2$/$FMNH_2$. Elektróny a protóny sú prenášané izoalloxazínovým kruhom týchto kofaktorov.

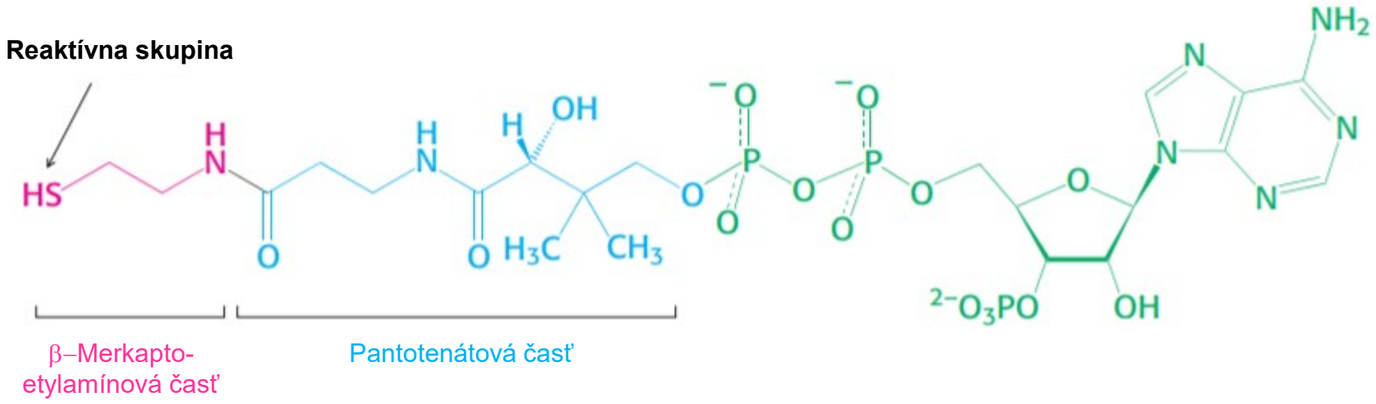


Štruktúra oxidovanej formy flavínu adenín dinukleotid (FAD). Tento elektrónový nosič pozostáva z jednotky flavín mononukleotidu (FMN) (zobrazené modrou farbou) a jednotky AMP (zobrazené čiernou farbou).

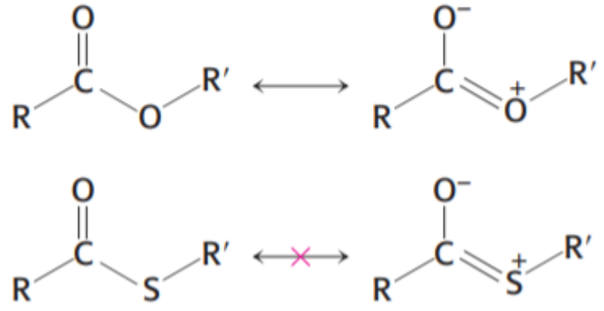
METABOLICKÉ DRÁHY OBSAHUJÚ MNOHÉ OPAKUJÚCE SA MOTÍVY

Aktivovaný nosič 2-uhlíkového fragmentu.





$$\text{AcetylCoA} + H_2O \rightleftharpoons \text{acetát} + \text{CoA} + H^+ \qquad \Delta G^{0'} = -31.4\ \text{kJ/mol}$$



Kyslíkové estery sú stabilizované rezonančnými štruktúrami, ktoré sa nevyskytujú u tioesterov.

Použitie aktivovaných nosičov ilustruje **dva kľúčové aspekty metabolizmu**. **Po prvé**, NADH, NADPH a $FADH_2$ v neprítomnosti katalyzátora reagujú pomaly s O_2. Rovnako tak ATP a acetyl CoA sa hydrolyzujú pomaly (občas niekoľko hodín alebo dokonca dní) v neprítomnosti katalyzátora. Tieto molekuly sú kineticky stabilné aj napriek termodynamickej výhodnosti reakcie s O_2 (pokiaľ ide o nosiče elektrónov) a H_2O (pre ATP a acetyl CoA). Kinetická stabilita týchto molekúl v neprítomnosti špecifických katalyzátorov je nevyhnutná pre ich biologickú funkciu, pretože to umožňuje enzýmom kontrolu toku voľnej energie. **Po druhé**, väčšina výmen aktivovaných skupín v metabolizme sa dosahuje pomerne malou skupinou nosičov. Existencia opakujúcej sa množiny aktivovaných nosičov vo všetkých organizmoch je jedným zo zjednocujúcich motívov biochémie a ilustruje modulárny dizajn metabolizmu.

AKTIVOVANÉ NOSIČE

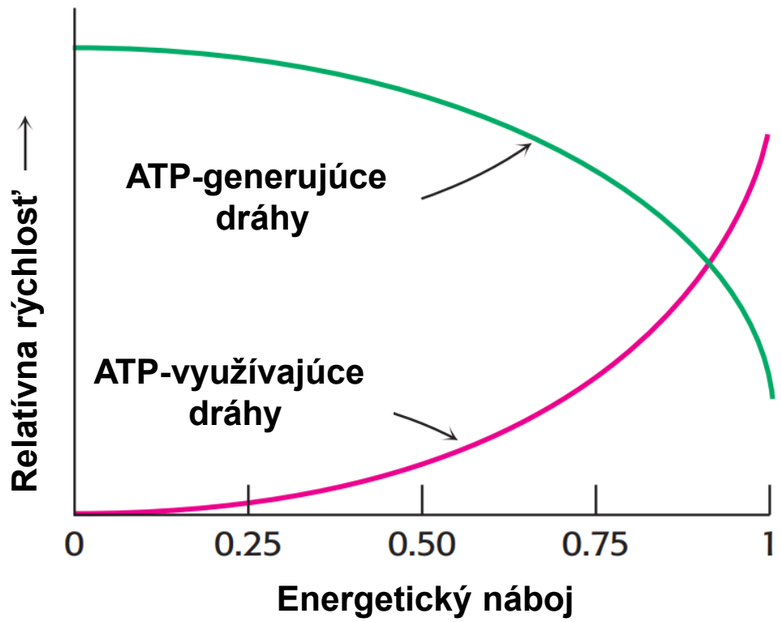
Nosič aktivovanej formy molekuly	Prenášaná skupina	Vitamínový prekurzor
ATP	Fosforyl	
NADH a NADPH	Elektróny	Nikotinát (niacin)
$FADH_2$	Elektróny	Riboflavín (vitamin B2)
$FMNH_2$	Elektróny	Riboflavín (vitamin B2)
Koenzým A	Acyl	Pantotenát
Lipoamid	Acyl	
Tiamín pyrofosfát	Aldehyd	Tiamín (vitamín B1)
Biotín	CO_2	Biotín
Tetrahydrofolát	Jednouhlíkové zlúčeniny	Folát
S-Adenosylmetionín	Metyl	
Uridín difosfát glukóza	Glukóza	
Cytidín difosfát diacylglycerol	Fosfatidát	
Nukleozid trifosfáty	Nukleotidy	

REGULÁCIA METABOLIZMU NA ZÁKLADE DOSTUPNOSTI ENERGIE-ATP

Mnoho reakcií v metabolizme je riadených energetickým stavom bunky. Jedným z parametrov energetického stavu je **energetický náboj**, ktorý je proporcionálny mólovému podielu ATP plus polovica mólového podielu ADP. Je to dané tým, že ATP obsahuje dve anhydridové väzby, zatiaľ čo ADP obsahuje jednu. Z tohto dôvodu je energetický náboj definovaný ako:

$$Energeticky\ naboj = \frac{[ATP] + 1/2\,[ADP]}{[ATP + [ADP] + [AMP]}$$

Hodnota energetického náboja môže mať hodnotu od 0 (všetky AMP) do 1 (všetky ATP). Daniel Atkinson ukázal, že ATP-generujúce (katabolické) dráhy sú inhibované vysokým energetickým nábojom, zatiaľ čo ATP- využívajúce (anabolické) dráhy sú stimulované vysokým energetickým nábojom. V grafoch reakčných rýchlostí také dráhy oproti energetickému náboju sú krivky strmé v blízkosti energie náboj 0.9, kde sa obvykle pretínajú. Je evidentné, že riadenie týchto dráh sa vyvinulo tak, aby sa udržal energetický náboj v dosť úzkych medziach. Inými slovami, energetický náboj, podobne ako pH bunky, je pufrovaný.



Energetický náboj reguluje metabolizmus. Vysoké koncentrácie ATP inhibujú relatívnu rýchlosť typických ATP-generujúcich (katabolických) dráh a stimulujú typické ATP-využívajúce (anabolické) dráhy.

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať základný koncept metabolizmu vo vzťahu k tvorbe energie
- Vysvetliť pojmy Gibbsova energia, rovnovážna konštanta, ako aj vzťahy medzi nimi
- Popísať základné vlastnosti väzieb bohatých na energiu – na príklade molekuly ATP
- Uviesť základné spôsoby tvorby ATP
- Uviesť príklady prenášačov „vysoko-energetických“ elektrónov

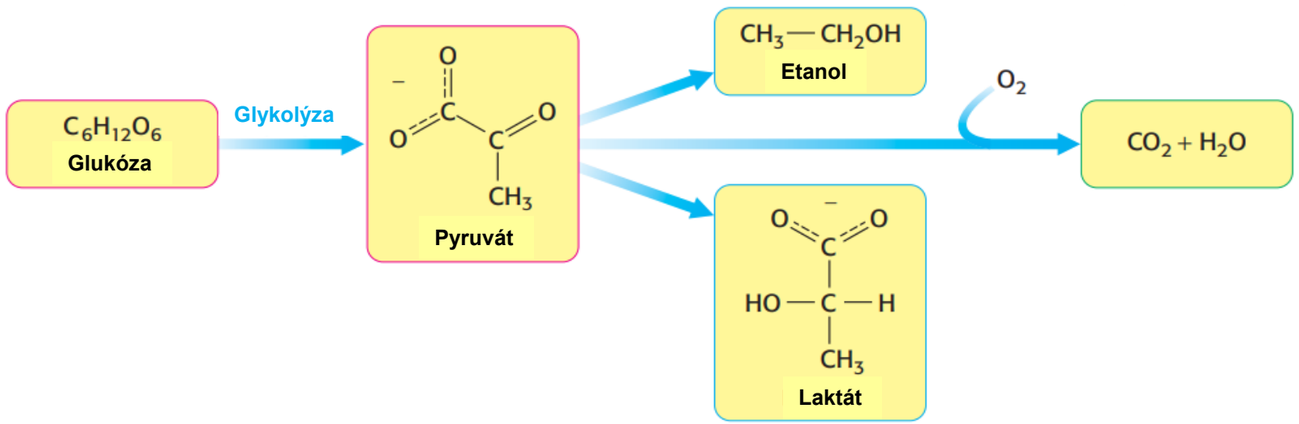
Glykolýza
2

Štádia glykolýzy
Jednotlivé reakcie glykolýzy
Tvorba ATP na substrátovej úrovni
Pyruvát a fermentácia
Glukóza, fruktóza a galaktóza
Regulácia glykolýzy

GLYKOLÝZA - DEFINÍCIA

Glykolýza je postupnosť reakcií, prebiehajúcich v cytoplazme, ktoré metabolizujú **jednu** molekulu **glukózy** na **dve** molekuly **pyruvátu** so sprievodnou produkciou **dvoch** molekúl **ATP**. Tento proces je anaeróbny (t. j. nevyžaduje prítomnosť O_2), pretože sa vyvinul v čase, keď sa v atmosfére nenachádzal kyslík v dostatočne vysokej koncentrácii.

Pyruvát môže byť ďalej spracovaný anaeróbne na **laktát** (*fermentácia*) alebo **etanol** (*alkoholové kvasenie*). Za aeróbnych podmienok môže byť pyruvát úplne oxidovaný na CO_2, čím sa vytvoria podmienky na produkciu oveľa väčšieho množstva ATP.



GLYKOLÝZA – HISTORICKÝ EXKURZ

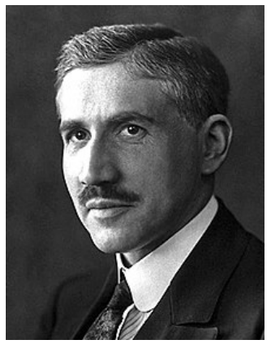
Hans a Eduard Buchnerovci v roku 1897 po prvýkrát demonštrovali, že fermentácia nie je viazaná na bunky a vyvrátili tak hypotézu Louisa Pasteura o existencii tzv. *životnej sily*.

Eduard Buchner (1860-1917)
Nobelova cena za Chémiu
v roku 1907.

Kompletná metabolická dráha glykolýzy bola vyriešená v roku 1940 vďaka úsiliu viacerých vedcov ako Gustav Embden, Otto Meyerhof, Carl Neuberg, Jacob Parnas, Otto Warburg, Gerty Cori a Carl Cori.

Glykolýza je tiež známa ako **Embden-Meyerhofova dráha**.

Gustav Georg Embden (1874-1933)
Bol nominovaný 12x na Nobelovu cenu.
Nikdy ju nezískal.

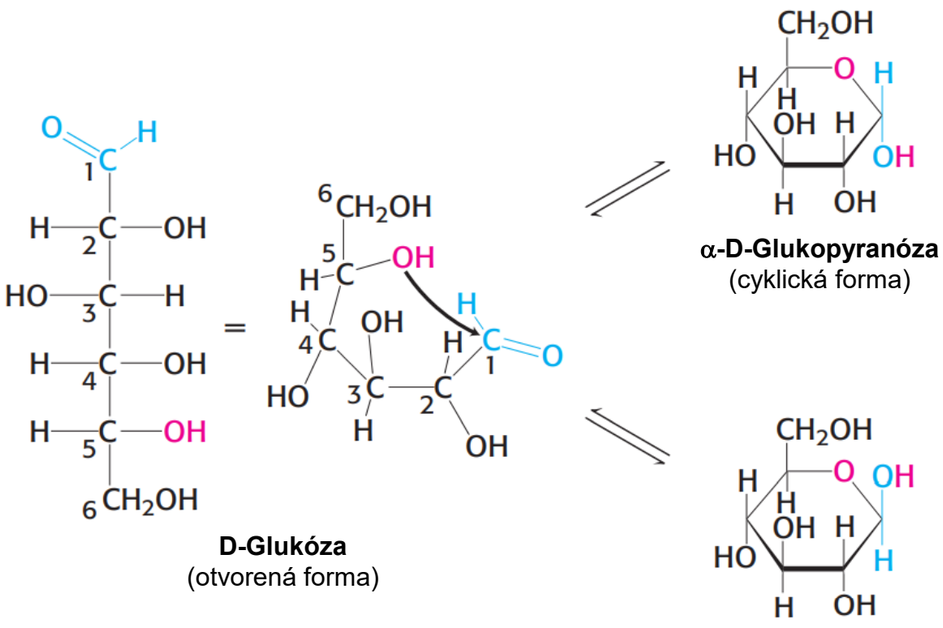


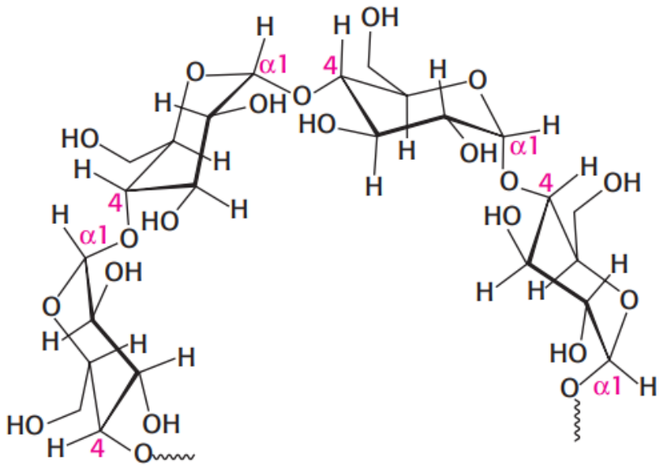
Otto Meyerhof (1884-1951)
Nobelova cena za Fyziológiu a medicínu
v roku 1922.

GLUKÓZA – VSTUPNÝ SUBSTRÁT PRE GLYKOLÝZU

Glukózu prijímame v strave vo forme komplexnejších cukrov. V strave zvyčajne konzumujeme veľké množstvo **škrobu** a menšie množstvo množstvo **glykogénu**.

Komplexné cukry sú premieňané na jednoduchšie enzýmami ako α-amyláza, maltáza, α-glukozidáza, α-dextrináza, sacharáza.





Škrob a glykogén
(Glukóza je spojená a-1,4 glykozidickými väzbami)

Glukóza je **dôležitý zdroj energie**. U cicavcov je glukóza hlavný zdroj energie pre mozog v čase nehladovania a jediný zdroj energie, ktoré červené krvinky môžu vôbec používať. Takmer všetky organizmy používajú glukózu ako zdroj energie a väčšina z nich ju spracováva podobným spôsobom.

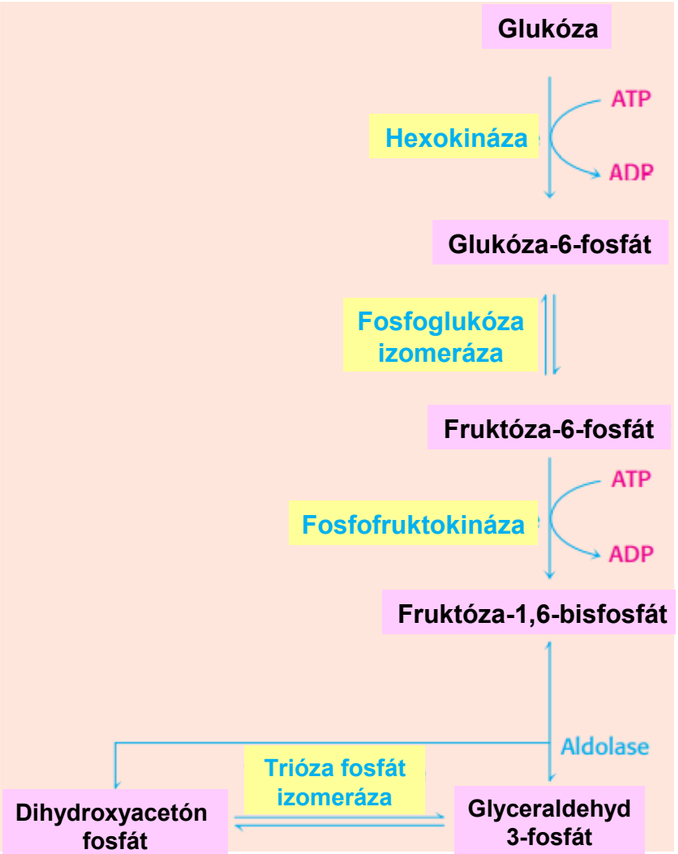
Prečo práve glukóza (a nie nejaký iný monosacharid) takým prominentným zdrojom energie? Možné dôvody sú:

- glukóza je jedným z niekoľkých monosacharidov vytvorených z formy aldehydu za prebiotických podmienok, a preto mohla byť dostupná ako zdroj zdroj energie pre primitívne biochemické systémy,
- glukóza má malú tendenciu v porovnaní s ostatnými monosacharidmi k neenzymatickej glykozylácii proteínov.

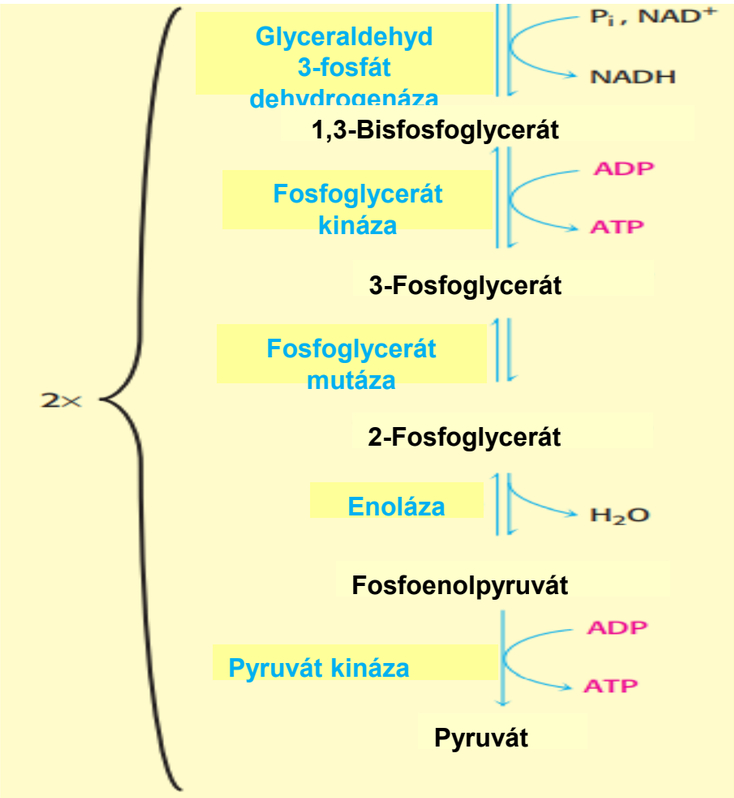
GLYKOLÝZA – ZÁKLADNÉ FÁZY

Glykolýza je spoločná pre prakticky všetky bunky, prokaryotické aj eukaryotické. V eukarytických bunkách prebieha glykolýza v cytoplazme. Táto cesta môže byť formálne rozdelená na dve fázy.

Fáza 1 slúži na záchyt glukózy a je možné ju považovať ako prípravnú fázu. V tejto fáze sa negeneruje žiadna ATP.

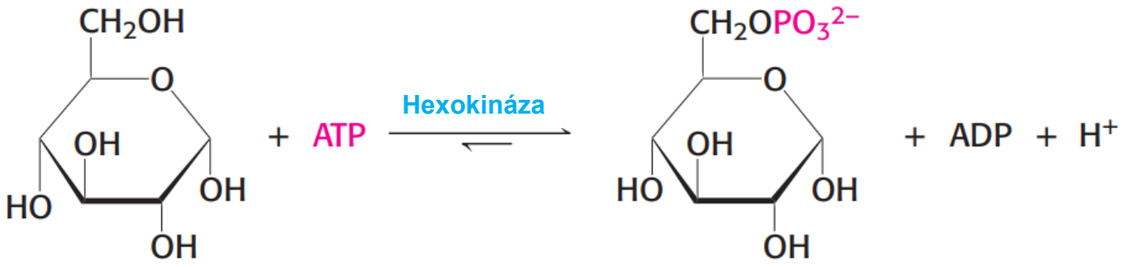


Fáza 2 slúži na tvorbu ATP na substrátovej úrovni. V tejto fáze dochádza k oxidácii 3C fragmentov (zo 6C glukózy) na pyruvát.



GLYKOLÝZA – 1.KROK

V 1.kroku glykolýzy **hexokináza** zachytáva glukózu a začína glykolýzu:



Glukóza **Glukóza-6-fosfát (G-6P)**

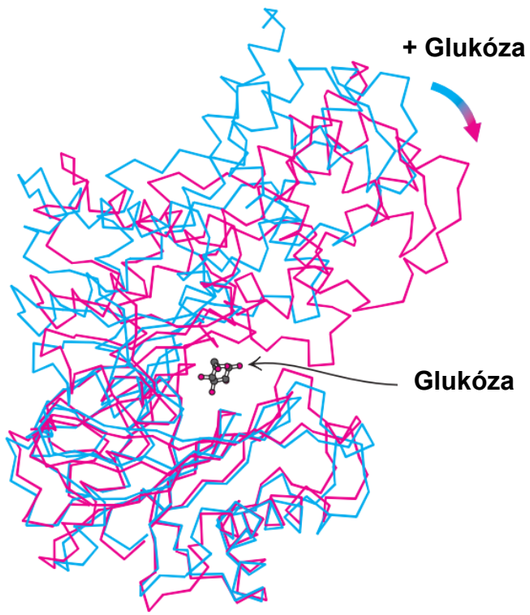
Tento krok je pozoruhodný z dvoch dôvodov:

(1) glukóza-6-fosfát nemôže prechádzať cez membránu, pretože nie je substrátom pre transportéry glukózy,

(2) pridanie fosforylovej skupiny teda vedie k destabilizácii glukózy a uľahčuje tak jej ďalší metabolizmus.

Prenos fosforylovej skupiny z ATP na hydroxylovú skupinu na uhlíku 6 glukózy je katalyzovaná *hexokináz*ou – enzýmom z rodiny **kináz**. **Kinázy** sú enzýmy, ktoré katalyzujú prenos fosforylovej skupiny z ATP na akceptorovú molekulu.

Röntgenové kryštalografické štúdie kvasinkovej hexokinázy odhalili, že väzba glukózy indukuje veľkú konformačnú zmenu v enzýme.
Uzatvorenie štrbiny v hexokináze je pozoruhodným príkladom úlohy **indukovaného fitu** vo funkcii enzýmov



Indukovaný fit v hexokináze. Dve časti (laloky) hexokinázy sú v neprítomnosti glukózy oddelené (konformácia znázornená modrou farbou). Konformácia hexokinázy sa výrazne zmení po väzbe glukózy (červená farba). Dva laloky enzýmu sa spoja a obklopia substrát, čím vytvoria vhodné prostredie pre katalýzu.

Glukózou-indukované konformačné zmeny sú významné z dvoch hľadísk:

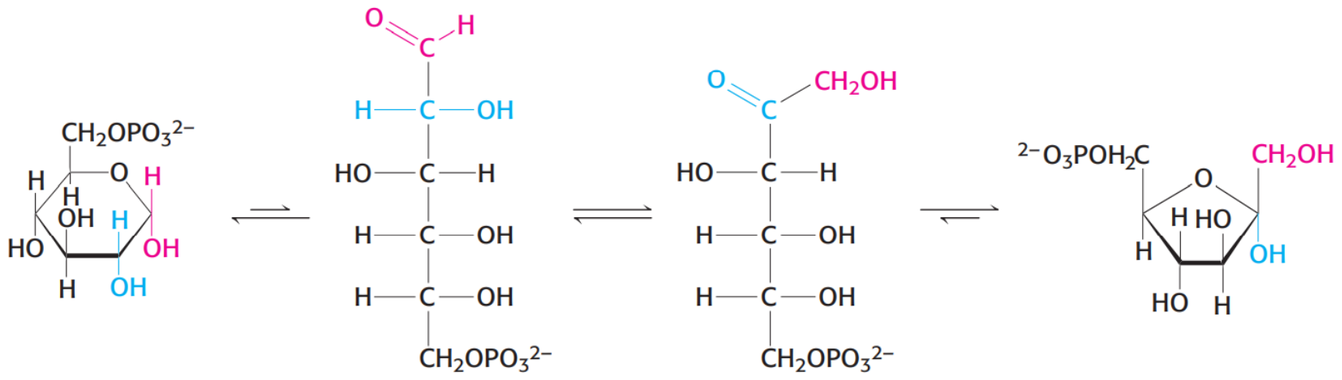
(1) Prostredie okolo glukózy sa stáva viac nepolárnym, čo uprednostňuje reakciu medzi hydrofilnou hydroxylovou skupinou glukózy a terminálnou fosforylovou skupinou ATP.

(2) Konformačné zmeny umožňujú kináze diskriminovať H_20 ako substrát. Uzatvorenie štrbiny zabraňuje molekule vody vstupu do aktívneho miesta.

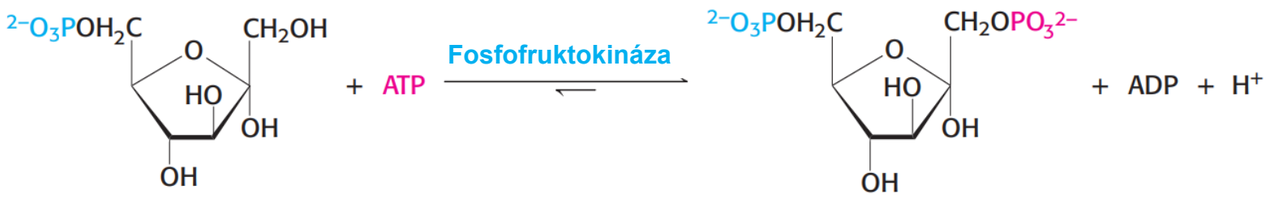
Je zaujímavé, že aj iné kinázy zúčastňujúce sa na glykolýze - *fosfofruktokináza*, *fosfoglycerátkináza* a *pyruvátkináza* - obsahujú štrbiny medzi lalokmi, ktoré sa uzavrú po naviazaní substrátu, hoci sa štruktúry týchto enzýmov líšia v iných ohľadoch. **Substrátom indukovaný fit je všeobecná vlastnosť kináz.**

GLYKOLÝZA – NASLEDUJÚCE KROKY (2 A 3)

V 2. kroku dochádza k izomerizácii glukóza 6-fosfátu na fruktózu 6-fosfát:



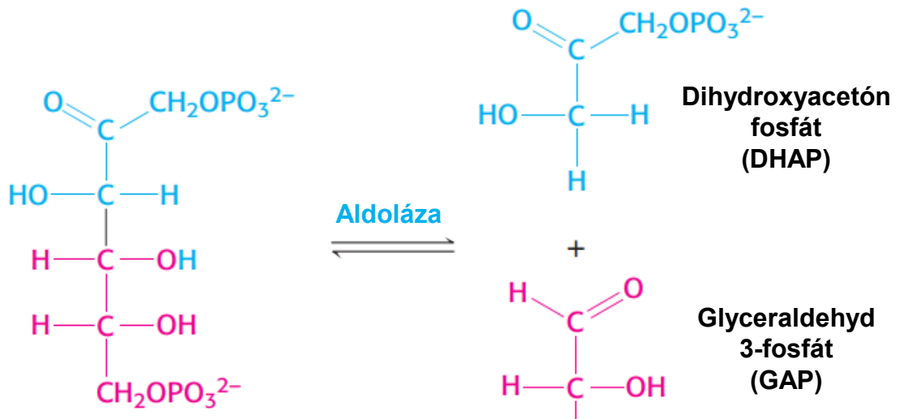
Následne dochádza ku fosforylácii F-6P enzýmom **fosforuktokináza (PFK)**, ktorý určuje rýchlosť glykolýzy.



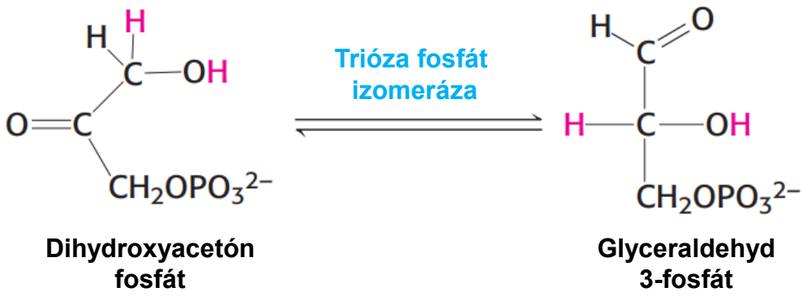
Fruktóza 6-fosfát **Fruktóza 1,6-bisfosfát (F-1,6-BP)**

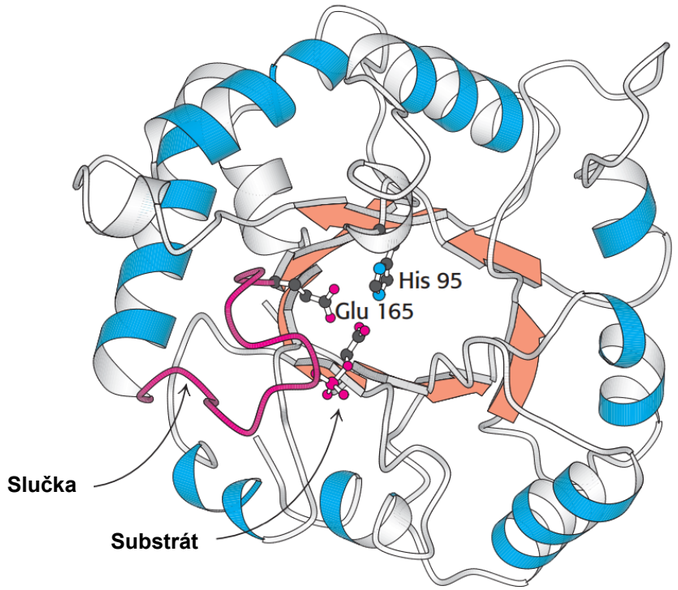
GLYKOLÝZA – POKRAČOVANIE (KROKY 4 A 5)

Šesťuhlíkový cukor (F-1,6 – BP) je rozštiepený na dva trojuhlíkové zlúčeniny. Táto reakcia je reverzibilná a je katalyzovaná **aldolázou**:



Glyceraldehyd-3-fosfát je na priamej ceste glykolýzy, zatiaľ čo dihydroxyacetónfosfát nie je. Preto musí dôjsť k premene DHAP na GAP prostredníctvom izomerizácie. Táto reakcia je katalyzovaná enzýmom **trióza fosfát izomeráza (TPI)**. Táto reakcia je rýchla a reverzibilná. V rovnováhe je 96% triózy fosfátov tvorených DHAP.

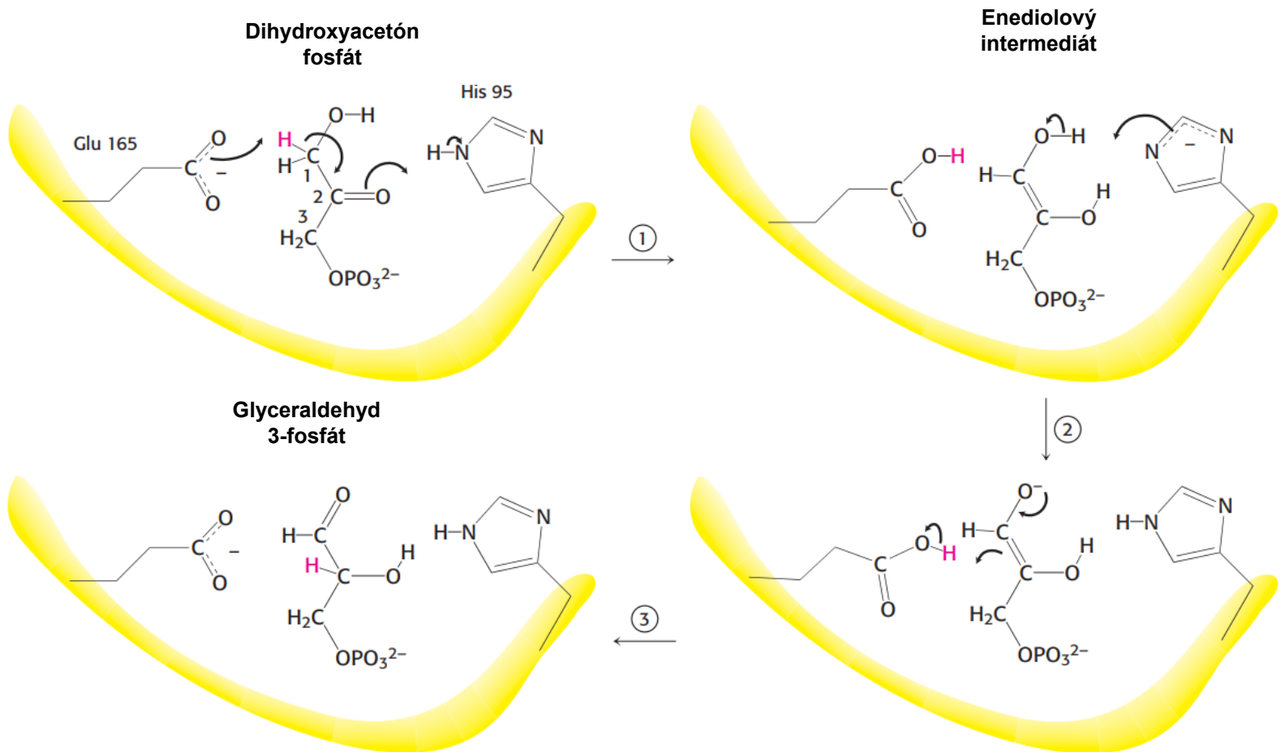




Štruktúra triózy fosfát izomerázy (2YPI.pdb). Tento enzým pozostáva z centrálneho jadra zloženého z ôsmich paralelných β-listov (**oranžová**) obklopených ôsmimi helixami (modrá). Tento štrukturálny motív, ktorý sa nazýva **αβ súdok**, sa tiež nachádza v glykolytických enzýmoch *aldoláza*, *enoláza* a *pyruvátkináza*. Histidín 95 a glutamát 165, nevyhnutné aminokyselinové zvyšky v aktívnom mieste, sa nachádzajú vo vnútri štruktúry. Slučka (**červená**) uzatvára aktívne miesto v oblasti väzby substrátu.

GLYKOLÝZA – POKRAČOVANIE (KROK 5)

Izomerizácia ketózy na aldózu sa uskutočňuje cez enediol intermediát:

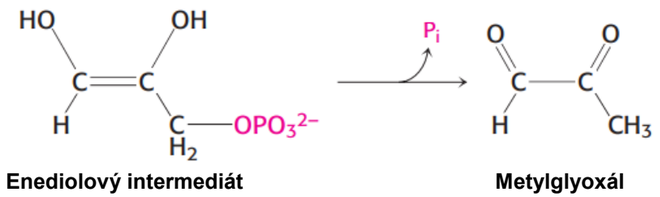


Katalytický mechanizmus trióza fosfát izomerázy. (1) Glutamát 165 pôsobí ako všeobecná báza a abstrahuje protónu (H^+) z uhlíka 1. Histidín 95, pôsobiaci ako všeobecná kyselina, daruje protón na atóm kyslíka naviazaný na uhlík 2, za vzniku enediolového medziproduktu. (2) Kyselina glutámová, ktorá tu pôsobí ako všeobecná kyselina, daruje protón na C-2, zatiaľ čo histidín odstraňuje protón z OH skupiny C-1. (3) Produkt sa formuje a glutamát a histidín nadobudajú pôvodné ionizované/neutrálne formy.

Pozoruhodné sú dve vlastnosti triózy fosfát izomerázy (TPI):

(1) TPI je veľmi účinný katalyzátor. Urýchľuje izomerizáciu faktorom 10^{10} v porovnaní s rýchlosťou získanou s jednoduchým bázickým katalyzátorom, ako je acetátový ión. Pomer k_{cat}/K_M pre izomerizáciu glyceraldehydu 3-fosfát je 2 x 10^8 $M^{-1}s^{-1}$, ktorý zodpovedá difúzne riadenému limitu. Inými slovami, katalýza prebieha vždy, keď sa tento enzým a substrát stretnú. TPI je príkladom kineticky dokonalého enzýmu.

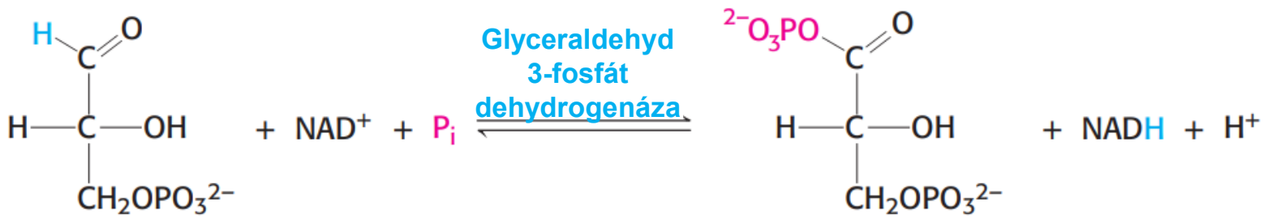
(2) TPI potláča nežiadúcu reakciu, rozklad enediolového medziproduktu na metylglyoxal a ortofosfát:



V roztoku je táto fyziologicky „zbytočná“ reakcia 100x rýchlejšia ako izomerizácia. Okrem toho je metylglyoxal vysoko reaktívna zlúčenina, ktorá môže pozmeniť štruktúru a funkciu rôznych biomolekúl vrátane proteínov a DNA.

GLYKOLÝZA – POKRAČOVANIE (KROK 6)

Prvý krok druhej fázy glykolýzy je oxidácia aldehydu na kyselinu, ktorá vedie k tvorbe zlúčeniny s veľkým potenciálom prenosu fosforylovej skupiny:

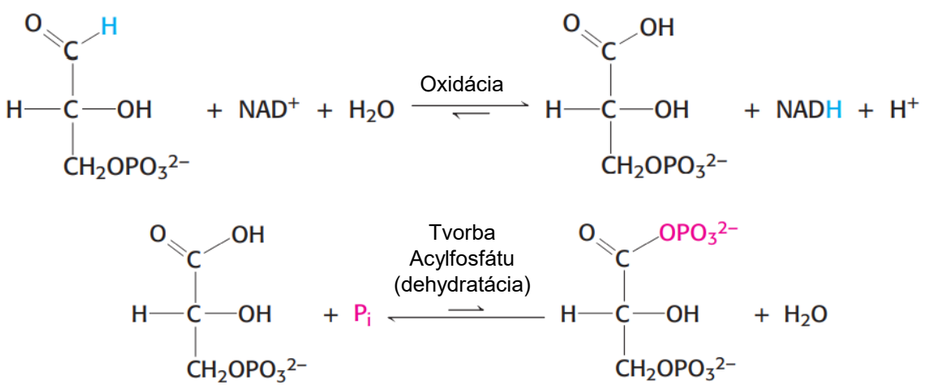


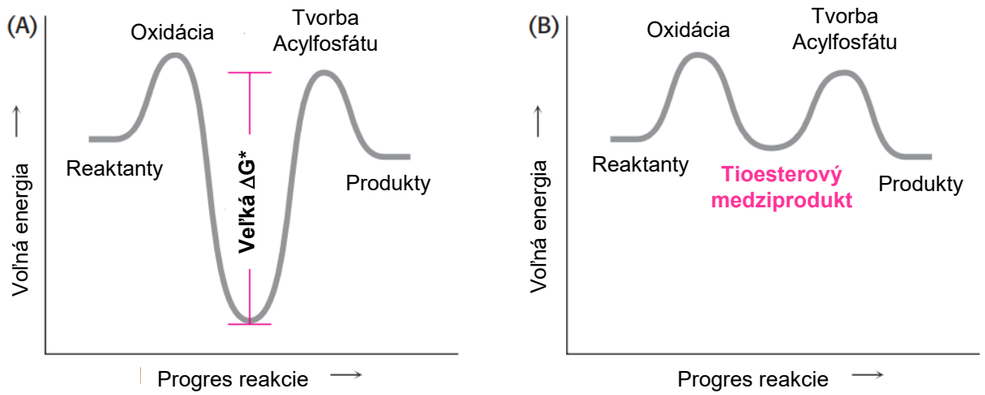
Glyceraldehyd 3-fosfát (GAP)

1,2-Bisfosfoglycerát (1,3-BPG)

Tvorba Acylfosfátu

Reakcia katalyzovaná **glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázou** sa dá považovať za súhrn dvoch procesov: oxidácie aldehydu na karboxylovú kyselinu pomocou NAD^+ a spojenie karboxylovej kyseliny a ortofosfátu za vzniku acyl-fosfátového produktu.

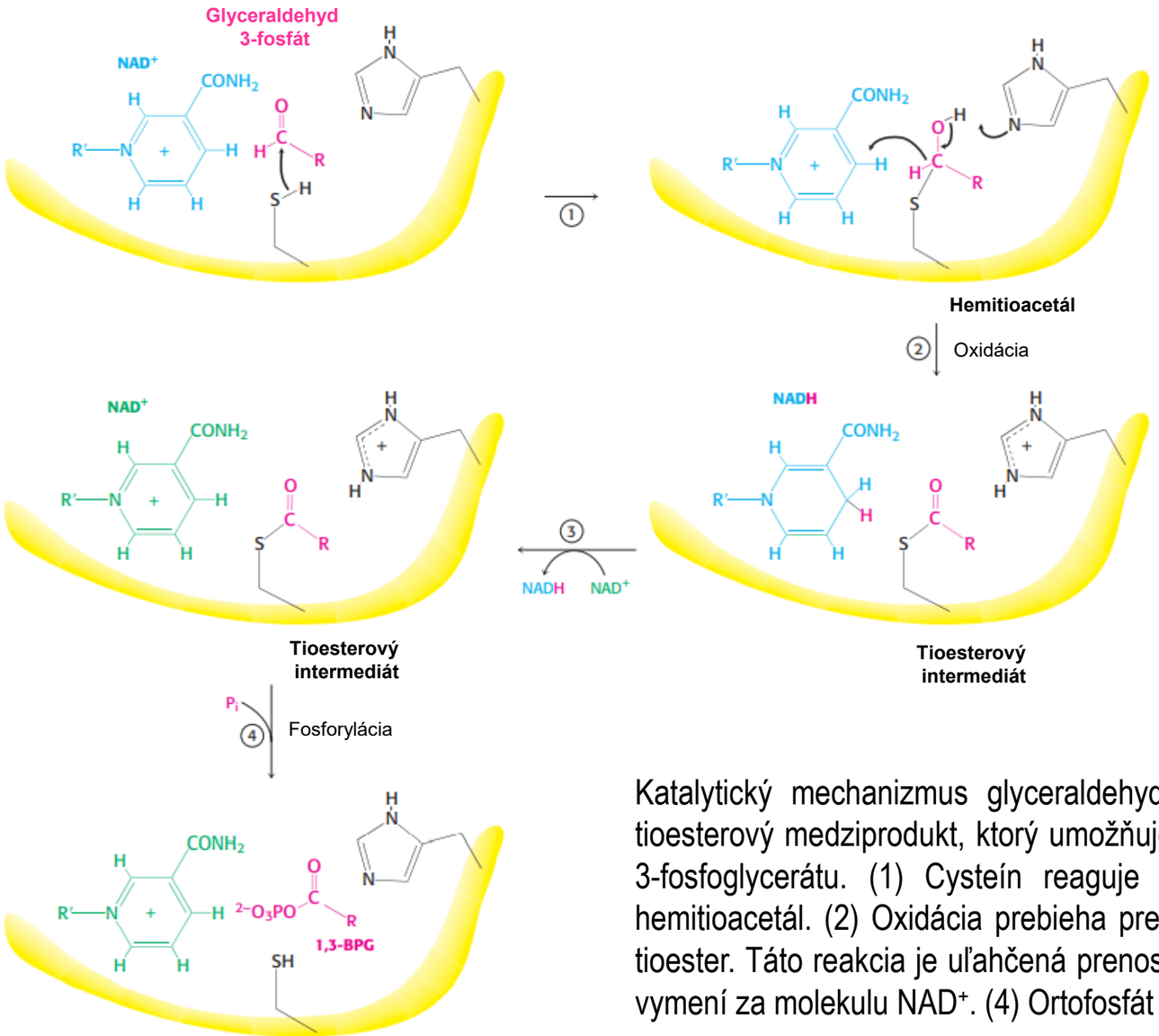




Profily voľnej energie pre oxidáciu glyceraldehydu nasledovanej tvorbou acylfosfátu. (A) Hypotetický prípad bez väzby medzi týmito dvoma procesmi. Druhý krok musí mať veľkú aktivačnú bariéru, vďaka ktorej je reakcia veľmi pomalá. (B) Skutočný priebeh týchto dvoch reakcií spojených cez tioesterový medziprodukt.

Prvá reakcia je termodynamicky priaznivá, so zmenou štandardnej Gibbsovej energie, $\Delta G^{0'}$, približne -50 kJ/mol, zatiaľ čo druhá reakcia je so zmenou štandardnej Gibbsovej energie zodpovedajúcou rovnakej amplitúde, ale s opačným znamienkom, výrazne nepriaznivá. Keby tieto dve reakcie jednoducho prebehli za sebou, druhá reakcia by musela prekonať veľmi veľkú aktivačnú energiu a preto by neprebiehala biologicky významnou rýchlosťou. Tieto dva procesy musia byť preto spojené tak, aby termodynamicky výhodná oxidácia aldehydu viedla k tvorbe acylfosfátu. Ako sú tieto reakcie spojené? Kľúčom je medziprodukt, ktorý vznikol v dôsledku oxidácia aldehydu, a ktorý je spojený s enzýmom tioesterovou väzbou. **Tioesterový medziprodukt má vyššiu Gibbsovu energiu** ako voľná karboxylová kyselina. Vidíme tu použitie **kovalentne enzýmovo-viazaného medziproduktu ako mechanizmu energetického spojenia (coupling)**.

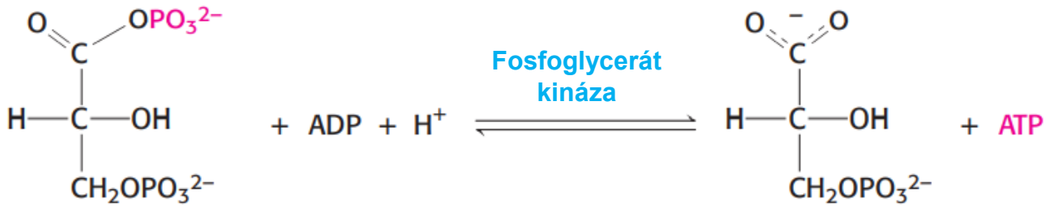
GLYKOLÝZA – POKRAČOVANIE (KROK 6)



Katalytický mechanizmus glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy. Reakcia prebieha cez tioesterový medziprodukt, ktorý umožňuje spojenie oxidácie glyceraldehydu s fosforyláciou 3-fosfoglycerátu. (1) Cysteín reaguje s aldehydovou skupinou substrátu, tvoriac tak hemitioacetál. (2) Oxidácia prebieha prenosom hydridového iónu do NAD^+, pričom vzniká tioester. Táto reakcia je uľahčená prenosom protónu na histidín. (3) Redukovaný NADH sa vymení za molekulu NAD^+. (4) Ortofosfát napáda tioester a vytvára produkt 1,3-BPG.

GLYKOLÝZA – POKRAČOVANIE (KROKY 7-10)

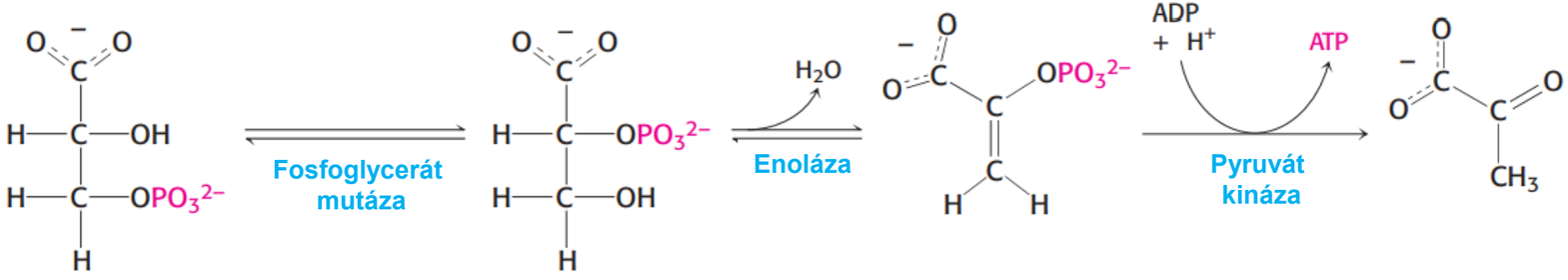
ATP je vytvorené prenosom fosforylu z 1,3-bisfosfoglycerátu. 1,3-bisfosfoglycerát je energeticky-bohatá molekula s väčším potenciálom na prenos fosforylu ako ATP.



1,3-bisfosfoglycerát **3-fosfoglycerát**

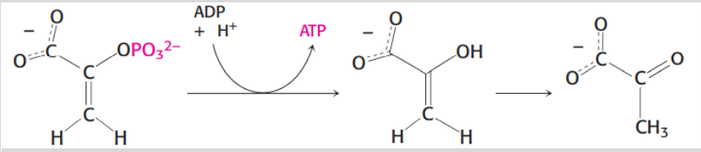
Tvorba ATP týmto spôsobom sa tiež označuje ako **fosforylácia na substrátovej úrovni**.

Vo zvyšných krokoch glykolýzy sa 3-fosfoglycerát transformuje na pyruvát a z ADP sa vytvorí druhá molekula ATP.



3-Fosfoglycerát **2-Fosfoglycerát** **Fosfoenolpyruvát** **Pyruvát**

$\Delta G^{0'}$ hydrolýzy fosfátového esteru bežného alkoholu je -13 kJ/mol, zatiaľ čo fosfoenolpyruvát je -62 kJ/mol.
Prečo má fosfoenolpyruvát taký vysoký potenciál prenosu fosforylu? Fosforylová skupina je zachytená v nestabilnej enol forme. Keď je fosforylová skupina darovaná za vzniku ATP, enol forma sa premení na stabilnejší ketón - konkrétne pyruvát.



Fosfoenolpyruvát **Pyruvát (enol)** **Pyruvát (keto)**

Vysoký potenciál prenosu fosforylu fosfoenolpyruvátu je primárne dôsledkom veľkej hnacej sily spojenej z následnou premenou enolu na ketón.

GLYKOLÝZA – ZHRNUTIE

Dve molekuly ATP sú vytvorené premenou glukózy na pyruvát. Sumárna reakcia transformácie glukózy na pyruvát je následovná:

Glukóza + 2 P_i + 2 ADP + 2 NAD^+ → 2 pyruvát + 2 ATP + 2 NADH + 2 H^+ + 2 H_2O

Uvoľnená energia pri anaeróbnej konverzii glukózy na 2 molekuly pyruvátu je približne 96 kJ/mol.

Reakcie Glykolýzy

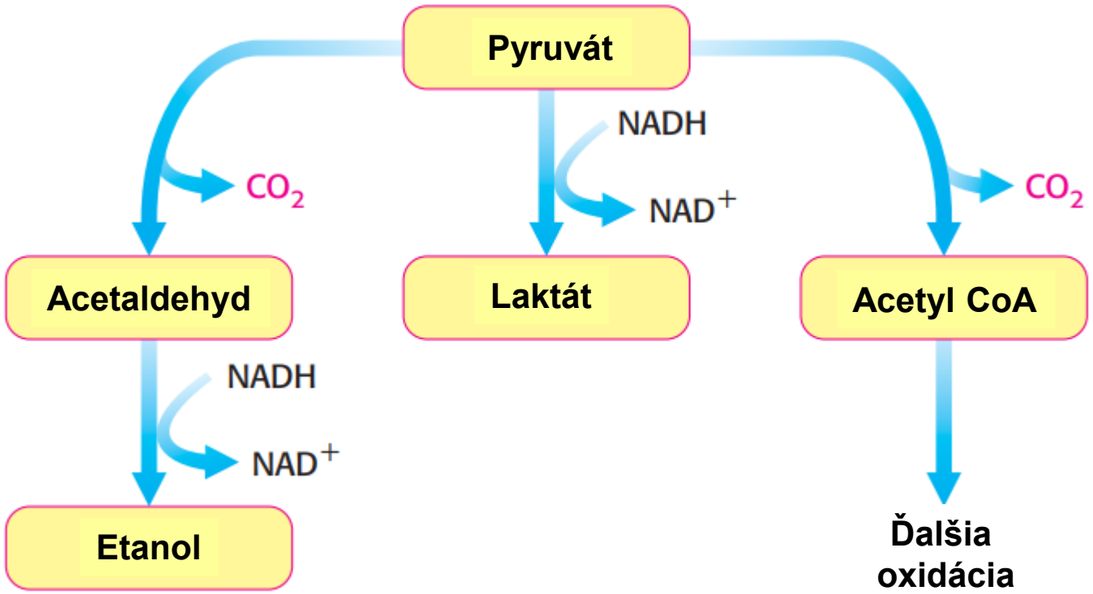
Krok	Reakcia	Enzým	Typ reakcie	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
1	**Glukóza+ATP → G-6P+ADP+H^+**	**Hexokináza**	**Prenos fosforylovej skupiny**	**-16.7**	**-33.5**
2	G-6P ↔ F-6P	Fosfofruktóza izomeráza	Izomerizácia	+1.7	-2.5
3	**F-6P+ATP → F-1,6-BP+ADP+H^+**	**Fosfofruktokináza**	**Prenos fosforylovej skupiny**	**-14.2**	**-22.2**
4	F-1,6-BP ↔ DHAP+GAP	Aldoláza	Aldolové štiepenie	+23.8	-1.3
5	DHAP ↔ GAP	Trióza fosfát izomeráza	Izomerizácia	+7.5	+2.5
6	GAP+P_i+NAD^+ ↔ 1,3-BPG+NADH+H^+	Glycerladehyde 3-fosfát dehydrogenáza	Fosforylácia spojená s oxidáciou	+6.3	-1.7
7	1,3-BPG+ADP ↔ 3-fosfoglycerát+ATP	Fosfoglycerát kináza	Prenos fosforylovej skupiny	-18.8	+1.3
8	3-fosfoglycerát ↔ 2-fosfoglycerát	Fosfoglycerát mutáza	Fosforylový shift	+4.6	+0.8
9	2-fosfoglycerát ↔ fosfoenolpyruvát+H_2O	Enoláza	Dehydratácia	+1.7	-3.3
10	**Fosfoenolpyruvát+ADP+H^+ → Pyruvát+ATP**	**Pyruvát kináza**	**Prenos fosforylovej skupiny**	**-31.4**	**-16.7**

ΔG, skutočná zmena Gibbsovej energie, bola vypočítaná z $\Delta G^{0'}$ a známych koncentrácií reaktantov a produktov za typických fyziologických podmienok. Glykolýza môže pokračovať iba ak sú hodnoty ΔG všetkých reakcií negatívne. Malé pozitívne hodnoty ΔG troch z vyššie uvedených reakcií naznačujú, že koncentrácie metabolitov *in vivo* v bunkách podstupujúcich glykolýzu nie sú celkom presne známe. **Zvýraznené reakcie** sú reakcie, ktoré určujú rýchlosť glykolýzy.

NAD^+ JE POTREBNÉ REGENEROVAŤ, ABY MOHLI PREBIEHAŤ PROCESY GLYKOLÝZY

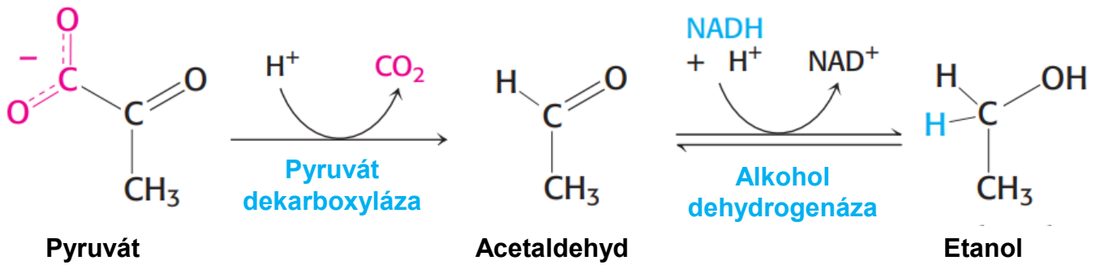
Glykolýza s koncovým produktom - pyruvátom - nebude môcť pokračovať, pretože redoxná rovnováha v tejto dráhe nie je zachovaná. Aktivita glyceraldehyd 3-fosfátdehydrogenázy, okrem toho, že vytvára zlúčeninu s vysokým potenciálom prenosu fosforylu, nevyhnutne vedie k redukcii NAD^+ na NADH. V bunke sú obmedzené množstvá NAD^+, ktorý je odvodený z vitamínu niacínu. Následne musí byť NAD^+ regenerovaný, aby mohla glykolýza prebiehať. Preto konečným procesom v tejto dráhe je regenerácia NAD^+ cez metabolizmus pyruvátu.

Detailnejšie preberieme 3 rôzne spôsoby metabolizmu pyruvátu:



NAD^+ JE POTREBNÉ REGENEROVAŤ, ABY MOHLI PREBIEHAŤ PROCESY GLYKOLÝZY

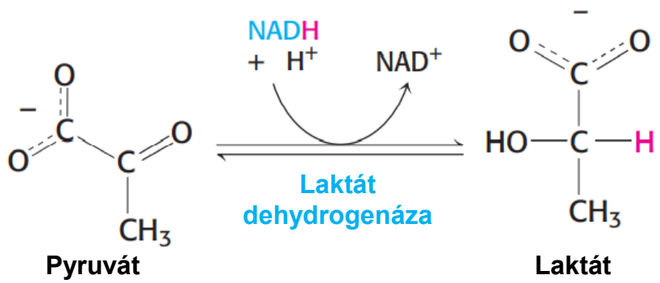
1. **Etanol** vzniká z pyruvátu v kvasinkách a niekoľkých ďalších mikroorganizmoch. Prvým krokom je dekarboxylácia pyruvátu. Táto reakcia je katalyzovaná **pyruvát dekarboxylázou**, ktorá si vyžaduje koenzým tiamín pyrofosfát. Tento koenzým je odvodený z vitamínu *tiamínu* (B_1). Druhým krokom je redukcia acetaldehydu na etanol pomocou NADH, v reakcii katalyzovanej **alkoholdehydrogenázou**. Tento proces regeneruje NAD^+:



Sumárna reakcia *alkoholového kvasenia*:

Glukóza + 2 P_i + 2 ADP + 2 H^+ → 2 etanol + 2 CO_2 + 2 ATP + 2 H_2O

2. **Laktát** sa tvorí z pyruvátu v rôznych mikroorganizmoch v procese známom ako mliečne kvasenie. Redukcia pyruvátu pomocou NADH za tvorby laktátu je katalyzovaná enzýmom **laktátdehydrogenáza**:



Sumárna reakcia *mliečneho kvasenia*:

Glukóza + 2 P_i + 2 ADP → 2 laktát + 2 ATP + 2 H_2O

3. V aeróbnych podmienkach dochádza k ďalšiemu spracovaniu pyruvátu *oxidatívnou dekarboxyláciou* a vzniknutý **acetyl CoA** vstupuje do citrátovho cyklu:

Pyruvát + NAD^+ + CoA → Acetyl CoA + CO_2 + NADH + H^+

K regenerácii NAD^+, potrebnej pre oxidáciu GAP, dochádza prenosom elektrónov z NADH na O_2 v dýchacom reťazci v mitochondriách.

FERMENTÁCIA

Kvasením (fermentáciou) sa získa iba zlomok energie dostupnej z úplnej oxidácie glukózy.
Prečo je táto relatívne neúčinná metabolická cesta tak extenzívne používaná? Zásadným dôvodom je, že pri fermentácii kyslík nie je potrebný.

Schopnosť prežiť bez kyslíka poskytuje množstvo variácií životného prostredia, ako sú pôdy, hlboká voda a póry pokožky. Niektoré organizmy, tzv. **obligátne anaeróby**, nemôže prežiť v prítomnosti O_2, ktorý je možno povazovať za vysoko reaktívnu zlúčeninu.
Napríklad, baktéria *Clostridium perfringens*, pôvodca gangrény, alebo *Clostridium botulinum*, zdroj zvlášť nebezpečnej otravy jedlom, sú príklady obligátnych anaeróbov.

Kostrové svaly u väčšiny zvierat môžu fungovať anaeróbne počas krátkych intervalov, napríklad počas intenzívneho fyzického výkonu. Pri takomto výkone dochádza k rýchlej únave v dôsledku zvyšenej koncentrácie laktátu, ktorý vo svaloch vzniká.

Hoci sme spomenuli iba alkoholovú a mliečnu fermentáciu, keď koncovými produktami kvasenia sú etanola alebo laktát (kyselina mliečna), mikroorganizmy sú schopné generovať širokú škálu molekúl ako konečné produkty fermentácie.

V praxi sa tieto schopnosti organizmov intenzívne využívajú napr. pri výrobe potravinárskych výrobkov, vrátane kyslej smotany, jogurtu, rôznych syrov, piva, vína, kyslej kapusty.

Začiatočný a koncový bod rôznych fermentácií

Glukóza	→	laktát
Laktát	→	acetát
Glukóza	→	etanol
Etanol	→	acetát
Arginín	→	oxid uhličitý
Pyrimidíny	→	oxid uhličitý
Puríny	→	formát
Treonín	→	propionát
Leucín	→	2-alkylacetát
Fenylalanín	→	propionát

GLYKOLÝZA – REGULÁCIA A RIADENIE

Glykolýza má dvojakú úlohu: degraduje glukózu pričom vytvára ATP a poskytuje stavebné zlúženiny pre syntetické reakcie, ako je tvorba mastných kyselín. Rýchlosť premeny glukózy na pyruvát sa reguluje tak, aby vyhovovala týmto dvom hlavným bunkovým potrebám. V metabolických cestách sú enzýmy katalyzujúce v podstate ireverzibilné reakcie potenciálnymi miestami kontroly tohto procesu.

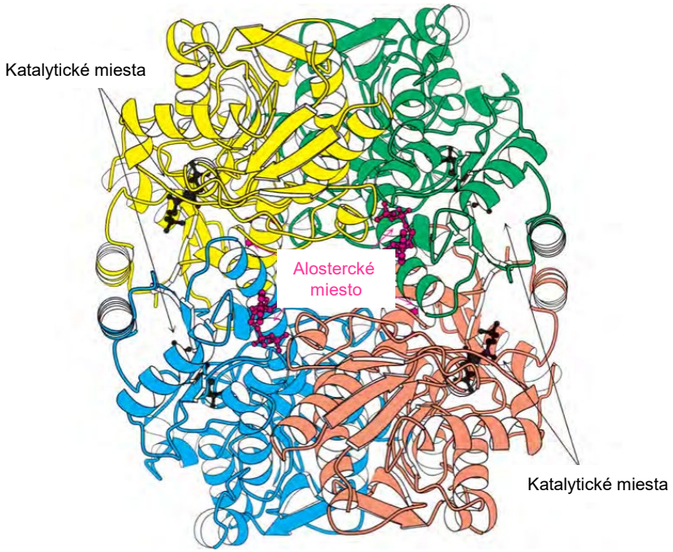
V glykolýze sú reakcie katalyzované **hexokinázou**, **fosfofruktokinázou** a **pyruvátkinázou** prakticky ireverzibilné. V skutočnosti tieto enzýmy predstavujú kontrolné miesta glykolytickej dráhy.

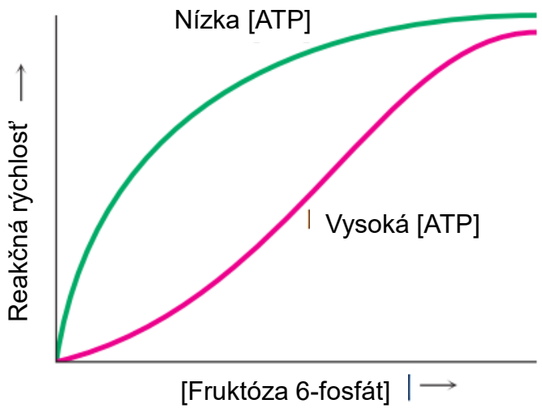
Regulácia glykolýzy vo *svaloch* a v *pečeni*.

- Regulácia glykolýzy vo svaloch odráža primárnu funkciu svalov a **potrebu ATP** na ich funkciu. Primárnym kontrolným parametrom je energetický náboj bunky, t.j. pomer konentrácie ATP a AMP.

Fosfofruktokináza je najdôležitejším kontrolným miestom glykolýzy.

ATP sa viaže na špecifické regulačné miesto, ktoré je odlišné od katalytického miesta. Väzba ATP znižuje afinitu enzýmu k fruktóza 6-fosfátu - vysoká koncentrácia ATP prevádza hyperbolickú väzbovú krivku fruktóza 6-fosfát na sigmoidnú.





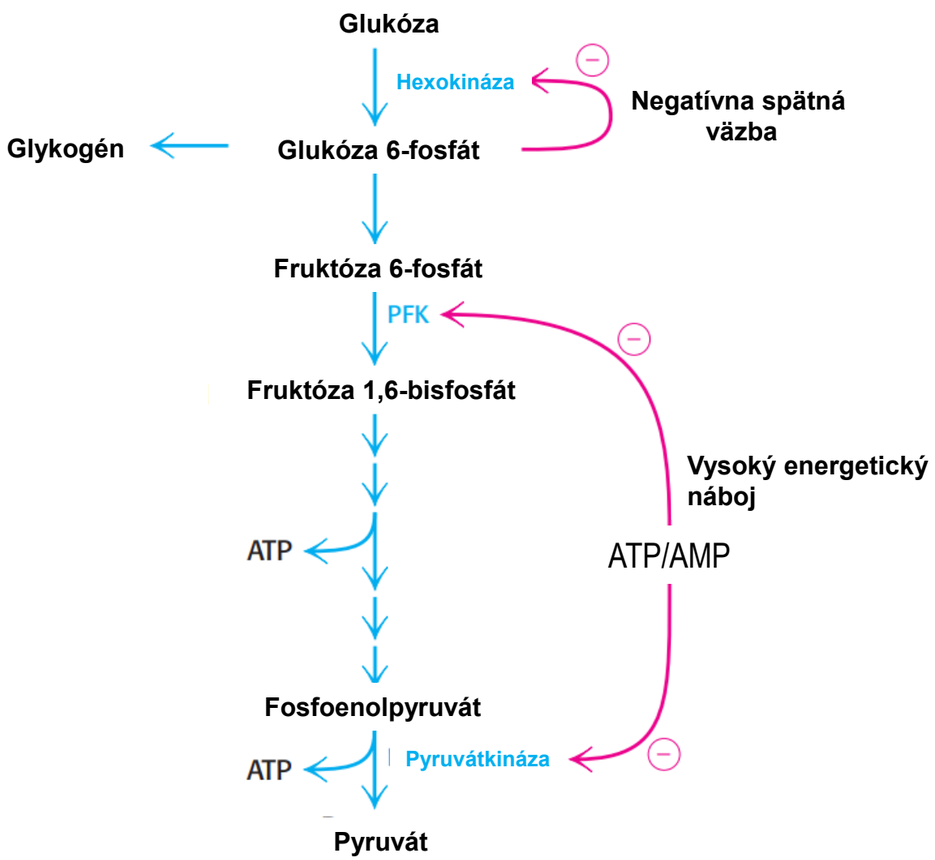
Zníženie pH tiež inhibuje aktivitu fosfofruktokinázy zvýšením inhibičného účinku ATP. K poklesu pH môže dôjsť počas anaeróbnej činnosti svalu, keď sa produkuje nadmerné množstvo kyseliny mliečnej. Inhibičný účinok chráni sval pred poškodením v dôsledku akumulácie príliš veľkého množstva kyseliny.

Hexokináza je inhibovaná produktom reakcie, ktorú katalyzuje, glukózou 6-fosfátom. Vysoké koncentrácie G-6P signalizujú, že bunka nepotrebuje glukózu na tvorbu energie alebo na syntézu glykogénu a glukóza tak ostáva v krvi. Vzostup v koncentrácii G-6P je prostriedok, ktorým komunikuje fosfofruk tokináza s hexokinázou. Keď je fosfofruktokináza neaktívna, koncentrácia F-6P stúpa a následne aj koncentrácia G-6P.

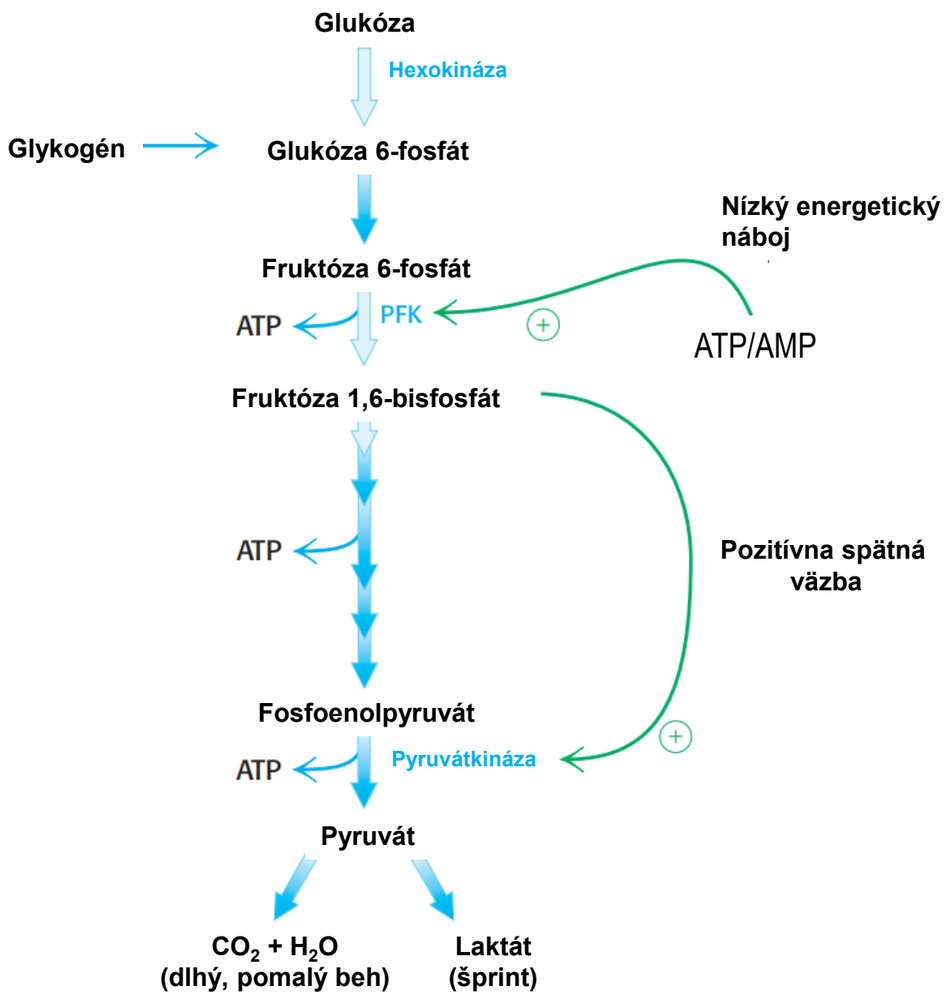
Pyruvátkináza je alostericky inhibovaná ATP a alanínom (syntetizovaný z pyruvátu). Naopak, F-1,6-BP aktivuje pyruvátkinázu.

REGULÁCIA GLYKOLÝZY VO SVALOCH

V pokoji – glykolýza je ***inhibovaná***



Počas cvičenia – glykolýza je ***aktivovaná***

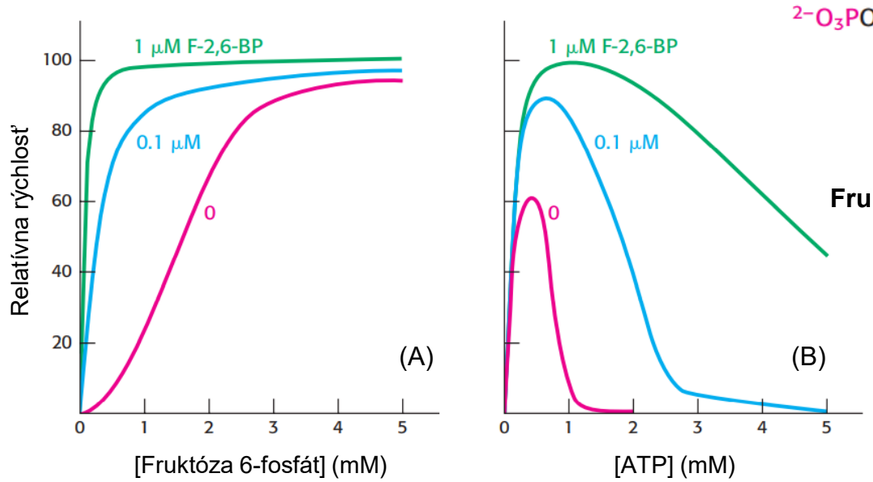


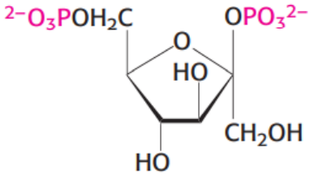
REGULÁCIA GLYKOLÝZY V PEČENI

Pečeň má rozmanitejšie biochemické funkcie ako sval. Pečeň udržuje hladinu glukózy v krvi, ukladá glukózu ako glykogén, keď je glukózy dostatok a uvoľňuje glukózu, keď je jej nedostatok. Používa glukózu na generovanie redukčnej sily pre biosyntézu a podieľa sa na syntéze množstva zlúčenín. Takže aj keď pečeň reguluje glykolýzu podobne ako je to vo svaloch, regulácia glykolýzy v pečeni je zložitejšia.

Fosfofruktokináza. Regulácia pomocou **ATP** je rovnaká v pečeni ako vo svale. **Nízke pH** nie je metabolickým signálom pre pečeňový enzým, pretože laktát sa normálne v pečeni nevytvára. Je však inhibovaná **citrátom**, počiatočným medziproduktom v citrátovom cykle. Vysoká hladina citrátu v cytoplazme znamená, že biosyntetické prekurzory sú v nadbytku, a preto nie je potrebné odbúravať ďalšiu glukózu na tento účel.

Jedným z prostriedkov, pomocou ktorých glykolýza v pečeni reaguje na zmeny v koncentrácii glukózy v krvi, je signálna molekula **fruktóza 2,6-bisfosfát (F-2,6-BP)**, ktorá je silným aktivátorom fosfofruktokinázy.



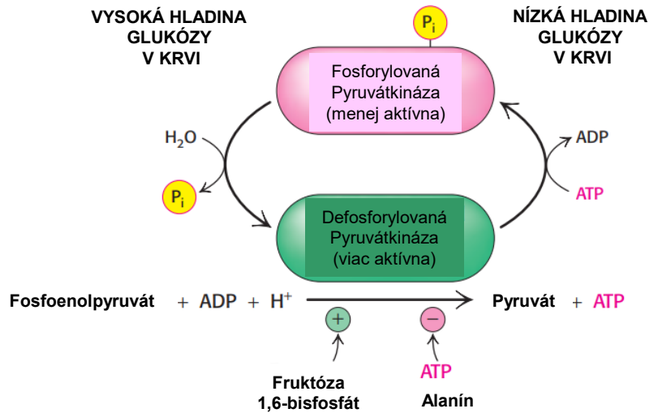


Fruktóza 2,6-bisfosfát

Aktivácia fosfofruktokinázy F-2,6-BP. (A) Sigmoidálna závislosť rýchlosti od koncentrácie substrátu sa stáva hyperbolickou v prítomnosť 1 μM F-2,6-BP. (B) ATP, pôsobiaci ako substrát, spočiatku stimuluje reakciu. Ako sa koncentrácia ATP vvyšuje, pôsobí ako alosterický inhibítor. Inhibičný účinok ATP je zvrátený F-2,6-BP.

Hexokináza. Hexokinázová aktivita v pečeni je kontrolovaná ako vo svaloch. Avšak pečeň, v rámci svojej úlohy monitorovania hladiny glukózy v krvi, má ďalší špecializovaný izozým hexokinázy, tzv. **glukokináza**, ktorá nie je inhibovaná G 6-P. Glukokináza fosforyluje glukózu iba vtedy, keď je jej dostatok v dôsledku afinity glukokinázy ku glukóze, ktorá je asi 50-krát nižšia ako v prípade hexokinázy. Úlohou glukokinázy je poskytnúť G 6-P pre syntézu glykogénu a na tvorbu mastných kyselín.

Pyruvát kináza. Existuje niekoľko izozymických foriem pyruvátkinázy u cicavcov: typ L prevláda v pečeni a typ M vo svaloch a mozgu. L a M formy pyruvátkinázy majú veľa vlastností spoločných, avšak líšia sa citlivosťou na kovalentné modifikácie. Katalytické vlastnosti L formy - ale nie M formy - sú riadené reverzibilnou fosforyláciou. Keď je hladina krvnej glukózy nízka, cyklicky sa spúšťa glukagónom indukovaná AMP kaskáda, ktorá vedie k fosforylácii pyruvátkinázy, čo znižuje jej aktivitu. Táto fosforylácia vyvolaná hormónmi zabraňuje spotrebe glukózy, keď je potrebná pre mozog a svaly.



ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať základné fázy glykolýzy
- Popísať jednotlivé reakcie glykolýzy
- Popísať rôzne spôsoby metabolizmu pyruvátu
- Spôsoby regulácie glykolýzy

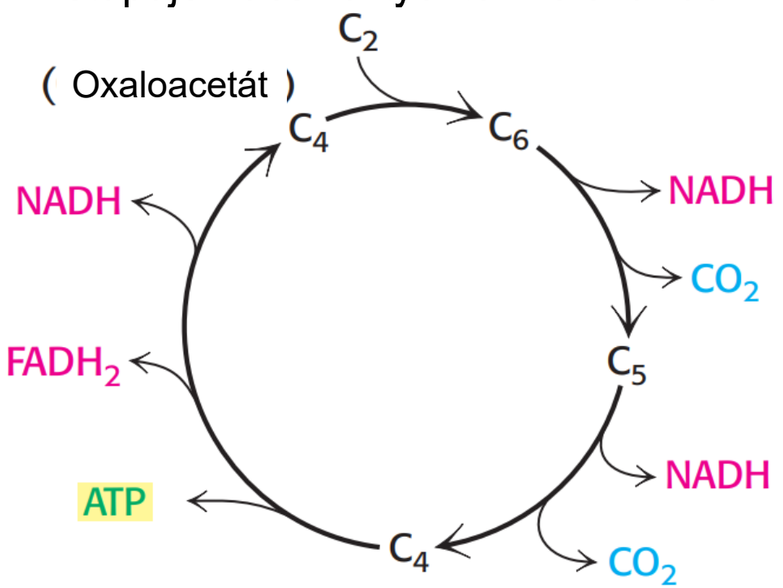
Citrátový (Krebsov) cyklus
3

Pyruvát dehydrogenáza
Jednotlivé reakcie citrátového cyklu
Regulácia citrátového cyklu
Glyoxylátový cyklus

CITRÁTOVÝ CYKLUS – CYKLUS TRIKARBOXYLOVEJ KYSELINY (TCA) – KREBSOV CYKLUS

V metabolizme glukózy na pyruvát v glykolýze sa v prípade anaeróbneho procesu získavá iba zlomok ATP dostupného z celkovej oxidácie glukózy. Väčšina ATP generovaného v metabolizme je získaná pri aeróbnom spracovaní glukózy. Tento proces začína úplnou oxidáciou derivátov glukózy na oxid uhličitý. Táto oxidácia prebieha v rade reakcií tvoriacich tzv. **cyklus kyseliny citrónovej**, tiež známy pod názvom **cyklus trikarboxylovej kyseliny** (TCA) alebo **Krebsov cyklus**. Cyklus kyseliny citrónovej, tiež **citrátový cyklus**, je poslednou spoločnou cestou oxidácie molekúl predstavujúcich zdroje energie - sacharidov, mastných kyselín a aminokyselín. Po transformácii vstupuje väčšina týchto molekúl do Krebsovho cyklu ako **acetyl koenzým A**.

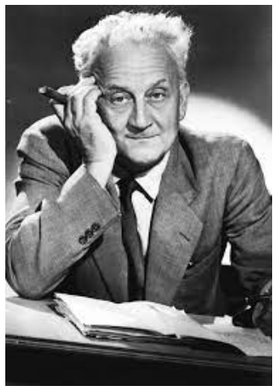
Citrátový cyklus je centrálnym metabolickým uzlom bunky. Je to brána ku aeróbnemu metabolizmu akejkoľvek molekuly, ktorá sa dá transformovať na acetylovú skupinu alebo zložka citrátového cyklu. Cyklus je tiež dôležitý zdroj prekurzorov pre stavebné bloky mnohých ďalších molekúl, ako sú aminokyseliny, nukleotidové bázy a porfyrín (organická zložka hemu). Zložka cyklu citrónovej kyseliny, oxaloacetát, je tiež dôležitým prekurzorom glukózy.



Citrátový cyklus oxiduje dvojuhlíkové jednotky, ktoré produkujú dve molekuly CO_2, jednu molekulu ATP a „vysoko-energetické“ elektróny vo forme NADH a $FADH_2$.

CITRÁTOV CYKLUS – HISTORICKÝ EXKURZ

Albert Szent-Györgyi – pripisuje sa mu prvá izolácia vitamínu C a objavenie zložiek a reakcií Citrátového cyklu.



Albert Szent-Györgyi (1893-1986)
Nobelova cena za Fyziológiu a medicínu
v roku 1937.

Sir Hans Adolf Krebs - je známy predovšetkým vďaka objavom dvoch dôležitých sekvencií chemických reakcií, ktoré prebiehajú v bunkách ľudí a mnohých ďalších organizmov, a to cyklu kyseliny citrónovej a močovinového cyklu.

The manuscript proposing the citric acid cycle was submitted for publication to *Nature* but was rejected in June 1937. That same year it was published in *Enzymologia*. Dr. Krebs proudly displayed the rejection letter throughout his career as encouragement for young scientists.

"The editor of NATURE presents his compliments to Dr. H. A. Krebs and regrets that as he has already sufficient letters to fill the correspondence columns of NATURE for seven or eight weeks, it is undesirable to accept further letters at the present time on account of the time delay which must occur in their publication.

If Dr. Krebs does not mind much delay the editor is prepared to keep the letter until the congestion is relieved in the hope of making use of it.

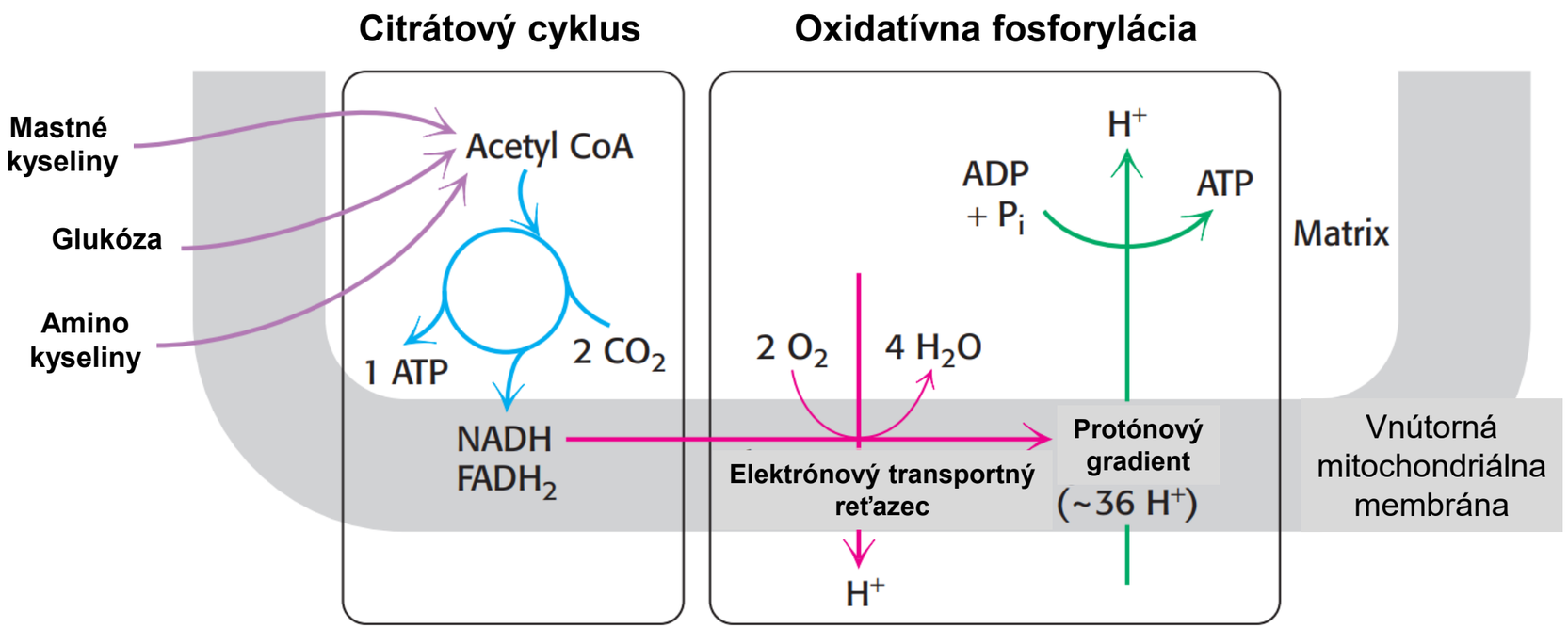
He returns it now, in case Dr. Krebs prefers to submit it for early publication to another periodical."

Sir Hans Adolf Krebs (1900-1981)
Nobelova cena za Fyziológiu a medicínu
v roku 1953.

William Arthur Johnson (1913-??)
PhD študent v laboratóriu Prof. Krebsa,
ktorý sa významným spôsobom podieľal
na popise citrátového cyklu.

CITRÁTOV CYKLUS – PRVÁ FÁZA BUNKOVÉHO DÝCHANIA

Citrátový cyklus v spojení s oxidatívnou fosforyláciou poskytuje energiu využívanú aeróbnymi bunkami - u ľudí, je to viac ako 90%.



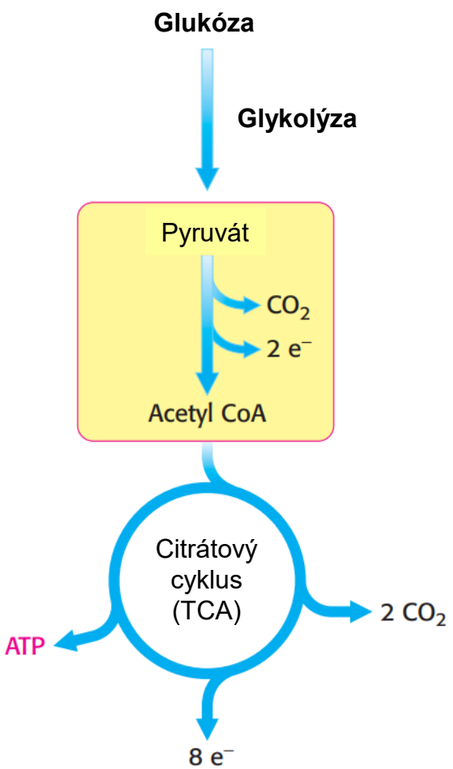
Bunkové dýchanie. Citrátový cyklus predstavuje prvý stupeň v bunkovom dýchaní, premiestnenie „vysoko-energetických“ elektrónov z molekúl obsahujúcih uhík apredstavujúcich zdroj energie do NADH a $FADH_2$ (vľavo). Tieto elektróny redukujú O_2 a vytvárajú protónový gradient na vnútornej mitochondtiálnej membráne v eukaryotoch alebo cytoplazmatickej membráne v baktériách (červená cesta), ktorý sa používa na syntézu ATP (zelená cesta). Redukcia O_2 a syntéza ATP predstavujú oxidatívnu fosforyláciu.

PYRUVÁT DEHYDROGENÁZA SPÁJA GLYKOLÝZU S CITRÁTOVÝM CYKLOM

Sacharidy, predovšetkým glukóza, sa spracovávajú glykolýzou na pyruvát. Za aeróbnych podmienok je pyruvát transportovaný do mitochondrií špecifickým nosičom zabudovaným do mitochondriálnej membrány. V mitochondriálnej matrici je pyruvát oxidačne dekarboxylovaný v komplexe pyruvátdehydrogenázy za vzniku acetyl CoA:

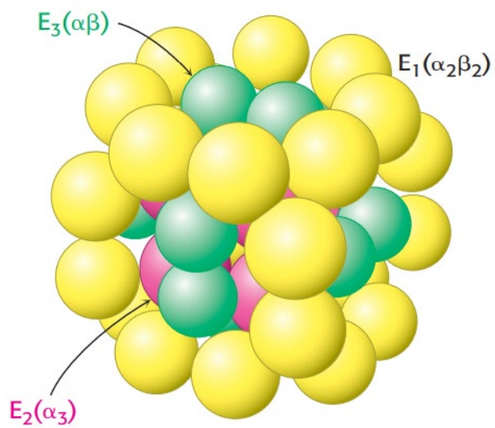
$$\text{Pyruvát} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Acetyl CoA} + CO_2 + \text{NADH} + H^+$$

Táto ireverzibilná reakcia spája glykolýzu s citrátovým cyklom. Komplex pyruvátdehydrogenázy produkuje CO_2 a zachytáva vysoko-energetické elektróny vo forme NADH. Reakcia pyruvát-dehydrogenázy má teda veľa kľúčových znakov spoločných s reakciami samotného citrátové-ho cyklu.



Komplex pyruvátdehydrogenázy je vysoko integrovaný komplex troch odlišných enzýmov. Pyruvátdehydrogenázový komplex je členom rodiny homológnych komplexov, ktoré zahŕňajú komplex enzýmu α-ketoglutarátdehydrogenázy z citrátového cyklu. Tieto komplexy sú obrovské, väčšie ako ribozómy, s molekulovou hmotnosťou v rozmedzí od 4 miliónov do 10 miliónov Daltonov.

Schematické znázornenie komplexu pyruvát-dehydrogenázy. Jadro transacetylázy (E2) je zobrazené červenou farbou, zložka pyruvátdehydrogenázy (E1) v žltej farbe a dihydrolipoyl dehydrogenáza (E3) je označená zelenou farbou.

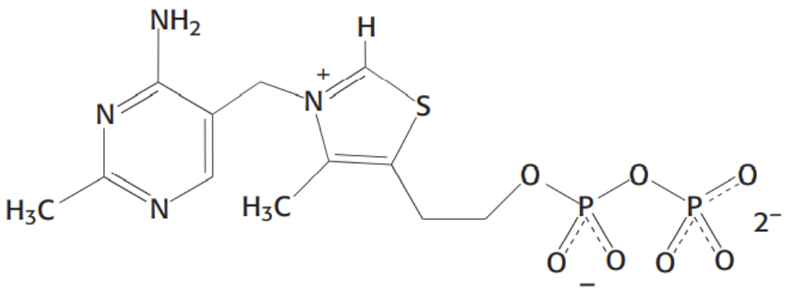


Pyruvátdehydrogenázny komplex z *E.coli*

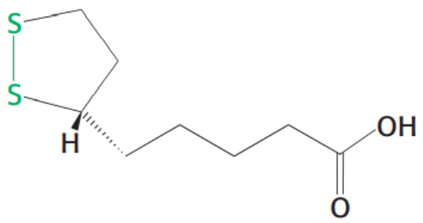
Enzým	Skratka	Počet reťazcov	Prostetická skupina	Katalyzovaná reakcia
Pyruvát dehydrogenázna zložka	**E_1**	**24**	**TPP**	**Oxidatívna dekarboxylácia pyruvátu**
Dihydrolipoyl transacetyláza	E_2	24	Lipoamid	Prenos acetylovej skupiny do CoA
Dihydrolipoyl dehydrogenáza	**E_3**	**12**	**FAD**	**Regenerácia oxidovanej formy lipoamidu**

MECHANIZMUS PREMENY PYRUVÁTU NA ACETYL CoA

Premena pyruvátu an acetyl CoA vyžaduje účasť troch enzýmov pyruvátdehydrogenázneho komplexu a päť koenzýmov:
tiamín pyrofosfát (TPP), lipoová kyselina, FAD ako katalytický kofaktor, CoA a NAD^+ ako stechiometrické kofaktory, t.j. kofaktory slúžiace ako substrát.

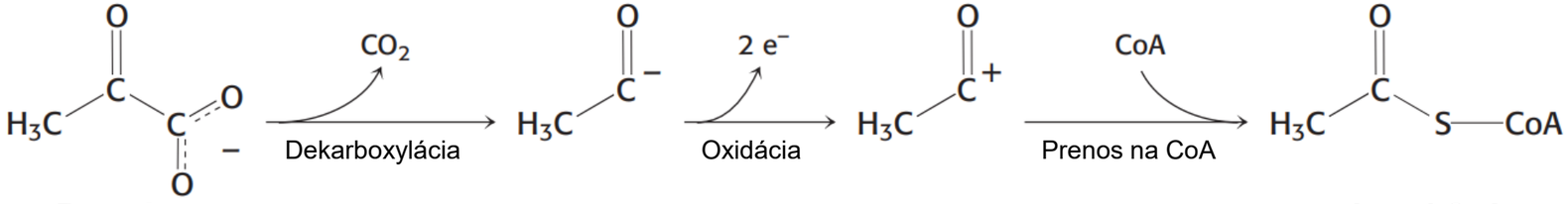


Tiamín pyrofosfát (TPP)



Lipoová kyselina

Konverzia pyruvátu na acetyl CoA pozostáva z troch krokov:
(1) dekarboxylácie, (2) oxidácie a (3) prenosu acetylovej skupiny na CoA:

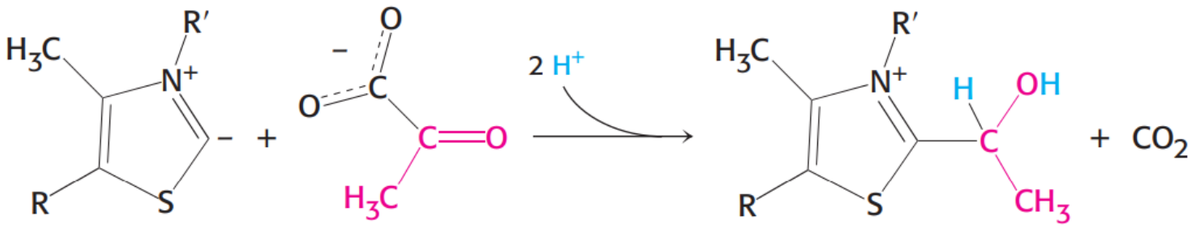


Pyruvát

Acetyl CoA

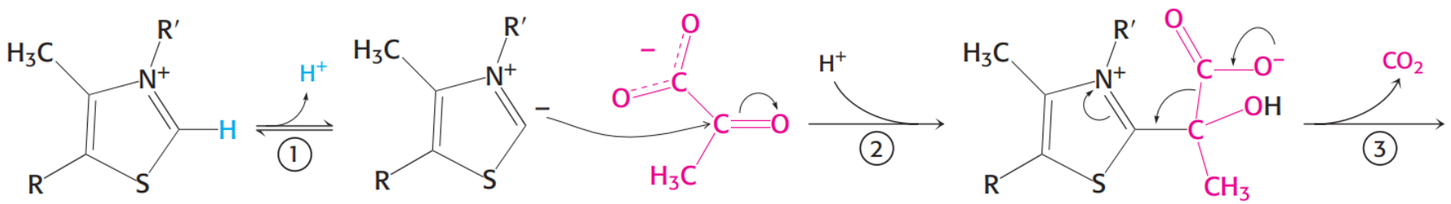
(1) Dekarboxylácia pyruvátu

Pyruvát reaguje s TPP a dekarboxylácia vedie k vzniku hydroxyetyl-TPP. Táto reakcia je katalyzovaná **zložkou pyruvátdehydrogenázneho (E_1)** multienzýmového komplexu, TPP je prostetickou skupinou tohto komplexu:

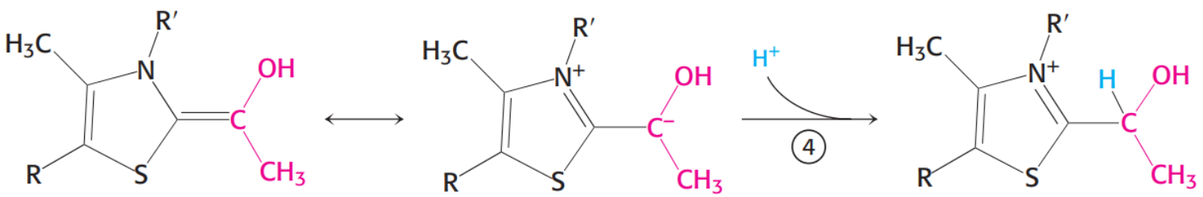


Karbanión TPP **Pyruvát** **Hydroxyetyl-TPP**

Mechanizmus dekarboxyláznej reakcie E_1:



TPP **Karbanión** **Pyruvát** **Adičný produkt**

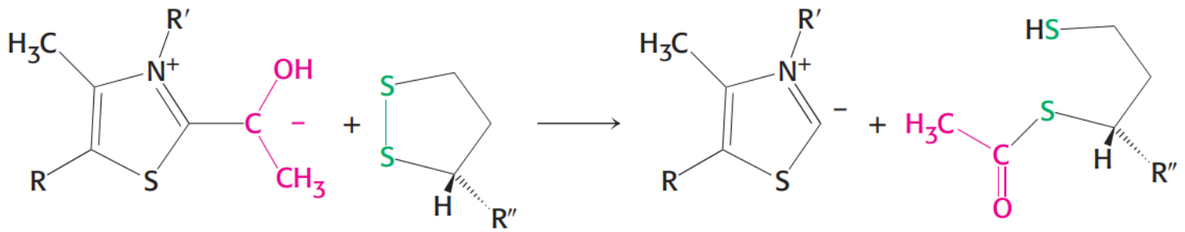


Rezonančné formy hydroxyetyl-TPP **Hydroxyetyl-TPP**

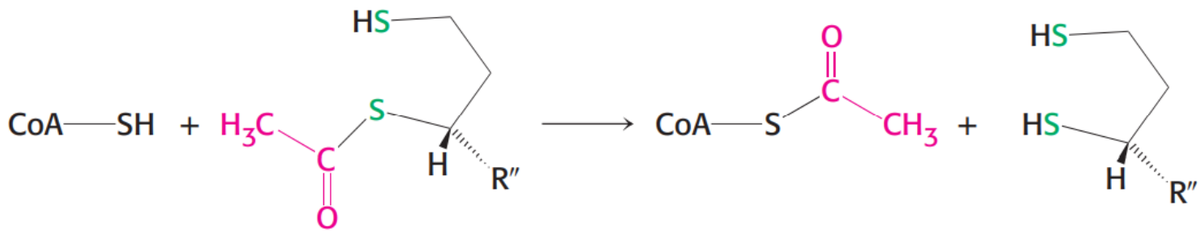
Kľúčovou vlastnosťou TPP je to, že atóm uhlíka medzi dusíkom a atómom síry v tiazolovom kruhu je oveľa viac kyslý ako väčšina skupín =CH- s pK_a hodnotou blízko 10. (1) Toto uhlíkové centrum sa ionizuje a vytvára *karbanió*n. (2) Karbanión ľahko reaguje s karbonylovou skupinou pyruvátu. (3) Po tejto adícii nasleduje dekarboxylácia pyruvátu. Pozitívne nabitý kruh TPP funguje ako „nasávač elektrónov“ („electron sink“), ktorý stabilizuje záporný náboj, ktorý sa vytvorí na tiazolovom kruhu v dôsledku dekarboxylácie. (4) Protonácia vedie k vzniku hydroxyetyl-TPP.

(2) Oxidácia a (3) Tvorba Acetyl CoA

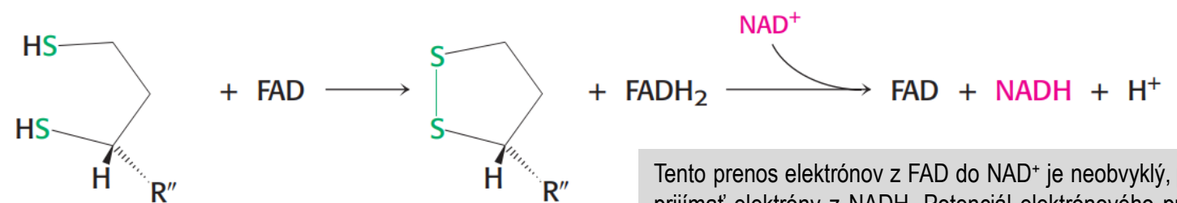
(2) **Oxidácia**. Hydroxyetylová skupina pripojená k TPP sa *oxiduje* za vzniku acetylovej skupiny, pričom sa súčasne prevádza na lipoamid, derivát kyseliny lipoovej, ktorý je spojený s bočným reťazcom lyzínového zvyšku pomocou amidovej väzby. Tento prenos vedie k vytvoreniu energeticky bohatej tioesterovej väzby. Oxidantom v tejto reakcii je disulfidová skupina lipoamidu, ktorá je redukovaná na svoju disulfhydrylovú formu. Táto reakcia, tiež katalyzovaná zložkou E_1 pyruvátdehydrogenázy, poskytuje acetyllipoamid.



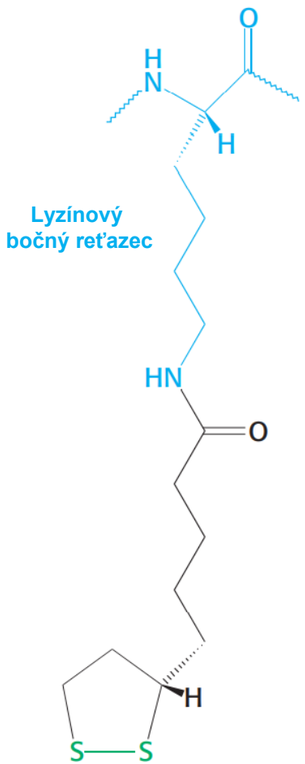
(3) **Tvorba Acetyl CoA**. Acetylová skupina z acetyllipoamidu je prenesená na CoA za tvorby acetyl CoA. Túto reakciu katalyzuje **dihydrolipoyltransacetyláza (E_2)**:



V poslednom kroku sa oxidovaná forma lipoamidu regeneruje dihydrolipoyldehydrogeázou (E_3). Dva elektróny sa prenesú do FAD prostetickej skupiny enzýmu a potom na NAD^+.

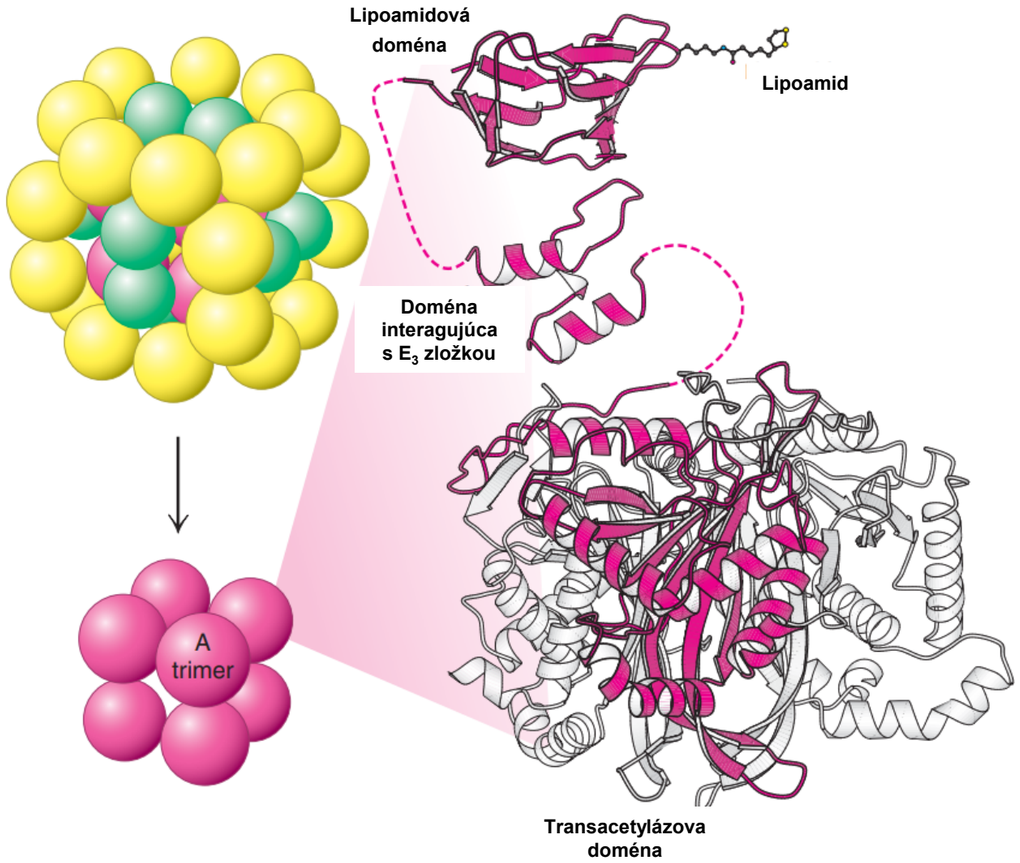


Tento prenos elektrónov z FAD do NAD^+ je neobvyklý, pretože bežnou úlohou FAD je prijímať elektróny z NADH. Potenciál elektrónového prenosu z FAD je zvýšený jeho chemickým prostredím v enzýme, ktorý mu umožňuje prenos elektrónov na NAD^+.

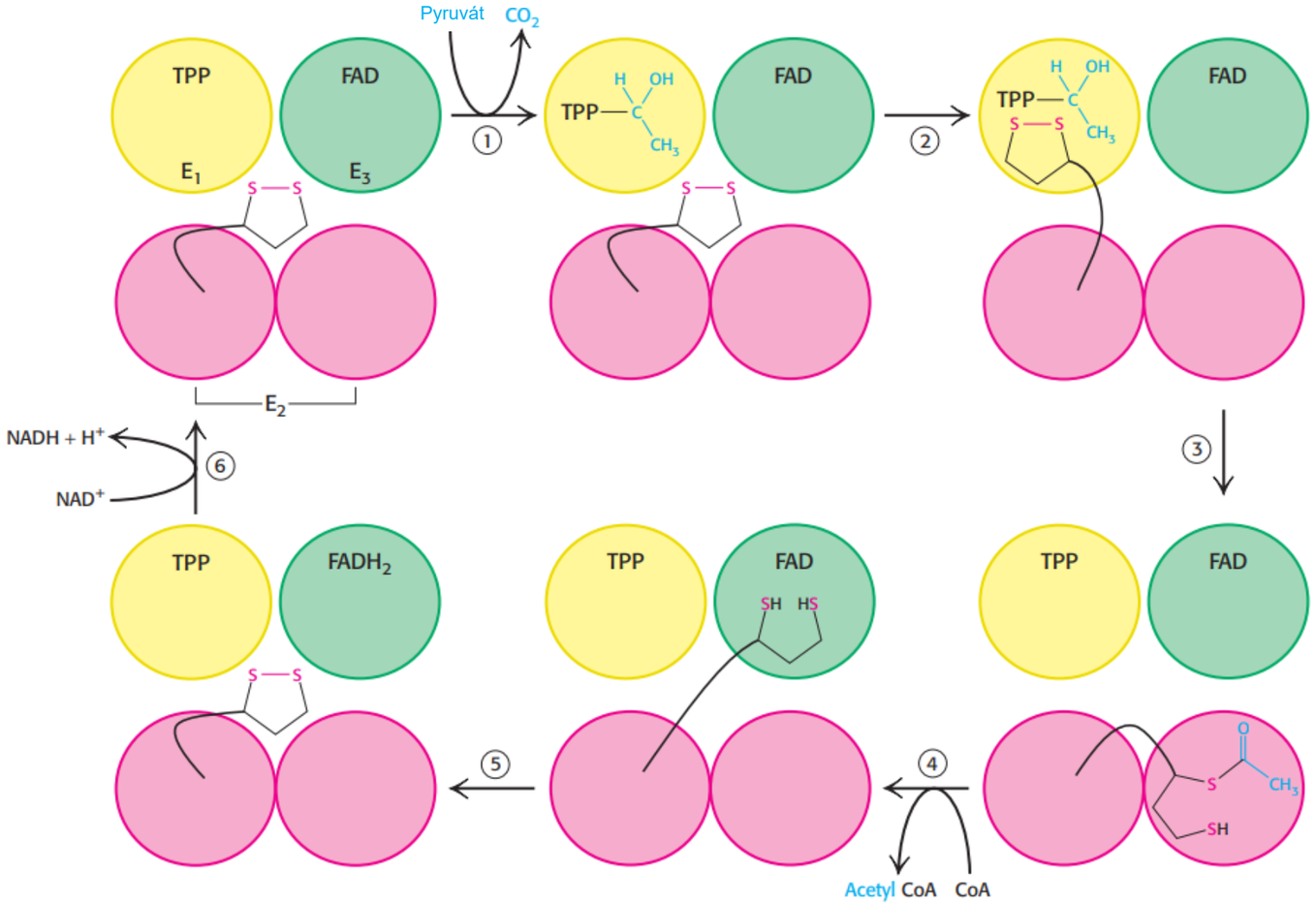


Lipoamid

Reakcie Pyruvátdehydrogenázneho komplexu



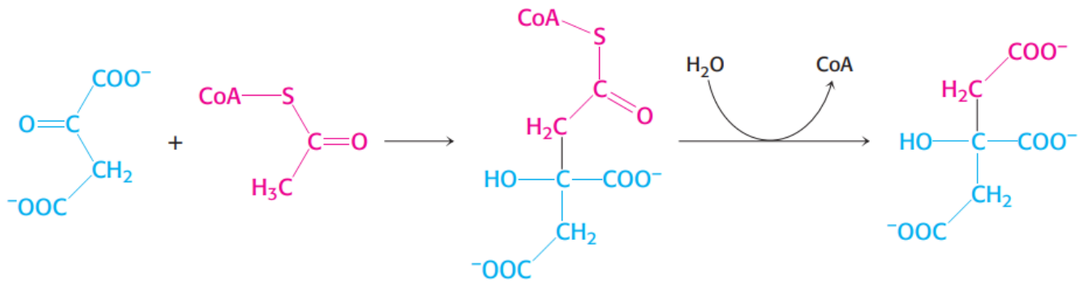
Štruktúra jadra transacetylázy (E_2). Každá červená guľa predstavuje trimér troch podjednotiek E_2. Každá podjednotka sa skladá z troch domén: doména viažuca lipoamid, malá doména pre interakciu s E_3 a veľká transacetylázová katalytická doména. Transacetylázová doména má tri identické podjednotky, z ktorých jedna je zobrazená červenou farbou a ostatné sú zobrazené bielou farbou.



Reakcie pyruvátdehydrogenázneho komplexu. (1) Pyruvát je dekarboxylovaný za vzniku hydroxyetyl-TPP. (2) Lipoamidové rameno E_2 sa presunie do aktívneho miesta E_1. (3) E_1 katalyzuje prenos dvojuhlíkovej skupiny na lipoamid za vzniku komplexu acetyl-lipoamid. (4) E_2 katalyzuje prenos acetylovej časti na CoA za vzniku produktu Acetyl CoA. Rameno dihydrolipoamidu sa potom prehupne na aktívne miesto E_3. E_3 katalyzuje (5) oxidáciu kyseliny dihydrolipoamidovej a (6) prenos protónov a elektrónov na NAD^+ na dokončenie reakčného cyklu.

CITRÁTOVÝ CYKLUS – 1.KROK

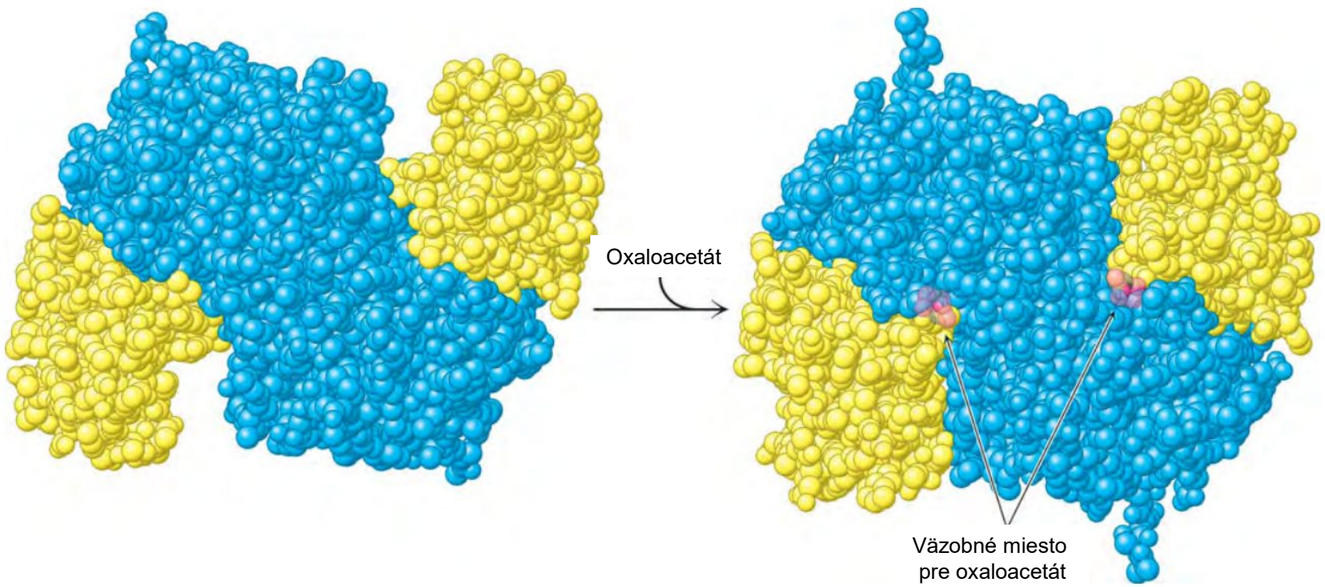
Citrátsyntáza tvorí citrát z oxaloaetátu a acetyl koenzýmu A:



Táto reakcia - aldolová kondenzácia nasledovaná hydrolýzou, je katalyzovaná enzýmom **citrátsyntázou**. Oxaloacetát najskôr kondenzuje s **acetyl CoA** za vzniku **citryl CoA**, molekuly, ktorá je energeticky bohatá, pretože obsahuje tioesterovú väzbu. Hydrolýza tioesteru Citrylu CoA na citrát a CoA ženie celkovú reakciu v smere syntézy Citrátu. V podstate hydrolýza tioesteru umožňuje syntézu novej molekuly z dvoch prekurzorov.

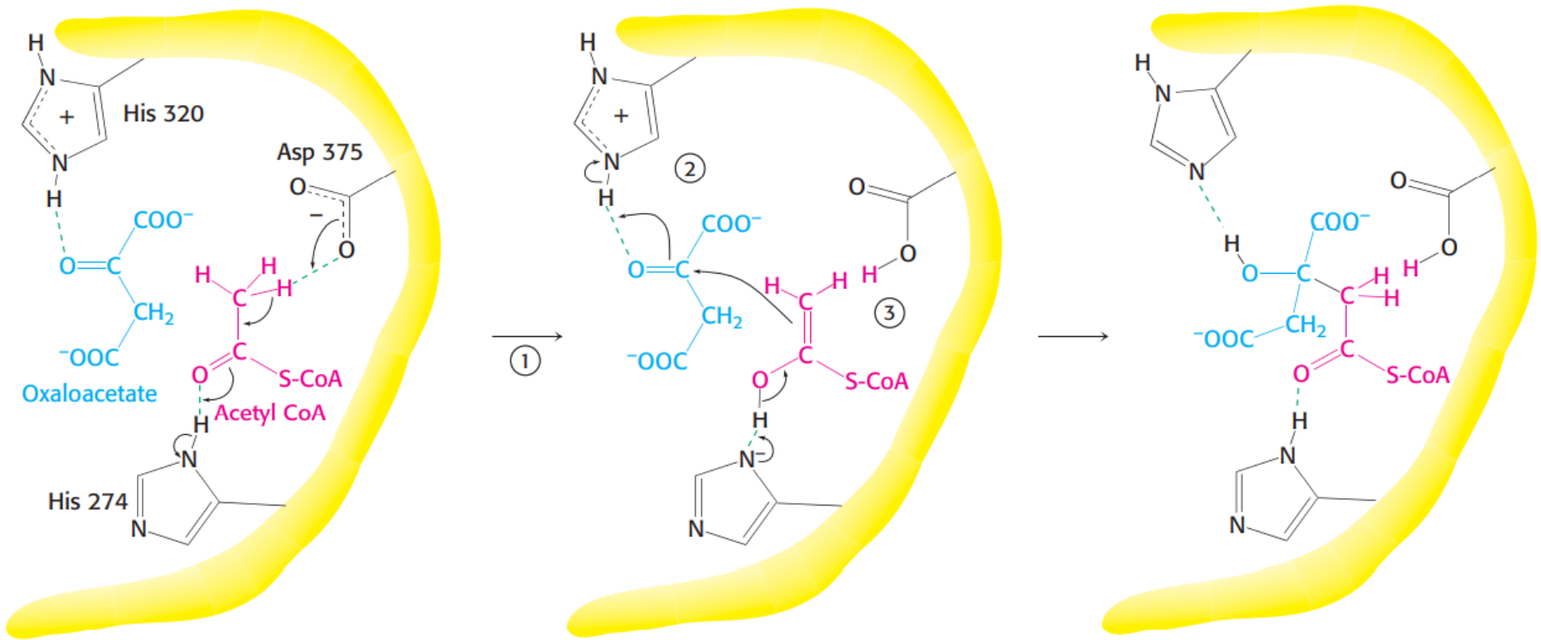
Syntáza - enzým katalyzujúci syntetickú reakciu, v ktorej sú dve jednotky spojené zvyčajne bez priamej účasti ATP (alebo iného nukleozidtrifosfát).

Pretože kondenzáciou acetyl CoA a oxaloacetátu sa iniciuje citrátový cyklus, je veľmi dôležité, aby sa zabránilo vedľajším nežiadúcim reakciám. Predovšetkým hydrolýza acetyl CoA na acetát a CoA musí byť minimalizovaná. Citrát syntáza vykazuje sekvenčnú, usporiadanú kinetiku: najskôr sa viaže oxaloacetát a potom acetyl CoA. Dôvod usporiadanej kinetiky je ten, že oxaloacetát indukuje konformačnú zmenu, ktorá vedie k vytvoreniu väzbového miesta pre acetyl CoA. Väzba oxaloacetátu prevádza otvorenú formu enzýmu na uzavretú formu, čo pripomína konformačnú zmenu hexokinázy indukovanú väzbou glukózy.



CITRÁTOVÝ CYKLUS – 1.KROK

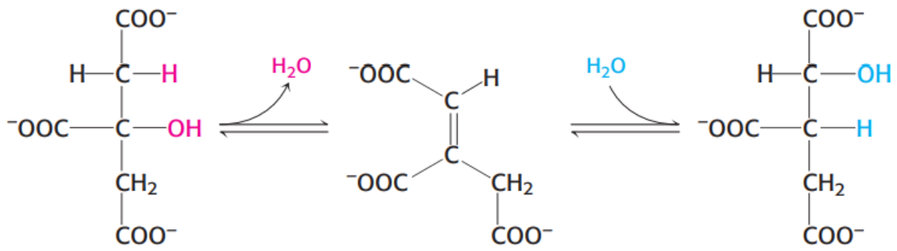
Teraz je možné pochopiť, ako je zabránené zbytočnej hydrolýze acetyl CoA. Citrátsyntáza je vhodná na hydrolýzu citryl CoA, avšak nie acetyl CoA. Ako sa táto diskriminácia dosahuje? Predovšetkým acetyl CoA nenaviaže na enzým, kým nie je naviazaný v aktívnom mieste oxalacetát a pripravený na kondenzáciu. Po druhé, katalytické zvyšky rozhodujúce pre hydrolýzu tioesterovej väzby nie sú vo vhodnej pozícii, kým sa nevytvorí citryl CoA. Rovnako ako u hexokinázy a triózafosfátizomerázy, indukovaný fit zabraňuje nežiadúcej vedľajšej reakcii.



Mechanizmus syntézy citryl CoA pomocou citrátsyntázy. (1) V substrátovom komplexe (vľavo), His 274 poskytne protón na karbonylový kyslík Acetyl CoA na podporu odstránenia metylového protónu pomocou Asp 375 za vzniku enolového medziproduktu (stred). (2) Oxaloacetát je aktivovaný prenosom protónu z His 320 na jeho karbonylový uhlíkový atóm. (3) Enolová forma Acetyl CoA napdá karbonylový uhlík oxaloacetátu za vzniku väzby uhlík-uhlík spájajúcej acetyl CoA a oxaloacetát. His 274 je reprotonovaný. Vytvorí sa citryl CoA a His 274 sa znovu zúčastňuje ako donor protónov v procese hydrolýzy tioesteru (nezobrazené), čím sa získa citrát a CoA.

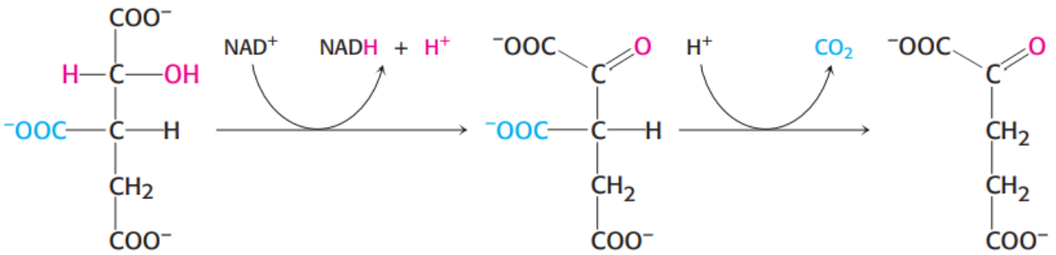
CITRÁTOVÝ CYKLUS – KROKY 2, 3 A 4

(2) Citrát je izomerizovaný na izocitrát enzýmom **akonitázou**:



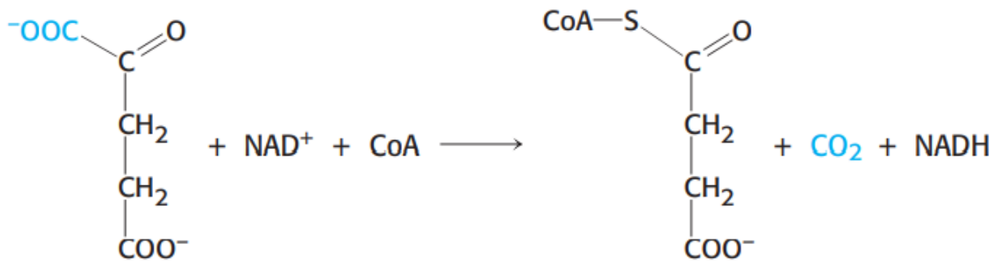
Citrát ***cis*-Akonitát** **Izocitrát**

(3) Izocitrát je oxidovaný a dekarboxylovaný na α-ketoglutarát **izocitrát dehydrogenázou**:



Izocitrát **Oxalosukcinát** **α-Ketoglutarát**

(4) Sukcinyl koenzým A je tvorený oxidatívnou dekarboxyláciou α-ketoglutarátu:



α-Ketoglutarát **Sukcinyl CoA**

Táto reakcia je katalyzovaná komplexom α-ketoglutarátdehydrogenázy zloženom z 3 druhov enzýmov, ktoré sú homológne s komplexom pyruvátdehydrogenázy. Oxidačná dekarboxylácia α-ketoglutarátu sa v skutočnosti veľmi podobá oxidačnej dekarboxylácii pyruvátu:

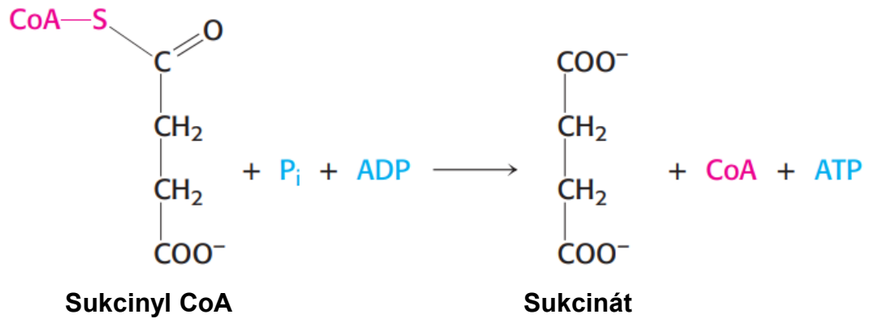
$$\text{Pyruvát} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \xrightarrow[\text{komplex}]{\text{Pyruvát dehydrogenázny}} \text{Acetyl Coa} + CO_2 + \text{NADH} + H^+$$

$$\alpha\text{-Ketoglutarát} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \xrightarrow[\text{dehydrogenázny komplex}]{\alpha\text{-Ketoglutarát}} \text{Sukcinyl CoA} + CO_2 + \text{NADH}$$

Obidve reakcie zahŕňajú dekarboxyláciu α-ketokyseliny a následnú tvorbu tioesterovej väzby s CoA, ktorá má vysoký prenosový potenciál. Reakčné mechanizmy sú úplne analogické.

CITRÁTOVÝ CYKLUS – KROK 5

Zlúčenina s vysokým potenciálom prenosu fosforylovej skupiny je generovaná zo Sukcinyl koenzýmu A. Sukcinyl CoA je energeticky-bohatá tioesterová zlúčeina. Hodnota $\Delta G^{0'}$ hydrolýzy sukcinyl CoA je približne -33.5 kJ/mol, čo je porovnateľné s hodnotou $\Delta G^{0'}$ hydrolýzy ATP, -30.5 kJ/mol.
Štiepenie tioesterovej väzby sukcinyl CoA je spojené s fosforyláciou purínového nukleoziddifosfátu, obvykle ADP. Táto reakcia, ktorá je reverzibilná, je katalyzovaná **sukcinyl CoA syntetázou** (sukcinát tiokináza):

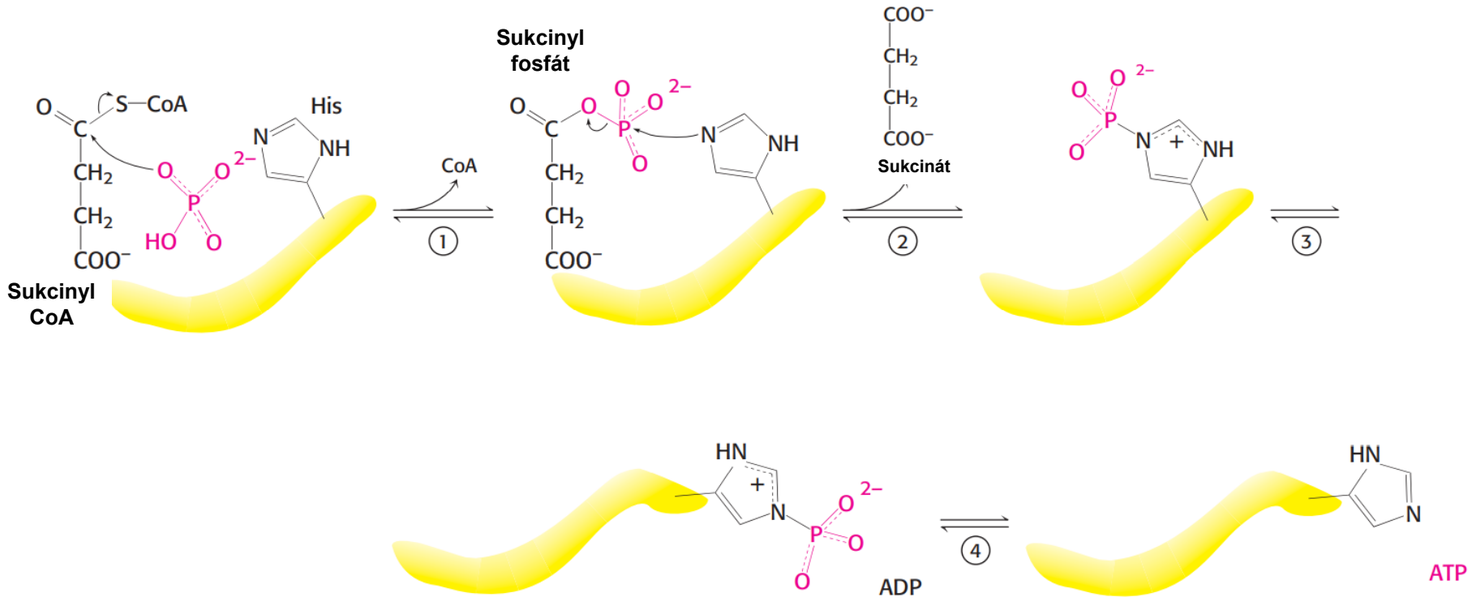


Táto reakcia je jediným krokom v citrátovom cykle, ktorá priamo vedie k zlúčenine s vysokým potenciálom prenosu fosforylu. U cicavcov existujú dve izozymické formy enzýmu, jedna špecifická pre ADP a druhá pre GDP.

Enzým **nukleozid difosfokináza**, ktorý katalyzuje reakciu:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

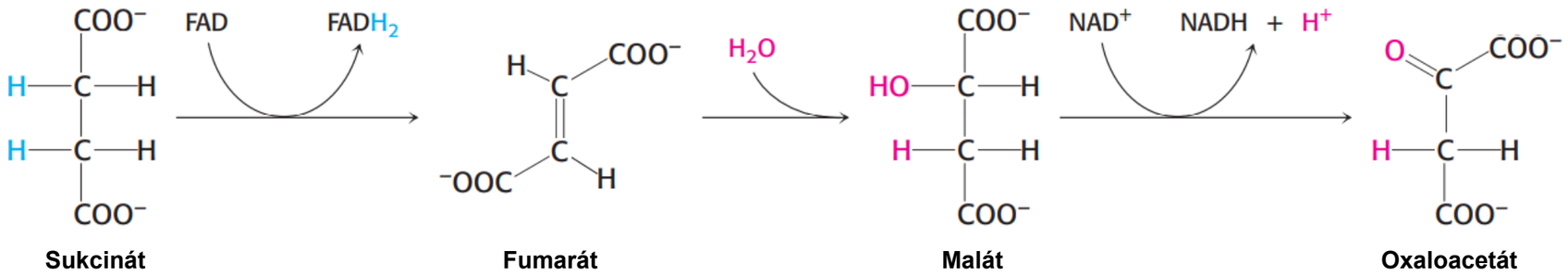
umožňuje prenos γ fosforylovej skupiny z GTP na ATP a takto prispôsobuje koncentráciu GTP alebo ATP podľa potreby bunky.



Reakčný mechanizmus sukcinyl CoA syntetázy. Reakcia prebieha cez fosforylovaný medziprodukt enzýmu. (1) Ortofosfát vytesňuje CoA za vzniku ďalšej energeticky bohatej zlúčeniny, sukcinylfosfátu. (2) Zvyšok histidínu odstraňuje fosforylovú skupinu za vzniku sukcinátu a fosfohistidínu. (3) Fosfohistidínový zvyšok sa následne prepne na viazaný nukleozid difosfát a (4) fosforylová skupina sa prenesie za vzniku nukleozidu trifosfátu.

CITRÁTOVÝ CYKLUS – KROKY 6, 7 A 8

Oxaloacetát sa regeneruje oxidáciou sukcinátu:



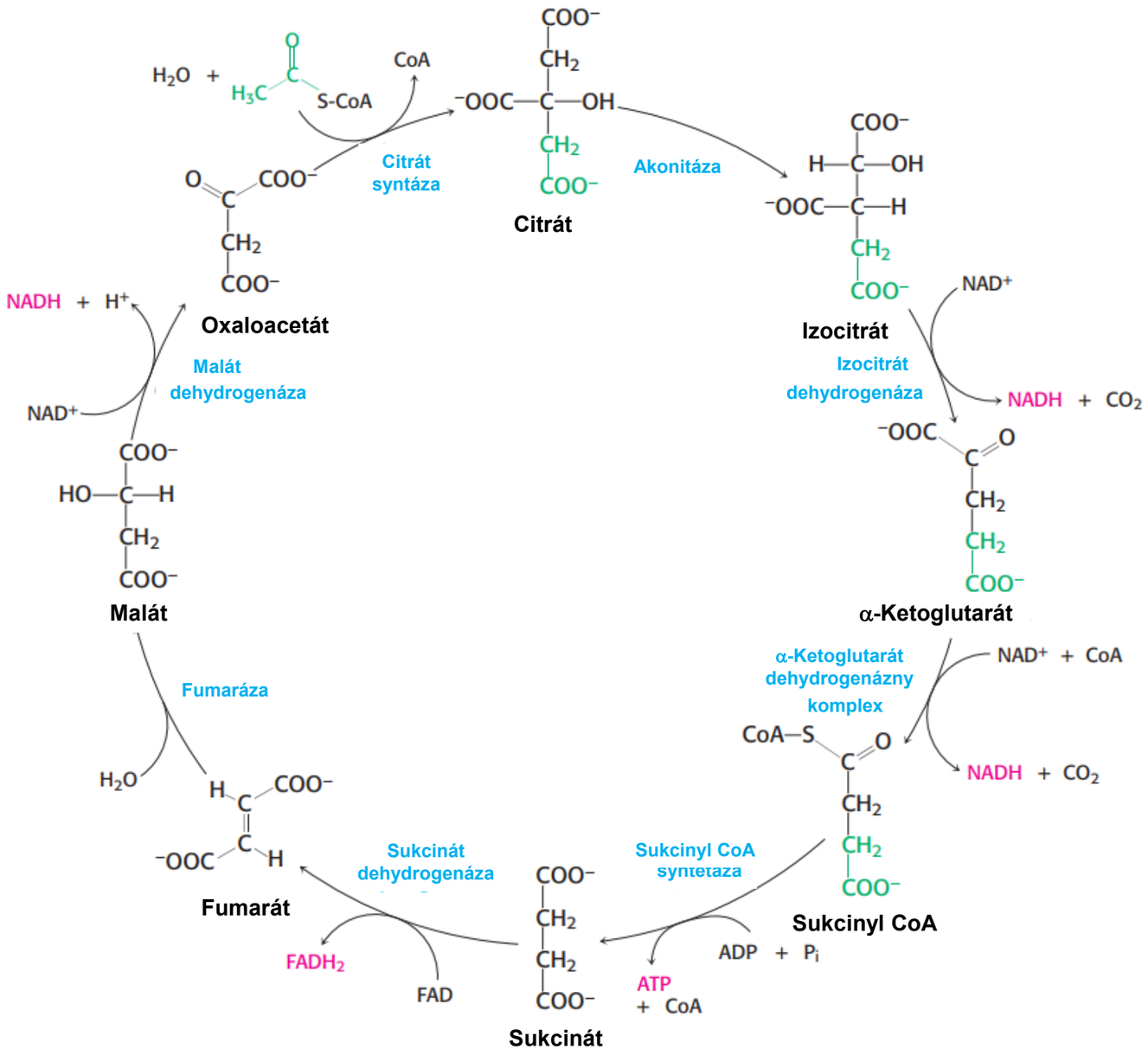
Reakcie tvoria metabolický motív, ktorý sa vyskytuje aj pri syntéze a degradácii mastných kyselín, ako aj pri degradácii niektorých aminokyselín. Metylénová skupina (CH_2) sa mení na karbonylovú skupinu (C=O) v troch krokoch: oxidácii, hydratácii a ďalšej oxidácii. Oxaloacetát sa týmto regeneruje pre ďalšie kolo cyklu. Sukcinát sa oxiduje na fumarát pomocou **sukcinátdehydrogenázy**.

Sukcinátdehydrogenáza sa líši od ostatných enzýmov v citrátovom cykle tým, že je vložená do vnútornej mitochondriálnej membrány. Tento enzým je priamo spojený s elektrónovo-transportným reťazcom, ktorý tvory spojenie medzi citrátovým cyklom a tvorbou ATP. $FADH_2$ produkovaný oxidáciou sukcinátu neodisociuje od enzýmu, na rozdiel od NADH produkovaného pri iných oxidačno-redukčných reakciách v citrátovom cykle. Namiesto toho sa dva elektróny prenášajú z $FADH_2$ priamo do železnato-sírnatých klastrov v enzýme, ktorý následne prenáša elektróny na **koenzým Q** (CoQ).

CITRÁTOVÝ CYKLUS – ZHRNUTIE

Sumárna reakcia citrátového cyklu je nasledovná:

$$\text{Acetyl CoA} + 3\,NAD^+ + FAD + ADP + P_i + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,CO_2 + 3\,NADH + FADH_2 + ATP + 2\,H^+ + CoA$$



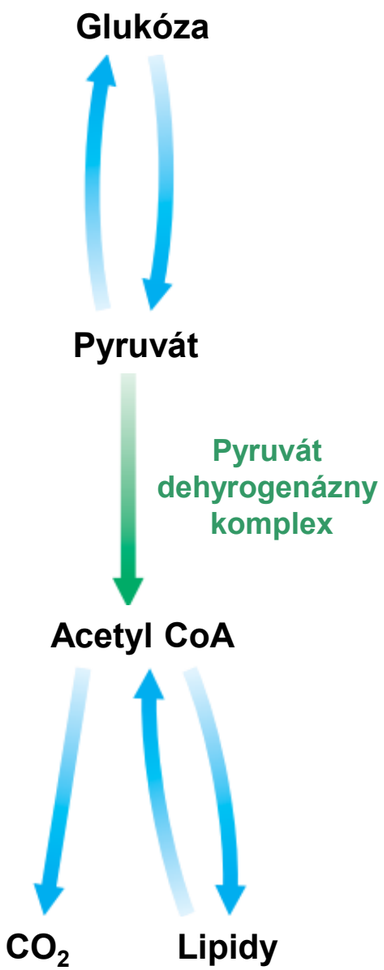
CITRÁTOVÝ CYKLUS - ZHRNUTIE

Reakcie citrátového cyklu

Krok	Reakcia	Enzým	Typ reakcie	Prostetická skupina	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)
1	Acetyl CoA+Oxaloacetát+H_2O → Citrát+CoA+H^+	Citrátsyntáza	Kondenzácia		-31.4
2a	Citrát ↔ *cis*-Akonitát+H_2O	Akonitáza	Dehydratácia	Fe-S	+8.4
2b	*cis*-Akonitát+H_2O ↔ Izocitrát	Akonitáza	Hydratácia	Fe-S	-2.1
3	Izocitrát+NAD^+ ↔ α-Ketoglutarát+CO_2+NADH	Izocitrát dehydrogenáza	Dekarboxylácia+oxidácia		-8.4
4	α-Ketoglutarát+NAD^++CoA ↔ Sukcinyl CoA+CO_2+NADH	α-Ketoglutarát dehydrogenázny komplex	Dekarboxylácia+oxidácia	Lipoová kyselina, FAD,TPP	-30.1
5	Sukcinyl CoA+P_i+ADP ↔ Sukcinát+ATP+CoA	Sukcinyl CoA syntetáza	Fosforylácia na substrátovej úrovni		-3.3
6	Sukcinát+FAD ↔ Fumarát+$FADH_2$	Sukcinát dehydrogenáza	Oxidácia	FAD, Fe-S	0
7	Fumarát+H2O ↔ L-malát	Fumaráza	Hydratácia		-3.8
8	L-malát+NAD^+ ↔ Oxaloacetát+NADH+H^+	Malát dehydrogenáza	Oxidácia		+29.7

CITRÁTOVÝ CYKLUS – KONTROLNÉ MECHANIZMY

Citrátový cyklus je poslednou spoločnou cestou pre aeróbnu oxidáciu molekúl predstavujúcich zdroje energie. Navyše, tento cyklus je dôležitým zdrojom stavebných blokov pre množstvo biomolekúl. V súlade s týmito funkciami citrátového cyklu ako metabolického uzla bunky sú vstup do cyklu ako aj jeho rýchlosť riadené v niekoľkých fázach.

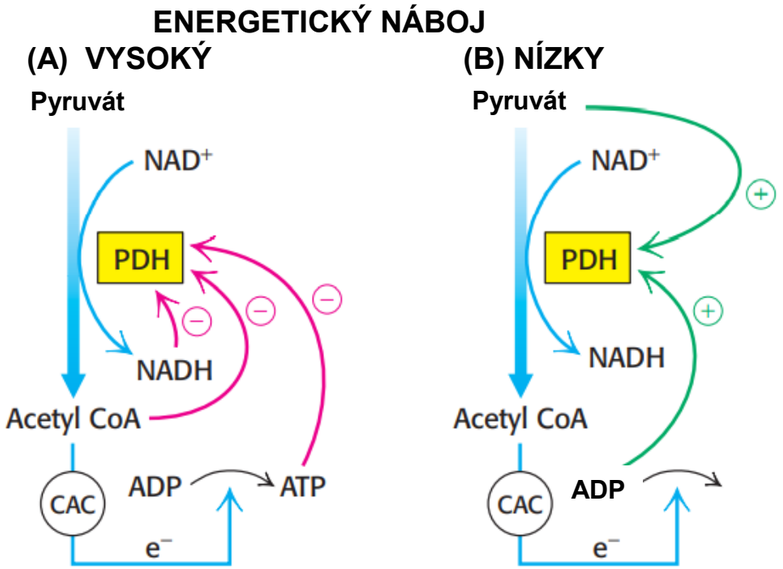


Od glukózy po acetyl CoA.
Syntéza acetyl CoA pyruvátom dehydrogenáznym komplexom je nezvratný kľúčový krok v metabolizme glukózy.

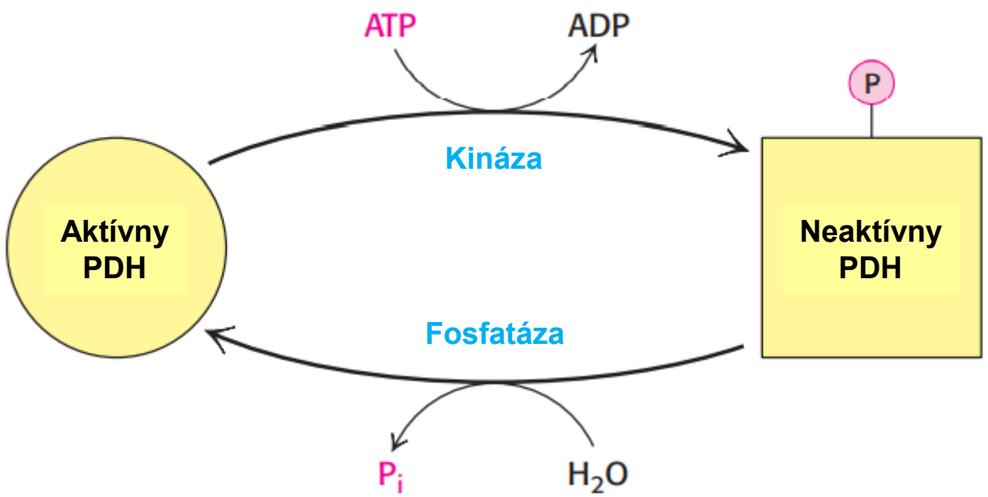
CITRÁTOVÝ CYKLUS – KONTROLNÉ MECHANIZMY

Tvorba acetyl CoA z pyruvátu je nezvratný krok u živočíchov, ktoré nie sú schopné premieňať acetyl CoA späť na glukózu. Oxidačná dekarboxylácia pyruvátu na acetyl CoA spôsobuje, že glukóza sa oxiduje v citrátovom cykle na CO_2, alebo sa vzniknutý acetyl CoA zabudováva do lipidov. Aktivita enzýmov v pyruvátdehydrogenáznom komplexe (PDH) je preto prísne regulovaná. Vysoké koncentrácie reakčných produktov inhibujú reakciu: acetyl CoA inhibuje transacetylázovú zložku (E_2) priamou väzbou, zatiaľ čo NADH inhibuje dihydrolipoyl dehydrogenázu (E_3). Vysoké koncentrácie NADH a acetyl CoA informujú enzým, že boli splnené energetické potreby bunky alebo došlo k degradácii mastných kyselín na tvorbu acetyl CoA a NADH. V obidvoch prípadoch nie je potrebné metabolizovať pyruvát na acetyl CoA. Účinkom tejto inhibície je šetrenie glukózy, pretože väčšina pyruvátu sa získava z glukózy glykolýzou.

Kľúčový prostriedok na reguláciu komplexu v eukaryotoch je kovalentná modifikácia enzýmov. Fosforylácia pyruvátdehydrogenázy, zložka (E_1), pyruvátdehydrogenázovou kinázou I (PDK) vypína činnosť tohto komplexu. Deaktivácia je reverzibilná za účasti enzýmu pyruvát dehydrogenázna fosfatáza (PDP).

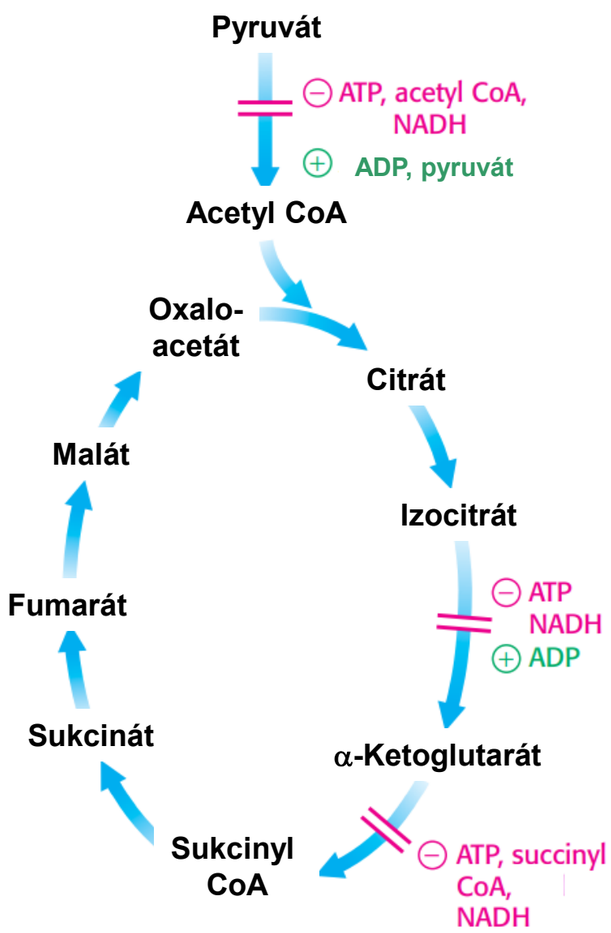


Odozva PDH na energetický náboj. PDH je regulovaný tak, aby reagoval na energetický náboj bunky. (A) PDH je inhibovaný svojimi bezprostrednými produktmi, NADH a Acetyl CoA, rovnako akokonečným produktom bunkového dýchania, ATP. (B) PDH je aktivovaný pyruvátom a ADP, ktoré inhibujú kinázu fosforylujúcu PDH.



Regulácia pyruvátdehydrogenázy je komplexná. Špecifická kináza fosforyluje a deaktivuje PDH a fosfatáza aktivuje PDH odstránením fosforylovej skupiny. Kináza a fosfatáza sú taktiež vysoko regulované enzýmy.

CITRÁTOVÝ CYKLUS – KONTROLNÉ MECHANIZMY



Citrátový cyklus je regulovaný primárne koncentráciou ATP a NADH. Kľúčovými kontrolnými bodmi sú enzýmy Izocitrát dehydrogenáza a α-Ketoglutarát dehydrogenáza.

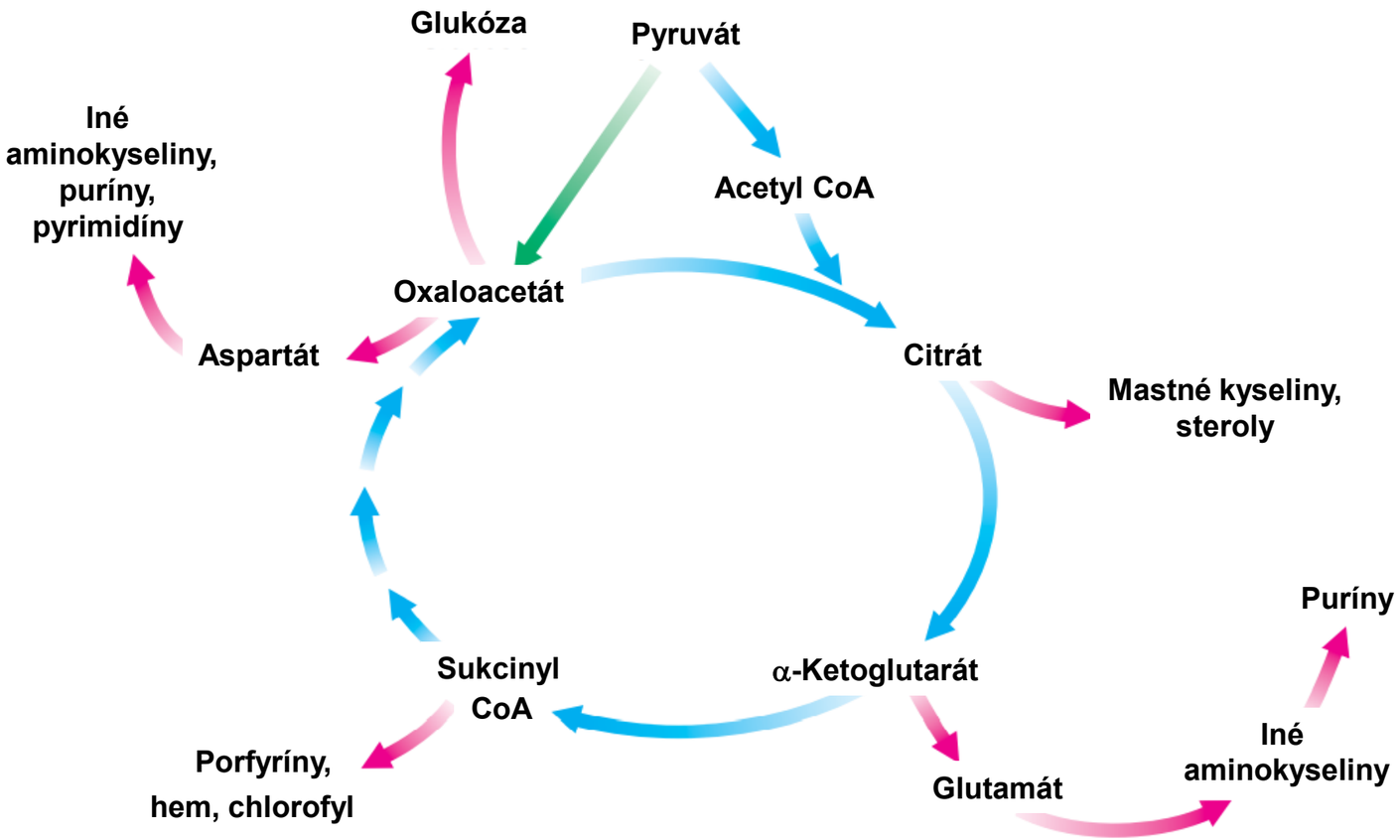
Primárne kontrolné body sú alosterické enzýmy **izocitrát dehydrogenáza** a **α-ketoglutarát dehydrogenáza,** prvé dva enzýmy v cykle, ktoré sa podieľajú na generovaní „vysoko-energetických“ elektrónov.

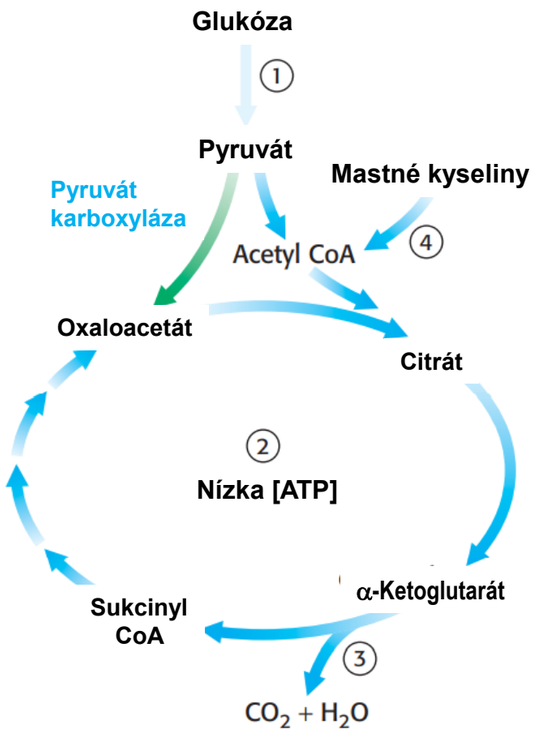
Použitie týchto enzýmov ako kontrolných bodov vedie k integrácii citrátovho cyklu s inými cestami a zdôrazňuje ústrednú úlohu tohto cyklu v metabolizme. Napríklad inhibícia izocitrátdehydrogenázy vedie k hromadeniu citrátu, pretože vzájomná premena izocitrátu a citrátu je reverzibilná za intracelulárnych podmienok. Citrát sa môže transportovať do cytoplazmy, kde signalizuje fosfofruktokináze zastavenie glykolýzy a kde môže slúžiť ako zdroj acetyl CoA pre syntézu mastných kyselín.
α-ketoglutarát, ktorý sa hromadí, keď α-ketoglutarát dehydrogenáza je inhibovaná, môže sa použiť ako prekurzor niekoľkých aminokyselín a purínových báz.

V mnohých baktériách je riadený aj vstup dvojuhlíkových fragmentov do cyklu. Syntéza citrátu z oxaloacetátu a acetyl CoA je dôležitým kontrolným bodom v týchto organizmoch. ATP je alosterický inhibítor citrátsyntázy. Účinkom ATP je zvýšenie hodnoty K_M pre acetyl CoA. Keď sa teda zvýši hladina ATP, menej enzýmu je nasýteného acetyl CoA, čím sa tvorí menej citrátu.

CITRÁTOVÝ CYKLUS – ZDROJ BIOSYNTETICKÝCH PREKURZOROV

Biosyntetické úlohy Citrátovho cyklu:

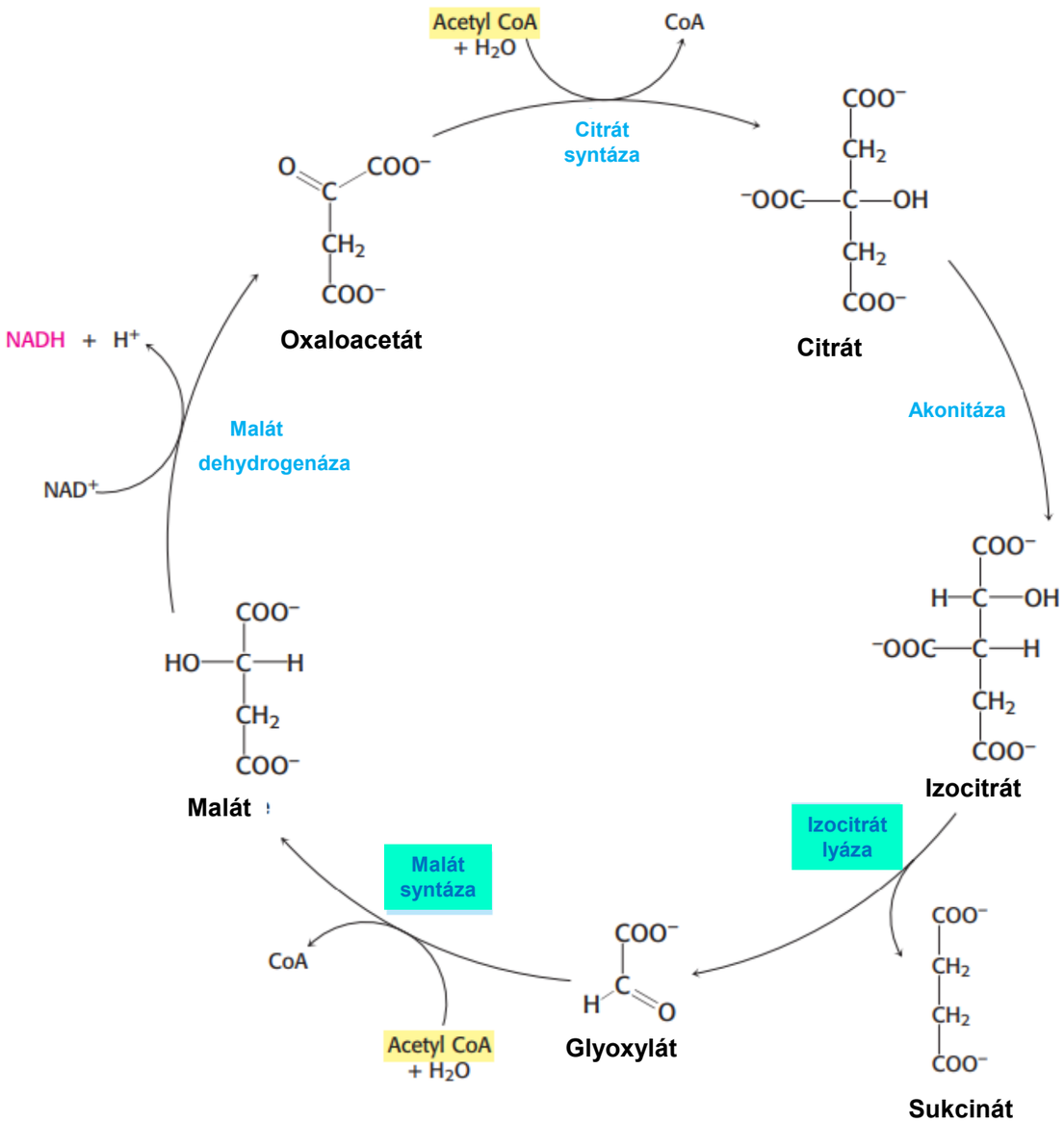




Aktívne dráhy:
1. Glykolýza
2. Citrátový cyklus
3. Oxidatívna fosforylácia
4. Oxidácia mastných kyselín

Ak je energetický náboj vysoký, oxaloacetát sa prevádza na glukózu. Ak je energetický náboj nízky, oxaloacetát vchádza do citrátovho cyklu. Syntéza Oxaloacetátu karboxyláciou pyruvátu je príkladom **anaplerotickej reakcie** (anaplerotic - z gréčtiny - znamená „naplniť sa“), t.j. reakcie, ktorá vedie k syntéze alebo doplneniu zložiek metabolickej dráhy. Keďže citrátov cyklus je cyklický, jeho doplnenie môže nastať ktorýmkoľvek medziproduktom.

GLYOXYLÁTOVÝ CYKLUS



Sumárna reakcia Glyoxylátoveho cyklu je nasledovná:

$$2\ \text{Acetyl CoA} + NAD^+ + 2\ H_2O \rightarrow \text{Sukcinát} + 2\ \text{CoASH} + NADH + H^+$$

Glyoxylátový cyklus umožňuje rastlinám a niektorým mikroorganizmom rásť na acetáte, pretože cyklus obchádza dekarboxyláčné reakcie v citrátovom cykle. Reakcie tohto cyklu sú rovnaké ako v citrátovom cykle okrem tých, ktoré sú katalyzované enzýmami izocitrát lyázou a malát syntázou, ktoré sú označené obdlžníkmi modrej farby.

GLYOXYLÁTOVÝ CYKLUS – UMOŽŇUJE RASTLINÁM A BAKTÉRIÁM RÁSŤ NA ACETÁTE

Acetyl CoA, ktorý vstupuje do citrátovho cyklu má iba jeden osud: oxidáciu na CO_2 a H_2O.

Väčšina organizmov tak **nemôže premieňať acetyl CoA na glukózu**, pretože aj keď sa Oxaloacetát, kľúčový medziprodukt syntézy glukózy, vytvára v citrátovom cykle, dve dekarboxylácie, ktoré prebiehajú pred regeneráciou oxaloacetátu vylučujú možnosť premeny acetyl CoA na glukózu.

V rastlinách a v niektorých mikroorganizmoch existuje metabolická cesta, ktorá umožňuje premenu acetyl CoA generovaného z tukových zásob na glukózu. Táto cesta, ktorá sa nazýva **glyoxylátový cyklus**, je podobná citrátovému cyklu, ale obchádza dva dekarboxylačné kroky citrátového cyklu. Ďalší dôležitý rozdiel je v tom, že dve molekuly acetyl CoA vstúpia počas jedného kola glyoxylátového cyklu v porovnaní s jedným acetyl CoA v citrátovom cykle.

V rastlinách tieto reakcie prebehajú v špecifických organelách – **glyoxyzómoch**. Tento cyklus zabezpečuje cukrami semená počas ich klíčenia až do času kým nie sú schopné začať fotosyntézu. Glyoxylátový cyklus tak poskytuje rastlinácm väčšiu univerzálnosť z hľadiska využitia molekuly acetyl CoA ako prekuzora pre glukózu a iné biomolekuly.

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať vznik acetyl CoA z pyruvátu
- Popísať reakcie citrátového cyklu
- Uviesť spôsoby regulácie citrátového cyklu
- Charakterizovať glyoxylátový cyklus

Membrány - Základné vlastnosti. 4

Biologické membrány – vlastnosti
Mastné kyseliny
Fosfolipidy, glykolipidy a cholesterol
Štruktúra biologických membrán
Dynamika biologickýchmembrán

BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY

Hranice všetkých buniek sú definované **biologickými membránami**. Tieto bariéry bránia molekulám generovaným vo vnútri bunky úniku a nežiadúcim molekulám difúzii dovnútra buniek. Biologické membrány však obsahujú aj transportné systémy, ktoré umožňujú bunke prijímať špecifické molekuly a odstráňovať nežiadúce. Takéto transportné systémy určujú dôležitú vlastnosť membrán **- selektívnu permeabilitu**.

Membrány sú dynamické štruktúry, v ktorých sú proteíny zabudované do lipidovej dvojvrstvy. Lipidové zložky membrán tvoria bariéru pre transport molekúl cez membránu a proteínové zložky pôsobia ako transportné systémy púmp a kanálov, ktoré umožňujú vybraným molekulám vstup do a výstup z bunky.

Okrem vonkajšej bunkovej membrány (nazývanej plazmatická membrána) eukaryotické bunky obsahujú aj vnútorné membrány, ktoré tvoria hranice organel, ako sú mitochondrie, chloroplasty, peroxizómy a lyzozómy.

Biologické membrány majú niekoľko ďalších nevyhnutných funkcií pre život, ako sú uchovávanie energie a prenos informácií medzi bunkami.

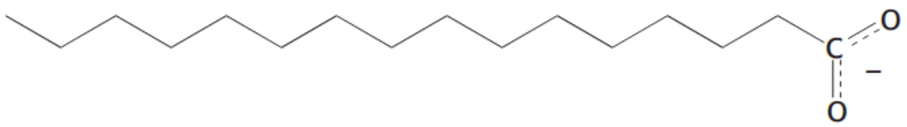
BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY – ZÁKLADNÉ VLASTNOSTI

Biologické membrány majú rovnako rôznorodú štruktúru ako sa líšia svojou funkčnosťou. Avšak majú spoločné množstvo dôležitých atribútov:

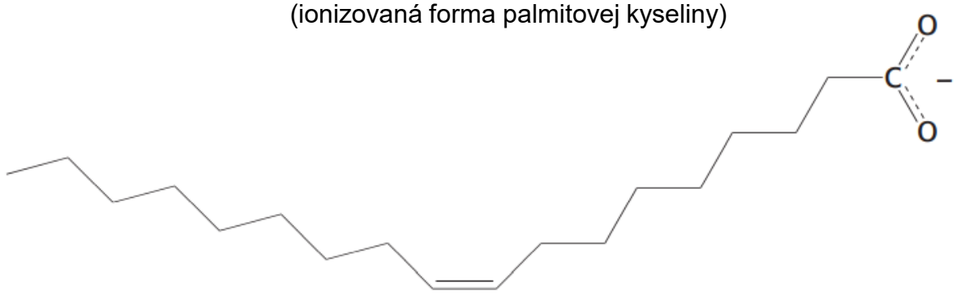
1. Membrány sú **listové štruktúry**, ktoré tvoria uzavreté hranice medzi rôznymi kompartmentami. Hrúbka väčšiny membrán je medzi 60 Å (6 nm) a 100 Å (10 nm).
2. Membrány **pozostávajú hlavne z lipidov a proteínov**. Hmotnostný pomer lipidov a proteínov sa pohybuje v rozmedzí od 1:4 do 4:1. Membrány tiež obsahujú sacharidy, ktoré sú spojené s lipidmi a proteínmi.
3. **Membránové lipidy sú malé molekuly, ktoré majú hydrofilné aj hydrofóbne skupiny**. Tieto lipidy spontánne tvoria uzavreté bimolekulové listy vo vodnom prostredí. Tieto lipidové dvojvrstvy zabraňujú voľnému toku polárnych molekúl cez membránu.
4. **Špecifické membránové proteíny** sprostredkovávajú charakteristické funkcie membrán. Proteíny slúžia ako pumpy, kanály, receptory, prevodníky energie a enzýmy. Membránové proteíny sú vnorené do lipidových dvojvrstiev, ktoré vytvárajú vhodné prostredie pre ich funkciu.
5. Membrány sú **nekovalentné súbory**. Molekuly proteínov a lipidov sú držané pohromade mnohými nekovalentnými interakciami, ktoré pôsobia kooperatívne.
6. Membrány sú **asymetrické**. Dva povrchy biologickej membrány sa vždy navzájom líšia.
7. Membrány sú **tekuté štruktúry**. Molekuly lipidov rýchlo difundujú v rovine membrány, rovnako ako proteíny, pokiaľ nie sú ukotvené špecifickými interakciami. Na druhej strane, lipidové molekuly a proteíny sa ľahko neotáčajú cez membránu. Membrány možno považovať za dvojrozmerné roztoky orientovaných proteínov a lipidov.
8. Väčšina bunkových membrán je **elektricky polarizovaná** tak, že vo vnútri je záporný potenciál [zvyčajne - 60 milivoltov (mV)]. Membránový potenciál zohráva kľúčovú úlohu v membránovom transporte zlúčenín, premene energie a excitabilite membrán.

MASTNÉ KYSELINY - ZÁKLADNÉ ZLOŽKY LIPIDOV

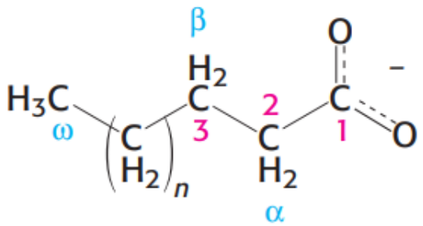
Hydrofóbne vlastnosti lipidov sú nevyhnutné pre ich schopnosť vytvárať membrány. Väčšina lipidov vďačí za svoje hydrofóbne vlastnosti jednej zložke, mastným kyselinám. Mastné kyseliny sú dlhé uhľovodíkové reťazce rôznej dĺžky a rôzneho stupňa nenasýtenosti, ktoré sú ukončené skupinami karboxylových kyselín.

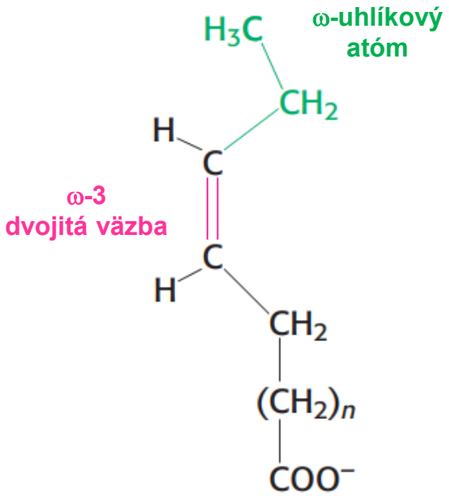


Palmitát
(ionizovaná forma palmitovej kyseliny)



Oleát
(ionizovaná forma olejovej kyseliny)





ω-3 mastná kyselina

Zápis 18:0 označuje C_{18} mastnú kyselinu bez dvojitej väzby, zatiaľ čo pomer 18:2 znamená, že v mastnej kyseline sa nachádzajú dve dvojité väzby. Štruktúry ionizovaných foriem dvoch bežných mastných kyselín - **kyseliny palmitovej (16:0)** a **kyseliny olejovej (18:1)** - sú znázornené na obrázku. Atómy uhlíka mastných kyselín sa číslujú od karboxylového konca. Atómy uhlíka 2 a 3 sa často označujú ako **α** a **β**. Atóm metylového uhlíka na distálnom konci reťazca je atóm uhlíka, ktorý sa nazýva **ω**. Pozíciu dvojitej väzby predstavuje symbol Δ, za ktorým nasleduje číslo v pozícii horného indexu. Napríklad ***cis*-Δ^9** znamená to, že medzi atómami uhlíka 9 a 10 je dvojitá *cis* väzba; ***trans*-Δ^2** znamená, že existuje *trans* dvojitá väzba medzi atómami uhlíka 2 a 3.

MASTNÉ KYSELINY - ZÁKLADNÉ ZLOŽKY LIPIDOV

Mastné kyseliny v biologických systémoch zvyčajne obsahujú **párny počet atómov uhlíka**, zvyčajne medzi 14 a 24. Mastné kyseliny so 16- a 18-uhlíkovými atómami sú najbežnejšie. Dominancia reťazcov mastných kyselín obsahujúcich párny počet atómov uhlíka je v súlade so spôsobom, akým sú mastné kyseliny biosyntetizované. Uhľovodíkový reťazec je **takmer vždy nerozvetvený** v živočíšnych mastných kyselinách. Alkylový reťazec môže byť **nasýtený alebo môže obsahovať jednu alebo viac dvojitých väzieb**. Konfigurácia dvojitého väzieb vo väčšine nenasýtených mastných kyselín je ***cis***.

Vlastnosti mastných kyselín a lipidov z nich odvodených sú zreteľne závislé od dĺžky reťazca a stupňa nasýtenia.

- Nenasýtené mastné kyseliny majú nižšie teploty topenia ako nasýtené mastné kyseliny s rovnakou dĺžkou. Napríklad teplota topenia kyseliny stearovej (C_{18}, *n-Oktadekanoát*) je 69.7 °C, zatiaľ čo teplota topenia kyseliny olejovej (C_{18}, *cis*-Δ^9-*Oktadekenoát*) (ktorá obsahuje jednu cis dvojnú väzbu) je 13.5 °C. Teploty topenia polynenasýtených mastných kyselín série C_{18} sú ešte nižšie.
- Dĺžka reťazca tiež ovplyvňuje teplotu topenia, ako je to ilustrované skutočnosťou, že teplota topenia kyseliny palmitovej (C_{16}) je o 6.5°C nižšia ako teplota topenia kyseliny stearovej (C_{18}).

Krátka dĺžka reťazca a nenasýtenosť zvyšujú tekutosť mastných kyselín a ich derivátov.

Lipidy sú vo vode nerozpustné biomolekuly, ktoré sa dobre rozpúšťajú v organických rozpúšťadlách ako je napr. chloroform, etanol.
Lipidy majú rôzne biologické úlohy:

- slúžia ako vysoko koncentrované zásoby energie,
- signálne molekuly,
- posly v signálnych transdukčných dráhach
- komponenty membrány.

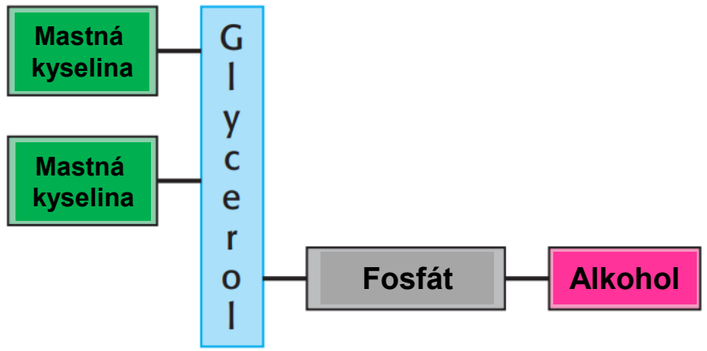
Tri hlavné druhy membránových lipidov sú:

- fosfolipidy,
- glykolipidy,
- cholesterol.

FOSFOLIPIDY

Fosfolipidy sú bohato zastúpené vo všetkých biologických membránach.
Fosfolipidová molekula je zložená zo štyroch zložiek:

- jednej alebo viacerých mastných kyselín,
- platformy, ku ktorej sú pripojené mastné kyseliny a fosfát,
- alkohol pripojený ku fosfátu.

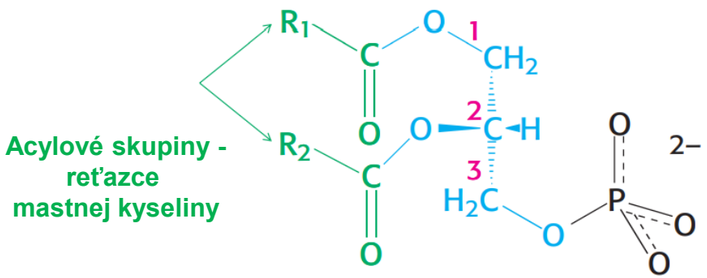


Schematická štruktúra fosfolipidu

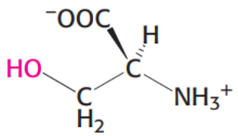
Mastné kyseliny poskytujú **hydrofóbnu bariéru**, zatiaľ čo zvyšok molekuly má hydrofilné vlastnosti, ktoré umožňujú interakciu s vodným prostredím. Platformou, na ktorej sú postavené fosfolipidy, môže byť glycerol, trojuhlíkový alkohol alebo sfingozín, zložitejší alkohol. Fosfolipidy odvodené od glycerolu sa nazývajú **fosfoglyceridy**. Fosfoglycerid pozostáva z glycerolového hlavného reťazca, ku ktorému sú pripojené dva reťazce mastných kyselín a fosforylovaný alkohol.

FOSFOLIPIDY

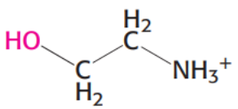
Vo fosfoglyceridoch sú hydroxylové skupiny na C-1 a C-2 glycerolu esterifikované na karboxylové skupiny reťazcov dvoch mastných kyselín. C-3 hydroxylová skupina glycerolového hlavného reťazca je esterifikovaná na kyselinu fosforečnú. Ak sa nepridajú žiadne ďalšie časti, výsledná zlúčenina je fosfatidát (diacylglycerol 3-fosfát) – najjednoduchší fosfoglycerid.



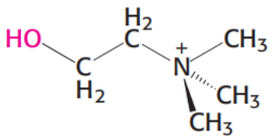
Štruktúra fosfatidátu (diacylglycerol 3-fosfát)



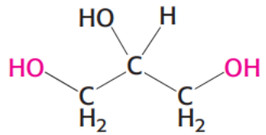
Serín



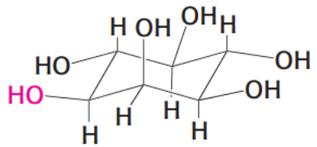
Etanolamín



Cholín

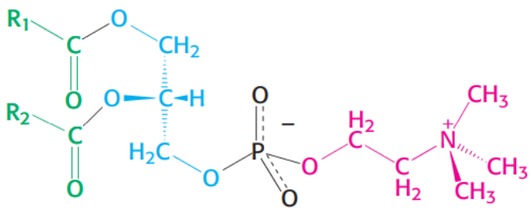


Glycerol

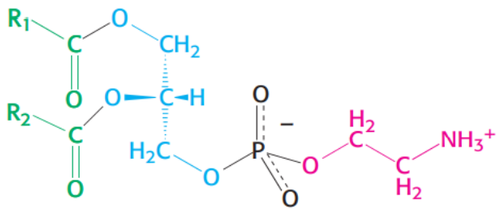


Inozitol

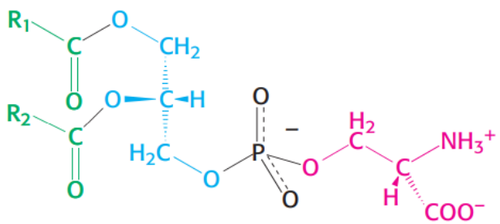
Štruktúra alkoholov, ktoré sú súčasťou fosfolipidov



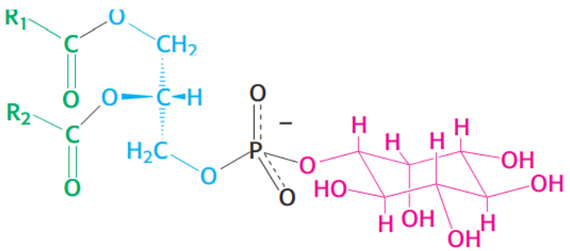
Fosfatidylcholín



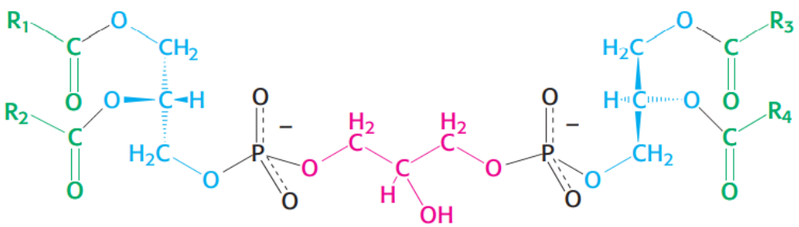
Fosfatidyletanolamín



Fosfatidylserín



Fosfatidylinozitol

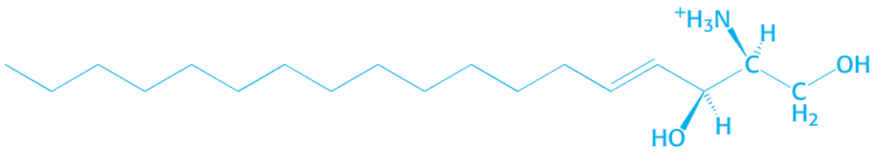


Difosfatidylglycerol (Kardiolipín)

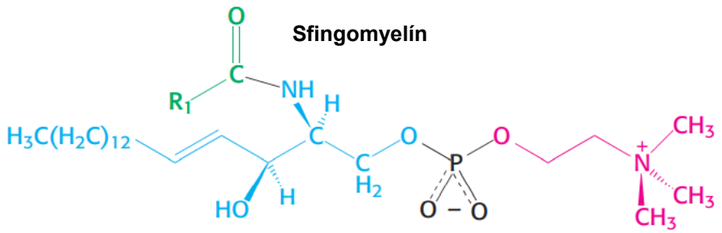
Štruktúra fosfoglyceridov nachádzajúcich sa v membránach

SFINGOMYELÍN A GLYKOLIPIDY

Sfingomyelín je fosfolipid nachádzajúci sa v membránach, ktorý nie je odvodený od glycerolu. Namiesto glycerolu je v sfingomyelíne „chrbticou“ **sfingozín**, amino alkohol, ktorý obsahuje dlhý nenasýtený uhľovodíkový reťazec. Pri sfingomyelíne je aminoskupina sfingozínového základného reťazca spojená s mastnou kyselinou amidovou väzbou. Okrem toho primárna hydroxylová skupina sfingozínu sa esterifikuje na fosforylcholín.



Sfingozín

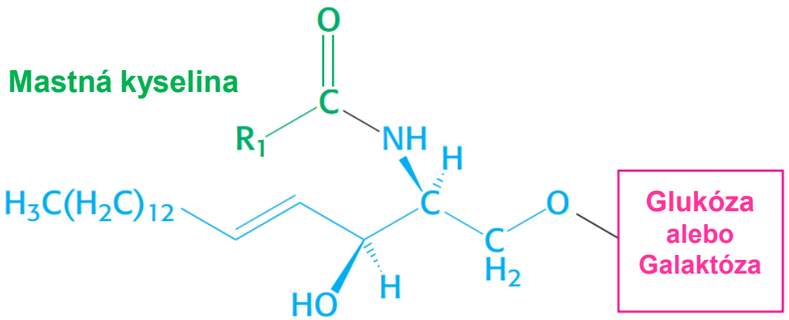


Sfingomyelín

Štruktúry sfingozínu a sfingomyelínu. Sfingozínova časť je v sfingomyelíne zvýraznená modrou farbou.

Druhou hlavnou triedou membránových lipidov, sú **glykolipidy**, lipidy obsahujúce cukor. Rovnako ako sfingomyelín sú aj glykolipidy v živočíšnych bunkách odvodené od sfingozínu.

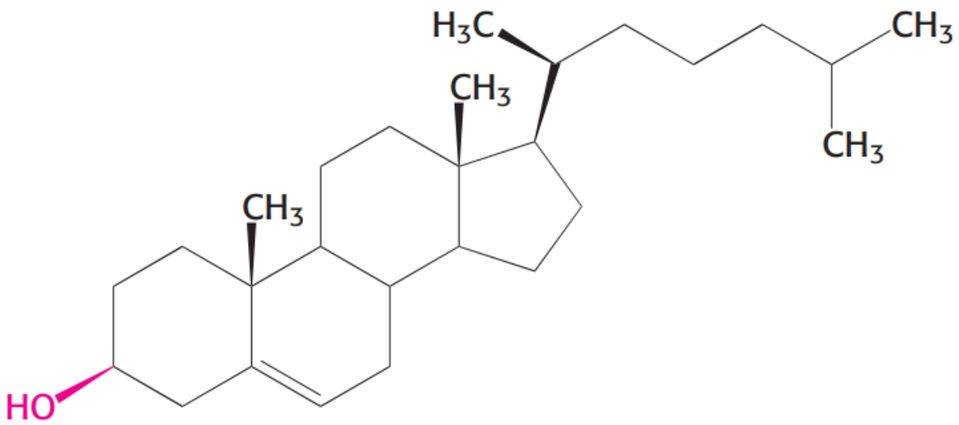
V glykolipidoch je k hydroxylovej skupine primárneho alkoholu pripojených jeden alebo viac cukrov (namiesto fosforylcholínu). Najjednoduchší glykolipid, ktorý sa nazýva **cerebrosid**, obsahuje jediný cukorný zvyšok buď glukózu alebo galaktózu.



Zložitejšie glykolipidy, napr. **gangliozidy**, obsahujú rozvetvený reťazec s až siedmimi zvyškami cukru. Glykolipidy sú orientované asymetricky vždy na extracelulárnej strane membrány.

CHOLESTEROL

Cholesterol, tretí hlavný typ membránových lipidov, má štruktúru, ktorá sa výrazne líši od štruktúry fosfolipidov. Je to steroid vyrobený zo štyroch spojených uhľovodíkových kruhov.



Cholesterol

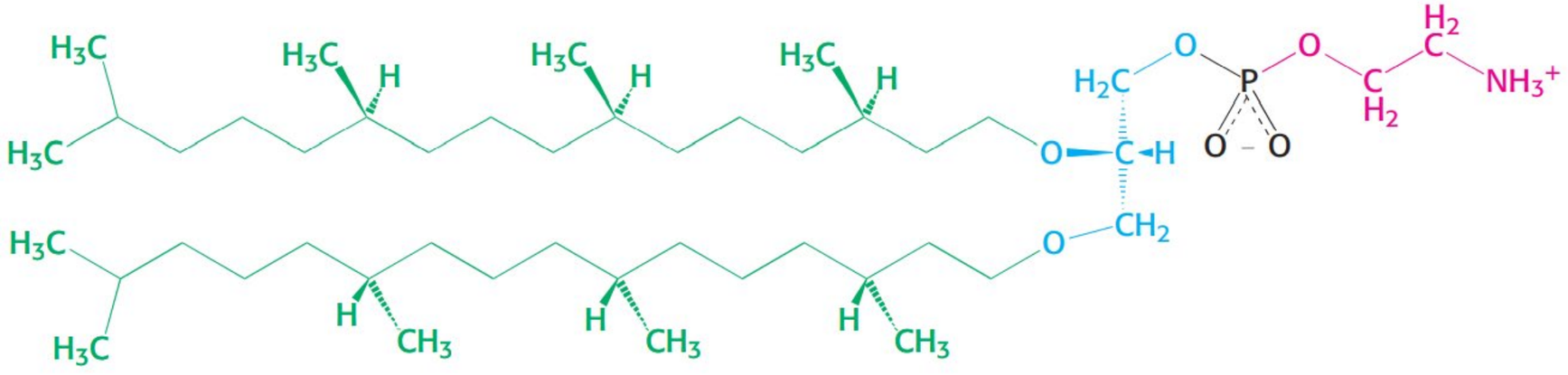
V membránach je orientácia molekuly cholesterolu paralelná s reťazcami mastných kyselín fosfolipidov a hydroxylová skupina interaguje s blízkymi hydrofilnými skupinami fosfolipidov. Cholesterol sa nenachádza u prokaryotov, ale jeho prítomnosť bola zistená v rôznej miere prakticky vo všetkých membránach živočíšnych buniek. Predstavuje takmer 25% membránových lipidov v určitých typoch nervových buniek, ale takmer úplne chýba v niektorých intracelulárnych membránach.

LIPIDY V ARCHAE SÚ REZISTENTNEJŠIE AKO V EUKARYOTOCH A BAKTÉRIÁCH

Zloženie membrán v *Archea* z hľadiska stability je odlišné od zloženia membrán v eukaryotoch alebo baktériách:

- Nepolárne reťazce sú spojené s glycerolovým hlavným reťazcom skôr éterovými ako esterovými väzbami. Éterová väzba je odolnejšia voči hydrolýze.
- Alkylové reťazce sú skôr rozvetvené ako lineárne. Tieto reťazce sú zostavené z opakovaní plne nasýteného päťuhlíkového fragmentu. Takéto rozvetvené, nasýtené uhľovodíky sú odolnejšie voči oxidácii.

Schopnosť lipidov nachádzajúcich sa v *Archae* odolávať hydrolýze a oxidácii môže pomôcť týmto organizmom zvládať extrémne podmienky ako sú vysoké teploty, nízke pH alebo vysoká koncentrácia solí, v ktorých tieto organizmy rastú.

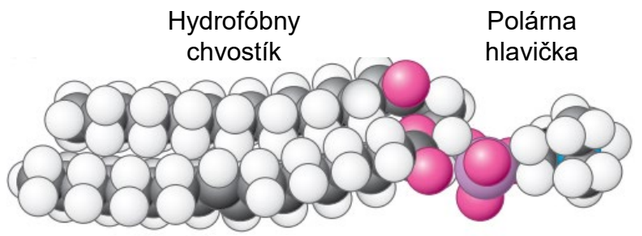


Membránový lipid z archeónu *Methanococcus jannaschii*

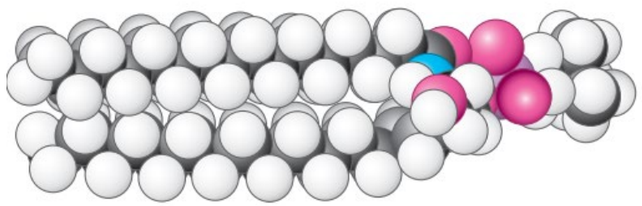
MEMBRÁNOVÉ LIPIDY SÚ AMFIPATICKÉ MOLEKULY

Repertoár membránových lipidov je rozsiahly. Tieto lipidy majú spoločné kritické štruktúrne vlastnosti: membránové lipidy sú **amfipatické** (**amfifilné**) molekuly, t.j. obsahujú **hydrofilnú** aj **hydrofóbnu** časť.

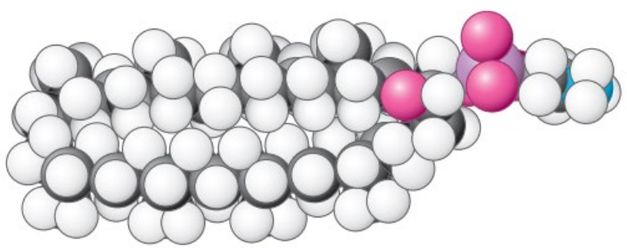
Model fosfoglyceridu, ako je napríklad fosfatidylcholín.



Fosfoglycerid



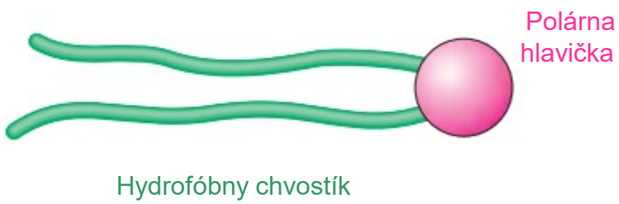
Sfingomyelín



Archaeálny lipid

Dva reťazce hydrofóbnych mastných kyselín sú navzájom rovnobežné, zatiaľ čo hydrofilná fosforylcholínová skupina je orientovaná opačným smerom. Sfingomyelín má podobnú konformáciu, rovnako ako aj znázornený archaeálny lipid.

Na znázornenie týchto membránových lipidov sa prijal nasledujúci model: hydrofilná jednotka, nazývaná tiež **polárna hlavička**, predstavuje kruh a uhľovodíkové reťazce (**hydrofóbny chvostík**) sú znázornené priamymi čiarami alebo vlnovkami.

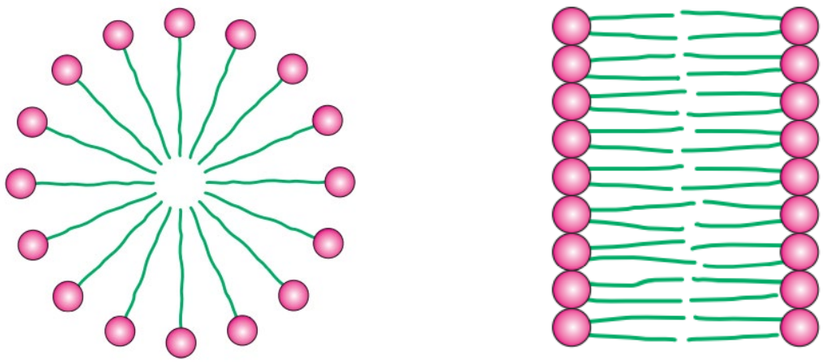


MEMBRÁNY - ŠTRUKTÚRA

Fosfolipidy a glykolipidy vo vodnom prostredí tvoria bimolekulové ploché štruktúry – membrány.

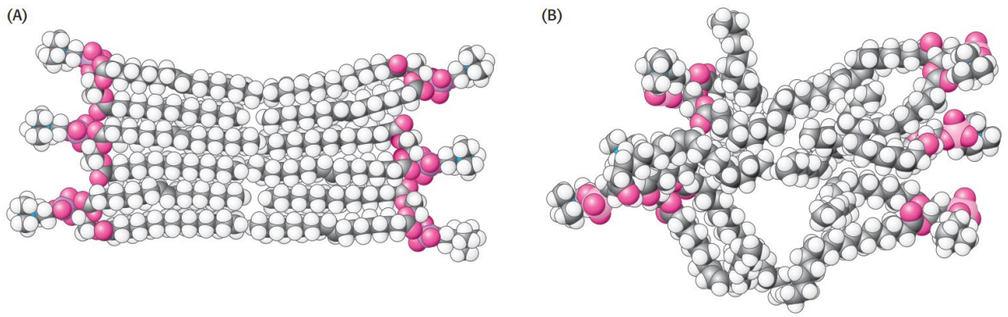
Aké vlastnosti umožňujú fosfolipidom vytvárať membrány? Tvorba membrány je dôsledkom amfipatickej povahy molekúl. Ich polárne hlavičky uprednostňujú kontakt s vodou, zatiaľ čo ich uhľovodíkové reťazce interagujú prednostne so sebou. Ako sa môžu molekuly s takýmito vlastnosťami usporiadať vo vodných roztokoch? Jedným zo spôsobov je vytvorenie guľovitej štruktúry nazývanej **micela**. Skupiny polárnych hlavičiek tvoria vonkajší povrch micely, ktorý je obklopený vodou, a uhľovodíkové chvostíky sú vo vnútornej časti, kde navzájom interagujú.
Alternatívne silne odlišné preferencie hydrofilných a hydrofóbne skupín membránových lipidov môžu viesť k tvorbe **lipidovej dvojvrstvy**. Lipidová dvojvrstva sa tiež nazýva **bimolekulový list**. Hydrofóbne konce každého jednotlivého listu interagujú navzájom a vytvárajú hydrofóbny interiér, ktorý funguje ako bariéra priepustnosti, zatiaľ čo hydrofilné hlavičky interagujú s vodným médiom na každej strane dvojvrstvy.

Preferovaná štruktúra pre väčšinu fosfolipidov a glykolipidov vo vodnom médiu je bimolekulový list. Lipidové dvojvrstvy sa tvoria spontánne procesom samousporiadania. Rast lipidových dvojvrstiev z fosfolipidov je vo vode rýchly a spontánny. Hydrofóbne interakcie sú hlavnou hnacou silou pre tvorbu lipidových dvojvrstiev.



Schematické znázornenie micely (vľavo) a výseku z lipidovej dvojvrstvy (vpravo)

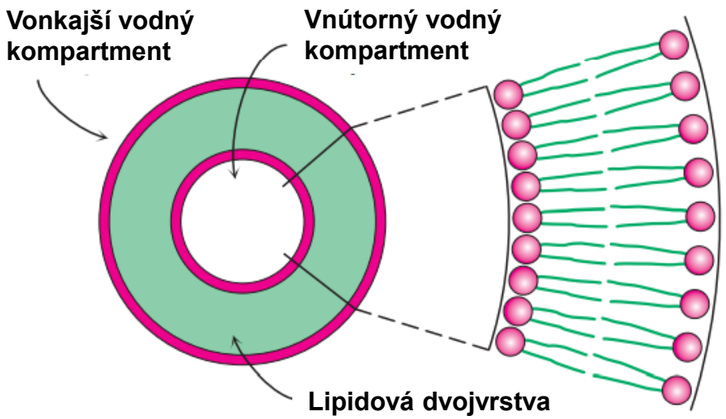
Na stabilizácii lipidovej dvojvrstvy sa podieľajú **van der Waalsove** príťažlivé sily medzi uhľovodíkovými chvostíkmi a **elektrostatické** a **vodíkové** interakcie medzi skupinami polárnych hlavičiek a molekulami vody. Lipidové dvojvrstvy sú tak stabilizované celým radom síl, ktoré sprostredkovávajú molekulárne interakcie v biologických systémoch. Pretože lipidové dvojvrstvy sú držané pohromade mnohými zosilňujúcimi, nekovalentnými interakciami (prevažne hydrofóbnymi), sú to **kooperatívne štruktúry**.
Tieto hydrofóbne interakcie majú tri významné biologické dôsledky: (1) lipidové dvojvrstvy majú inherentnú tendenciu byť rozsiahle; (2) lipidové dvojvrstvy majú tendenciu uzatvárať sa tak, aby neexistovali žiadne hrany s exponovanými uhľovodíkovými reťazcami; a (3) lipidové dvojvrstvy sú samotesniace, pretože diera v dvojvrstve je energeticky nepriaznivá.



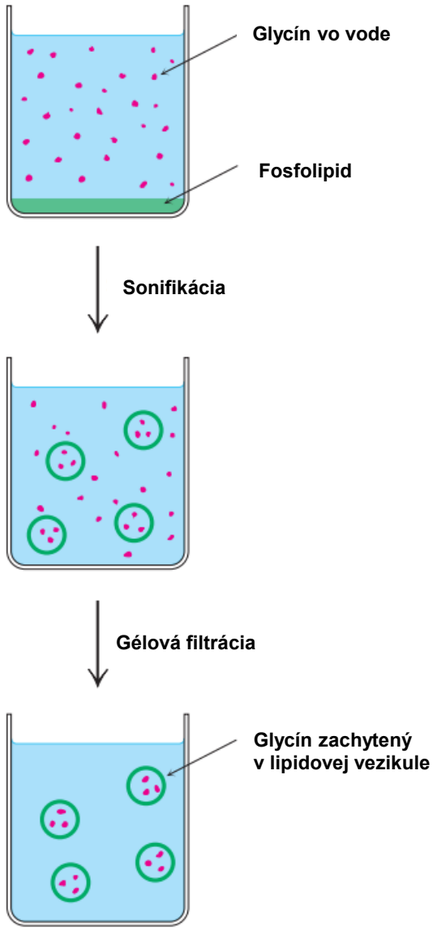
Priestorový model úseku časti fosfolipidovej dvojvrstvovej membrány. (A) Idealizovaný pohľad zobrazujúci pravidelné štruktúry. (B) Realistickejší pohľad na tekutú dvojvrstvu, ktorá zobrazuje viac nepravidelné štruktúry reťazcov mastných kyselín.

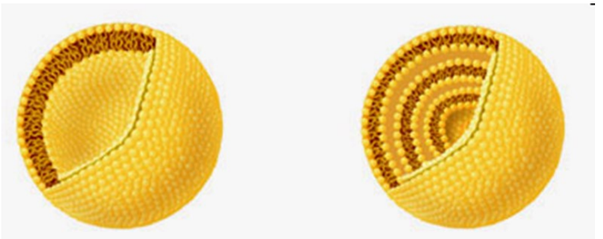
LIPOZÓMY

Sklon fosfolipidov k tvorbe membrán sa použil na vytvorenie dôležitého experimentálneho a klinického nástroja. **Lipidové vezikuly** alebo **lipozómy** sú lipidové dvojvrstvy uzatvárajúce vodný kompartment vo vnútri týchto štruktúr. Tieto štruktúry sa môžu použiť na štúdium permeability membrán alebo na dodanie chemických látok do buniek. Lipozómy sa tvoria suspendovaním vhodného lipidu, ako je napríklad fosfatidylcholín vo vodnom prostredí, a následnom pôsobení ultrazvuku (t. j. vysokofrekvenčnými zvukovými vlnami), čím sa získava disperzia uzavretých vezikúl.



Lipozóm alebo **lipidová vezikula** je lipidová dvojvrstva uzatvárajúca vnútorný vodný kompartment.



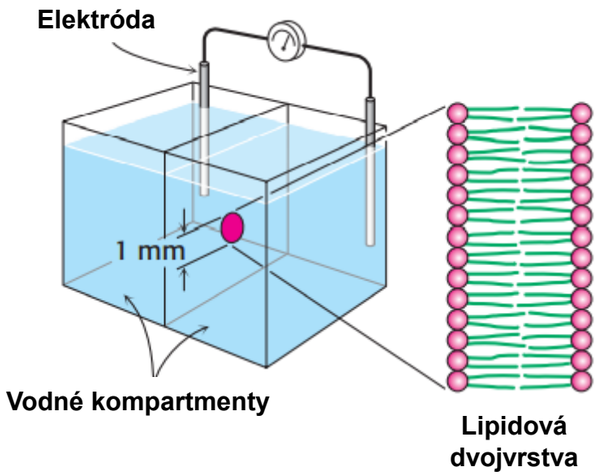


Unilamelárne lipozómy Multilamelárne lipozómy

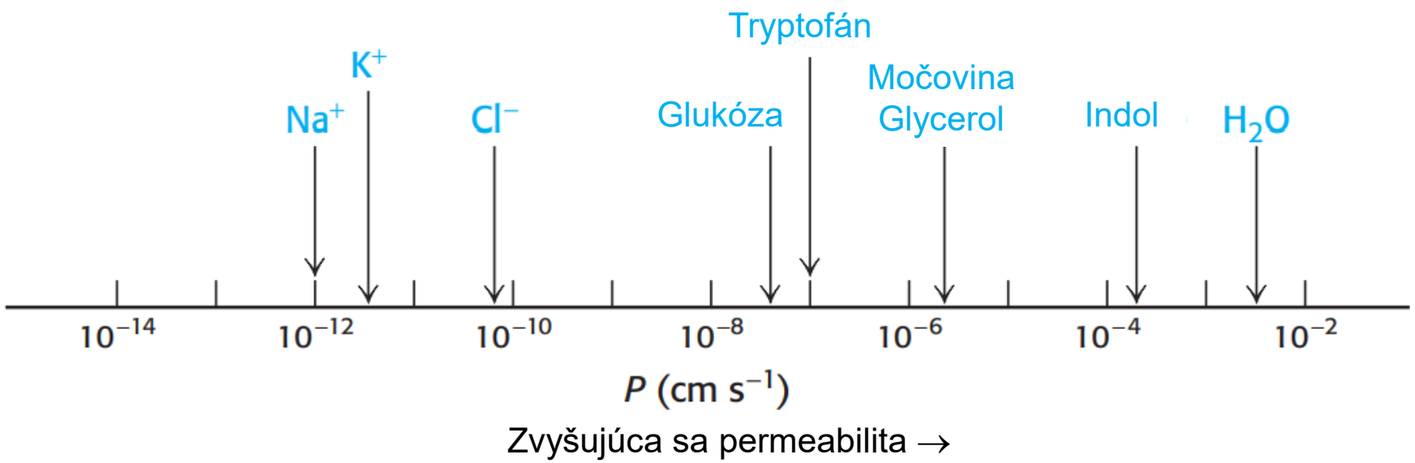
Príprava lipozómov obsahujúcich glycín. Lipozómy obsahujúce glycín sa tvoria pôsobením ultrazvuku na fosfolipidy v prítomnosti glycínu. Voľný glycín sa odstráni gélovou filtráciou.

LIPIDOVÁ DVOJVRSTVA JE NEPRIEPUSTNÁ PRE IÓNY A VÄČŠINU POLÁRNYCH MOLEKÚL

Štúdie permeability lipidových vezikúl a merania elektrickej vodivosti planárnych dvojvrstiev ukázali, že lipidové dvojvrstvové membrány majú veľmi nízku priepustnosť pre ióny a väčšinu polárnych molekúl. Molekula vody je výnimkou z tohto zovšeobecnenia. Molekuly vody prechádzajú cez tieto membrány relatívne ľahko kvôli svojej nízkej molekulovej hmotnosti, vysokej koncentrácii a neprítomnosti náboja. Rozsah nameraných koeficientov priepustnosti je veľmi široký. Napríklad Na^+ a K^+ prechádzajú týmito membránami 10^9-krát pomalšie ako molekuly H_2O.
Priepustnosť malých molekúl koreluje s ich rozpustnosťou v nepolárnom rozpúšťadle v pomere k ich rozpustnosti vo vode. Tento vzťah naznačuje, že malá molekula môže prechádzať lipidovou dvojvrstvovou membránou nasledujúcim spôsobom: (i) najskôr sa zbaví svojej solvatačnej vrstvy z molekúl vody; (ii) potom sa rozpustí v uhľovodíkovej vrstve membrány; a (iii) nakoniec difunduje cez toto jadro na druhú stranu membrány, kde sa opäť solvatuje vodou.



Experimentálne usporiadanie na štúdium rovinnej membránovej dvojvrstvy. Vytvorí sa membrána v 1 mm otvore priehradky, ktorá oddeľuje dva vodné oddiely. Toto usporiadanie umožňuje meranie priepustnosti a elektrickej vodivosti lipidovej dvojvrstvy.

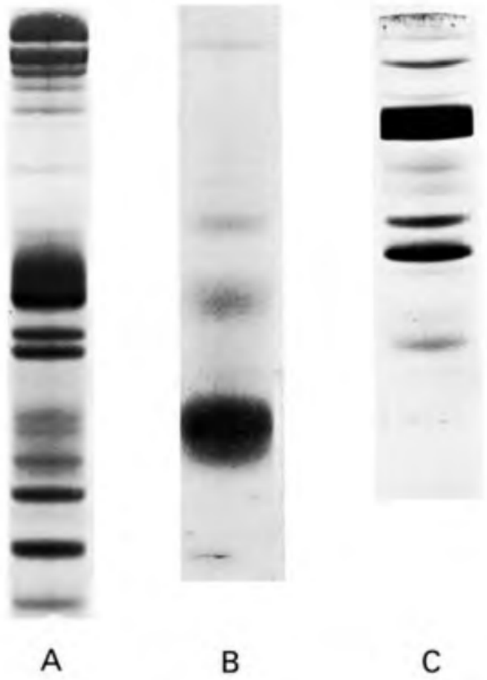


Koeficienty permeability (P) iónov a molekúl v lipidovej dvojvrstve.
Schopnosť molekúl prekonať lipidovú dvojvrstvu je reprezetovaná širokým spektrom hodnôt.

MEMBRÁNOVÉ PROTEÍNY USKUTOČŇUJÚ VÄČŠINU MEMBRÁNOVÝCH PROCESOV

Membránové lipidy tvoria bariéru priepustnosti a tým vytvárajú kompartmenty, zatiaľ čo špecifické proteíny sprostredkovávajú takmer všetky ostatné membránové funkcie. Proteíny predovšetkým zabezpečujú transport zlúčenín a informácií cez membránu. Membránové lipidy vytvárajú vhodné prostredie pre pôsobenie takýchto proteínov.

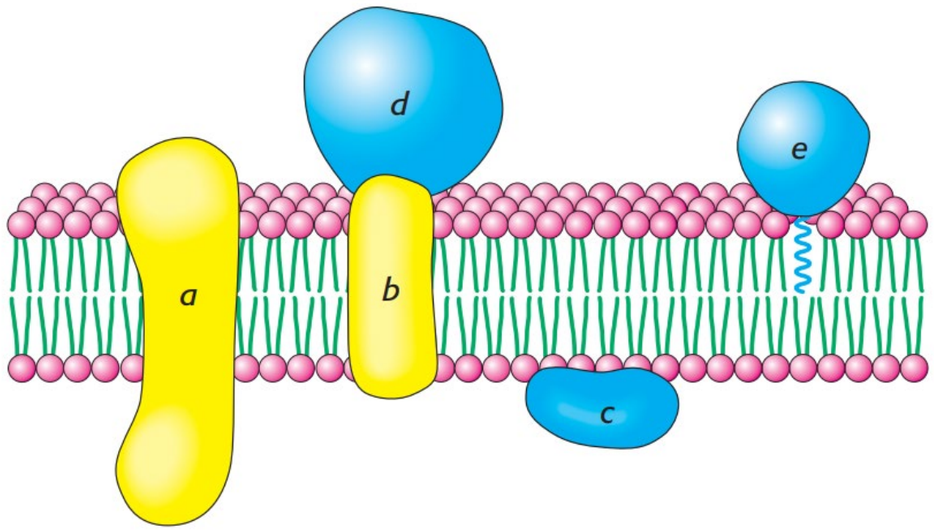
Membrány sa líšia obsahom proteínov. Myelínová membrána, ktorá slúži ako elektrický izolátor okolo určitých nervových vlákien, má nízky obsah proteínov (18%). Relatívne čisté lipidy sú veľmi vhodné na izoláciu. Naproti tomu plazmatické membrány alebo vonkajšie membrány väčšiny buniek sú oveľa metabolicky aktívnejšie. Obsahujú veľa púmp, kanálov, receptorov a enzýmov. Obsah proteínov v týchto plazmatických membránach je zvyčajne 50%. Membrány, zúčastňujúce sa na prenose energie, ako napríklad vnútorné membrány mitochondrií a chloroplastov, majú najvyšší obsah proteínov, zvyčajne 75%. Vo všeobecnosti, membrány zabezpečujúce rozdielne funkcie obsahujú rozdielny repertoár proteínov.



SDS – akrylamidový gél membránových proteínov. (A) Plazmatická membrána erytrocytov. (B) Fotoreceptorové membrány tyčinkových buniek sietnice. (C) Membrána sarkoplazmatického retikula svalových buniek.

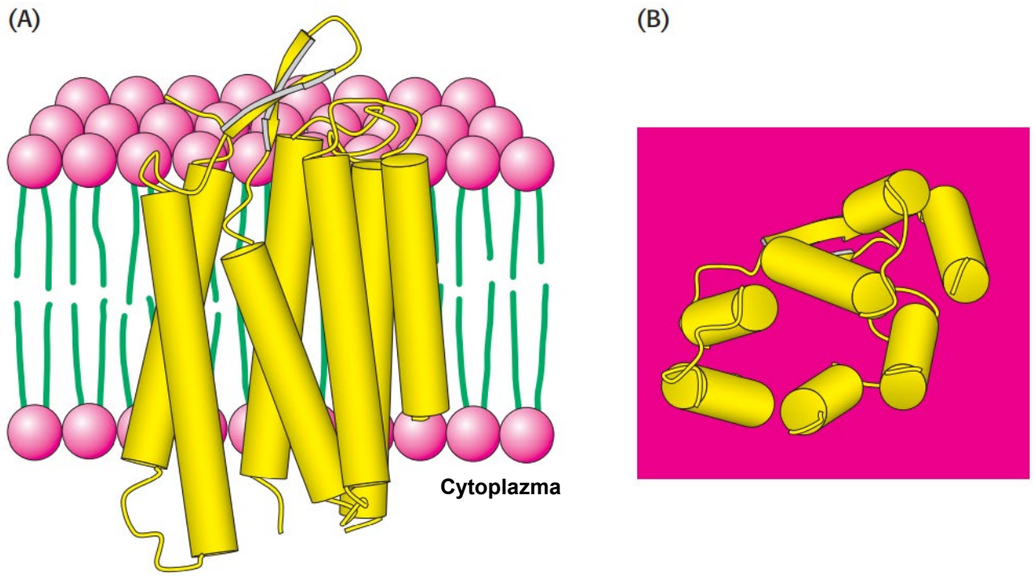
PROTEÍNY SÚ ASOCIOVANÉ S LIPIDOVOU DVOJVRSTVOU RÔZNYMI SPÔSOBMI

Spôsob akým je možné proteíny oddeliť od membrány naznačuje ako pevne sú proteíny spojené s membránou. Niektoré membránové proteíny je možné solubilizovať relatívne miernymi prostriedkami, napríklad extrakciou pomocou roztoku s vysokou iónovou silou (napr. 1 M NaCl). Iné membránové proteíny sú viazané oveľa pevnejšie a môžu byť solubilizované iba použitím detergentu alebo organického rozpúšťadla. **Membránové proteíny** možno klasifikovať ako **periférne** alebo **integrálne** na základe tohto rozdielu v rozpustnosti. Integrálne membránové proteíny intenzívne interagujú s uhľovodíkovými reťazcami membránových lipidov a môžu sa uvoľňovať iba agentmi, ktorí súťažia o tieto nepolárne interakcie. Väčšina integrálnych membránových proteínov prechádza lipidovou dvojvrstvou. Naopak proteíny nachádzajúce sa na periférii membrán sú viazané na membrány predovšetkým elektrostatickými a vodíkovými väzbami s hydofilnými hlavičkami lipidov. Tieto polárne interakcie je možné narušiť pridaním solí alebo zmenou pH. Veľa perifférnych membránových proteínov sú viazané na povrchy integrálnych proteínov.



Integrálne a periférne membránové proteíny.
Integrálne membránové proteíny (*a* a *b*) intenzívne interagujú s uhľovodíkovou/hydrofóbnou oblasťou dvojvrstvy. Väčšina známych integrálnych membránových proteínov prechádza lipidovou dvojvrstvou. Periférne membránové proteíny interagujú s polárnou hlavičkou lipidov (*c*) alebo sa viažu na povrchy integrálnych proteínov (*d*). Ostatné proteíny sú pevne ukotvené na membránu kovalentnou väzbou s molekulou lipidu (*e*).

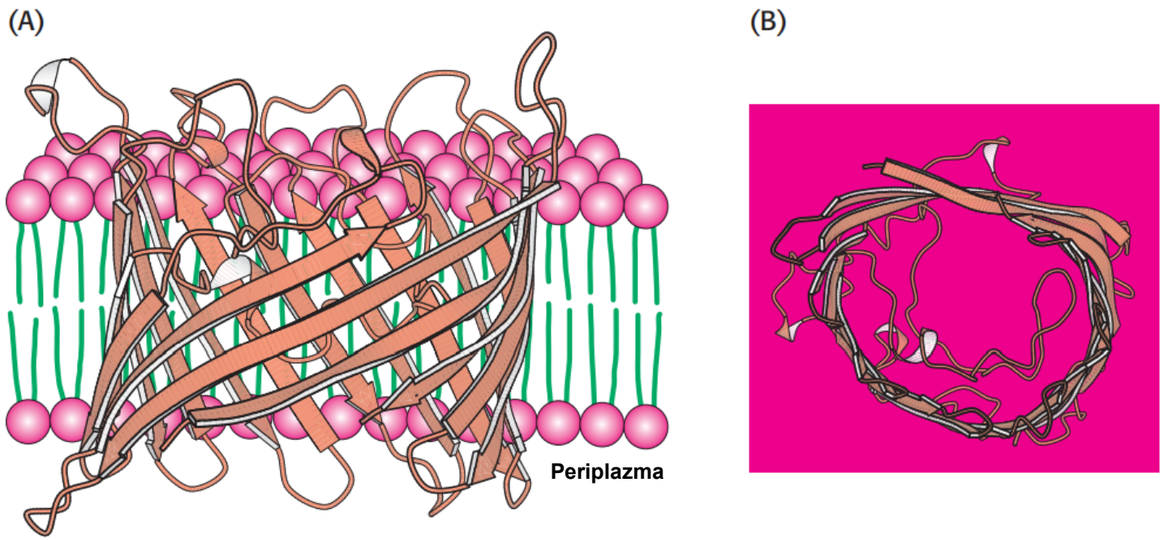
PRÍKLADY INTEGRÁLNYCH MEMBRÁNOVÝCH PROTEÍNOV



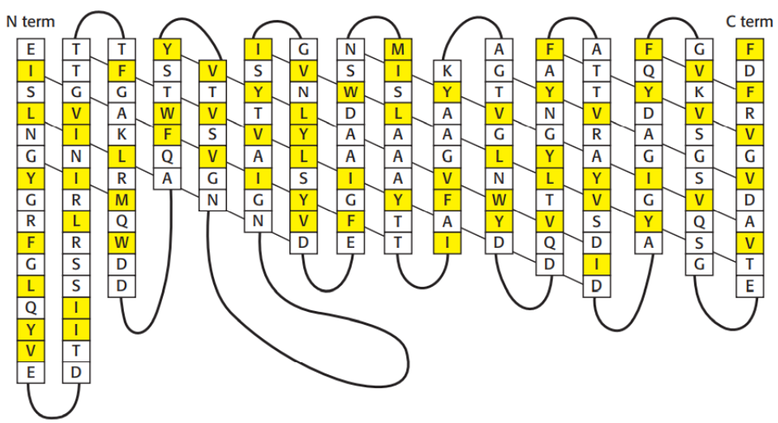
Štruktúra bakteriorodopsínu. Bakteriorodopsín sa skladá prevažne z α helixov prechádzajúcich membránou (znázornené žltými valcami). (A) Pohľad cez membránovú dvojvrstvu. Interiér membrány je znázornený zelenou farbou a polárne hlavičky červenou. (B) Pohľad z cytoplazmatickej strany membrány.

```
AQITGRPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKKFYAITTLVPA
IAFTMYLSMLLGYGLTMVPFGGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLV
DADQGTILALVGADGIMIGTGLVGALTKVYSYRFVWWAISTAAMLYILYV
LFFGFTSKAESMRPEVASTFKVLRNVTVVLWSAYVVVWLIGSEGAGIVPL
NIETLLFMVLDVSAKVGFGLILLRSRAIFGEAEAPEPSADGAAATS
```

Aminokyselinová sekvencia bakteriorodopsínu. Sedem helixov oblastí je zvýraznených žltou farbou a nabité aminokyselinové zvyšky červenou farbou.



Štruktúra bakteriálneho porínu (z *Rhodopseudomonas blastica*). Tento membránový proteín je celý zložený z β-listov. (A) Bočný pohľad. (B) Pohľad z periplazmatického priestoru. Iba jeden monomér trimérneho proteínu je zobrazený.



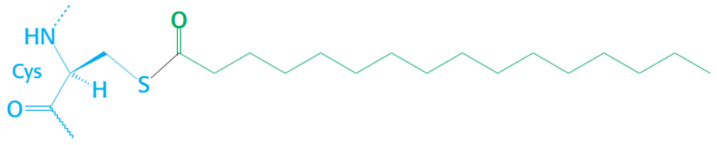
Aminokyselinová sekvencia porínu. Niektoré membránové proteíny, ako napríklad poríny, sú vytvorené z β–reťazcov, ktoré sa skladajú tak z hydrofóbnych ako aj hydrofilných aminokyselín. Znázornená je sekundárna štruktúra porínu z *Rhodopseudomonas blastica*, kde diagonálne čiary označujú vodíkové väzby pozdĺž β–listu. Hydrofóbne zvyšky (F, I, L, M, V, W a Y) sú zobrazené žltou farbou. Tieto zvyšky sú zvyčajne lokalizované na vonkajšej strane štruktúry a sú v kontakte s hydrofóbnym jadrom membrány.

KOVALENTNÉ HYDROFÓBNE KOTVY

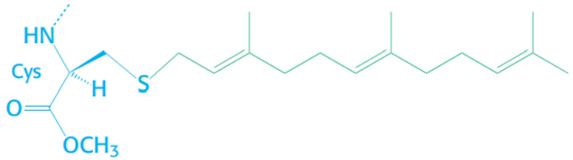
Typické membránové proteíny sú vďaka hydrofóbnym interakciám s vnútrom lipidovej dvojvrstvy spojené s membránou. Avšak aj inak rozpustné proteíny sa môžu spájať s membránami, ak sú k proteínom pripojené špecifické hydrofóbne skupiny.
Tri takéto skupiny sú zobrazené na obrázku:

(1) palmitoylová skupina pripojená k špecifickému cysteínovému zvyšku tioesterovou väzbou,
(2) farnezylová skupina pripojená k cysteínovému zvyšku na karboxylovom konci,
(3) glykolipidová štruktúra označovaná ako glyko-sylfosfatidylinozitolová (GPI) kotva pripojená na karboxylovom konci.

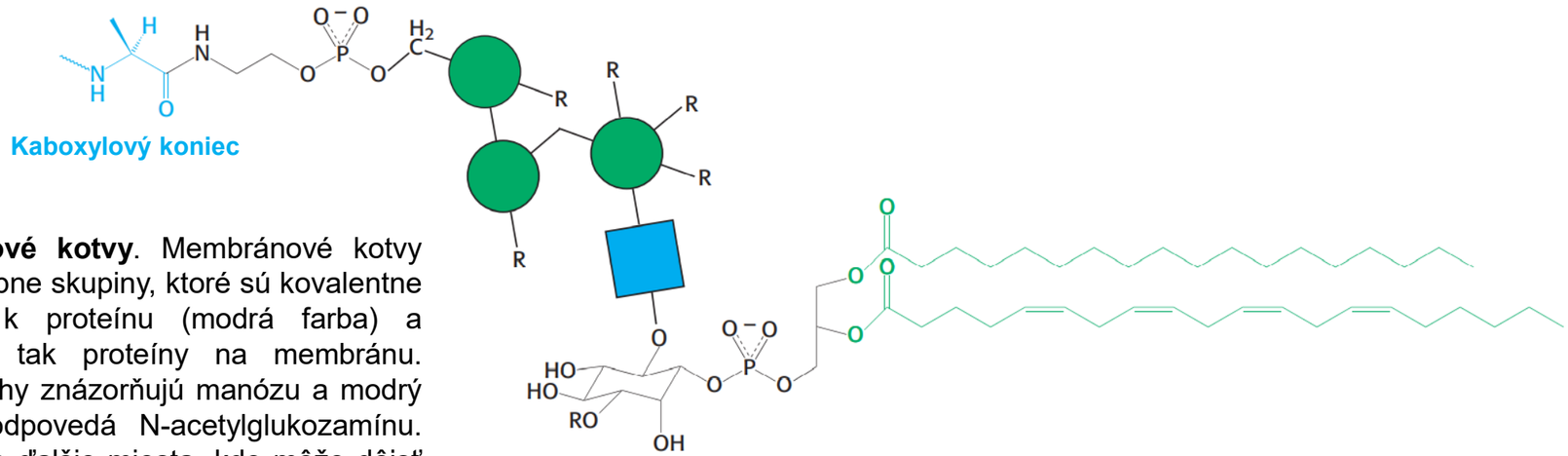
Tieto modifikácie sú pripojené enzýmovými systémami, ktoré rozpoznávajú špecifické signálne sekvencie v blízkosti miesta pripojenia.



S-Palmitoylcysteín



C-terminálny S-farnezylcysteín metylester

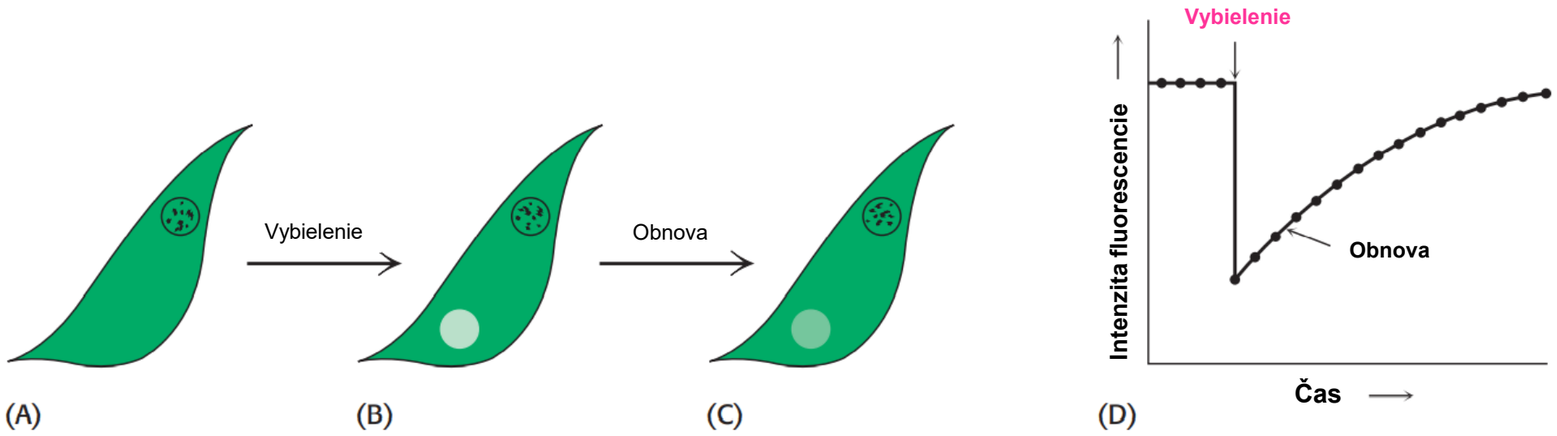


Membránové kotvy. Membránové kotvy sú hydrofóbne skupiny, ktoré sú kovalentne pripojené k proteínu (modrá farba) a pripevňujú tak proteíny na membránu. Zelené kruhy znázorňujú manózu a modrý štvorec zodpovedá N-acetylglukozamínu. R označuje ďalšie miesta, kde môže dôjsť k ďalšej modifikácii.

Glykozylfosfatidylinozitolová (GPI) kotva

DYNAMIKA MEMBRÁN

Biologické membrány nie sú pevné, statické štruktúry. Naopak lipidy a mnoho membránových proteínov je neustále v laterálnom pohybe, čo je proces nazývaný **laterálna difúzia**. Rýchly laterálny pohyb membránových proteínov bol vizualizovaný pomocou fluorescenčnej mikroskopie pomocou techniky obnovy fluorescencie po fotobielení (Fluorescence Recovery After Photobleaching - FRAP).



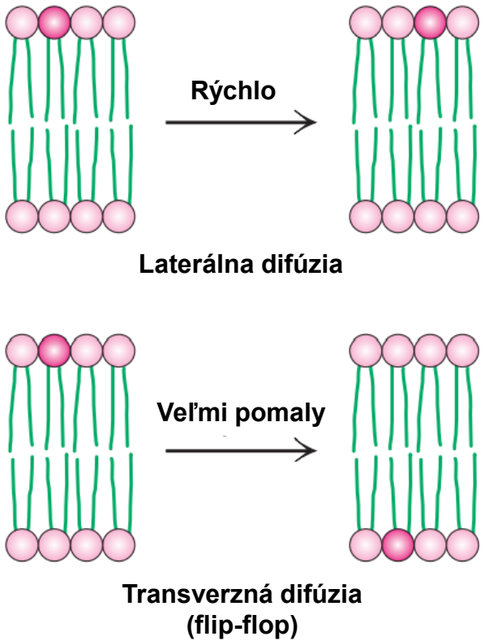
Technika obnovy fluorescencie po „fotobielení“. (A) Bunkový povrch fluoreskuje v dôsledku fluorescenčnej značky na povrchu membrány. (B) Fluorescenčné molekuly malej časti povrchu sú vybielené intenzívnym svetelným impulzom. (C) Intenzita fluorescencie sa obnoví, pretože „vybielené“ molekuly difundujú z danej oblasti a do neho difundujú nepoškodené molekuly. D. Rýchlosť obnovy fluorescencie závisí od difúzneho koeficientu prostredia.

Rýchlosť regenerácie fluorescencie závisí od laterálnej pohyblivosti fluorescenčne označenej zložky na povrchu membrány, ktorú je možné vyjadriť pomocou difúzneho koeficientu, D. Priemerná vzdialenosť S prejdená v čase *t* závisí od *D* podľa vzťahu: $S = (4Dt)^{1/2}$.
Difúzny koeficient lipidov v rôznych membránach je asi 1 $\mu m^2\ s^{-1}$. Teda, fosfolipidová molekula prejde difúziou priemernú vzdialenosť 2 μm za 1 s. Táto rýchlosť znamená, že lipidová molekula môže prejsť z jedného konca baktérie na druhý koniec za sekundu. Veľkosť pozorovaného difúzneho koeficientu znamená, že viskozita membrány je asi 100-násobná v porovnaní s viskozitou vody.

Proteíny sa výrazne líšia vo svojej laterálnej mobilite. Niektoré proteíny sú takmer také mobilné ako lipidy, zatiaľ čo iné sú prakticky imobilné.

DYNAMIKA MEMBRÁN

Laterálna difúzia komponentov membrány môže byť rýchla, avšak spontánna rotácia lipidov z jednej strany membrány na druhú je veľmi pomalý proces. Prechod molekuly z jedného povrchu membrány na druhý sa nazýva **priečna difúzia** alebo **flip-flop**. Flip-flop fosfolipidových molekúl vo fosfatidylcholínových vezikulách bol priamo meraný technikou rezonancie elektrónových spinov, ktoré ukazujú, že molekula fosfolipidu uskutoční flip-flop raz za niekoľko hodín. Molekule fosfolipidu trvá asi 10^9 krát dlhšie transport prostredníctvom flip-flop, ako trvá difúzia fosfolipidu do vzdialenosti 50 Å. Bariéry voľnej energie pre flip-flop preklopenie sú ešte väčšie pre molekuly proteínov, pretože proteíny majú rozsiahlejšie polárne oblasti. V skutočnosti flip-flop prechod molekuly proteínu ešte nebol pozorovaný. Asymetria membrán teda môže byť zachovaná po dlhú dobu.

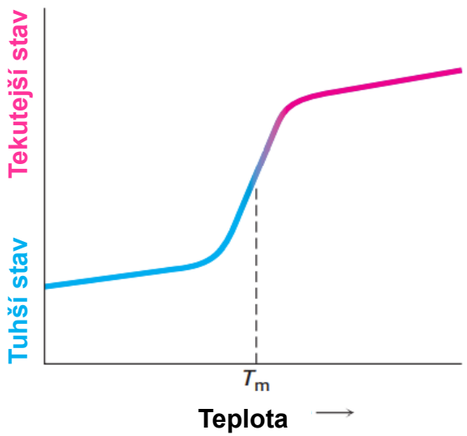


Pohyb lipidov v membráne. Laterálna difúzia lipidov je oveľa rýchlejšia ako priečna difúzia (flip-flop).

DYNAMIKA MEMBRÁN – KONTROLA FLUIDITY MEMBRÁN

Mnoho membránových procesov, ako je napríklad doprava alebo prenos signálu, závisia od tekutosti lipidových membrán, čo závisí od vlastnosti reťazcov mastných kyselín. Reťazce mastných kyselín v membránových dvojvrstvách môžu existovať v usporiadanom, tuhom stave alebo v relatívne neusporiadanom, tekutom stave. Prechod z tuhého do tekutého stavu nastáva náhle, keď sa teplota zvýši nad teplotu topenia, T_m. Táto teplota prechodu závisí od dĺžky reťazcov mastných kyselín a na ich stupni nenasýtenosti. Nasýtené mastné kyseliny uprednostňujú tuhý stav, pretože ich priame uhľovodíkové reťazce navzájom priaznivo interagujú. Na druhej strane *cis* dvojitá väzba vytvára ohyb v uhľovodíkovom reťazci. Tento ohyb prekáža usporiadaniu reťazcov mastných kyselín a to vedie k zníženiu hodnoty T_m. Teplotný prechod je ovplyvnený aj dĺžkou reťazca mastných kyselín. Dlhé uhľovodíkové reťazce interagujú silnejšie ako tie kratšie. Konkrétne, každá ďalšia skupina -CH_2- vytvára priaznivý príspevok približne -2 kJ/mol k voľnej energii vzájomného pôsobenia dvoch susedných uhľovodíkových reťazcov.

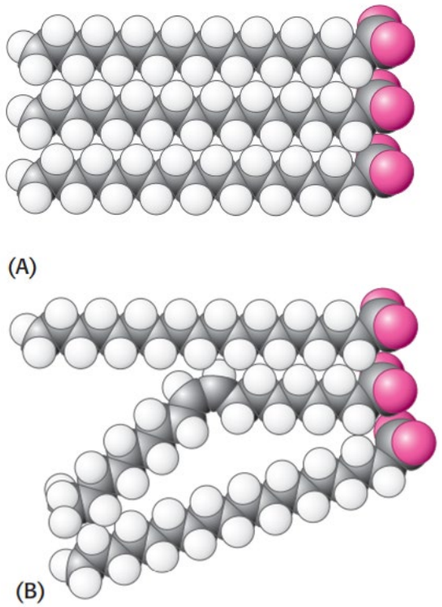
Baktérie regulujú tekutosť svojich membrán počtom dvojitých väzieb a dĺžkou reťazcov mastných kyselín.



Teplota topenia (T_m) pre fosfolipidovú membránu.

Teplota topenia fosfatidylcholínu obsahujúceho rôzne páry rovnakých reťazcov mastných kyselín

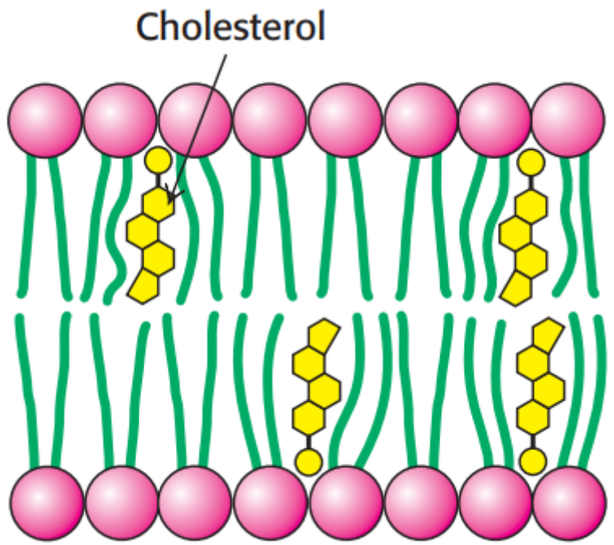
Počet uhlíkov	Počet dvojitých väzieb	Mastná kyselina		
		Triviálny názov	Systémový názov	T_m (°C)
22	0	Behenát	n-Dokozanoát	75
18	0	Stearát	n-Oktadekanoát	58
16	0	Palmitát	n-Hexadekanoát	41
14	0	Myristát	n-Tetradekanoát	24
18	1	Oleát	*cis*-Δ^9-Oktadekenoát	-22



Usporiadanie (packing) reťazcov mastných kyselín v membráne. Veľmi tesné usporiadanie reťazcov mastných kyselín narušuje prítomnosť *cis* dvojitých väzieb. Modely ukazujú usporiadanie (A) troch molekúl stearátu (C_{18}, nasýtené) a (B) jednej molekuly oleátu (C_{18}, nenasýtená) medzi dvoma molekulami stearátu.

DYNAMIKA MEMBRÁN – KONTROLA FLUIDITY MEMBRÁN

U živočíchov je cholesterol kľúčovým regulátorom tekutosti membrán.
Cholesterol obsahuje objemné steroidné jadro s hydroxylovou skupinou na jednom konci a pružný uhľovodíkový chvost na druhom konci. Cholesterol sa vkladá do dvojvrstiev tak, že jeho dlhá os je kolmá na rovinu membrány. Hydroxylová skupina skupina cholesterolu vytvára vodíkovú väzbu s karbonylovým atómom kyslíka na fosfolipidovej hlavičke, zatiaľ čo uhľovodíkový zvyšok cholesterolu sa nachádza v nepolárnom jadre dvojvrstvy. Odlišný tvar cholesterolu v porovnaní s fosfolipidmi narúša pravidelné interakcie medzi reťazcami mastných kyselín.



Cholesterol narúša tesné usporiadanie reťazcov mastných kyselín.

VŠETKY BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY SÚ ASYMETRICKÉ

Membrány sú štrukturne a funkčne asymetrické. Vonkajšie a vnútorné povrchy všetkých známych biologických membrán majú rôzne zložky a rozdielnu enzymatickú aktivitu.

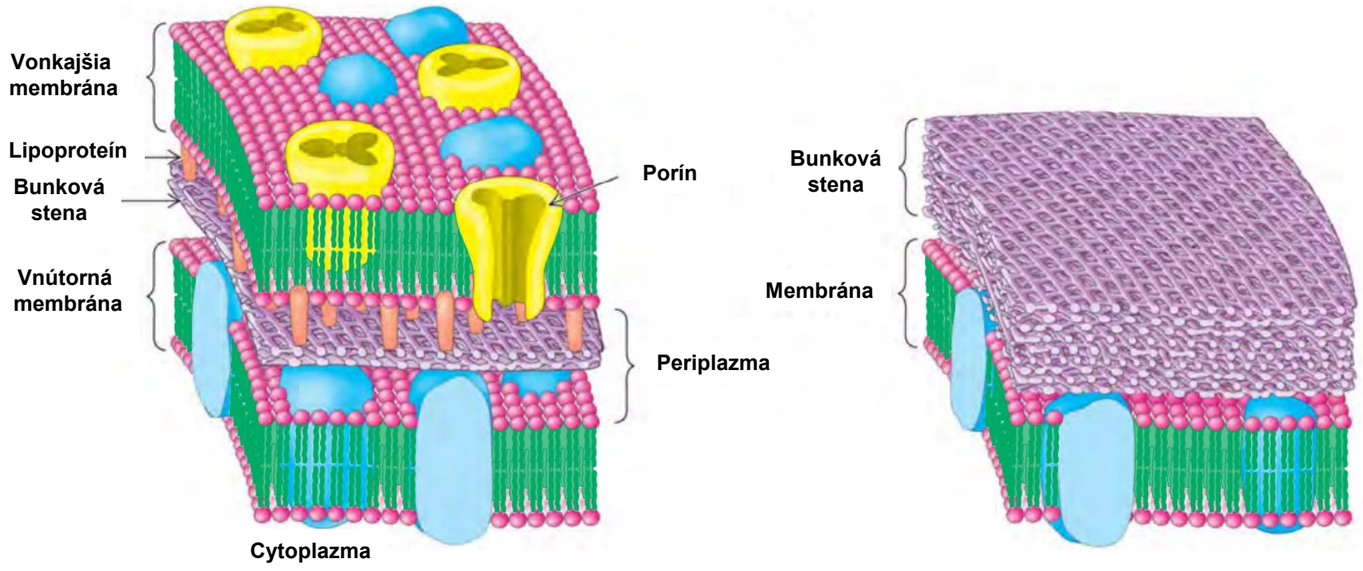
Membránové proteíny majú jedinečnú orientáciu, pretože pri syntéze sa vkladajú do membrány asymetrickým spôsobom. Táto absolútna asymetria je zachovaná, pretože membránové proteíny sa neotáčajú z jednej strany membrány na druhú.

Lipidy sú tiež asymetricky distribuované v dôsledku ich spôsobu biosyntézy, ale táto asymetria zvyčajne nie je absolútna, okrem glykolipidov. V membráne červených krviniek sú sfingomyelín a fosfatidylcholín prednostne umiestnené vo vonkajšej časti dvojvrstvy, zatiaľ čo fosfatidyletanolamín a fosfatidylserín sa nachádzajú hlavne vo vnútornej časti.
Asymetria lipidov v membráne má dôležitý význam pre funkciu membrán. Poznáme tri rôzne skupiny fosfolipidových transportných enzýmov, ktorých funkciou je prenos molekúl medzi vonkajšou a vnútornou časťou membrán. Tieto skupiny enzýmov majú príznačné názvy:

- skramblázy,
- flippázy,
- floppázy.

MEMBRÁNY V PROKARYOTOCH A EUKARYOTOCH

Prokaryotické bunky - Niektoré baktérie a *Archea* majú iba jedinú membránu obklopenú bunkovou stenou. Ostatné baktérie, ako napríklad *E. coli*, majú dve membrány oddelené bunkovou stenou (vytvorená z proteínov, peptidov a sacharidov). Vnútorná membrána slúži ako bariéra priepustnosti a vonkajšia membrána a bunková stena poskytujú ďalšiu ochranu. Vonkajšia membrána je celkom priepustná pre malé molekuly kvôli prítomnosti porínov. Oblasť medzi dvoma membránami obsahujúca bunkovú stenu sa volá **periplazma**.



Bunkové membrány prokaryotov. Schematický pohľad na bakteriálne membrány buniek, ktoré sú obklopené **dvoma membránami** (vľavo) alebo **jednou membránou** (vpravo).

Eukaryotické bunky s výnimkou rastlinných buniek nemajú bunkové steny a ich bunkové membrány pozostávajú z jednoduchej lipidovej dvojvrstvy. V rastlinných bunkách je bunková stena na vonkajšej strane plazmatickej membrány. Eukaryotické bunky sa od prokaryotických buniek odlišujú prítomnosťou membrán vo vnútri bunky, ktoré tvoria vnútorné kompartmenty. Napríklad peroxizómy, organely, ktoré hrajú hlavnú úlohu v oxidácii mastných kyselín na tvorbu energie, sú definované jedinou membránou. Mitochondrie, organely, v ktorých sa syntetizuje ATP, sú obklopené dvoma membránami. Rovnako ako v prípade baktérií je vonkajšia membrána mitochondrií úplne priepustná pre malé molekuly, zatiaľ čo vnútorná membrána nie je priepustná.

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať vlastnosti biologických membrán
- Uviesť základné zložky biologických membrán
- Čo určuje špecificitu priepustnosti biologických membrán
- Uviesť základné vlastnosti membránových proteínov
- Uviesť spôsoby modifikácie dynamických vlastností membránovej dvojvrstvy

Membránové prenášače, pumpy. Prenos iónov a látok cez membrány. 5

Aktívny a pasívny membránový transport
Pumpy
Nosiče
Kanály

TRANSPORT LÁTOK CEZ MEMBRÁNY

Lipidová dvojvrstva biologických membrán je **nepriepustná pre ióny a polárne molekuly**, avšak určité druhy týchto molekúl musia byť schopné prechodu cez biologiké membrány pre normálnu funkciu buniek. Priepustnosť membrán je zabezpečená troma triedami membránových proteínov:

(i) pumpy,
(ii) nosiče,
(iii) kanály.

Pumpy využívajú ako zdroj energie hydrolýzu ATP alebo energiu získanú z absorpcie svetla na to, aby mohli uskutočniť transport iónov alebo molekúl aj proti termodynamicky nevýhodnému koncentračnému gradientu. Takáto činnosť púmp je príkladom **aktívneho transportu** molekúil cez membránu.
Nosiče sprostredkúvajú prepravu iónov a malých molekúl cez membránu bez spotreby ATP.
Kanály vytvárajú póry v membráne, cez ktoré môžu ióny veľmi rýchlo prechádzať v smere termodynamického gradientu. Činnosť kanálov je príkladom **pasívneho transportu** alebo **uľahčenej difúzie**.

PASÍVNY A AKTÍVNY TRANSPORT LÁTOK CEZ MEMBRÁNY

Dva faktory určujú, či molekula bude prechádzať cez membránu:

(1) permeabilita molekuly v lipidovej dvojvrstve,
(2) dostupnosť zdroja energie.

Niektoré molekuly môžu prechádzať cez bunkové membrány pretože sa rozpúšťajú v lipidovej dvojvrstve. Takéto molekuly sa nazývajú **lipofilné molekuly**. Steroidné hormóny predstavujú fyziologický príklad. Tieto molekuly, príbuzné s cholesterolom, môžu prechádzať cez membránu. Čo určuje smer, ktorým sa budú pohybovať? Tieto molekuly prechádzajú cez membránu v smere koncentračného gradientu v procese zvanom **jednoduchá difúzia**.

Schopnosť prenosu cez membránu sa stáva komplikovanejšou, keď je molekula vysoko polárna. Napríklad sodné ióny sú prítomné pri koncentrácii 143 mM mimo typickej bunky a 14 mM vo vnútri bunky. Sodík však voľne nevstupuje do bunky, pretože nabitý ión nemôže prechádzať cez hydrofóbnu membránu. Za určitých okolností, napríklad počas nervového impulzu, sodné ióny vstupujú do bunky. Ako je to možné?
Ióny sodíka prechádzajú cez špecifické kanály v hydrofóbnej bariére tvorenej membránovými proteínmi. Tento spôsob prechodu cez membránu sa nazýva **uľahčená difúzia**, pretože difúziu cez membránu uľahčuje kanál. Nazýva sa tiež **pasívny transport**, pretože energia poháňajúca pohyb iónov pochádza zo samotného iónového gradientu bez akéhokoľvek príspevku transportného systému.

Ako sa vytvára gradient sodíka?
V tomto prípade sa totiž sodík musí pohybovať proti koncentračnému gradientu. Pohyb iónu z miesta nízkej koncentrácie na miesto s vyššou koncentráciou si vyžaduje dodanie energie. Proteínové transportéry zabudované v membráne sú schopné využívať túto energiu na transport molekuly voči koncentračnému gradientu. Pretože na prenos molekuly cez membránu je potrebná energia z iného zdroja, tento transport sa nazýva **aktívny transport**.

KVANTIFIKÁCIA GIBBSOVEJ ENERGIE V KONCENTRAČNOM GRADIENTE

Nerovnovážne rozdelenie molekúl je situácia, ktorá je bohatá na využiteľnú energiu, pretože Gibbsova energia sa minimalizuje, keď sú koncentrácie molekúl rovnaké na oboch stranách membrány. Dosiahnutie nerovnovážnej distribúcie molekúl si vyžaduje prísun Gibbsovej energie.
Ako môžeme kvantifikovať množstvo Gibbsovej energie potrebnej na generovanie koncentračného gradientu?
Zmena Gibbsovej energie pri preprave nenabitejmolekuly zo strany 1, kde je prítomná v koncentrácii c_1, na stranu 2, kde je prítomná v koncentrácii c_2, je:

$$\Delta G = RTln(c_2/c_1)$$

V prípade nabitých molekúl, ich nerovnomerné rozdelenie na povrchoch membrány vytvára elektrický potenciál, ktorý je tiež potrebné vziať do úvahy, Súčet koncentračných a elektrických členov sa nazýva **elektrochemický potenciál** alebo **membránový potenciál**. Zmena voľnej energie je potom daná vzťahom:

$$\Delta G = RTln(c_2/c_1) + ZF\Delta V$$

Z je elektrický náboj prenášanej molekuly, ΔV je potenciál existujúci na membráne a *F* je Faradayova konštanta (96,5 kJ V^{-1} mol^{-1}).
Transportný proces je aktívny, keď je hodnota ΔG pozitívna, a je pasívny, keď je ΔG záporná.

Príklad: O aký typ transportu sa jedná pri preprave nenabitej molekuly z $c_1 = 10^{-3}$ M do $c_2 = 10^{-1}$ M.

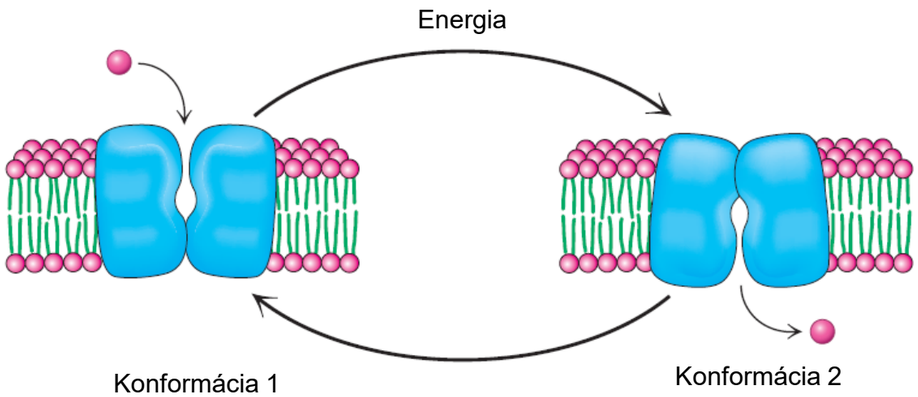
$$\Delta G = RTln(10^{-1}/10^{-3}) = +11.4\ kJmol^{-1}$$

pri 25°C je hodnota ΔG pozitívna, čo značí, že transport vyžaduje dodanie energie – ide o aktívny transport.

PUMPY

Extracelulárna tekutina živočíšnych buniek má podobnú koncentráciu solí ako morská voda. Bunky však musia kontrolovať koncentrácie intracelulárnej soli na uľahčenie špecifických procesov, ako je prenos signálu a šírenia akčného potenciálu, ako aj pre zabránenie nepriaznivým interakciám s vysokými koncentráciami iónov, napr. Ca^{2+}. Väčšina živočíšnych buniek obsahuje vysokú koncentráciu K^+ a nízku koncentráciu Na^+ vzhľadom na externé médium. Tieto iónové gradienty sú generované špecifickým transportným systémom, enzýmom, ktorý sa nazýva Na^+-K^+ pumpa alebo Na^+-K^+ ATPáza. Hydrolýza ATP pumpou poskytuje potrebnú energiu na aktívny transport Na^+ z bunky a K^+ do bunky, ktoré generujú elektrochemické gradienty. Pumpa sa nazýva Na^+-K^+ ATPáza, pretože hydrolýza ATP prebieha iba za prítomnosti Na^+ a K^+. T

Zmenu Gibbsovej energie sprevádzajúcu transport Na^+ a K^+ je možné vypočítať. Predpokladajme, že extracelulárna koncentrácia Na^+ je 143 mM a vo vnútri bunky 14 mM, zodpovedajúce hodnoty pre K^+ sú 4 mM a 157 mM. Zmena Gibbsovej energie pri teplote 37 °C pri transporte 3 mólov Na^+ z bunky a 2 mólov K^+ do bunky zodpovedá hodnote 3x(5,99) + 2x(9,46) = +36,9 $kJ.mol^{-1}$. Za typických bunkových podmienok hydrolýza jednej molekuly ATP vedie k hodnote približne -50 $kJ.mol^{-1}$. Táto hydrolýza tak môže poskytnúť dostatok Gibbsovej energie na jeden transportný cyklus prenosu týchto iónov proti koncentračnému gradientu. Aktívny transport Na^+ a K^+ má veľký fyziologický význam. V skutočnosti viac ako tretina ATP spotrebovaná živočíšnymi bunkami (v stave pokoja) sa využíva na transport týchto iónov.



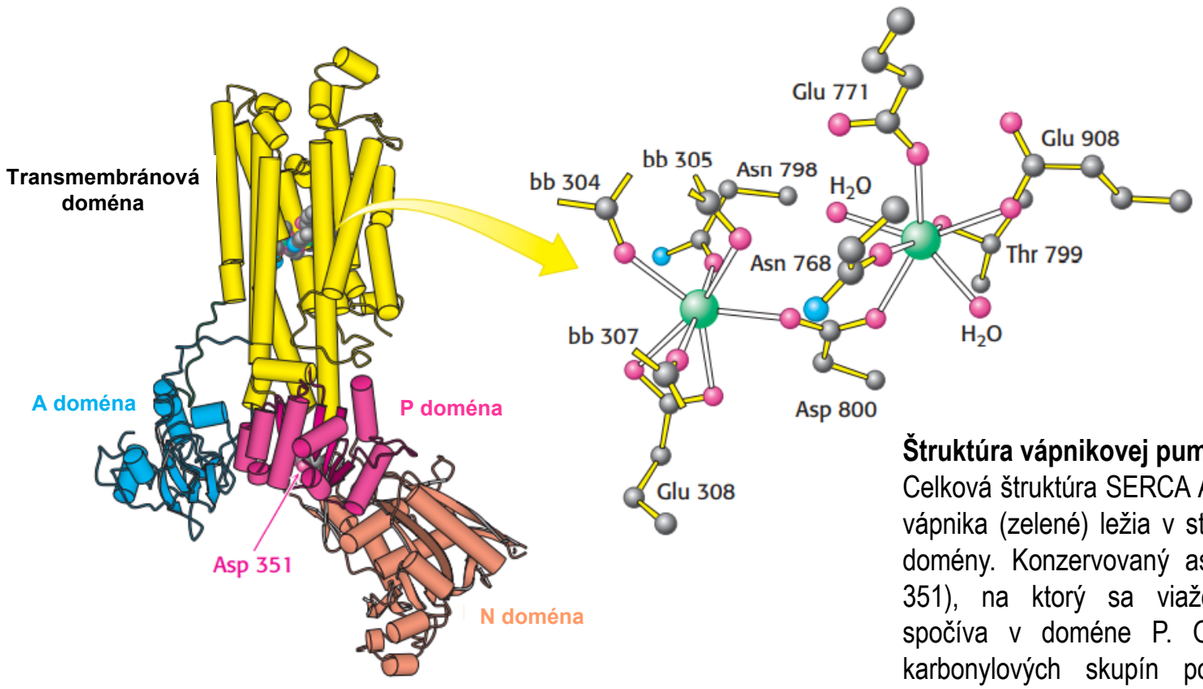
Činnosť pumpy. Jednoduchá schéma pumpovania molekúl cez membránu. Pumpa môže existovat v dvoch konformačných stavoch, každý s väzbovým miestom prístupným z inej strany membrány.

PUMPY – P-TYP ATPÁZA

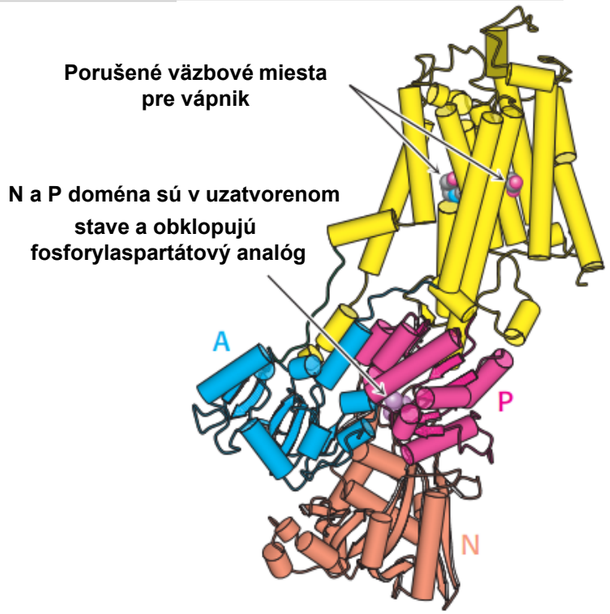
Membránové pumpy fungujú prostredníctvom mechanizmov, ktoré sú v zásade jednoduché, ale často zložité v detailoch. V zásade môže každá pumpa existovať v dvoch hlavných konformačných stavoch, jednom s iónovo-väzobnými miestami otvorenými na jednej strane membrány a druhom s iónovo-viažucimi miestami otvorenými na druhej strane membrány. Pumpovanie iónov jedným smerom cez membránu je spojené s interkonverziou medzi týmito konformačnými stavmi vďaka energii hydrolýzy ATP.

Štrukturne a mechanické vlastnosti typu P ATPázy – prípad SERCA. Táto pumpa udržuje koncentráciu Ca^{2+} približne 0,1 μM v cytoplazme buniek v porovnaní s 1,5 mM v sarkoplazmatickom retikule. Enyým SERCA je tvorený jedným 110-kDa polypeptidom s transmembránovou doménou pozostávajúcou z 10 α–helixov. Transmembránová doména obsahuje miesta pre viazanie dvoch iónov vápnika. Každý ión vápnika je koordinovaný na sedem atómov kyslíka pochádzajúcich z kombinácie zvyškov glutamátu, aspartátu, treonínu a asparagínu, karbonylovej skupiny hlavného reťazca a molekuly vody.

SERCA je pozoruhodne štrukturne/konformačne dynamická.

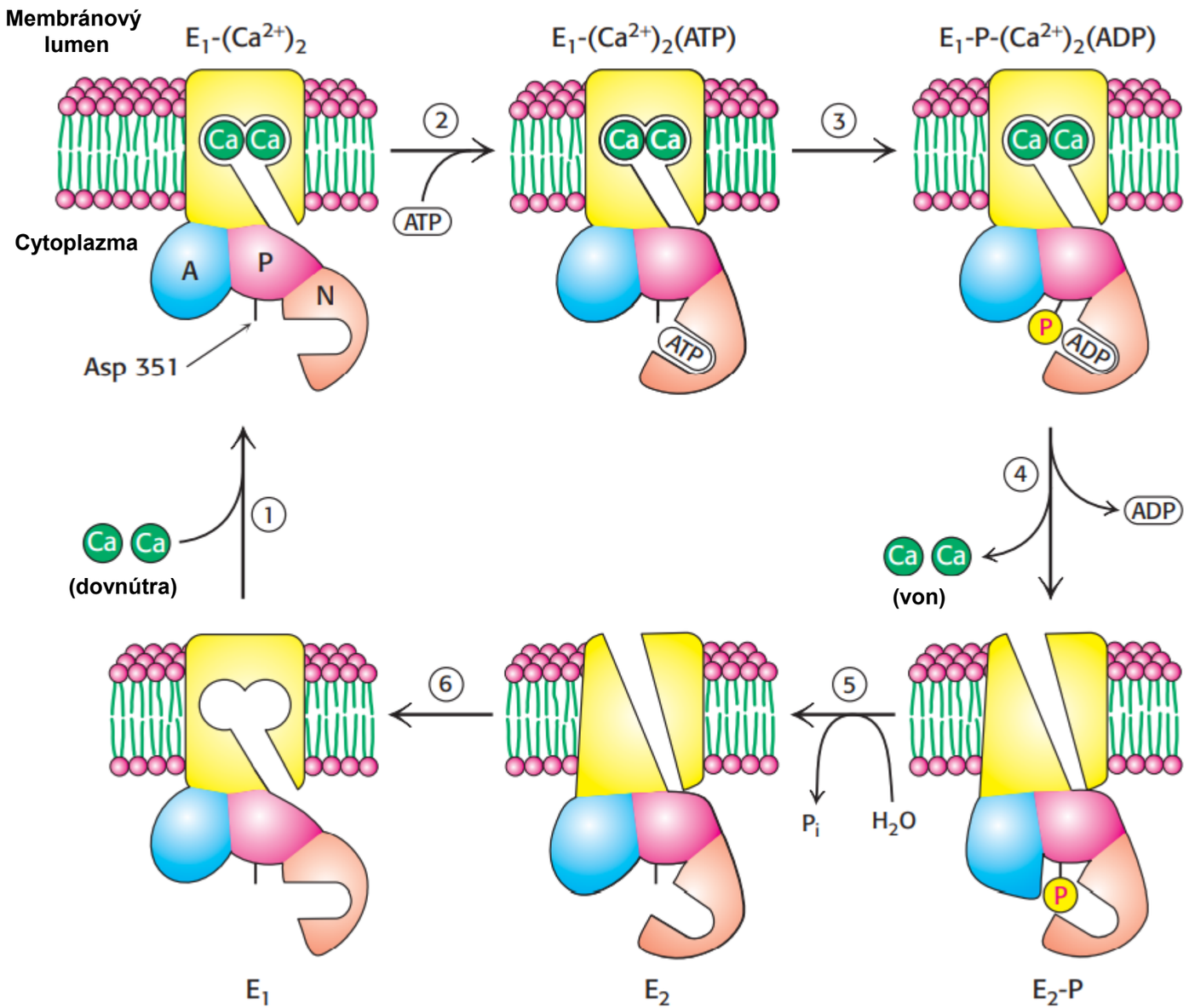


Štruktúra vápnikovej pumpy.
Celková štruktúra SERCA ATPázy typu P. Dva ióny vápnika (zelené) ležia v strede transmembránovej domény. Konzervovaný aspartátový zvyšok (Asp 351), na ktorý sa viaže fosforylová skupina, spočíva v doméne P. Označenie bb sa týka karbonylových skupín polypeptidového reťazca [1SU4.pdb].



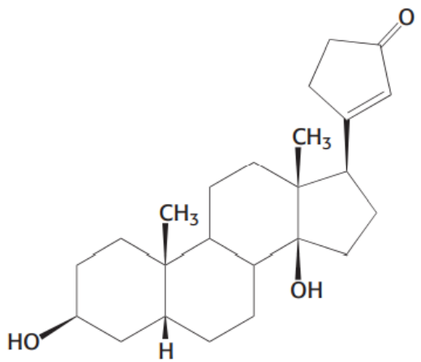
Konformačné zmeny v SERCA spojené s väzbou vápnika.

SERCA – KATALYTICKÝ MECHANIZMUS



Pumpovanie vápnika. Ca^{2+} ATPáza transportuje Ca^{2+} cez membránu mechanizmom, ktorý zahŕňa (1) väzbu Ca^{2+} z cytoplazmy, (2) väzbu ATP, (3) štiepenie ATP spojenú s prenosom fosforylovej skupiny na Asp 351 na enzýme, (4) uvoľnenie ADP a premenu enzýmu spojenú s uvoľnením Ca^{2+} na opačnej strane membrány, (5) hydrolýzu fosforylaspartátového zvyšku a (6) transformáciu enzýmu na stav schopný viazať Ca^{2+} z cytoplazmy.

Niektoré steroidy pochádzajúce z rastlín sú silnými inhibítormi (K_i ≈10 nM) Na^+-K^+ púmp. Digitoxigenín a ouabain sú členmi tejto skupiny inhibítorov, ktoré sú známe ako **kardiotonické steroidy** kvôli ich silným účinkom na srdce. Tieto zlúčeniny inhibujú defosforyláciu E_2-P formy ATPázy po aplikácii na extracelulárnej strane membrány.



Digitoxigenín

E_2—P + H_2O ⟶ E_2 + P_i

Inhibované kardiotonickými steroidmi

P-ATPÁZY SÚ EVOLUČNE KONZERVOVANÉ A MAJÚ VIACERÉ FUNKCIE

Analýza kompletného kvasinkového genómu odhalila prítomnosť 16 proteínov, ktoré jednoznačne patria do rodiny ATPáz typu P. Podrobnejšia sekvenčná analýza naznačuje, že dva z týchto proteínov transportujú H^+ ióny, dva transportujú ióny Ca^{2+}, tri proteíny transportujú Na^+ a dva z nich transportujú kovy ako napríklad Cu^{2+}. Okrem toho sa zdá, že sa 5 členov tejto rodiny zúčastňuje na transporte fosfolipidov, ktorých hydrofilné hlavičky obsahujú aminokyseliny. Týchto 5 transportných proteínov pomáha udržiavať asymetriu membrány transportom lipidov, ako je fosfatidylserín, z vnútornej do vonkajšej vrstvy membrány. Takéto enzýmy sa nazývajú „flippázy“.

Pozoruhodné je, že **ľudský genóm** kóduje **70 ATPáz typu P**. Všetci členovia tejto rodiny transportných proteínov využívajú ten istý základný mechanizmus: Gibbsova energia ATP hydrolýzy poháňa membránový transport pomocou konformačných zmien, ktoré sú indukované adíciou a odstránením fosforylovej skupiny na analogickej pozícii aspartátového zvyšku v každom proteíne.

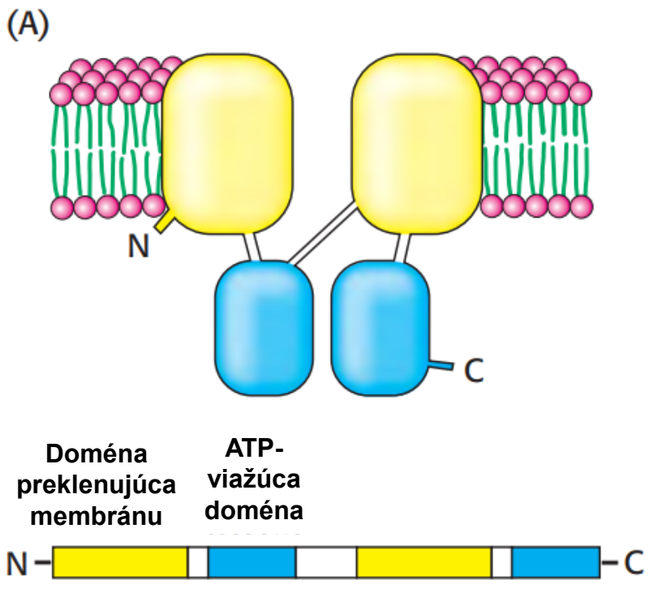
ATP-viažúce kazetové (ATP-binding casette – ABC) domény

Štúdie ľudských chorôb odhalili ďalšiu veľkú a dôležitú rodinu proteínov aktívneho transportu so štruktúrami a mechanizmami úplne odlišnými od tých z rodiny ATPáz typu P. Tieto pumpy boli identifikované zo štúdií na nádorových bunkách v kultúrach, u ktorých sa vyvinula rezistencia na lieky, ktoré boli spočiatku dosť toxické pre bunky. Je pozoruhodné, že vývoj rezistencie na jeden liek spôsobil, že bunky boli menej citlivé aj na viacero ďalších zlúčenín. Tento jav je známy ako **multilieková rezistencia (**z angl. **multidrug resistance)**.

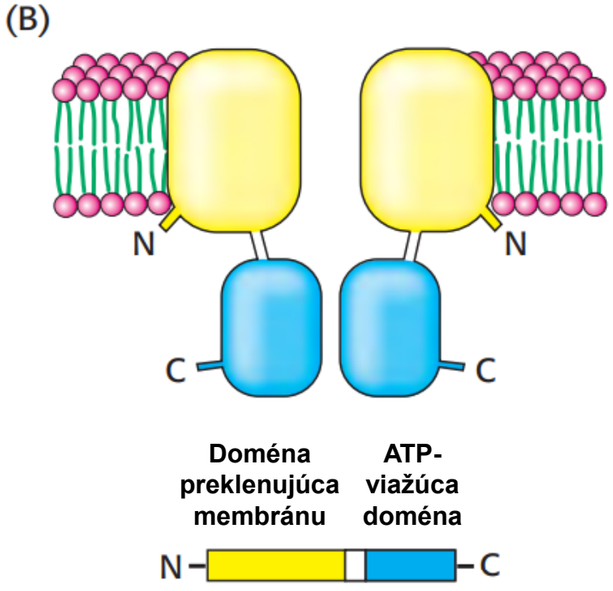
Nástup rezistencie na viac liečiv súvisí s expresiou a aktivitou membránového proteínu s molekulovou hmotnosťou 170 kDa. Tento proteín funguje ako ATP-závislá pumpa, ktorá vytláča širokú škálu malých molekúl z buniek, ktoré ho exprimujú. Tento proteín sa nazýva **multiliekovo rezistentný proteín** (MDR) alebo **P-glykoproteín** („glyko“, pretože obsahuje sacharidovú časť). Teda keď sú bunky vystavené pôsobeniu liečiva, MDR odstráni liečivo z bunky predtým, ako bude môcť liek začať pôsobiť.

ATP-viažuce kazetové (ATP-binding casette – ABC) domény

Analýza aminokyselinových sekvencií MDR a homológnych proteínov odhalili spoločnú architektúru. Každý z týchto proteínov pozostáva zo štyroch domén: dvoch domén preklenujúcich membránu a dvoch ATP-viažúcich domén. Domény viažúce ATP sú nazývané ATP-viažuce kazetové (ABC) domény a sú homológne s doménami nachádzajúcimi sa vo veľkej rodine transportných proteínov v baktériách a *archea*. Transportéry, ktoré obsahujú tieto domény, sa nazývajú ABC transportéry. S 79 členmi sú ABC transportéry najväčšou samostatnou rodinou identifikovanou v genóme *E. coli*. Ľudský genóm obsahuje viac ako 150 génov ABC transportérov.



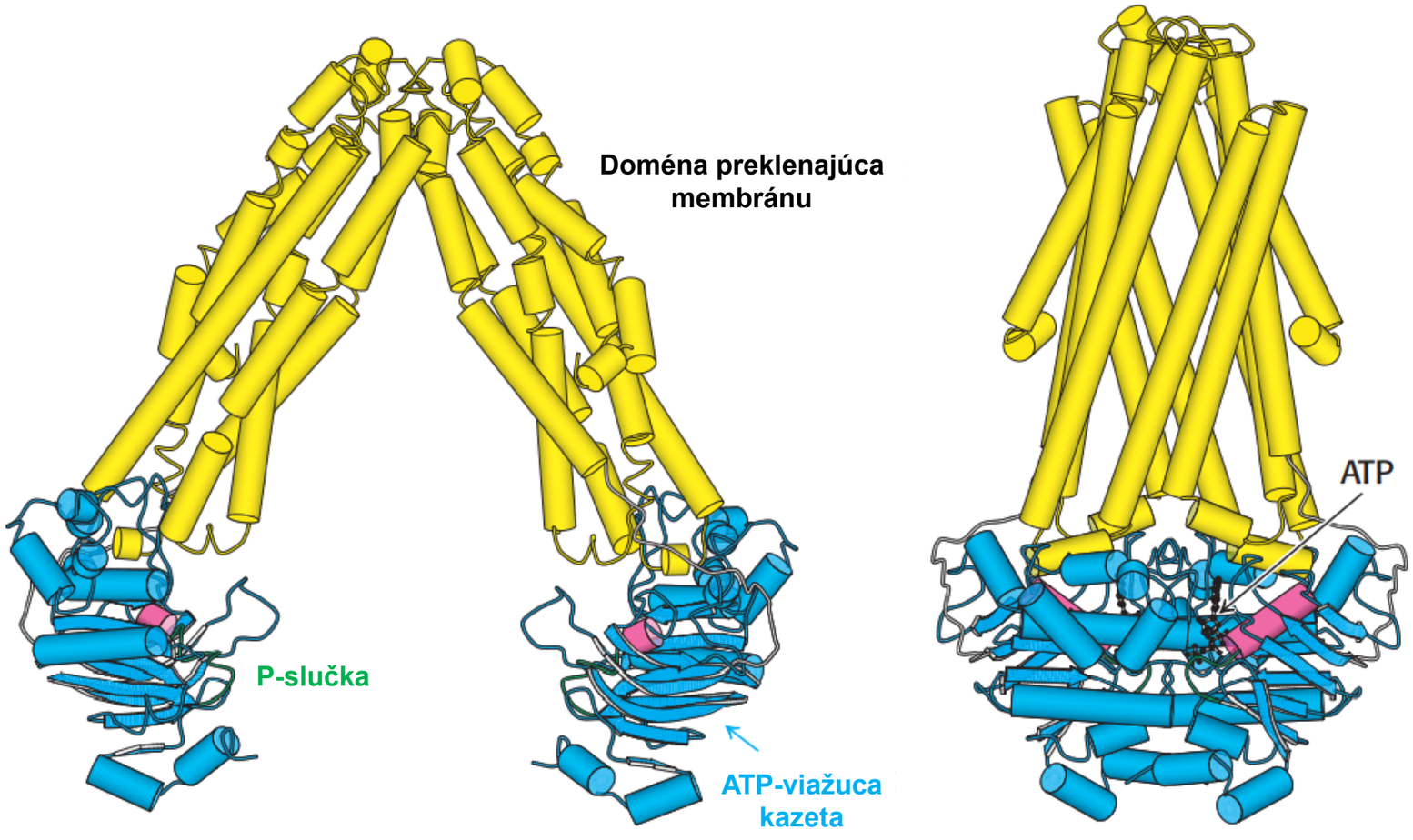
Multidrogový rezistentný proteín (MDR)



Lippidový transportér *Vibrio cholerae* (MsbA)

Doménové usporiadanie ABC transportérov. ABC transportéry tvoria veľkú rodinu homológnych proteínov zloženú z dvoch transmembránových domén a dvoch ATP väzobných domén, nazývaných ATP viažuce kazety. (A) Multiliekový rezistentný proteín tvorí jediný polypeptidový reťazec obsahujúci všetky štyri domény, zatiaľ čo (B) *Vibrio cholerae* lipidový transportér MsbA pozostáva z diméru dvoch identických reťazcov, z ktorých každý obsahuje jednu z každej domény.

ŠTRUKTÚRA ABC TRANSPORTÉROV

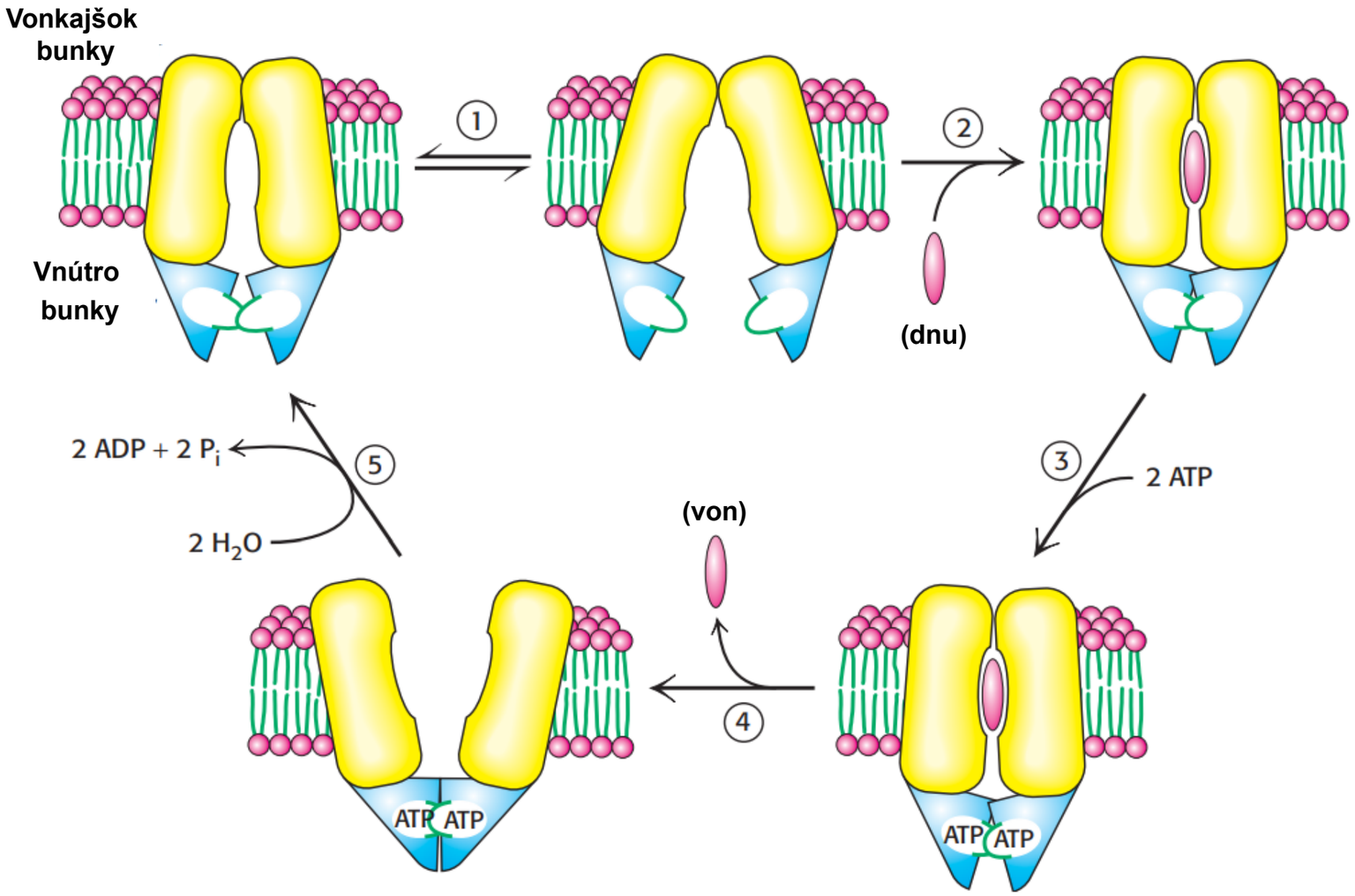


Otvorená forma

Uzatvorená forma (viažuca ATP)

Štruktúra ABC transportérov. Dve štruktúry lipidového transportéra MsbA z *Vibrio cholerae*, reprezentatívneho ABC transportéra. Otvorená forma je vľavo a uzavretá forma s naviazaným ATP je vpravo. Dve kazety viažuce ATP (modré) majú vzťah k P-slučkovým NTPázam a rovnako ako tieto obsahujú P-slučky (zelené). α–helix susediaci s P-slučkou je zobrazený červenou farbou. [3B5W.pdb a 3B60.pdb.]

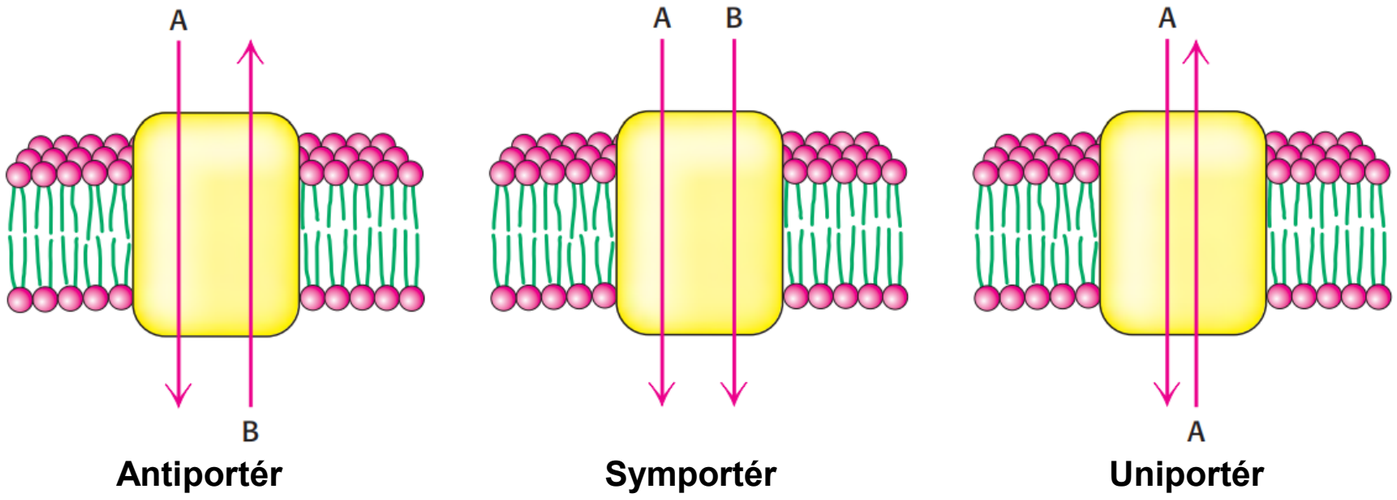
MECHANIZMUS ABC TRANSPORTÉROV



Mechanizmus ABC transportérov. Mechanizmus pôsobenia ABC transportérov zahŕňa nasledujúce kroky: (1) otvorenie kanálu smerom dovnútra bunky; (2) väzba substrátu a konformačné zmeny vo väzbe ATP kazety; (3) ATP väzba a ďalšie konformačné zmeny; (4) separácia membránových viažucich domén a uvoľnenie substrátu na druhú stranu
membrány; a (5) hydrolýza ATP a prechod transportéra do pôvodného stavu.

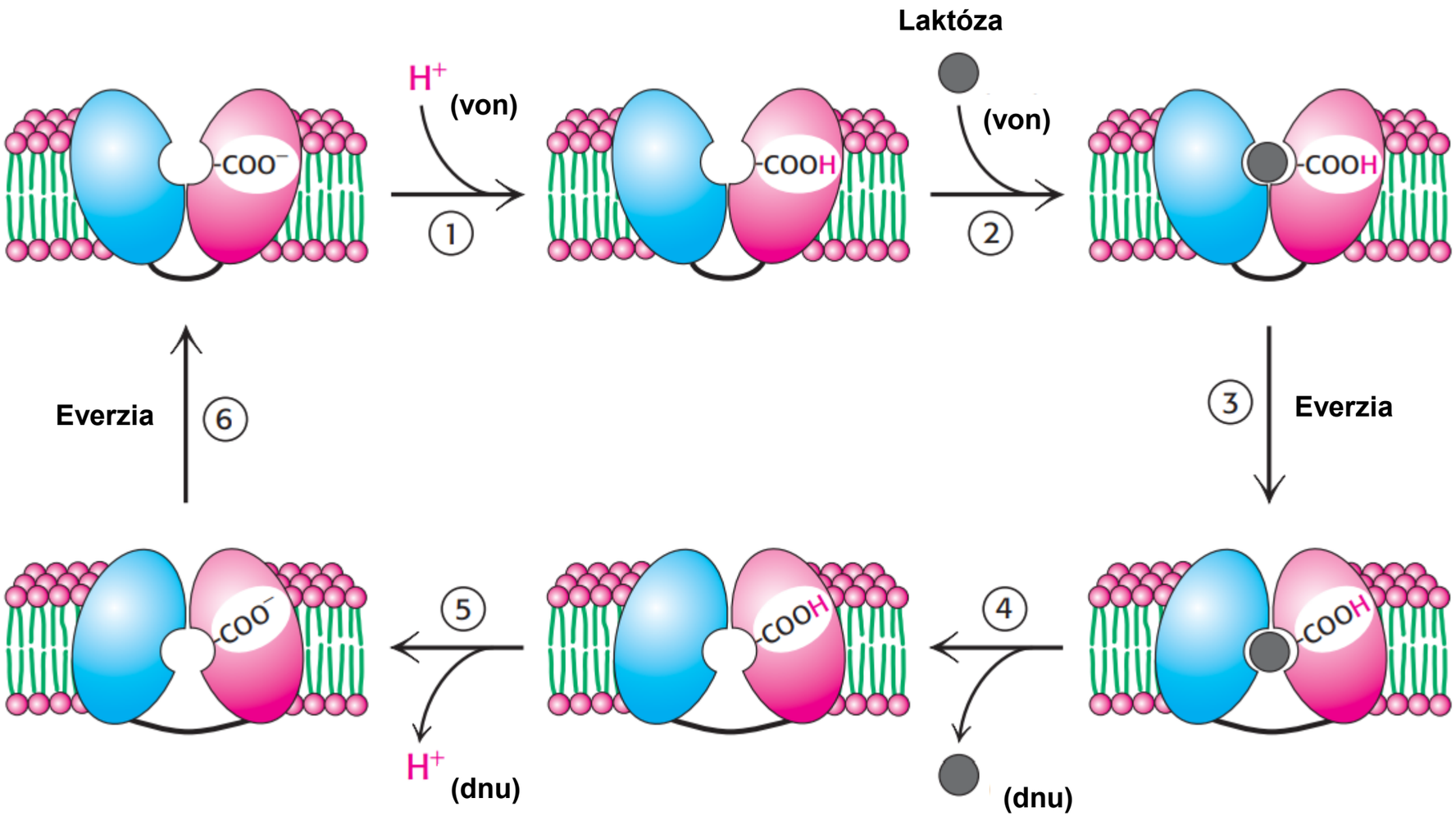
NOSIČE

Nosiče sú proteíny, ktoré transportujú ióny alebo molekuly cez membránu bez hydrolýzy ATP. Mechanizmus nosičov zahŕňa veľké konformačné zmeny a interakciu proteínu s niekoľkými molekulami počas jedného transportného cyklu, čo obmedzuje maximálnu rýchlosť, akou môže dôjsť k prenosu. Aj keď nosiče nemôžu sprostredkovať primárnu aktívnu dopravu molekúl, vďaka svojej neschopnosti hydrolyzovať ATP môžu spájať termodynamiky nepriaznivý tok jedného druhu iónu alebo molekuly proti koncentračnému gradientu s priaznivým tokom iných druhov molekúl v smere koncentračného gradientu. Tento proces sa označuje ako **sekundárny aktívny transport**. Nosiče, ktoré týmto spôsobom transportujú ióny alebo molekuly proti koncentračnému gradientu, sa nazývajú **sekundárne transportéry** alebo **kotransportéry**. Tieto proteíny je možné klasifikovať ako antiportery alebo symportéry. **Antiportéry** spájajú prúdenie jedného druhu molekúl v smere koncentračného gradientu s tokom iného druhu molekúl proti koncentračnému gradientu, ale v opačnom smere cez membránu; **symportéry** používajú tok jedného druhu na riadenie toku iného druhu rovnakým smerom cez membránu. **Uniportéry**, ďalšia trieda nosičov, sú schopné prepravovať konkrétny druh molekúl v oboch smeroch v závislosti od koncentrácie tohto druhu molekúl na oboch stranách membrány.



Sekundárne transportéry môžu prepraviť dva substráty v opačných smeroch (**antiportéry**), dva substráty rovnakým smerom (**symportéry**), alebo jeden substrát v obidvoch smeroch (**uniportér**).

MECHANIZMUS NOSIČOV – PRÍKLAD MECHANIMU PERMEÁZY LAKTÓZY

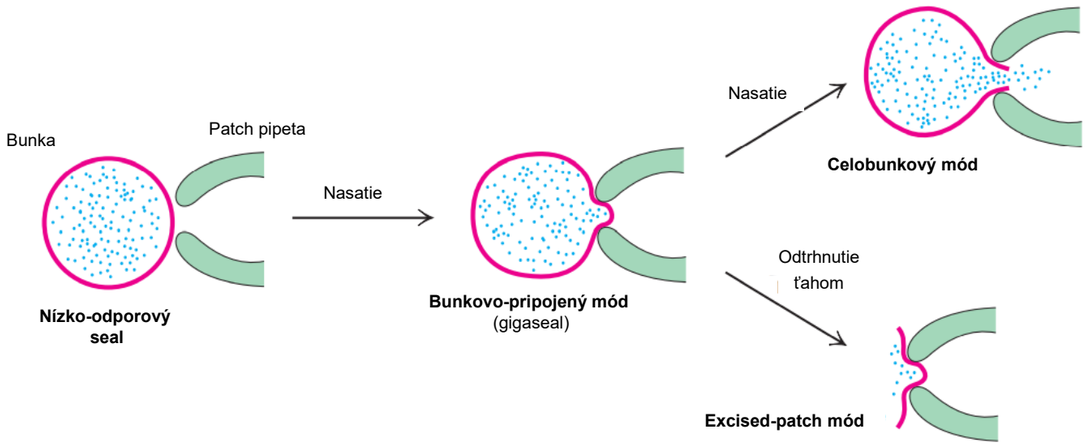


Mechanizmus permeázy laktózy. Mechanizmus činnosti enzýmu začína tým, že permeáza je otvorená smerom von z bunky (ľavý horný). Permeáza viaže protón z vonkajšej strany bunky (1) a potom viaže svoj substrát (2). Permeáza sa transformuje (everzia) (3) a potom uvoľní svoj substrát (4) a protón (5) do vnútra bunky. Následne sa permeáza znova evertuje (6) a cyklus sa dokončí.

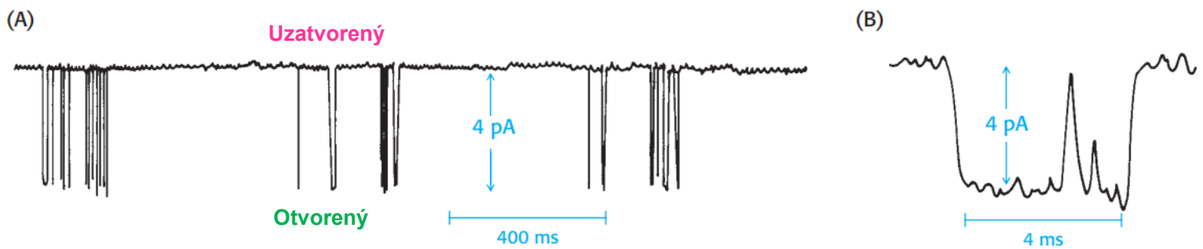
IÓNOVÉ KANÁLY – ŠPECIFICKY A RÝCHLO TRANSPORTUJÚ IÓNY CEZ MEMBRÁNU

Pumpy a nosiče môžu transportovať ióny cez membránu rýchlosťou približne niekoľko tisíc iónov za sekundu. Ostatné membránové proteíny, pasívne transportné systémy nazývané **iónové kanály**, sú schopné iónového transportu rýchlosťami, ktoré sú viac ako 1 000-krát rýchlejšie. Tieto rýchlosti prepravy cez iónové kanály sú blízke rýchlosti očakávanej pre ióny voľne difundujúce vo vodnom roztoku. Iónové kanály však nie sú iba trubice, ktoré preklenujú membrány, cez ktoré môžu ióny rýchlo prúdiť. Sú to vysoko sofistikované molekulové stroje, ktoré reagujú na chemické a fyzikálne zmeny v ich prostredí a prechádzajú presne načasovanými konformačnými zmenami.

Priamy dôkaz o existencii týchto kanálov poskytla tzv. **„patch-clamp“ technika**, ktorú zaviedli Erwin Neher a Bert Sakmann v roku 1976. Táto účinná technika umožňuje meranie iónovej vodivosti cez malý kúsok bunkovej membrány. V tejto technike čistá sklenená pipeta s priemerom špičky asi 1 μm je stlačená proti neporušenej bunke, aby sa vytvorila pečať (seal). Mierne odsávanie vedie k tvorbe veľmi tesného uzáveru. Tým sa vytvorí medzi vnútornou časťou pipety a vonkajším roztokom odpor rádovo niekoľko gigaohmov. Takéto gigaohmské tesnenie (nazývané „gigaseal“) zaisťuje, že elektrický prúd prúdiaci cez pipetu je totožný s prúdom, ktorý preteká membránou držanou pipetou. „Gigaseal“ umožňuje meranie prúdu s vysokým rozlíšením, zatiaľ čo je na neho aplikované známe napätie cez membránu. „Patch-clamp“ metódy poskytli jeden z prvých pohľadov na činnosť jednotlivých biomolekúl.



„Patch-clamp“ módy. Patch-clamp technika pre monitorovanie činnosti kanálov je veľmi univerzálna. Vysoko rezistentný uzáver (gigaseal) sa vytvorí medzi pipetou a malým kúskom plazmatickej membrány. Táto konfigurácia sa nazýva **bunkovo-pripojený mód (cell-attached mode)**. Roztrhnutie membránovej časti zvýšeným nasávaním vytvára nízky odpor medzi pipetou a vnútorným priestorom bunky. Činnosť kanálov v celej plazmatickej membráne je možné monitorovať v tomto **celobunkovom móde (whole-cell mode)**. Na prípravu membrány v **móde „excised-patch“** je pipeta odtiahnutá od bunky. Kus plazmatickej membrány s cytoplazmatickou stranou vystavenou do média je monitorovaný „patch“ pipetou.

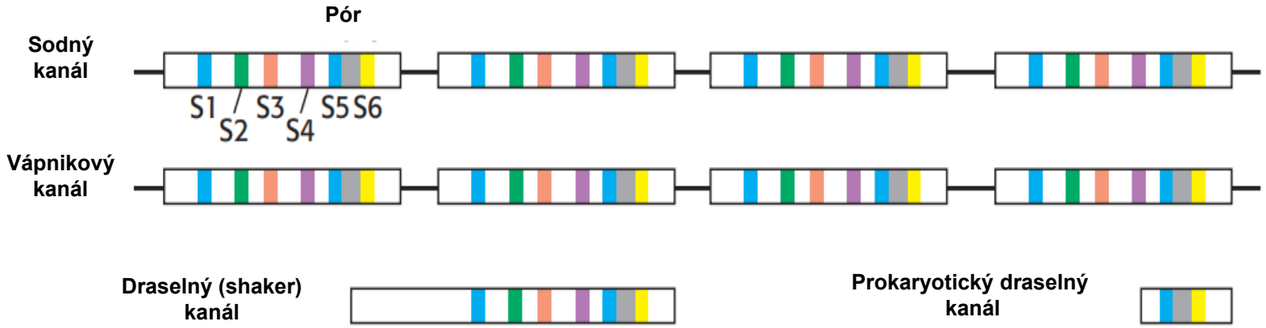


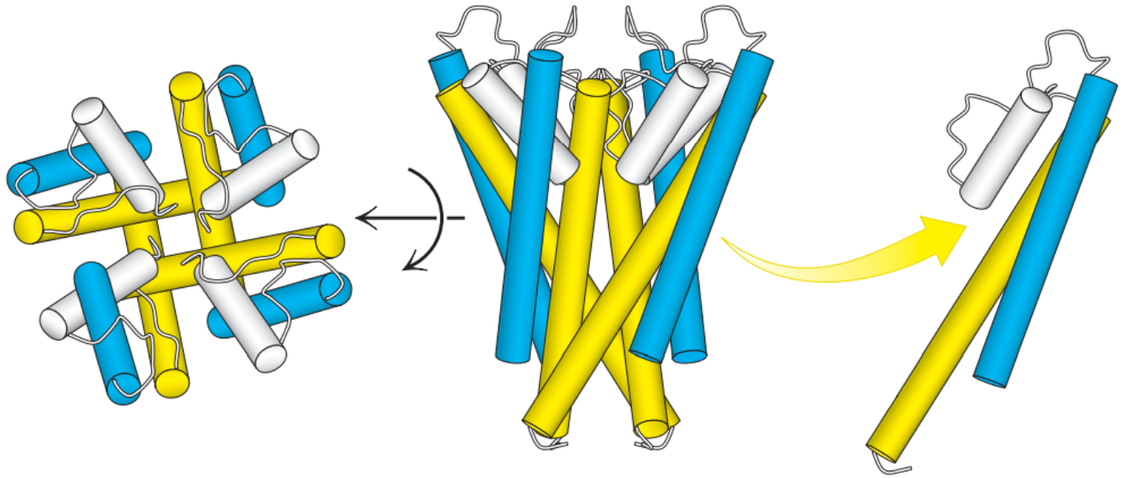
Pozorovanie jednotlivých kanálov. (A) Výsledky experimentu „patch-clamp“, ktorý odhaľuje konformačné prechody jediného iónového kanála medzi uzavretým a otvoreným stavom. (B) Detailnejší pohľad na signál v (A) odhaľuje dĺžku času, počas ktorého je kanál v otvorenom stave.

IÓNOVÉ KANÁLY – DRASLÍKOVÝ KANÁL

Sekvenčné vzťahy iónových kanálov. Rovnaké farby naznačujú štruktúrne podobné oblasti sodíkového, vápnikového a draslíkového kanála. Každý z týchto kanálov vykazuje približne štvornásobnú symetriu buď v rámci jedného reťazca (sodíkové, vápnikové kanály) alebo tvorbou tetramérov (u draslíkových kanálov).

Štruktúrna/evolučná podobnosť iónových kanálov



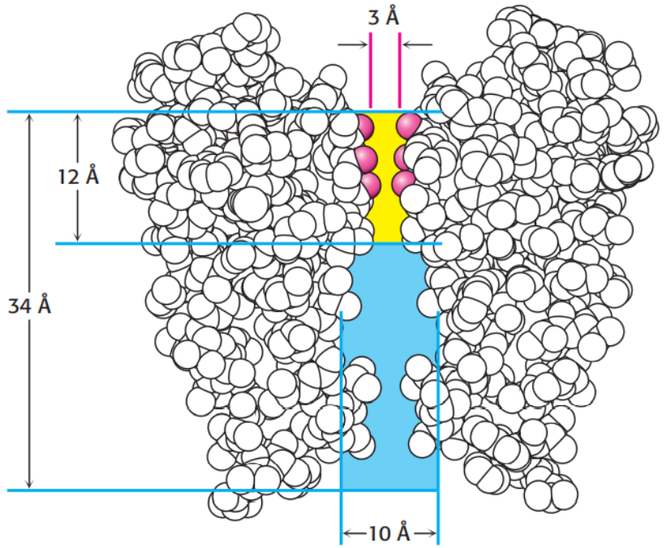


Pohľad dole pórom | Bočný pohľad | Izolovaná subjednotka

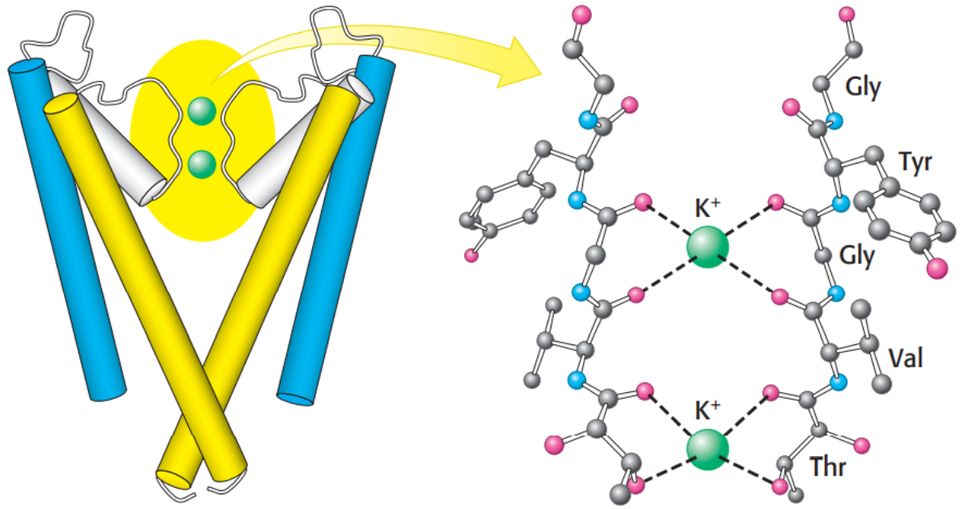
Štruktúra draslíkového iónového kanála. Kanál K^+ je zložený zo štyroch identických podjednotiek, má tvar kužeľa s väčším otvorom smerujúcim do vnútra bunky (stredný obrázok). Pohľad dolu pórom, ktorý smeruje von z bunky, ukazuje vzťahy jednotlivých podjednotiek (vľavo). Jedna zo štyroch identických podjednotiek póru je zobrazená vpravo, pričom oblasť tvoriaca pór je zobrazená sivou farbou. [1K4C.pdb.]

SELEKTIVITA DRASLÍKOVÉHO KANÁLU

Štruktúra uvedená na obrázku vpravo hore predstavuje kanál K^+ v uzavretej forme. Táto štruktúra naznačuje ako je kanál schopný odlíšiť katióny K^+ od ostatných iónov. Počínajúc zvnútra bunky, pór začína s priemerom približne 10 Å a potom sa zúži na menšiu kavitu s priemerom 8 Å. Otvor smerom von y bunkzy a centrálna dutina póru sú naplnené vodou a K^+ ión sa zmestí do póru bez straty obalu vyvtvorenej z molekúl vody. Približne v dvoch tretinách cesty cez membránu, sa póry zúžia (priemer 3 Å). V tom okamihu sa musia všetky ióny K^+ vzdať naviazaných molekúl vody a ióny K^+ interagujú priamo so skupinami na proteíne. Štruktúra kanálu účinne zmenšuje hrúbku membrány z 34 Å na 12 Å umožnením prieniku solvatovaných iónov do membrány pred tým, ako musia ióny priamo interagovať s kanálom. Aby sa ióny K^+ vzdali viazaných molekúl vody, iné polárne interakcie musia nahradiť interakcie s vodou. Obmedzená časť póru je tvorená zo zvyškov prislúchajúcim dvom transmembránovým α-helixom. Najmä úsek s piatimi aminokyselinami v tejto oblasti funguje ako filter selektivity, ktorý určuje preferenciu K^+ pred ostatnými iónmi. Tento úsek má sekvenciu Thr-Val-Gly-Tyr-Gly (TVGYG) a je takmer úplne konzervovaný vo všetkých kanáloch K^+.



Cesta cez draslíkový kanál. Draselný ión vstupom do kanálu K^+ môže prejsť vzdialenosť 22 Å v membráne, zatiaľ čo zostane solvatovaný molekulou vodou (modrá). V tomto bode, priemer pórov sa zúži na 3 Å (žltý) a draselné ióny musia zbaviť viazanej vody a interagujú s karbonylovými skupinami (červené) aminokyselín nachadzajúcimi sa v póroch.



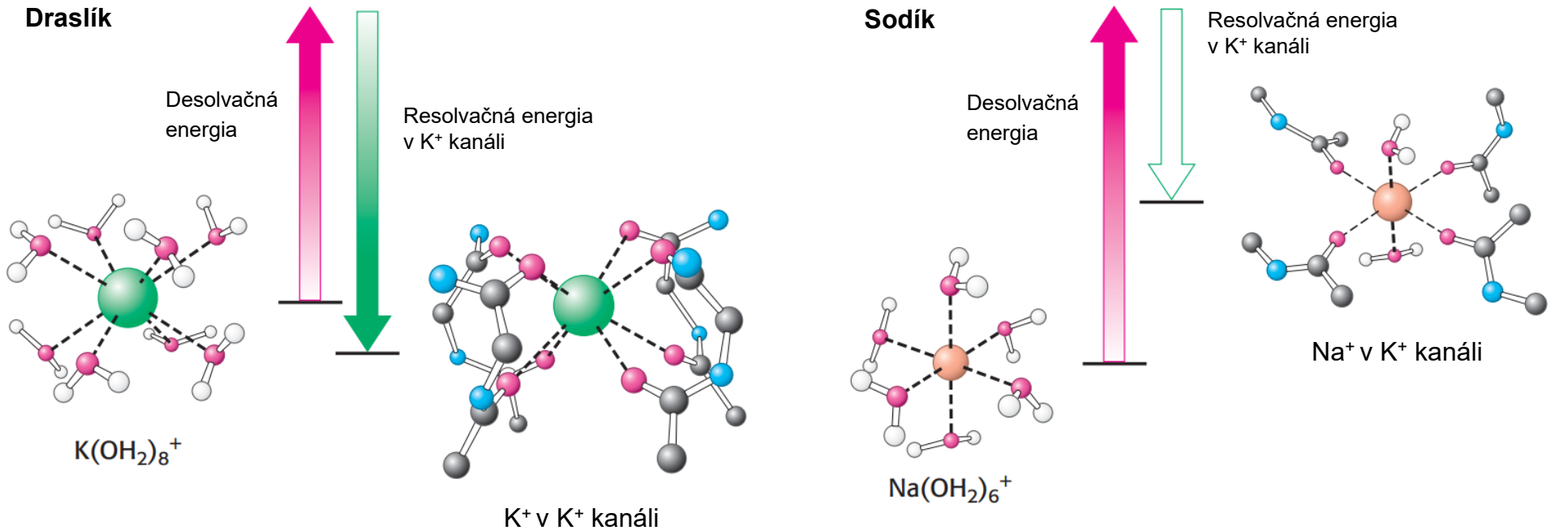
Filter selektivity draslíkového iónového kanálu. Iónyy draslíka interagujú s karbonylovými skupinami sekvencie TVGYG, ktorá tvorí selektívny filter nachádzajúci sa v časti póru K^+ kanálu s priemerom 3 Å. Zobrazené sú Iba dve zo štyroch subjednotiek kanála.

SELEKTIVITA DRASLÍKOVÉHO KANÁLU

Vlastnosti alkalických katiónov

Ión	Ionový polomer (Å)	Hydratačná voľná energia (kJ/mol)
Li^+	0,60	-410
Na^+	0,95	-301
K^+	1,33	-230
Rb^+	1,48	-213
Cs^+	1,69	-197

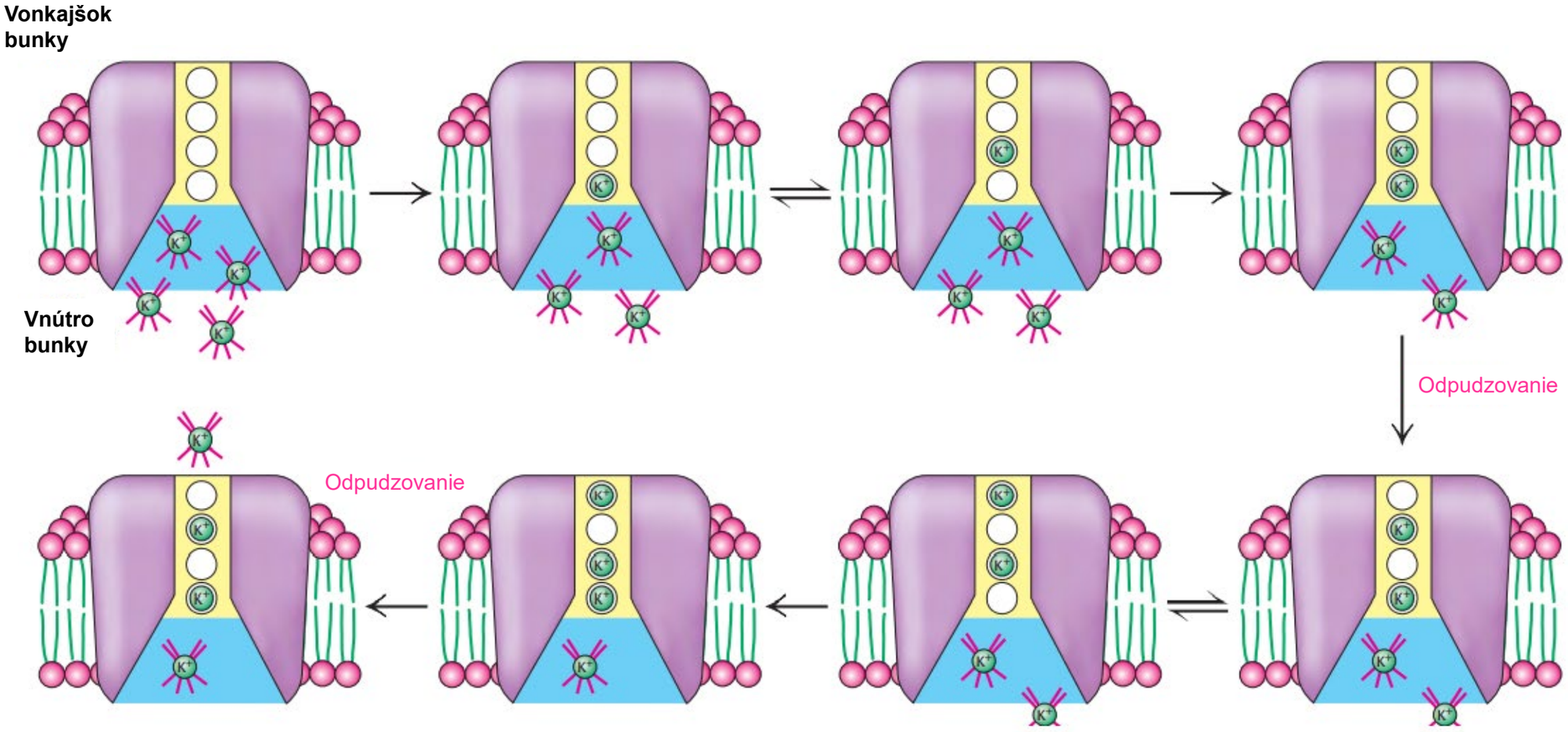
Draslíkové iónové kanály sú 100-krát priepustnejšie pre K^+ ako pre Na^+. Ako sa dosahuje tento vysoký stupeň selektivity? Ióny majúce polomer väčší ako 1,5 Å nemôžu prejsť cez časť kanálu s priemerom 3 Å, ktorý tvorí selektívny filter K^+ kanálu. Katión Na^+ je však dostatočne malý, aby touto časťou kanála mohol prejsť. Iónový polomer Na^+ je podstatne menší ako u K^+. Ako je potom možné, že Na^+ neprejde K^+ kanálom?
Kľúčovým bodom je, že Gibbsova energia pre dehydratáciu týchto iónov je značná [Na^+, 301 kJ/mol; a K^+, 230 kJ/ mol]. Kanál vyrovnáva náklady na dehydratáciu K^+ kompenzačnými interakciami s karbonylovými atómami kyslíka lemujúcimi jeho selektívny filter. Tieto atómy kyslíka sú však umiestnené tak, že ich interakcia s Na^+ nie je priaznivá, pretože Na^+ je príliš malý. Sodné ióny sú preto odmietané, pretože vysoké energetické náklady na ich dehydratáciu by neboli kompenzované.



Energetický základ iónovej selektivity. Energetické náklady na dehydratáciu draselného iónu sú kompenzované priaznivými interakciami s filtrom selektivity. Pretože sodíkový ión je príliš malý, aby mohol priaznivo interagovať so selektívnym filtrom, nemôže byť energia desolvatácie kompenzovaná a sodíkový ión neprechádza cez kanál.

RÝCHLOSŤ TRANSPORTU CEZ DRASLÍKOVÝ KANÁL

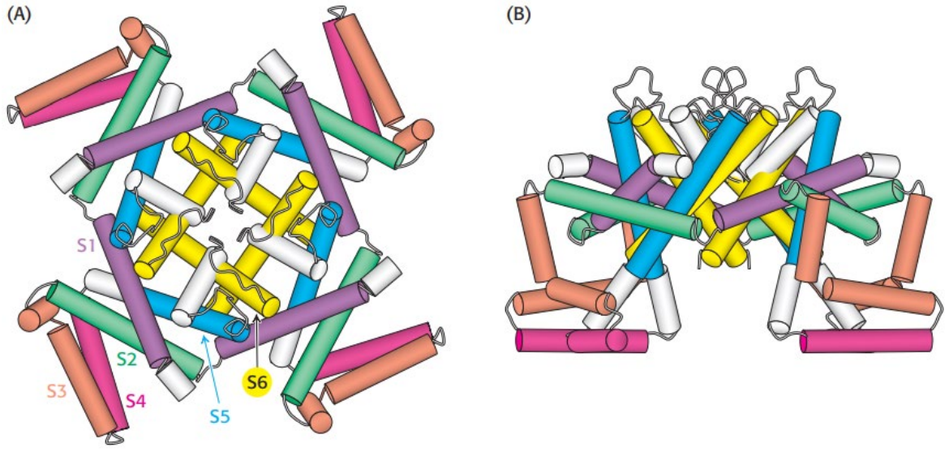
Tesné väzbové miesta potrebné pre iónovú selektivitu by mali spomaliť postup iónov kanálom, ale iónové kanály dosahujú veľké rýchlosti iónového transportu. Ako je vyriešený tento paradox?



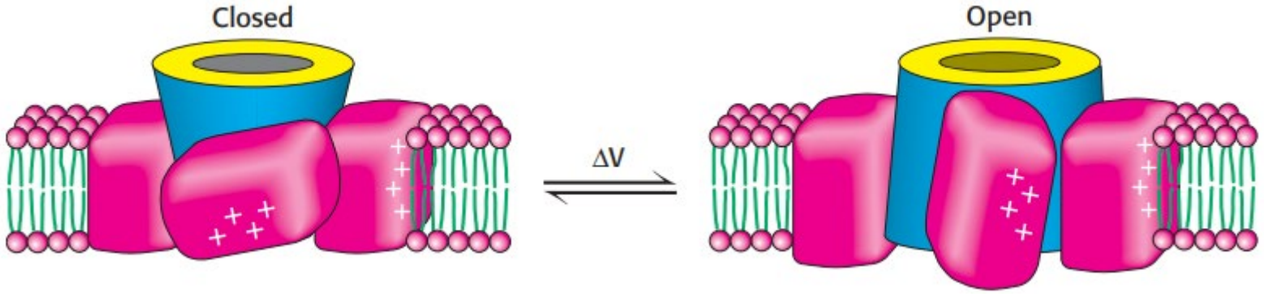
Model pre iónový transport K^+ kanálom. Filter selektivity má štyri väzobné miesta. Hydratované ióny draslíka môžu vstúpiť na tieto miesta, jeden po druhom, za súčasnej straty ich hydratačného obalu. Keď dva ióny obsadia susedné miesta, elektrostatické sily pôsobia odpudivo a snažia sa ich oddialiť. Ióny vstupujú do kanála z jednej strany a sú vytláčané ďalšími iónmi na druhú stranu.

NAPÄŤOVO RIADENÉ KANÁLY

Niektoré kanály Na^+ a K^+ sú riadené membránovým potenciálom; dochádza u nich ku zmene konformácie na vysoko vodivú formu v reakcii na zmeny v napätí na membráne. Tieto napäťovo riadené kanály zahŕňajú segmenty S1 až S4 okrem samotného póru tvoreného segmentami S5 a S6. Štruktúra napäťovo riadeného kanálu K^+ z *Aeropyrum pernix* bola stanovená röntgenovou kryštalografiou. Segmenty S1 až S4 tvoria domény, nazývané „lopatky“, ktoré priliehajú k jadru kanálu. Tieto lopatky zahŕňajú segment S4, napäťový snímač. Segment S4 tvorí α-helix lemovaný kladne nabitými nábojmi aminokyselinovými zvyškami.



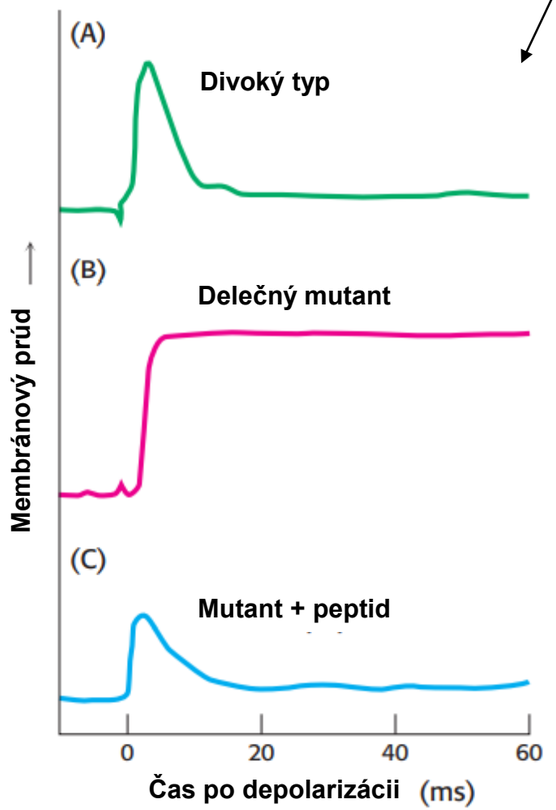
Štruktúra napäťovo riadeného draslíkového kanála. (A) Pohľad zhora.. (B) Bočný pohľad. Kladne nabitá oblasť S4 (červená) leží na boku štruktúry v spodnej časti póru. [Čerpané z 1ORQ.pdb].



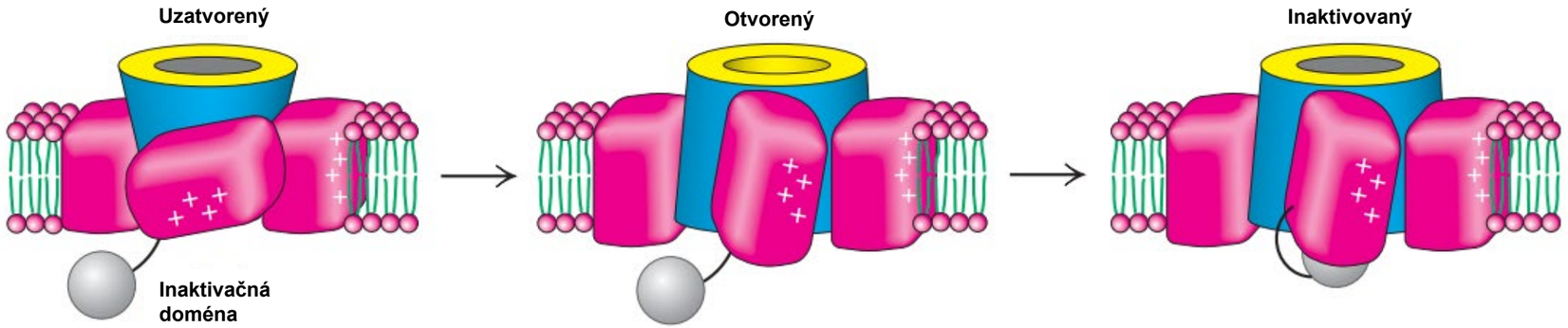
Model napäťového ovládania iónových kanálov. Pádla snímajúce napätie ležia v „dolnej“ polohe pod uzavretým kanálom (vľavo). Depolarizácia membrán ťahá pádla cez membránu. Pohyb ťahá základňu kanálu od seba a tak dochádza k otvoreniu kanála (vpravo).

INAKTIVÁCIA KANÁLOV – MODEL „GULE A REŤAZE“.

Kanály K^+ a Na^+ prechádzajú inaktiváciou do niekoľkých milisekúnd od otvorenia (A). Prvou indíciou mechanizmu inaktivácie bolo vystavenie cytoplazmatickej strany kanálu pôsobeniu trypsínu; štiepením trypsínom sa vytvorili upravené kanály, ktoré zostali vytrvalo otvorené po depolarizácii (B). Mutant draslíkového kanála, ktorému chýba 42 aminokyselín z N-konca, sa po depolarizácii nedokázal inaktivovať. Je pozoruhodné, že inaktiváciu obnovilo pridanie syntetického peptidu zodpovedajúceho prvým 20 zvyškom natívneho kanálu (C).



Tieto experimenty výrazne podporujú model „gule a reťaze“ pre inaktiváciu kanálov. Podľa tohto modelu prvých 20 aminokyselinových zvyškov kanála K^+ tvorí cytoplazmatickú jednotku (guľu), ktorá je pripevnená k pružnému segmentu polypeptidového reťazca.



Model s guľou a reťazou pre deaktiváciu kanála. Inaktivačná doména, guľa“ (sivá farba), je pripútaná ku kanálu flexibilným „reťazcom“. V uzatvorenom stave sa guľa nachádza v cytoplazme. Po depolarizácii sa kanál otvorí a vytvorí sa väzbové miesto pre kladne nabitú „guľu“ v ústí póru. Pohyb „gule“ do tohto miesta deaktivuje kanál tým, že ho uzatvorí.

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Vedieť rozdiel medzi aktívnym a pasívnym transportom
- Popísať mechanizmus púmp typu P a ABC transportérov
- Popísať základný mechanizmus nosičov
- Rozlíšiť mechanizmy v činnosti antiportéru, symportéru a uniportéru
- Popísať základný mechanizmus selekcie iónových kanálov
- Popísať základný mechanizmus napäťových kanálov
- Uviesť ako dochádza k inaktivácii kanálov

Mitochondrie – štruktúra a funkcie. 6

Mitochondrie – štruktúra
Funkcie mitochondrií
Dýchací reťazec – základné pojmy
Komponenty dýchacieho reťazca

MITOCHONDRIE – ZÁKLADNÉ FUNKCIE

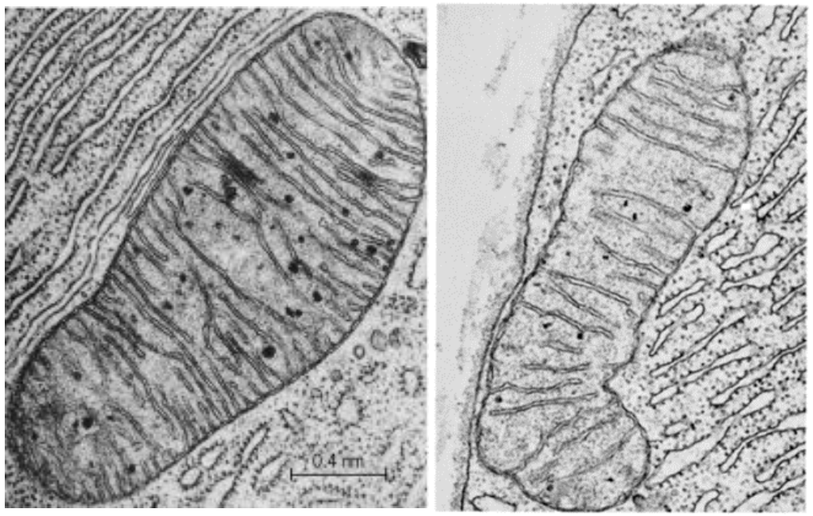
Mitochondrie (z gr. mitos-niť a chondrion-granula) sú membránovo uzavreté organely, ktoré sa nachádzajú vo väčšine eukaryotických buniek a predstavujú tzv. energetické centrá buniek resp. „bunkové elektrárne“.

Ich **hlavnou funkciou** je konverzia redukovaných molekúl NADH a $FADH_2$ (produkty glykolýzy a Krebsovho cyklu) **na molekuly ATP v procese oxidatívnej fosforylácie**.

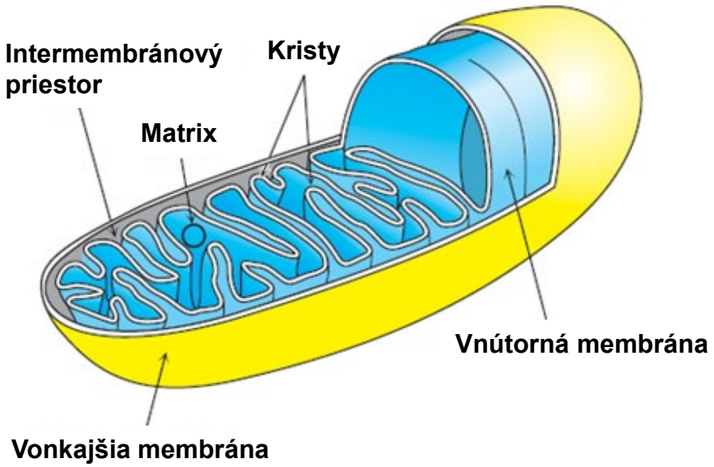
Ďalšie funkcie a úlohy mitochondrií:

- Vznik a progres apoptózy (programovaná bunková smrť)
- Syntéza hémov a steroidov
- Regulácia vnútrobunkovej koncentrácie iónov Ca^{2+}
- Úloha v procese starnutia
- Účasť v neurodegeneratívnych ochoreniach (Alzheimerova choroba, Parkinsonove ochorenie, Huntingtonova choroba), ako aj vo veľkom množstve iných chorôb

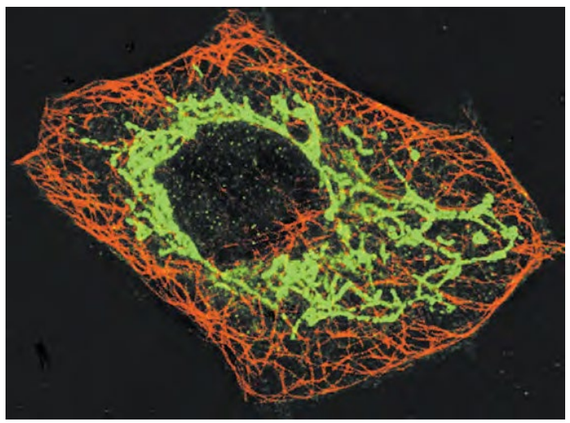
MITOCHONDRIE – MIKROSKOPISKÝ OBRAZ A ŠTRUKTÚRA



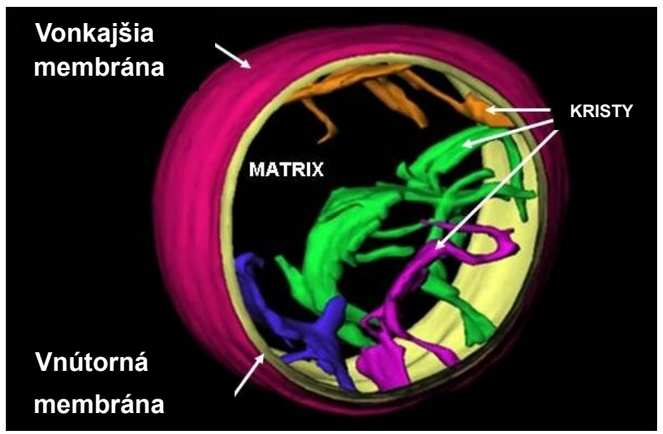
Obrazy mitochondrií získané elektrónovým mikroskopom.



Schematická štruktúra mitochondrie.



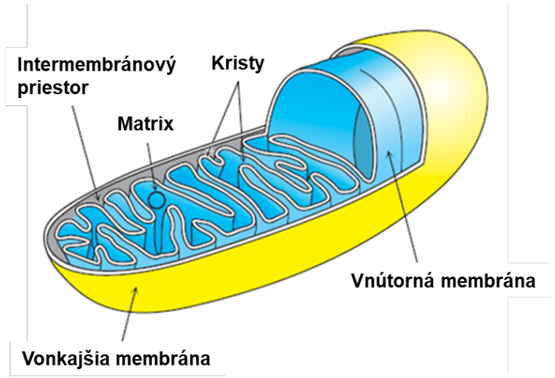
Mitochondrie, zafarbené na zeleno, tvoria sieť vnútri buniek fibroblastov.



Prierezový obraz mitochondrií.

MITOCHONDRIE – ŠTRUKTÚRA

Väčšina eukaryotických buniek obsahuje ~ 1000 mitochondrií, avšak niektoré typy buniek, napr. bunky srdcového svalu, či pečeňové bunky obsahujú oveľa vyšší počet týchto organel. Na druhej strane červené krvinky neobsahujú žiadne mitochondrie. Mitochondrie sa zvyčajne izolujú z tých tkanív, ktoré obsahujú ich najvyšší počet.



Charakteristický rozmer mitochondrie je 1-10 µm

Vonkajšia membrána - obsahuje značné množstvo integrálnych membránových proteínov, ktoré sa nazývajú poríny (tieto molekuly sa niekedy zvyknú označovať na napätí závislé aniónové kanály (VDAC, z angl. volt-dependent anion channels). Tieto proteíny vo svojej štruktúre obsahujú „kanál“, prostredníctvom ktorého sa transportujú molekuly s molekulovou hmotnosťou do 5-10 kDa. Táto membrána takisto obsahuje enzýmy zahrnuté do procesov degradácie tryptofánu, oxidácie adrenalínu, elongácie mastných kyselín.

Vnútorná membrána – obsahuje proteíny, ktoré sú súčasťou nasledujúcich procesov oxidačno-redukčné procesy v dýchacom reťazci

- syntéza ATP
- špecifický transport proteínov regulujúcich prechod metabolitov do a z mitochondriálneho matrixu
- import proteínov

Obsahuje viac než 100 rôznych polypeptidov a hmotnostný koncentračný pomer proteíny:lipidy je ~ 3:1. Membrána je nepriepustná a takmer všetky ióny a molekuly vyžadujú špeciálne transportné systémy na jej prechod.

Vytvára záhyby (*cristae*), ktoré zvyšujú povrch tejto membrány, čím sa vytvárajú podmienky pre vyššiu aktivitu dýchacieho reťazca

Mitochondriálny matrix - priestor uzatvorený vnútornou mitochondriálnou membránou. Obsahuje enzýmy podieľajúce sa na Krebsovom cykle, oxidácii pyruvátu a mastných kyselín. Koncentrácia proteínov v matrixe môže dosahovať hodnoty až 500 mg/ml. Zároveň sa tam nachádza mitochondriálna DNA a mitochondriálne ribozómy.

MITOCHONDRIE – MITOCHONDRIÁLNY GENÓM

Mitochondrie obsahujú **vlastnú DNA (mtDNA)** a predstavujú tak jedinú organelu cytoplazmy, v ktorej sa nachádza DNA. V jednej mitochondrii sa nachádza viacero kópií mtDNA. Všetok ostatný genetický materiál bunky sa nachádza v bunkovom jadre.

Ľudská mtDNA

- patrí medzi kruhové DNA
- obsahuje 16 569 bázových párov, pričom neobsahuje tzv. „junk DNA“, t.j. DNA, ktorá nekóduje proteíny, alebo sa neprepisuje do rôznych typov RNA
- kóduje 13 polypeptidových reťazcov, pričom všetky sú súčasťou dýchacieho reťazca a taktiež kóduje 22 tRNA a 2 rRNA
- je náchylnejšia k mutáciám než jadrová DNA (oxidatívny stres, častejšia replikácia, nie je chránená pred okolím tak ako jadrová DNA)
- má mierne odlišný genetický kód v porovnaní s jadrovou DNA

Replikácia a dedičnosť mtDNA

Mitochondrie replikujú svoju DNA a následne sa delia v závislosti od energetickej potreby bunky. Replikácia a transkripcia mtDNA však závisí od proteínov, ktoré sú geneticky kódované v bunkovom jadre.

Pri delení bunky sa mitochondrie náhodne prerozdelia medzi vznikajúce nové bunky.

mtDNA sa vo väčšine organizmov dedí po materskej línii. Táto vlastnosť spolu s neexistenciou rekombinácie mtDNA robí z tejto molekuly dôležitý zdroj informácií pre populačnú genetiku a evolučnú biológiu.

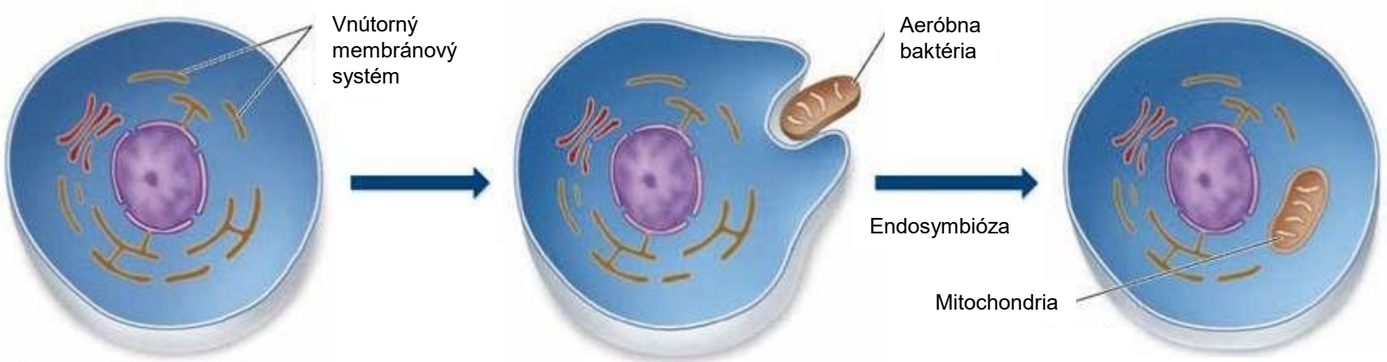
Na základe skúmania mtDNA sa usudzuje, že ľudský rod vznikol v Afrike.

MITOCHONDRIE – PÔVOD

Vzhľadom k tomu, že mitochondrie obsahujú DNA aj ribozómy, sa predpokladá, že tieto organely sú „potomkami“ endosymbiotických baktérií (najpravdepodobnejšie špecializované purpurové baktérie), ktoré prežili ich endocytózu inými bunkami. Schopnosť symbiotických baktérií uskutočňovať dýchanie v hostiteľských bunkách pravdepodobne viedla k evolučnej výhode pre tieto bunky.

Vlastnosti, ktorými sa mitochondrie podobajú na svojich predchodcov:

- viacero kópií DNA v jednej mitochondrii (rovnako je to aj u baktérií),
- 70S ribozóm v mitochondriách podobne ako u baktérií, v cytoplazme eukarytických buniek je to 80S ribozóm,
- nízke zastúpenie intrónov v štruktúre mtDNA, u baktérií je to obdobne,
- kruhová forma mtDNA, rovnakú formu majú aj baktérie.

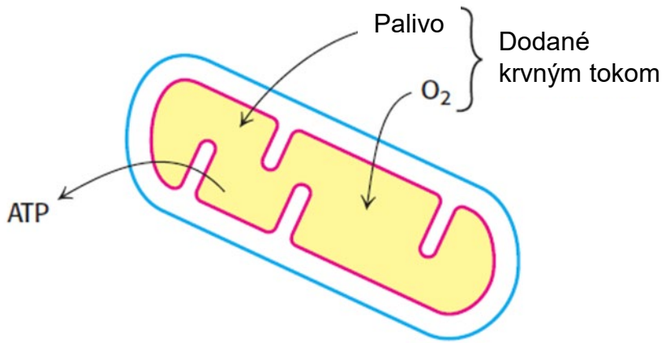


Predok eukaryotickej bunky

Eukaryotická bunka s mitochondriou

ÚVOD K DÝCHACIEMU RĚŤAZCU

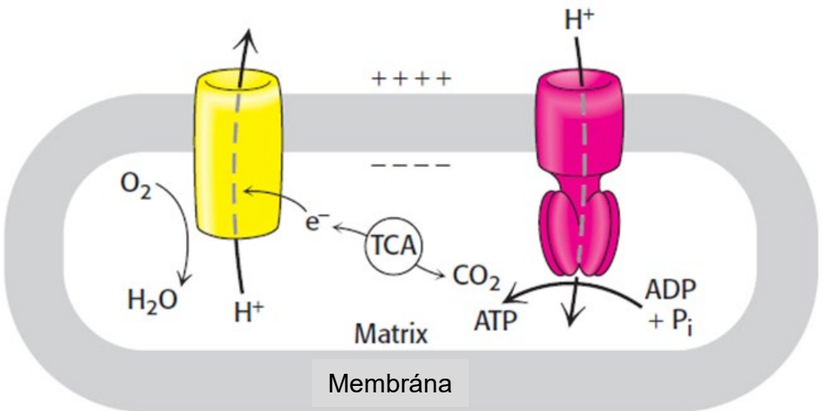
- Sediaci 70 kg muž spotrebuje za deň energiu cca 8400 kJ (2000 kcal), t.j. cca 83 kg ATP
- V každom momente má ľudský organizmus cca 250 g ATP, 1 molekula ATP sa recykluje cca 300x za deň v procese **oxidatívnej fosforylácie**



Mitochondrie oxidujú uhlík obsahujúce, energeticky bohaté molekuly na bunkovú energiu.

Dýchanie buniek

Proces, v ktorom sa tvorí ATP pričom inorganická zlúčenina (ako je molekulový kyslík) slúži ako konečný elektrónový akceptor. Donorom elektrónov môže byť organická alebo anorganická zlúčenina.



Dýchací reťazec alebo elektrón-transportný reťazec pozostáva zo 4 veľkých membránových komplexov nachádzajúcich sa vo vnútornej mitochondriálnej membráne a zabezpečujú oxidáciu NADH a $FADH_2$:

$$NADH + \frac{1}{2} O_2 + H^+ \rightarrow H_2O + NAD^+ \qquad \Delta G^{0'} = -220.1 \text{ kJ/mol}$$

tri z týchto komplexov pumpujú protóny a vzniknutý protónový gradient sa využíva na tvorbu ATP v piatom komplexe, ATP-syntáze

$$ADP + P_i + H^+ \rightarrow ATP + H_2O \qquad \Delta G^{0'} = +30.5 \text{ kJ/mol}$$

ÚVOD K DÝCHACIEMU RĚŤAZCU

Celková bilancia pre oxidáciu glukózy v procese glykolýzy a Krebsovho cyklu
(treba mať na zreteli, že z jednej molekuly glukózy vznikajú dve molekuly pyruvátu)

$$\text{D-glukóza} + 10\ NAD^+ + 2\ FAD + 2\ ADP^{3-} + 2\ GDP^{3-} + 4\ P_i + 2H_2O \rightarrow$$
$$10\ NADH + 10\ H^+ + 2\ FADH_2 + 2\ ATP^{4-} + 2\ GTP^{4-} + 6\ CO_2$$

Molekuly NADH a $FADH_2$ slúžia ako zdroje elektrónov pre dýchací reťazec.

Pri oxidácii týchto molekúl sa uvoľňuje energia, ktorá sa v konečnom dôsledku využíva na syntézu ATP:

$$NADH + ½\ O_2 + H^+ \rightarrow H_2O + NAD^+ \qquad \Delta G^{0'} = -220.1\ kJ/mol$$

alebo

$$NADH + ½\ O_2 + H^+ \rightarrow H_2O + NAD^+ \qquad \Delta E^{0'} = +1.13\ V$$

Táto oxidačno – redukčná reakcia je zložená z komponentov dvoch redoxných párov:

$$½\ O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow H_2O \qquad E^{0'} = +0.815\ V$$

$$NAD^+ + 2\ H^+ + 2\ e^- \rightarrow NADH + H^+ \qquad E^{0'} = -0.315\ V$$

ÚVOD K DÝCHACIEMU RĚŤAZCU

V dýchacom reťazci je potenciál eletrónového transferu z NADH a $FADH_2$ konvertovaný na energiu prenosu fosfátovej skupiny pomocou ATP.

$$X^- + H^+ \rightarrow X + \frac{1}{2} H_2$$

V oxidačno-redukčnej reakcii sa donor elektrónov, v uvedenom prípade X^-, nazýva **reduktant** alebo **redukčný agent**, zatiaľ čo akceptor elektrónov, H^+:, sa nazýva **oxidant**.

Záporný redoxný potenciál znamená, že oxidovaná forma látky má nižšiu afinitu k elektrónom ako H_2. Pozitívny redoxný potenciál znamená, že oxidovaná forma látky má vyššiu afinitu k elektrónom ako H_2. Tieto porovnania sa týkajú štandardných podmienok - konkrétne 1 M oxidant, 1 M redukčné činidlo, 1 M H^+ a 1 atm H_2.
Silné redukčné činidlo (ako je NADH) je teda pripravené darovať elektróny a má negatívny redoxný potenciál, zatiaľ čo silné oxidačné činidlo (napr. ako O_2) je pripravené prijímať elektróny a má pozitívny redoxný potenciál.

Reduoxný potenciál H^+:H_2 páru je definovaný ako 0 voltov

Štandardný redoxný potenciál niektorých reakcií

Oxidant	Reduktant	n	$E^{0'}$ (V)
Sukcinát + CO_2	α-Ketoglutarát	2	-0.67
Acetát	Acetaldehyd	2	-0.60
Feredoxín (oxidovaný)	Feredoxín (redukovaný)	1	-0.43
2 H^+	H_2	2	-0.42
NAD^+	NADH + H^+	2	-0.32
$NADP^+$	NADPH + H^+	2	-0.32
Lipoát (oxidovaný)	Lipoát (redukovaný)	2	-0.29
FAD	$FADH_2$	2	-0.22
Acetaldehyde	Etanol	2	-0.20
Pyruvát	Laktát	2	-0.19
Fumarát	Sukcinát	2	+0.03
Cytochróm *b* (+3)	Cytochróm *b* (+2)	1	+0.07
Dehydroaskorbát	Askorbát	2	+0.08
Ubichinón (oxidovaný)	Ubichinón (redukovaný)	2	+0.10
Cytochróm *c* (+3)	Cytochróm *c* (+2)	1	+0.22
Fe (+3)	Fe (+2)	1	+0.77
½ O_2 + 2 H^+	H_2O	2	+0.82

Poznámka: $E^{0'}$ je štandardný oxidačno-redukčný potenciál (pH 7, 25 °C) a n je počet prenesených elektrónov. $E^{0'}$ zodpovedá parciálnej reakcii v tvare Oxidant + $e^- \rightarrow$ Reduktant (Tabuľka je prebraná a upravená z učebnice Biochemistry 8.vydanie, Berg, Tymoczko, Gatto, Stryer).

ÚVOD K DÝCHACIEMU RĚŤAZCU

Zmena štandardnej Gibbsovej energie $\Delta G^{0'}$ sa dá vypočítať z hodnoty redukčného potenciálu $\Delta E^{0'}$:

$$\Delta G^{0'} = -nF\,\Delta E^{0'}$$

kde n je počet prenesených elektrónov, F je tzv. Faradayova konštanta (96.48 C/mol), $\Delta E^{0'}$ je vo voltoch a $\Delta G^{0'}$ je v kJ/mol.

Určenie hodnoty štandardnej Gibbsovej energie pre reakciu:

Pyruvát + NADH + H^+ → Laktát + NAD^+ (A)

Pyruvát + 2 H^+ + 2 e^- → Laktát $E^{0'}{}' = -0.19$ V (B)
NAD^+ + H^+ + 2 e^- → NADH $E^{0'}{}' = -0.32$ V (C)

Na získanie reakcie A z reakcií B a C potrebujeme otočiť reakciu C tak, aby NADH bola na ľavej strane šípky. V takomto prípade je potrebné zmeniť aj znemienko pre hodnotu $E^{0'}$:

Pyruvát + 2 H^+ + 2 e^- → Laktát $E^{0'}{}' = -0.19$ V (B)
NADH → NAD^+ + H^+ + 2 e^- $E^{0'}{}' = +0.32$ V (D)

Gibbsovu energiu pre reakciu B môžeme vypočítať, keď $n = 2$:

$$\Delta G^{0'} = -2 \times 96.48 \text{ kJ/mol/V} \times -0.19 \text{ V} = +36.7 \text{ kJ/mol}$$

Podobne pre reakciu D:

$$\Delta G^{0'} = -2 \times 96.48 \text{ kJ/mol/V} \times +0.32 \text{ V} = -61.8 \text{ kJ/mol}$$

Gibbsovu energiu pre reakciu A vypočítame ako:

$\Delta G^{0'}$ = $\Delta G^{0'}$ (pre reakciu B) + $\Delta G^{0'}$ (pre reakciu D) =
= +36.7 kJ/mol + (-61.8 kJ/mol) = -25.1 kJ/mol

ÚVOD K DÝCHACIEMU RĚŤAZCU

Elektrónový transportný reťazec je tvorený komplexom (sériou) membránových proteínov a redoxných prenášačov nachádzajúcich sa na vnútornej mitochondriálnej membráne, ktoré umožňujú oxidáciu redukovaných NADH a $FADH_2$ molekulovým kyslíkom. Tento proces je viacstupňový a v jeho priebehu sa na membráne tvorí elektrochemický protónový gradient. Tento gradient je využívaný na syntézu ATP a na aktívny transport molekúl cez membrány.

Prenos elektrónov v rámci dýchacieho reťazca (t.j. oxidácia redoxných centier s nižšími redoxnými potenciálmi, redoxnými centrami s vyššími redoxnými potenciálmi) je spojená (coupled) s translokáciou protónov cez vnútornú mitochondriálnu membránu, pričom tento transport sa uskutočňuje proti protónovému gradientu.

Príklad spriahnutých reakcií - termodynamicky výhodné reakcie (prenos elektrónov medzi centrami dýchacieho reťazca) a termodynamicky nevýhodnou reakciou (transport protónov proti elektrochemickému protónovému gradientu).

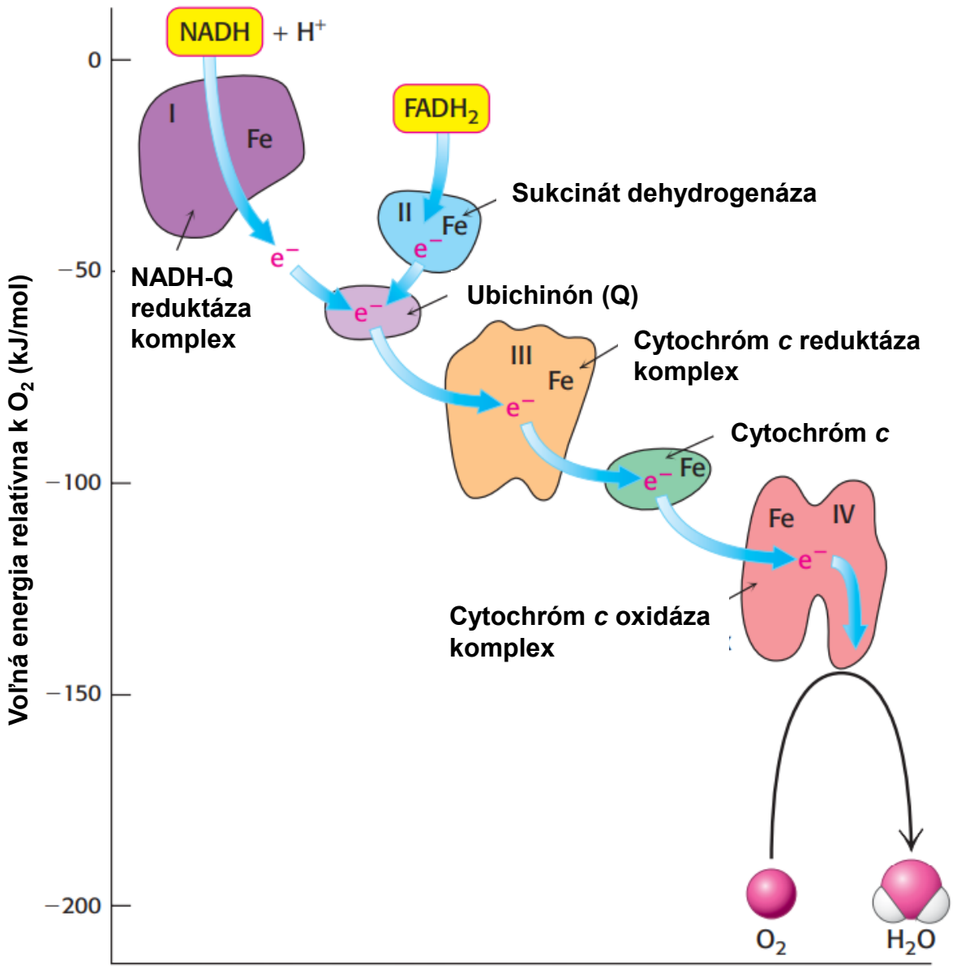
ÚVOD K DÝCHACIEMU RĚŤAZCU

Ako možno kvantifikovať energiu spojenú s protónovým gradientom? Zmena Gibbsovej energie pre látku pohybujúcu sa z jednej strany membrány, kde sa nachádza pri koncentrácii c_1 na druhú stranu, kde má koncentráciu c_2, je daná vzťahom:

$$\Delta G = RT \ln (c_2/c_1) + ZF\Delta V$$

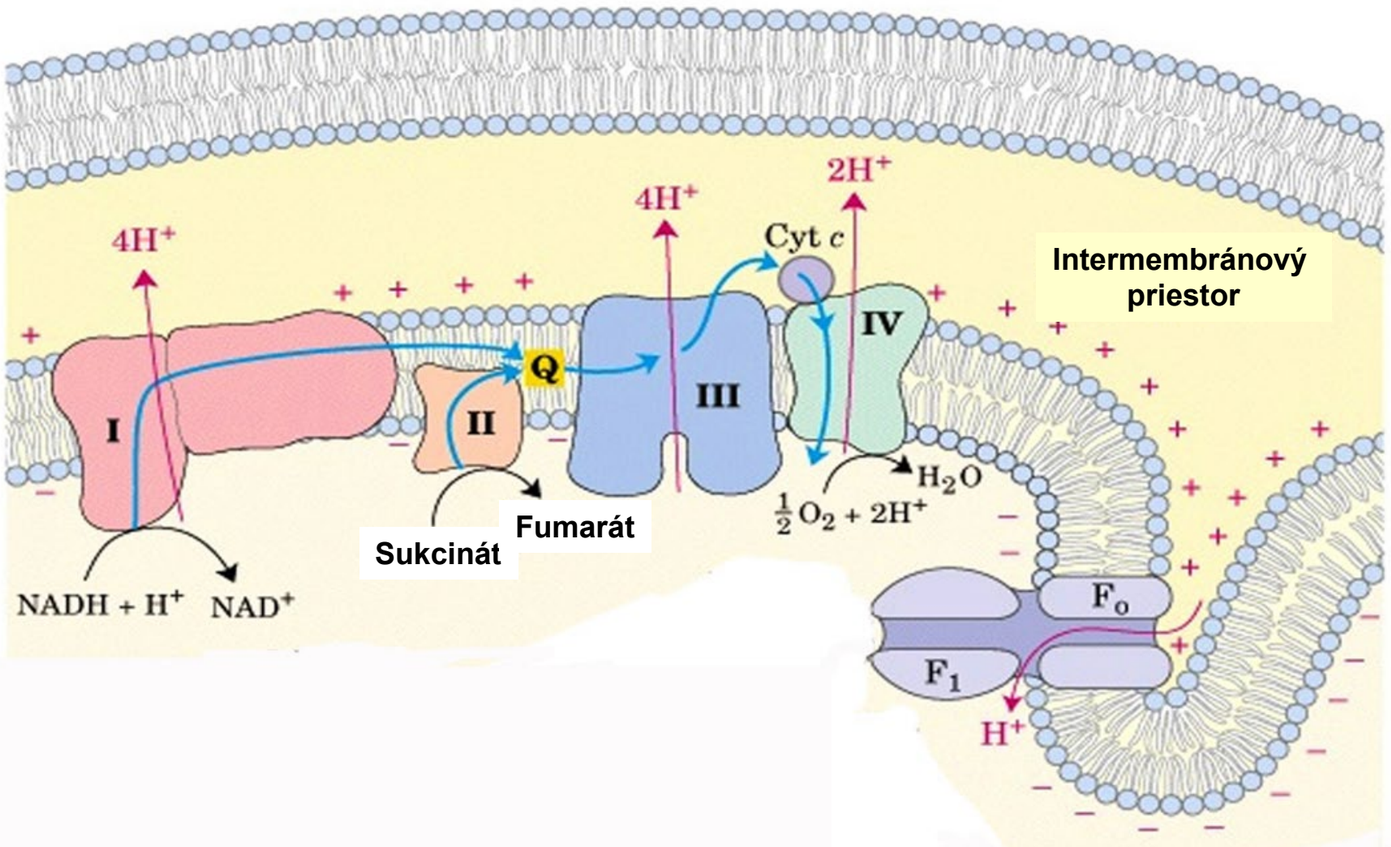
Z je elektrický náboj prepravovanej látky a ΔV je membránový potenciál vo voltoch.

Za typických podmienok pre vnútornú mitochondriálnu membránu je pH na vonkajšej strane o 1.4 jednotky nižšie ako vo vnútri (čo zodpovedá ln (c_2/c_1) = 1.4] a membránový potenciál je 0.14 V, vonkajšia strana je kladná.
Pretože Z = +1 pre protóny, zmena voľnej energie je (8,32 x 10^{-3} kJ/mol/K x 310 K x 1.4) + (+1 x 96.48 kJ/mol/V x 0.14 V) = 21.8 kJ/mol.
Na prenos každého protónu z matrixu do cytoplazmy sa tak spotrebuje 21.8 kJ/mol Gibbsovej energie.



Komponenty elektrónového transportného reťazca. Elektróny tečú v smere energetického gradientu od NADH k O_2. Tok je katalyzovaný štyrmi proteínovými komplexmi. Železo je zložkou komplexov I, III, IV a cytochrómu c.

SCHEMATICKÉ ZNÁZORNENIE DÝCHACIEHO REŤAZCA V MITOCHONDRIÁCH



KOMPONENTY DÝCHACIEHO REŤAZCA

Komplex I – NADH dehydrogenáza, NADH:ubichinón oxidoreduktáza

Enzým obsahujúci 46 polypeptidových reťazcov a katalyzujúci reakciu:

$$\mathbf{NADH + 5\ H^{+}_{matrix} + Q \rightarrow NAD^{+} + QH_2 + 4\ H^{+}_{cytoplazma}}$$

Táto reakcia je spojená s translokáciou 4 protónov z matrixu do intermembránového priestoru mitochondrií

Kompex II – sukcinát dehydrogenáza, sukcinát:ubichinón oxidoreduktáza

Enzým sa skladá z 5 polypeptidov, je súčasťou Krebsovho cyklu a katalyzuje oxidáciu sukcinátu na fumarát, pričom elektróny sa prostredníctvom $FADH_2$ prenesú na ubichinón:

$$\mathbf{Sukcinát + FAD \rightarrow Fumarát + FADH_2}$$

$$\mathbf{FADH_2 + Q \rightarrow FAD + QH_2}$$

Komplex III – cytochróm *bc*$_1$, cytochróm *c* reduktáza, ubichinón:cytochróm *c* oxidoreduktáza

Enzým pozostávajúci z 11 podjednotiek a katalyzujúci prenos elektrónov z ubichinolu (QH_2) na cytochróm *c* (cyt *c*), pričom 2 protóny sú translokované cez vnútornú mitochondriálnu membránu do mitochondriálneho medzimembránového priestoru:

$$\mathbf{QH_2 + cyt\ c^{3+} + 2\ H^{+}_{matrix} \rightarrow Q + cyt\ c^{2+} + 4\ H^{+}_{cytoplazma}}$$

Komplex IV – cytochróm *c* oxidáza

Enzým pozostávajúci z 13 polypeptidových reťazcov a umožňujúci prenos elektrónov z redukovaného cyt *c* na molekulu kyslíka, pričom 4 protóny z matrixu mitochondrií sú translokované cez vnútornú mitochondriálnu membránu do medzimembránového priestoru

$$\mathbf{4\ cyt\ c^{2+} + O_2 + 8\ H^{+}_{matrix} \rightarrow 4\ cyt\ c^{3+} + 2\ H_2O + 4\ H^{+}_{cytoplazma}}$$

KOMPONENTY DÝCHACIEHO REŤAZCA

Okrem štyroch integrálno-membránových polypeptidových komplexov obsahuje dýchací reťazec aj dva mobilné prenášače elektrónov: **ubichinón (Q)** a **cytochróm *c* (cyt *c*)**.

Ubichinón (koenzým Q) - je značne hydrofóbna molekula nachádzajúca sa vo vnútri membrán a v dýchacom reťazci slúži na prenos elektrónov z komplexov I a II na komplex III a taktiež zohráva dôležitú úlohu pri translokácii protónov cez membránu v komplexe III (tzv. Q sľučka, z angl. Q loop). Ubichinón môže byť redukovaný v procese dvojelektrónovej redukcie na ubichinol:

$$Q + 2\,e^- + 2\,H^+ \leftrightarrow QH_2$$

alebo môže byť redukovaný len jedným elektrónom za vzniku semichinónového radikálu:

$$Q + e^- + H^+ \leftrightarrow Q^{\cdot -}$$

Cytochróm c – je malý (M_w= 12 kDa), vo vode rozpustný hemový proteín, ktorý je „voľne“ naviazaný na vnútornú mitochondriálnu membránu. Jeho hlavnou úlohou je prenos elektrónov medzi komplexami III a IV v dýchacom reťazci.
Cytochróm *c* vo svojej štruktúre obsahuje hem *c*, ktorý je kovalentne naviazaný na polypeptidový reťazec prostredníctvom dvoch tioéterových väzieb na dva cysteínové zvyšky. Axiálnymi ligandami pre atóm Fe nachádzajúci sa v heme *c* sú molekuly histidínu a metionínu.

Oxidačno-redukčná reakcia prebiehajúca v cyt *c*: $Fe^{3+} + e^- \leftrightarrow Fe^{2+}$

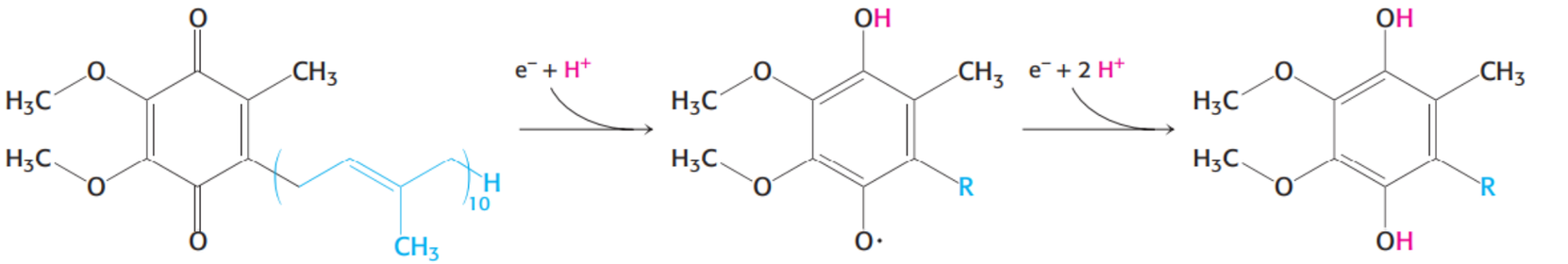
Na povrchu molekuly cyt *c* sa nachádzajú kladne nabité lyzínové zvyšky, prostredníctvom ktorých cyt *c* interaguje so záporne nabitými skupinami nachádzajúcimi sa na povrchu jeho prirodzených redoxných partnerov, cytochróm bc_1 a cytochróm *c* oxidázy.

Pred cca. 20 rokmi sa zistilo, že okrem tejto úlohy zohráva cyt *c* dôležitú funkciu pri iniciácii apoptózy.

KOMPONENTY DÝCHACIEHO REŤAZCA

Enzýmový komplex	Hmotnosť (kDa)	Počet podjednotiek	Prostetická skupina	Oxidant alebo reduktant		
				Matrix	Vnútro membrány	Cytoplazma
NADH-Q oxidoreduktáza	>900	46	FMN Fe-S	NADH	Q	
Sukcinát-Q reduktáza	140	4	FAD Fe-S	Sukcinát	Q	
Q-cytochróm *c* oxidoreduktáza	250	11	Hem b_H Hem b_L Hem c_1 Fe-S		Q	Cyt *c*
Cytochróm c oxidáza	200	12	Hem *a* Hem a_3 Cu_A a Cu_B			Cyt *c*

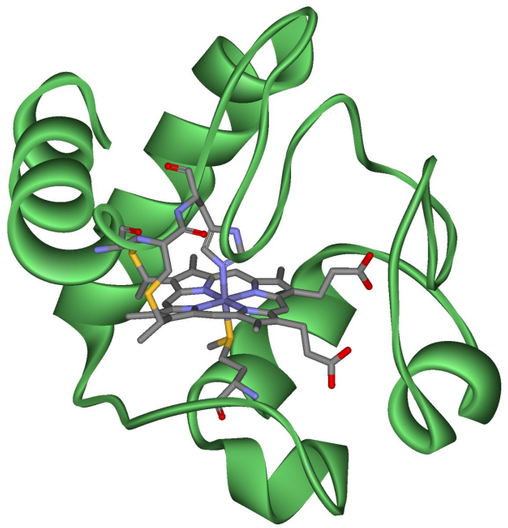
Tabuľka je prebraná a upravená z učebnice Biochemistry 8.vydanie, Berg, Tymoczko, Gatto, Stryer).



Oxidovaná forma koenzýmu Q (Q, ubichinón)

Semichinónový medziprodukt (QH·)

Redukovaná forma koenzýmu Q (QH_2, ubichinol)



ZASTÚPENIE JEDNOTLIVÝCH ZLOŽIEK V DÝCHACOM REŤAZCI

Dva mobilné prenášače elektrónov v dýchacom reťazci (Q, cyt *c*) sa dokážu rýchlo pohybovať v rovine vnútornej mitochondriálnej membrány a interagovať s ich prirodzenými redoxnými partnermi.

Zastúpenie jednotlivých komponentov dýchacieho reťazca nie je ekvivalentné a závisí od typu bunky, napr. v mitochondriách zo srdca kravy je toto zastúpenie nasledovné:

1 NADH dehydrogenáza : 3 cytochróm bc_1: 7 cytochróm *c* oxidáza : 9 cytochróm *c* : 30 ubichinón

V súčasnosti sa však začínajú objavovať hypotézy o tom, že jednotlivé zložky dýchacieho reťazca tvoria jednu veľkú multikomplexnú štruktúru, do ktorej sú zakomponované aj cyt *c* a ubichinón.

CHEMIOSMOTICKÝ PROTÓNOVÝ OKRUH

Pri elektrónovom transporte pozdĺž dýchacieho reťazca sa translokovali protóny z matrixu mitochondrií do intermembránového priestoru, pričom sa takto generuje protónový elektrochemický potenciál Δp, ktorý pozostáva z membránového elektrického potenciálu ΔΨ a zložky odpovedajúcej rozdielu pH na obidvoch stranách membrány:

$$\Delta p(mV) = \Delta\Psi - 59 \,.\, \Delta pH$$

Veľkosť tohto potenciálu na vnútornej mitochondriálnej membráne je zvyčajne 200 – 220 mV, pričom podstatná časť je tvorená elektrickým membránovým potenciálom (treba si uvedomiť, že intenzita elektrického poľa vnútri membrány je veľmi vysoká cca. 300 000 $V.cm^{-1}$).

Tento potenciál môže byť využitý na užitočnú prácu (syntéza ATP, aktívny transport molekúl cez membrány, alebo byť disipovaný v prítomnosti tzv. protonofórov, ktoré zvyšujú priepustnosť protónov cez membrány (napr. karbonyl kyanid p-trifluómetoxyfenylhydrazón (FCCP)), a tak odpájajú procesy dýchacieho reťazca od fosforylácie ADP (tzv. uncouplers) - analógia s elektrickým obvodom a jeho skratovaním.

VYUŽITIE PROTÓNOVÉHO ELEKTROCHEMICKÉHO POTENCIÁLU NA SYNTÉZU ATP PROSTREDNÍCTVOM ATP-SYNTÁZY

Elektrochemický protónový gradient na vnútornej mitochondriálnej membráne sa využíva prostredníctvom ATP-syntázy (F_0F_1 ATP-ázy) na syntézu ATP:

$$ADP + P_i \leftrightarrow ATP$$

V závislosti od vonkajších podmienok môže táto ATP-áza katalyzovať aj hydrolýzu ATP (v prípade vysokej koncentrácie ATP resp. malého protónového elektrochemického gradientu).

Koľko molov protónov je potrebných na syntézu jedného molu ATP ?

Na vznik 1 molu ATP v procese katalyzovanom ATP-syntázou sú potrebné 3 - 4 moly H^+.

ΔG pre syntézu ATP závisí od konkrétnych koncentrácii ATP, ADP a P_i. Za normálnych fyziologických podmienok je to okolo 50-55 $kJ.mol^{-1}$. Pri transporte 1 molu H^+ cez membránu v smere protónového elektrochemického potenciálu (200 mV) sa uvoľní energia 19,3 kJ $\Rightarrow$ 3 moly H^+ stačia na syntézu 1 molu ATP.

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať základnú štruktúru mitochondrií
- Uviesť funkcie mitochondrií
- Opísať funkciu dýchacieho reťazca
- Uviesť základné komponenty dýchacieho reťazca

Oxidatívna fosforylácia - Komplexy dýchacieho reťazca.

7

Štruktúra a funkcia dýchacieho reťazca
Komplex 1 - NADH dehydrogenáza
Komplex II - sukcinát dehydrogenáza
Komplex III - cytochróm bc_1
Komplex IV - cytochróm c oxidáza

KOMPLEX I - NADH dehydrogenáza, NADH - ubichinón oxidoreduktáza

NADH dehydrogenáza je prvý enzým mitochondriálneho dýchacieho reťazca. Katalyzuje prenos elektrónov z NADH na ubichinón. Pri tomto procese sa uvoľňuje energia, ktorá sa využíva na translokáciu 4 protónov z matrixu mitochondrií do medzimembránového mitochondriálneho priestoru proti smeru elektrochemického protónového gradientu.

$$NADH + 5\,H^+_{matrix} + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4\,H^+_{cytoplazma}$$

$$NADH + H^+ + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2 \qquad \Delta E^o = 430\ mV$$

Tento proces pozostáva z komponentov dvoch redoxných párov

$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow NADH + H^+ \qquad E^o = -320\ mV$$

$$Q + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow QH_2 \qquad E^o = 110\ mV$$

Teoreticky môže za štandardných podmienok **Komplex I** prenášať protóny proti elektrochemickému protónovému gradientu („protonmotive force“) o veľkosti:

$$\Delta p = 2\,(e\text{-}).\ 430\ mV / 4\,(H^+) = 215\ mV$$

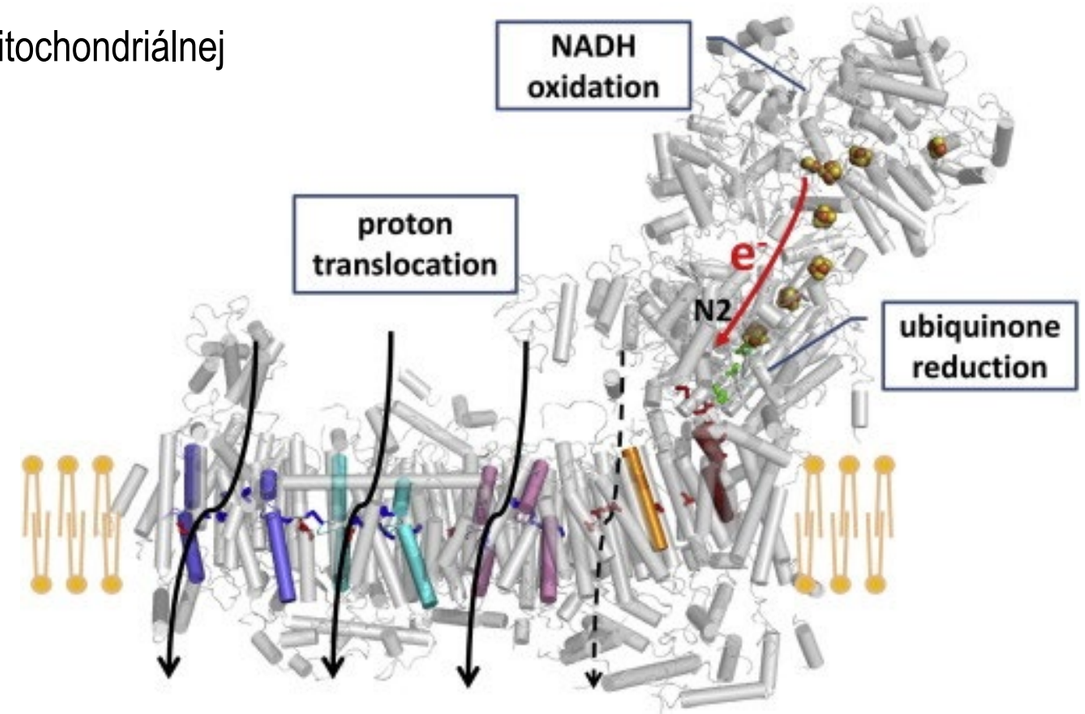
Typická hodnota pre Δp v mitochondriách v ustálenom stave je 200 mV ⇒ proces, ktorý je katalyzovaný enzýmom NADH dehydrogenáza je veľmi efektívny.

KOMPLEX I - ŠTRUKTÚRA

NADH dehydrogenáza (M_w ~1000 kDa) pozostáva zo 46 polypeptidových reťazcov, z ktorých 14 je jadrových (z angl. core) a zvyšných 32 je doplnkových (z angl. accessory). Jadrové polypeptidové reťazce sú zachované vo všetkých komplexoch I a sú dostačujúce pre procesy spojené s transformáciou energie v tomto komplexe.

Jadrové podjednotky sú rozdelené do dvoch skupín: 7 hydrofilných (kódované v jadre) a 7 hydrofóbnych (kódované mtDNA).

Tvar enzýmu je v tvare L, pričom jedno rameno je vnorené do vnútornej mitochondriálnej membrány a druhé sa nachádza v mitochondriálnom matrixe.

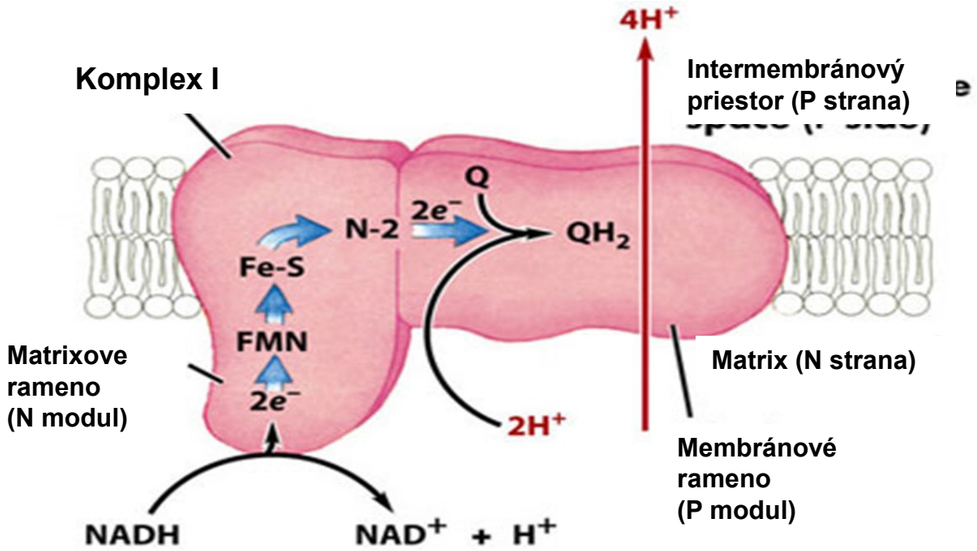


Kofaktory NADH dehydrogenázy:

Flavín mononukleotid (FMN),
Fe-S klastre (z angl. cluster): šesť 4Fe-4S klastrov a dva 2Fe-2S klastre.

Všetky kofaktory sú naviazané na hydrofilné jadrové podjednotky.

KOMPLEX I - ŠTRUKTÚRA



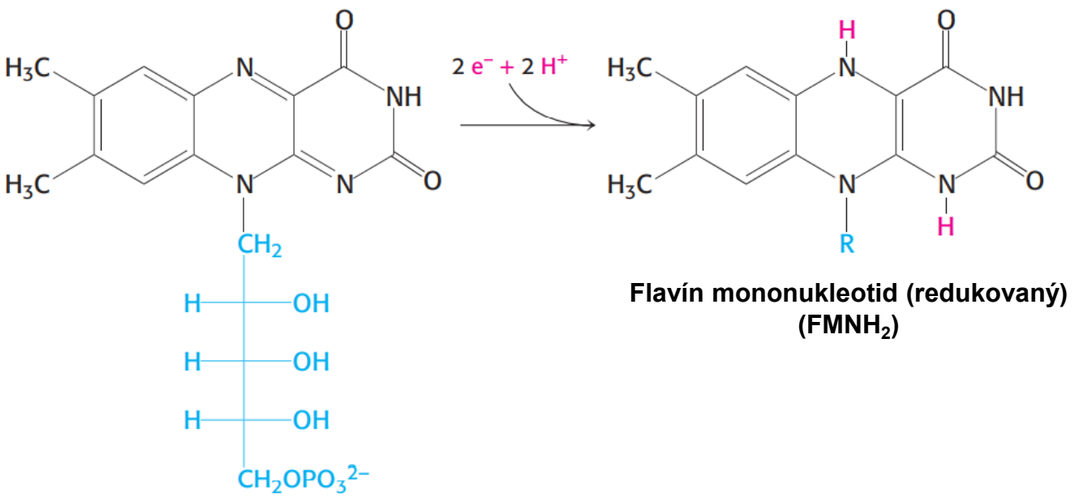
Architektúra NADH dehydrogenázy je rozdelená do troch funkčných blokov (modulov):

N modul: katalyzuje sa na ňom oxidácia NADH
Q modul: miesto redukcie ubichinónu
P modul: zodpovedný za transport protónov cez membránu

Elektróny v procese katalyzovanom NADH dehydrogenázou prechádzaju z N modulu do Q modulu prostredníctvom Fe-S klastrov. Energia uvoľnená pri tomto transporte sa potom využíva pri transporte protónov cez membránu v P module - mechanizmus spriahnutia týchto dvoch procesov nie je dostatočne známy.

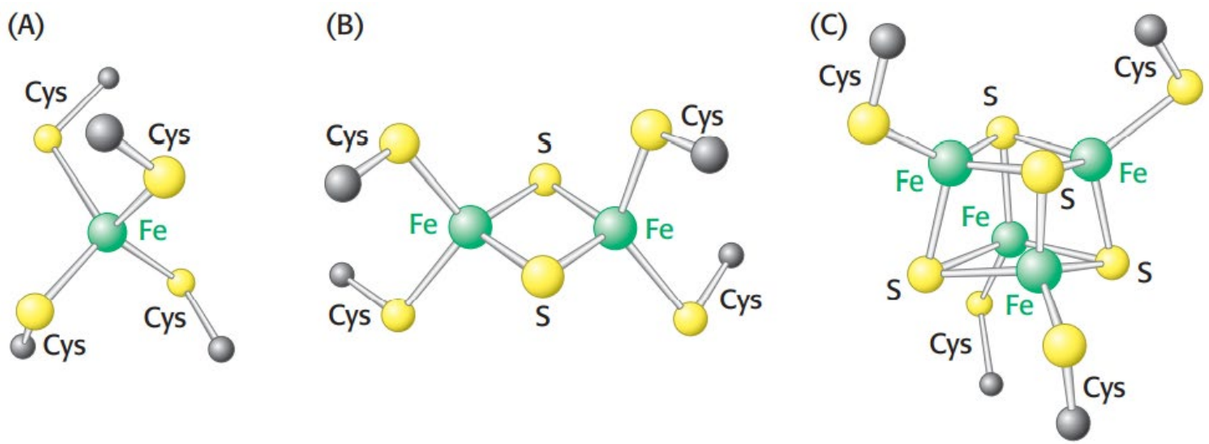
KOMPLEX I - KOFAKTORY

Oxidačné stavy FMN



Štruktúra Fe-S centier

- každý atóm Fe je obkolesený 4 atómami S
- redukčný potenciál týchto centier závisí na okolí, v ktorom sa daný klaster nachádza



Je známych niekoľko typov klastrov Fe-S. V najjednoduchšom type, jediný ión železa je tetraedricky koordinovaný so sulfhydrylovými skupinami štyroch cysteínových zvyškov proteínu (A). Druhý typ (B), označený ako 2Fe-2S, obsahuje dva ióny železa, dva anorganické sulfidy a zvyčajne štyri cysteínové zvyšky. Tretí typ (C), označený ako 4Fe-4S, obsahuje štyri ióny železa, štyri anorganické sulfidy a štyri cysteínové zvyšky. NADH-Q oxidoreduktáza obsahuje aj klastre 2Fe-2S aj 4Fe-4S. Ióny železa v týchto komplexoch Fe-S sa cyklujú medzi dvoma stavmi: Fe^{2+} (redukovaný) a Fe^{3+} (oxidovaný). Na rozdiel od chinónov a flavínov, klastre Fe-S všeobecne prechádzajú oxidačno-redukčnými reakciami bez uvoľňovania alebo viazania protónov.

KOMPLEX I – VÄZOBNÉ MIESTA A INHIBÍTORY

Ubichinónové väzobné miesta v NADH dehydrogenáze

Doteraz nie je celkom presne určený počet a lokalizácia väzobných miest pre molekuly ubichinónu v NADH dehydrogenáze.
Tieto väzobné miesta však musia vyhovovať niektorým podmienkam:

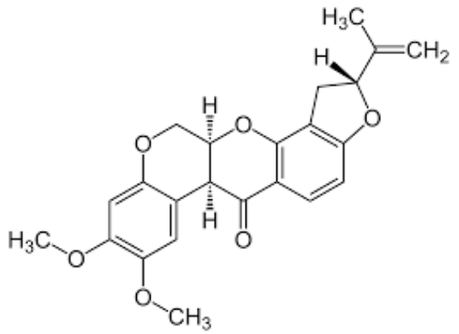
- Redukcia ubichinónu si vyžaduje prítomnosť protónov (prístup protónov k väzobnému miestu z matrixovej stany mitochondriálnej membrány),
- Je pravdepodobné, že väzobné miesta sa nachádzajú v membránovej doméne proteínu, vhodné vzhľadom na dlhý izoprénový reťazec ubichinónu, avšak hydrofilná hlavička musí byť spojená s vodnou fázou, kvôli protonácii,
- Ubichinónové miesto musí byť v „rozumnej“ vzdialenosti (do 14 Å) od donora elektrónov (Fe-S klaster).

Inhibítory NADH dehydrogenázy

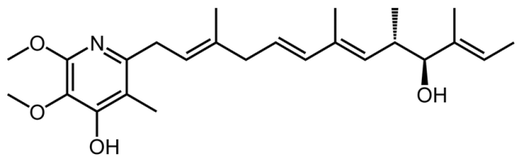
Inhibítory NADH dehydrogenázy sú väčšinou hydrofóbne molekuly, ktoré sa viažu do, alebo do tesnej blízkosti, väzobného miesta pre ubichinón.
Rozdelené sú do troch skupín (A,B,C) podľa toho, do akej domény NADH dehydrogenázy sa viažu, a ktorý katalytický stav tohto enzýmu inhibujú.

Príklady inhibítorov:

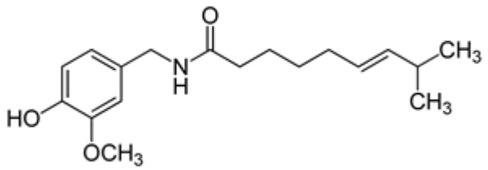
rotenon (A)



piericidin (B)



kapsaicín (C)



Príkladom inhibítora, ktorý neinhibuje viazanie ubichinónu, ale transport protónov je fenpyroximat.

KOMPLEX I - KATALYTICKÝ MECHANIZMUS

Oxidácia NADH ubichinónom je z termodynamického hľadiska veľmi výhodná, preto reverzibilná reakcia je málo pravdepodobná. Tento proces prebieha vo viacerých krokoch:

1. NADH + FMN ↔ NAD^+ + $FMNH^-$

Táto reakcia je tzv. hydridná, prenesú sa naraz dva elektróny z NADH na FMN. Postupný prenos elektrónov nie je možný z dôvodu značnej nestability NADH radikálu.

2. $FMNH^-$ + Fe-S $(N3)_{ox}$ → $FMNH^{\cdot}$ + Fe-S$(N3)_{red}$

3. $FMNH^{\cdot}$+Fe-S $(N3)_{ox}$ → FMN + Fe-S $(N3)_{red}$

$FMNH^-$ je reoxidovaný prostredníctvom Fe-S klastra N3 v procese dvoch jednoelektrónových prechodov

4. Fe-S $(N3)_{red}$ + Fe-S $(N2)_{ox}$→ Fe-S $(N3)_{ox}$ + Fe-S $(N2)_{red}$

Prenos elektrónov reťazcom Fe-S klastrov (celkovo 8 klastrov). Vzdialenosti medzi jednotlivými klastrami 11-13 Å.

KOMPLEX I – KATALYTICKÝ MECHANIZMUS

5. Fe-S $(N2)_{red}$ + Q + H^+ → Fe-S $(N2)_{ox}$ + SQ

Klaster N2 je donorom elektrónov pre naviazaný ubichinón. Elektróny prechádzajú z N2 na Q postupne, pričom jednoelektrónovou redukciou ubichinónu vzniká semichinón (SQ). Tento je následne rýchlo redukovaný druhým elektrónom z N2 klastra.

6. Fe-S $(N2)_{red}$ + SQ + H^+ → Fe-S $(N2)_{ox}$ + QH_2

Existencia semichinónového radikálu v priebehu redukcie ubichinónu na ubichinol môže za určitých okolností viesť k redukcii O_2 na superoxidový aniónový radikál $O_2^{-\bullet}$.

Je známe, že komplex I spolu s komplexom III sa najviac podieľajú na tvorbe reaktívnych kyslíkových molekúl v mitochondriách. Tvorba týchto molekúl môže viesť k smrti bunky (apoptóza), vzniku rôznych ochorení (mutácie mtDNA), ako aj prispievať k procesom starnutia.

KOMPLEX I – mechanizmus transportu protónov - Q-cyklus

V modeli Q-cyklu pre transport protónov v komplexe I zohráva podstatnú úlohu redukcia ubichinónu, molekuly FMN a Fe-S klastrov predstavujú len zdroje elektrónov a nepodieľajú sa na pumpovaní protónov.

Predpokladaná existencia dvoch väzobných miest pre ubichinón (ubichinol), jedno miesto na matrixovej strane a jedno na cytoplazmatickej strane membrány.

Podstatné fakty svedčiace proti navrhovanému mechanizmu:

- pri oxidácii jednej molekuly NADH sa transportujú cez membránu len **2 protóny**, v skutočnosti sú transportované **4 protóny**

- nebol nájdený kofaktor sprostredkujúci elektrónový transport medzi dvoma väzobnými miestami pre ubichinóny.

KOMPLEX I - mechanizmus transportu protónov - priame spriahnutie

Schéma transportu elektrónov cez NADH dehydrogenázu naznačuje, že v dvoch krokoch je rozdiel medzi redoxnými potenciálmi susedných redoxných partnerov dostatočný na jeho využitie pri transporte protónov cez membránu:

1. Redukcia Fe-S klastra N2
2. Oxidácia N2 klastra ubichinónom

Na základe týchto skutočností boli navrhnuté dve možnosti priameho spriahnutia prenosu protónov cez membránu s elektrónovým transportom v komplexe I.

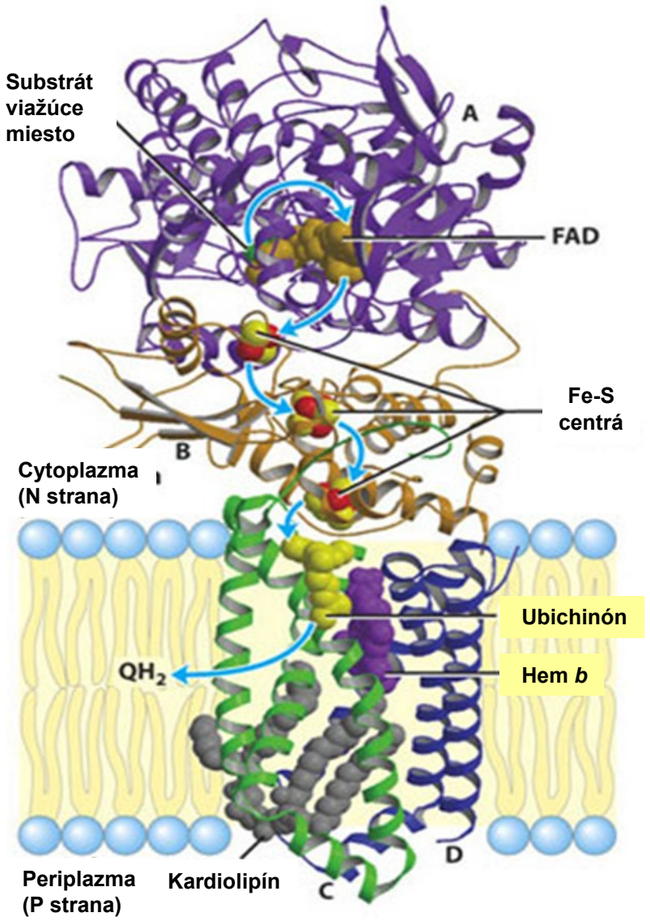
1. Elektrón pochádzajúci z NADH a prechádzajúci cez Fe-S klastre redukuje klaster N2, ktorý sa dostáva do „vysoko-energetického“ stavu $(N2_{red})^*$. Relaxácia tohto stavu do stavu $N2_{red}$ je spojená s prenosom dvoch protónov cez membránu. Relaxovaný $N2_{red}$ je ešte schopný redukovať ubichinón. O tom, že klaster N2 je pravdepodobne zapojený do protón pumpovania svedčí skutočnosť, že jeho redoxný potenciál je pH závislý a tento potenciál je taktiež citlivý na celkový membránový potenciál. N2 predstavuje priamy zdroj elektrónov pre redukciu ubichinónu.

2. Redoxný potenciál naviazaného ubichinónu je oveľa nižší než voľného $\Rightarrow$ prenos elektrónov na naviazaný ubichinón konzervuje potenciálnu energiu. Afinita ubichinónu k väzbe s Komplexom I je oveľa vyššia v porovnaní s afinitou ubichinolu k tomuto enzýmu. Pri disociácii ubichinolu (QH_2) z NADH dehydrogenázy je vyššie spomenutá potenciálna energia uvoľnená a je spriahnutá s translokáciou 4 protónov cez membránu.

KOMPLEX II - SUKCINÁT DEHYDROGENÁZA, SUKCINÁT-UBICHINÓN OXIDOREDUKTÁZA

Sukcinát + FAD → Fumarát + $FADH_2$
$FADH_2$ + Q → FAD + QH_2

Sukcinát dehydrogenáza, enzým z cyklu kyseliny citrónovej, je súčasťou komplexu sukcinát dehydrogentázy (komplexu II), integrálneho membránového proteínu vnútornej mitochondriálnej membrány. Enzým sa skladá zo 4 polypeptidov a 5 kofaktorov (prostetické skupiny). Elektróny sa prenášajú do centier Fe-S a potom do Q za vzniku QH_2, ktorý je potom pripravený na prenos elektrónov ďalej v dýchacom reťazci. Komplex sukcinát-ubichinón reduktázy, na rozdiel od NADH-Q oxidoreduktázy, nepumpuje protóny z jednej strany membrány na druhú. V dôsledku toho sa vytvára menej ATP oxidáciou $FADH_2$ než z NADH.

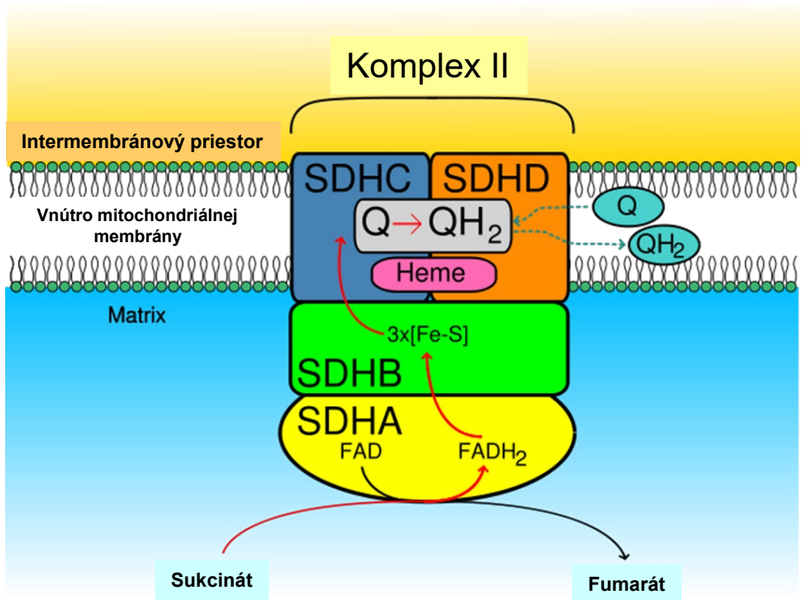


V enzýme sa nachádzajú tri domény:

SDHA - katalytická doména,

SDHB – doména pre elektrónový transport,

SDHC/SDHD – „kotva“ pre zachytenie proteínu v membráne.



KOMPLEX II - katalytický mechanizmus

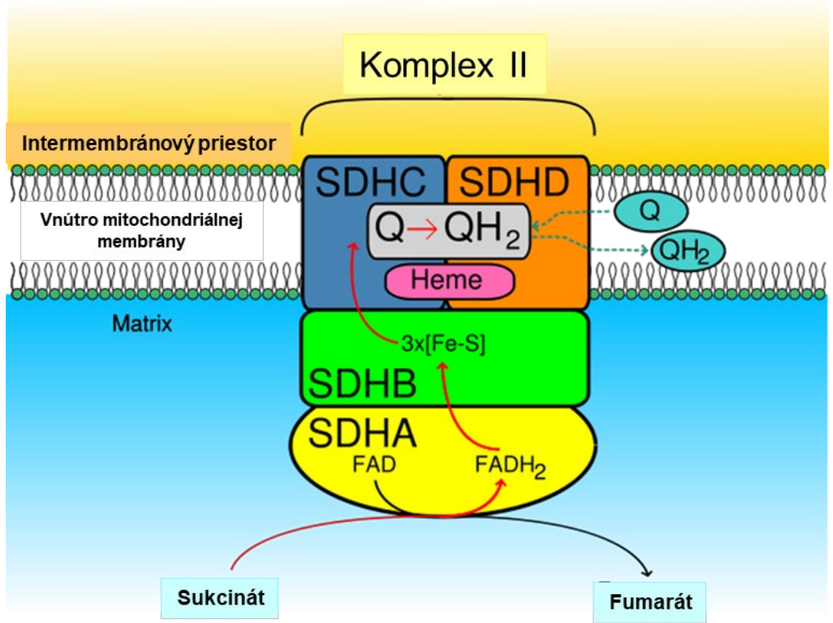
1. Sukcinát sa viaže do domény SDHA, ktorá obsahuje molekulu FAD a kde prebieha oxidácia sukcinátu na fumarát a vzniká redukovaná molekula $FADH_2$.

2. Doména SDHB obsahuje 3 Fe-S centrá (2Fe-2S, 3Fe-3S, 4Fe-4S), prostredníctvom ktorých sa elektróny transportujú z SDHA domény do membránovej SDHC/SDHD domény.

3. Takto prenesené elektróny sa podieľajú na dvojelektrónovej redukcii ubichinónu na ubichinol, ktorá sa uskutočňuje v SDHC/SDHD doméne.

4. Vzniknutý ubichinol sa uvoľňuje zo sukcinát dehydrogenázy do vnútornej mitochondriálnej membrány a slúži ako zdroj elektŕonov pre Komplex III dýchacieho reťazca.

V SDHC/SDHD doméne sa ešte nachádza hém *b*, ktorý sa priamo nepodieľa na transporte elektrónov, ale pravdepodobne slúži ako ochrana pred tvorbou voľných kyslíkových radikálov v sukcinát dehydrogenáze.



KOMPLEX III – CYTOCHRÓM BC_1, CYTOCHRÓM C REDUKTÁZA

Cytochróm bc_1 je enzým pozostávajúci z 11 podjednotiek a katalyzujúci prenos elektrónov z ubichinolu (QH_2) na cytochróm *c* (cyt *c*), pričom 2 protóny sú translokované cez vnútornú mitochondriálnu membránu do mitochondriálneho medzimembránového priestoru:

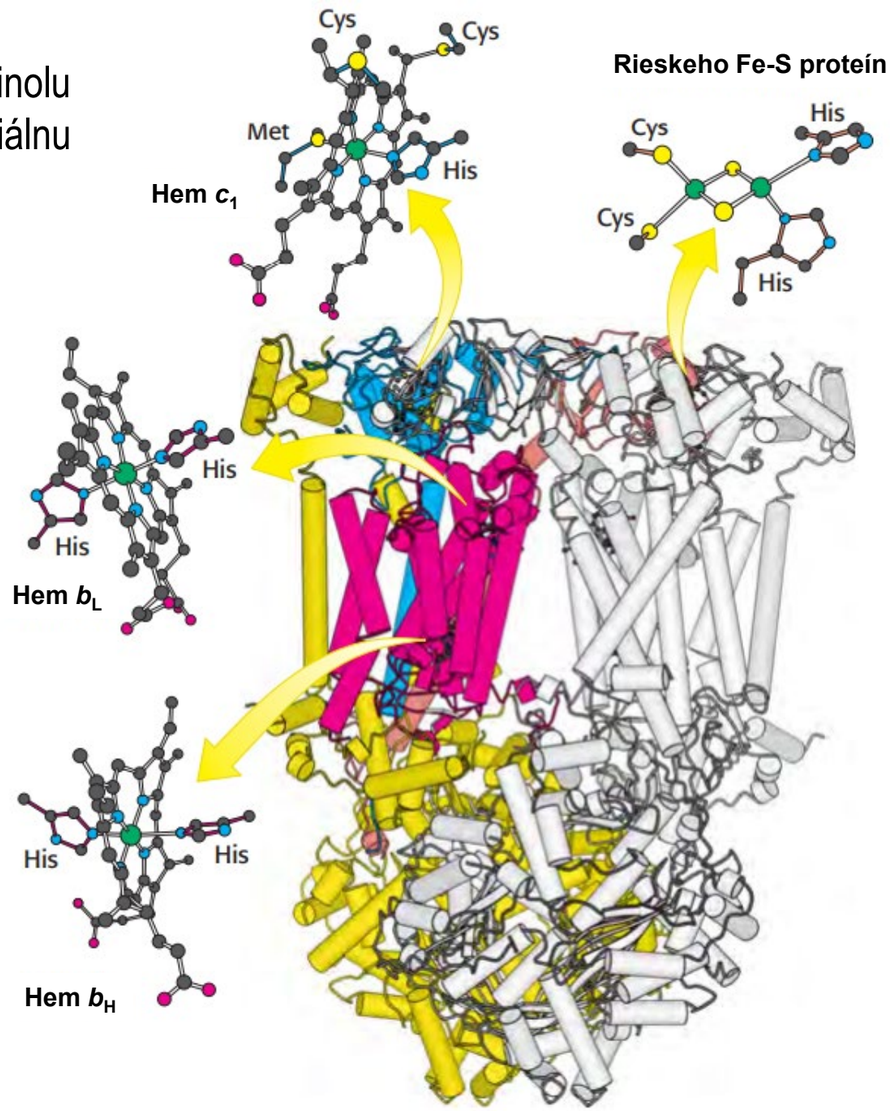
$$QH_2 + \text{cyt } c^{3+} + 2\,H^+_{matrix} \rightarrow Q + \text{cyt } c^{2+} + 4\,H^+_{cytoplazma}$$

Zvyčajne sa cytochróm c reduktáza nachádza vo forme diméru.

Vo svojej štruktúre monomér cytochróm c reduktázy obsahuje 4 kofaktory:

cytochrómy b_L, b_H a c_1, Rieskeho Fe-S proteín

a dve väzobné miesta pre ubichinón (ubichinol): **Q_0 (Q_P), Q_1 (Q_N)**

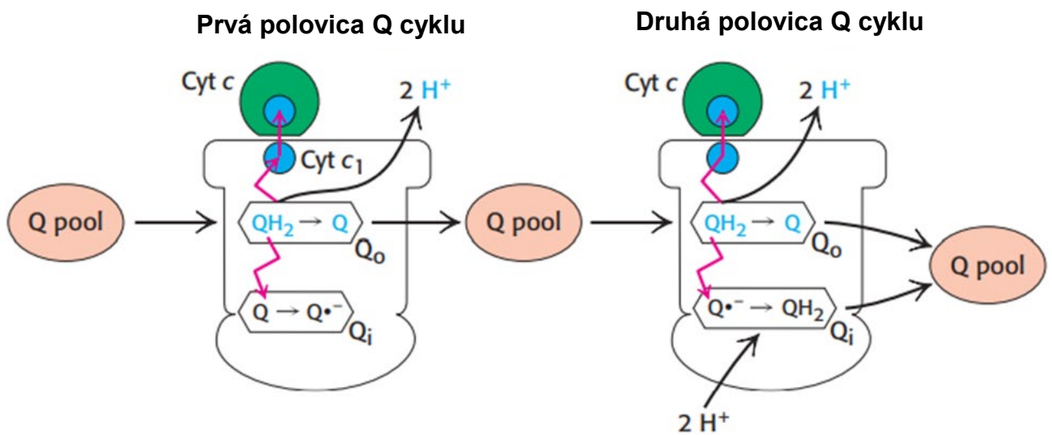


Cytochróm bc_1 je homodimér s 11 rozdielnymi subjednotkami/monomér.

KOMPLEX III - Q CYKLUS

Mechanizmus pumpovania protónov prostredníctvom Q-sľučky (z angl. Q-loop) bol navrhnutý P. Mitchelom.

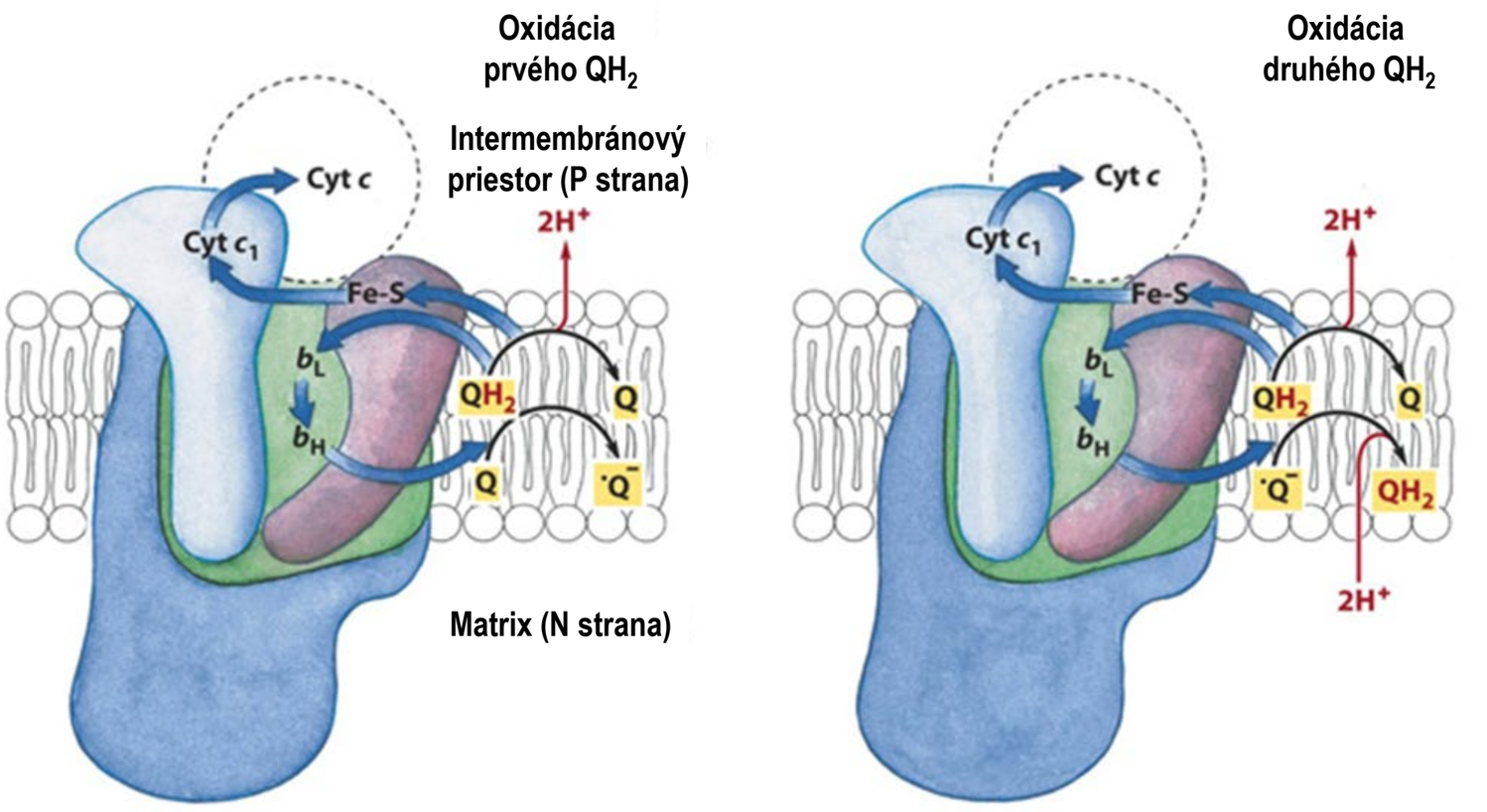
1. Molekula QH_2 sa naviaže do Q_0 (Q_P) miesta, pričom uvoľní dva protóny do medzimembránového mitochondriálneho priestoru.
2. Jeden z elektrónov z QH_2 je transportovaný cez Rieskeho Fe-S proteín na cytochróm c_1 a potom ďalej na cytochróm *c*.
3. Druhý elektrón z QH_2 sa prostredníctvom hémov b_L a b_H dostáva k väzbovému miestu Q_1 (Q_N), kde redukuje naviazaný oxidovaný Q na semichinónový anión $Q^{-\bullet}$
4. Oxidovaná molekula Q (krok 1) sa uvoľní z miesta Q_0 a nahradí sa ďalšou molekulou QH_2, pričom sa z tejto molekuly uvoľnia dva protóny do mitochondriálneho medzimembránového priestoru.
5. Jeden z elektrónov z QH_2 putuje prostrednćictvom Rieskeho Fe-S proteínu a cyrochrómu c_1 na cytochróm *c*.
6. Druhý elektrón sa cez hemy b_L a b_H dostáva k Q_1 miestu, kde redukuje semichinónový radikál, pričom sa vychytávajú dva protóny z matrixu a vzniká QH_2.
7. Molekula QH_2 disociuje z Q_1 miesta.



Q-cyklus: V prvej polovici cyklu sa prenášajú dva elektróny viazaného QH_2, jeden na cytochróm *c* a druhý na viazané Q v druhom väzbovom mieste za vzniku semichinónového radikálového aniónu $Q^{\bullet-}$. Novovzniknutý Q následne disociuje. V druhej polovici cyklu druhá molekula QH_2 odovzdáva elektróny v komplexe III, jeden druhej molekule cytochrómu *c* a druhý na redukciu $Q^{\bullet-}$ na QH_2. Výsledkom tohto druhého prenosu elektrónov je absorpcia dvoch protónov z matrixu. Dráha prenosu elektrónov je zobrazená červenou farbou.

$$2\ QH_2 + Q + 2\ \text{Cyt}\ c_{ox} + 2\ H^+_{matrix} \rightarrow 2\ Q + QH_2 + 2\ \text{Cyt}\ c_{red} + 4\ H^+_{cytoplazma}$$

KOMPLEX III – Q CYKLUS – SCHEMATICKÉ ZNÁZORNENIE



QH_2 + cyt c_1 (oxidovaný) ⟶ $^{\cdot}Q^-$ + $2H_P^+$ + cyt c_1 (redukovaný)

QH_2 + $^{\cdot}Q^-$ + $2H_N^+$ + cyt c_1 (oxidovaný) ⟶ QH_2 + $2H_P^+$ + Q + cyt c_1 (redukovaný)

Výsledná reakcia:

QH_2 + 2 cyt c_1 (oxidovaný) + $2H_N^+$ ⟶ Q + 2 cyt c_1 (redukovaný) + $4H_P^+$

KOMPLEX III – CHEMICKÝ ZÁPIS Q CYKLU

Oxidácia prvej molekuly QH_2

$$QH_2 + \text{cyt c}^{3+} \rightarrow Q^{\cdot -} + \text{cyt c}^{2+} + 2\,H^+_{mmp}$$

Oxidácia druhej molekuly QH_2

$$QH_2 + \text{cyt c}^{3+} + Q^{\cdot -} + 2H^+_{mat} \rightarrow QH_2 + \text{cyt c}^{2+} + Q + 2\,H^+_{mmp}$$

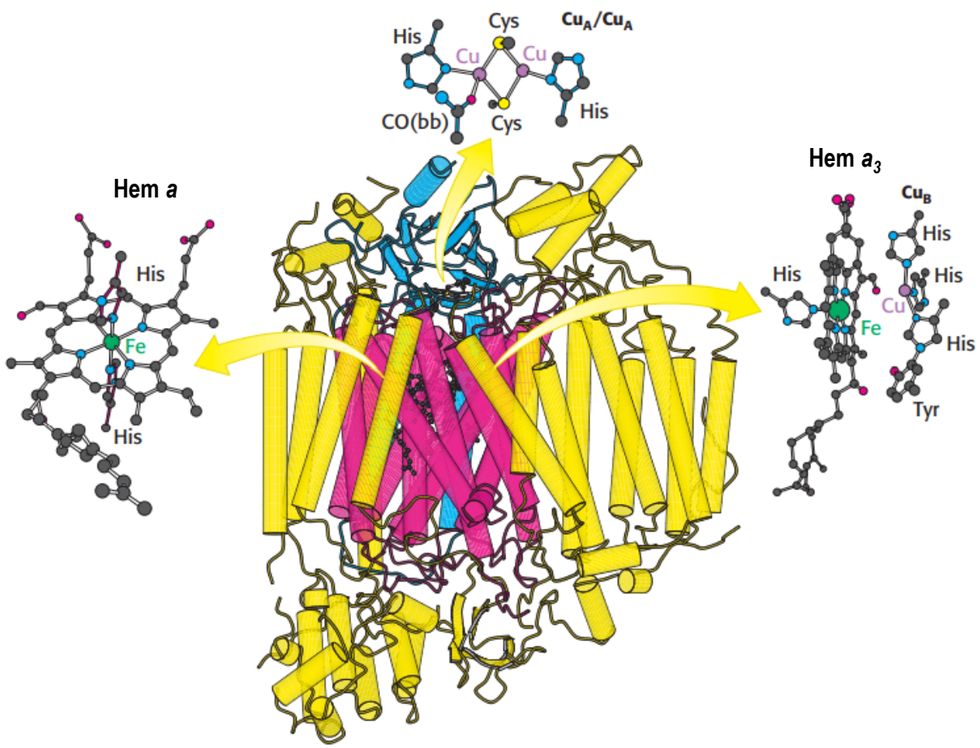
Celkovo je možno procesy Q-cyklu zhrnúť v chemickej rovnici:

$$QH_2 + 2\,\text{cyt c}^{3+} + 2\,H^+_{mat} \rightarrow Q + 2\,\text{cyt c}^{2+} + 4\,H^+_{mmp}$$

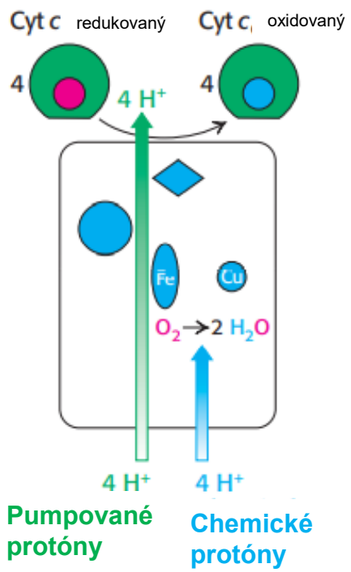
KOMPLEX IV – CYTOCHRÓM C OXIDÁZA

Cytochróm c oxidáza je enzým pozostávajúci z 13 polypeptidových reťazcov, ktorý umožňuje prenos elektrónov z redukovaného cyt *c* na molekulu kyslíka, pričom 4 protóny z matrixu mitochondrií sú translokované cez vnútornú mitochondriálnu membránu do medzimembránového priestoru:

$$4\ \text{cyt}\ c^{2+} + O_2 + 8\ H^+_{matrix} \rightarrow 4\ \text{cyt}\ c^{3+} + 2\ H_2O + 4\ H^+_{cytoplazma}$$



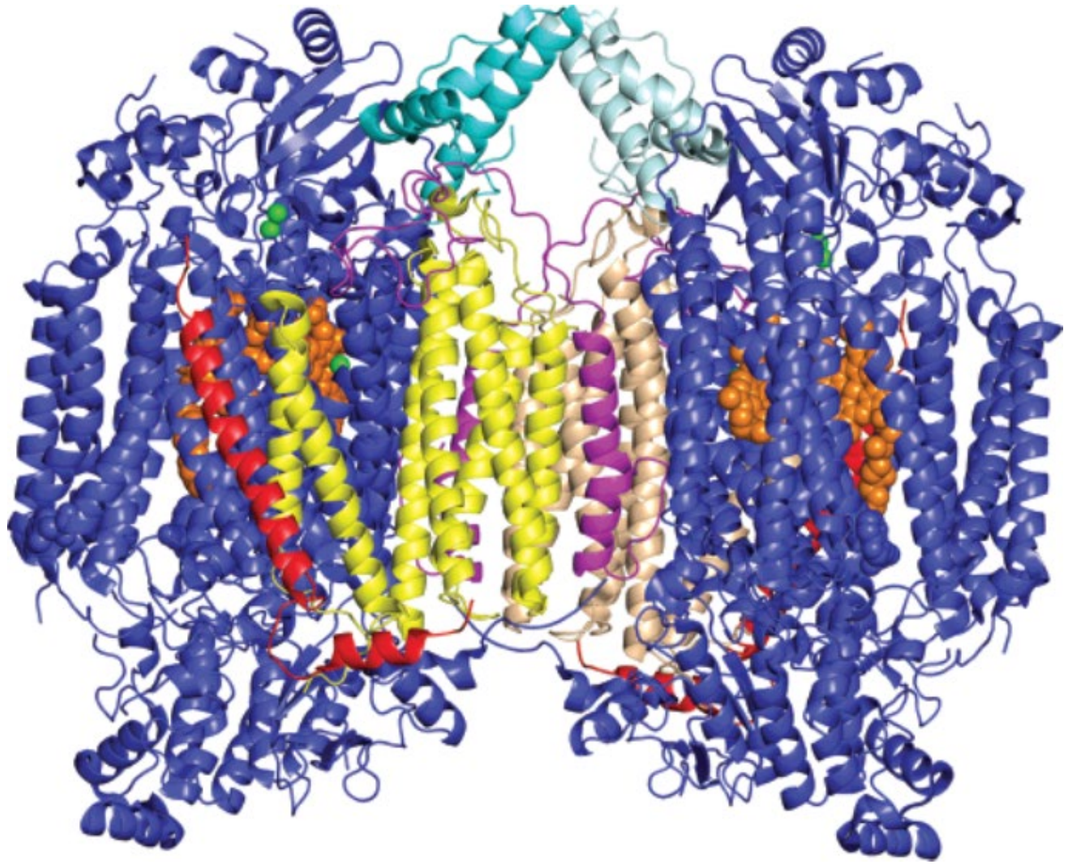
Cytochróm c oxidáza pozostáva z 13 subjednotiek.



Cytochróm *c* oxidáza (CcO) patrí do skupiny tzv. medˇ obsahujúcich hemových oxidáz (z angl. heme-copper oxidases), ktoré sú finálnym komponentom dýchacieho reťazca v mitochondriách eukaryotov alebo v cytoplazmatickej membráne v baktériách.

V aeróbnych bunikách sa v CcO spotrebuváva cca. 90-95 % z celkového množstva O_2 použitého týmito bunkami.

KOMPLEX IV - ŠTRUKTÚRA



- integrálny membránový proteín pozostávajúci z 13 subjednotiek, v membráne vytvára dimér
- obsahuje 3 atómy medi a 2 hemy: *a* a a_3
- purifikovaný komplex zvyčajne obsahuje 15-20 fosfolipidov, 13 fosfolipidov bolo detekovaných v kryštálovej štruktúre CcO
- obsahuje 3-4 molekuly kardiolipínu

KOMPLEX IV - ŠTRUKTÚRA

Je známa kryštálová štruktúra mitochondriálnej CcO ako aj viacerých bakteriálnych oxidáz (*Paracoccus denitrificans, Rhodobacter spaeroides, Thermus thermophilus*)

Z 13 polypepdidových reťazcov tvoriacich CcO vo vyšších organizmoch sú 3 kódované v mtDNA a zvyšné sú kódované jadrovou DNA. V baktériách je CcO v prevažnej miere zložená z 3 polypeptidov (analógia k 3 subjednotkám kódovaných mtDNA v eukaryotických bunkách), pričom tieto CcO sú plne funkčné. Predpokladá sa, že 10 subjednotiek CcO kódovaných jadrovou DNA plní regulačnú a ochrannú funkciu a nepodieľa sa priamo na transporte elektrónov a pumpovaní protónov.

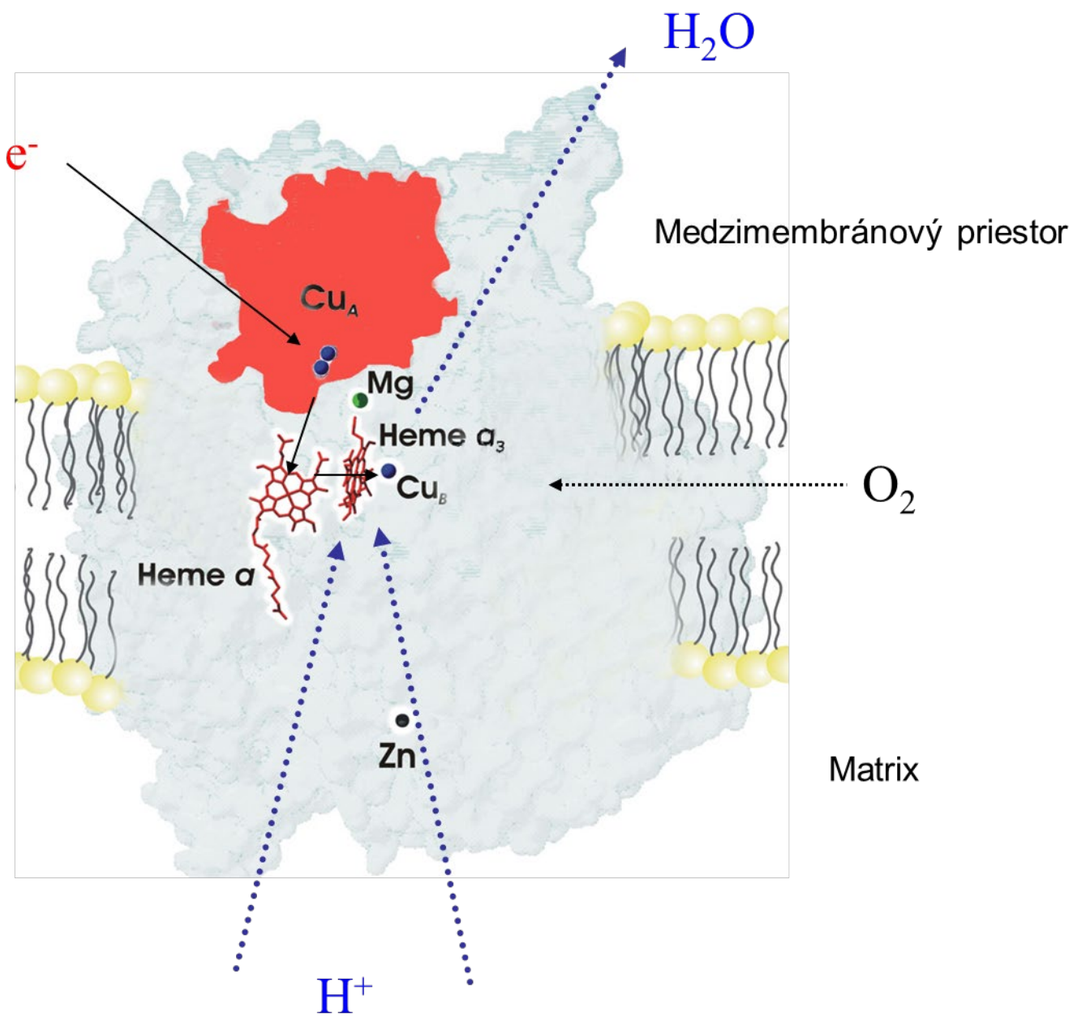
Kofaktory nachádzajúce sa v CcO:

2 hemy *a* (hem *a* a hem a_3) nachádzajúce sa na subjednotke I,
2 atómy Cu tvoriace tzv. centrum Cu_A nachádzajúce sa na subjednotke II,
1 atóm Cu označovaný ako Cu_B vyskytujúci sa na subjednotke I.

Hem a_3 a Cu_B tvoria tzv. binukleárne (katalytické) centrum CcO.

V štruktúre CcO boli ešte nájdené atómy Mg^{2+} a Zn^{2+}. Ich úloha nie je doteraz dostatočne objasnená.

KOMPLEX IV – LOKALIZÁCIA REDOXNÝCH CENTIER V MITOCHONDRIÁLNEJ CcO



KOMPLEX IV – ŠTRUKTÚRA KATALYTICKÉHO CENTRA CcO

Katalytické (binukleárne) centrum CcO pozostáva z hemu a_3 a atómu Cu_B.

Ligandom hemu a_3 je molekula His 376 a ligandami Cu_B je trojica His 291, 290, 240.
Zvláštnosťou je kovalentná väzba medzi His 240a Tyr 244 (zriedkakedy vídaná skutočnosť existencie kovalentnej väzby medzi dvomi bočnými skupinami aminokyselín). Predpokladá sa, že táto väzba zabezpečuje správnu polohu Tyr zvyšku voči katalytickému centru. To je potrebné k tomu, aby bol Tyr schopný počas katalytického cyklu dodať do katalytického centra elektrón resp. protón.

Šieste ligandové miesto na heme a_3 je v prípade redukovaného katalytického centra prázdne. Ak je toto centrum oxidované, nachádza sa pravdepodobne medzi Fe hému a_3 a atómom Cu_B molekula H_2O a ión OH^-.

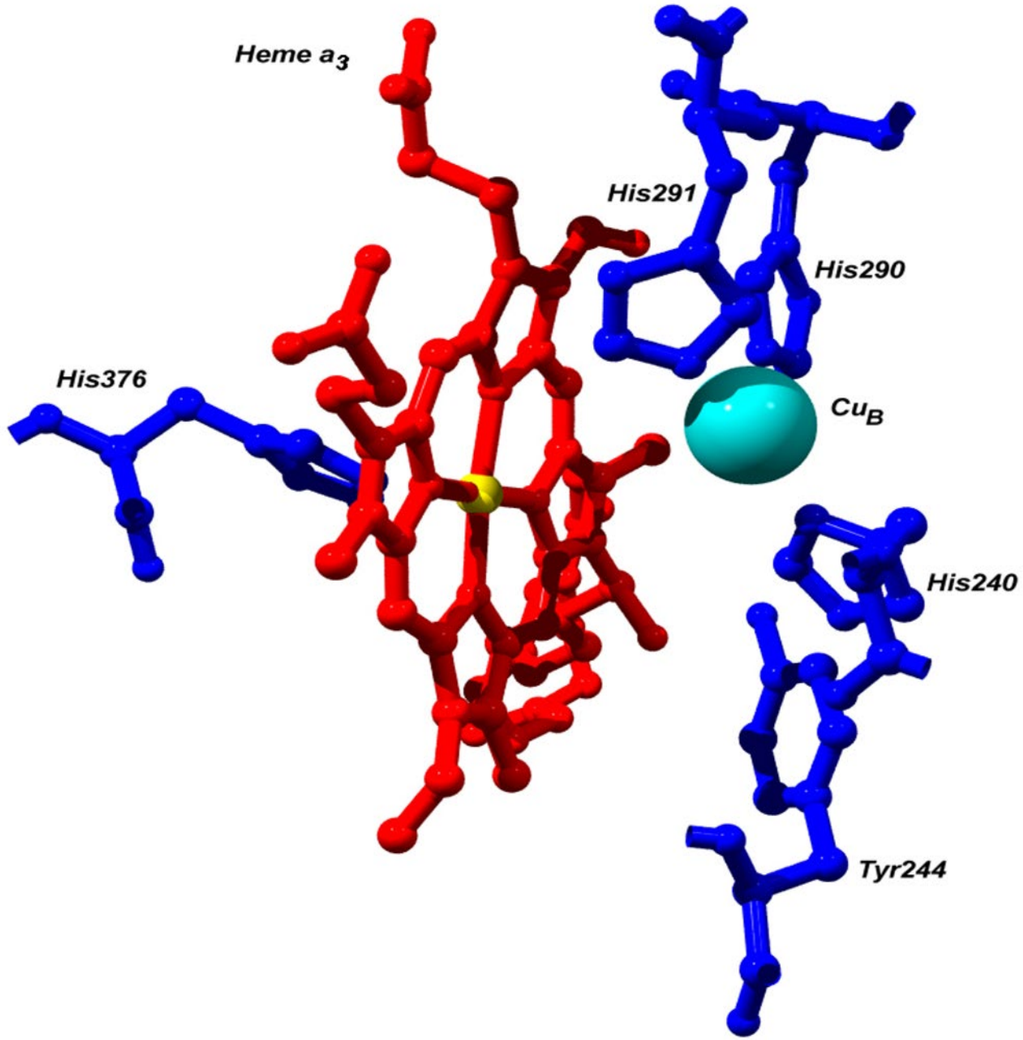
Na ligandové miesto hemu a_3 sa môžu viazať viaceré nízkomolekulové zlúčeniny:

Redukovaný stav: **O_2** (substrát pre CcO), CO, NO, CN^-.

Oxidovaný stav: CN^-, N_3^-, Cl^-, NO.

Molekuly CO, CN^-, N_3^-, NO pôsobia ako inhibítory CcO.

KOMPLEX IV – ŠTRUKTÚRA KATALYTICKÉHO CENTRA CcO



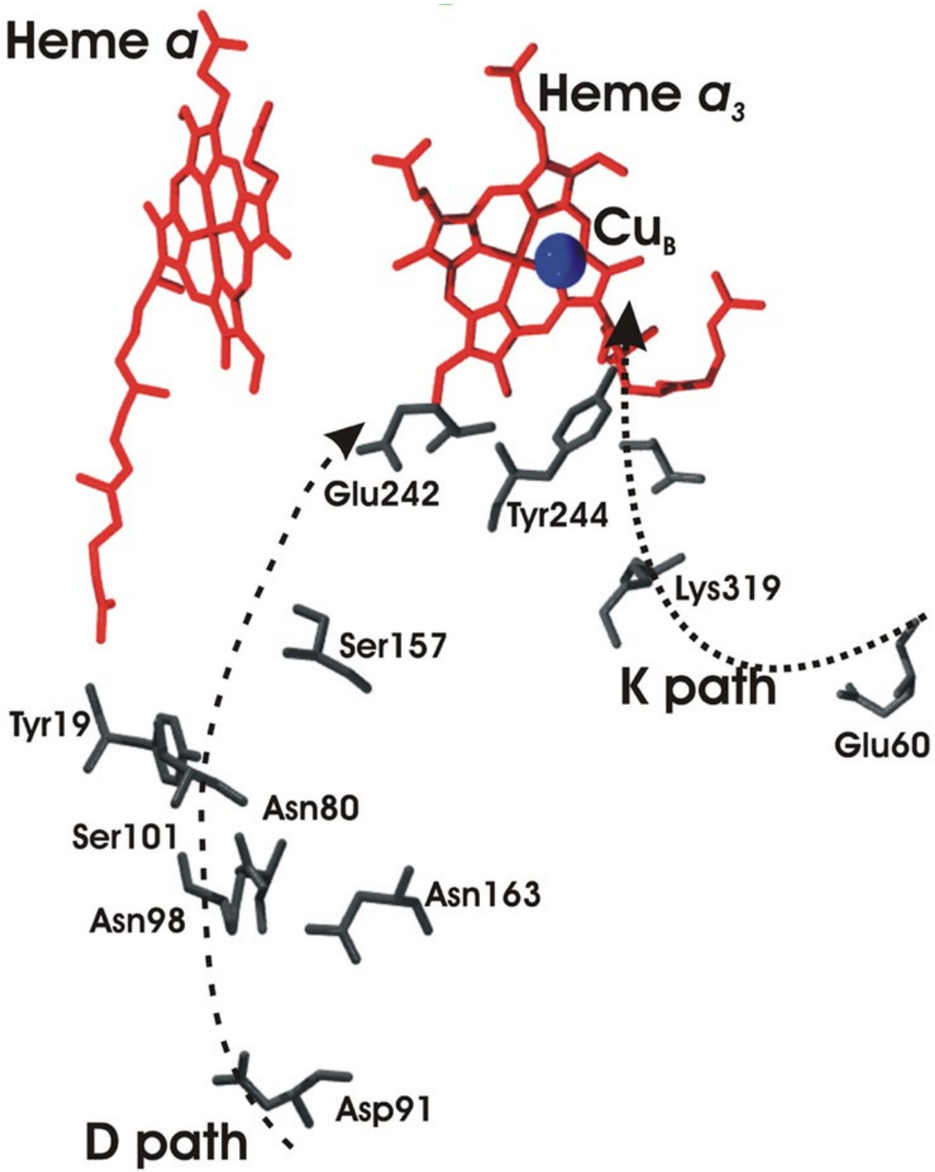
KOMPLEX IV – KANÁLY PRE TRANSPORT PROTÓNOV DO KATALYTICKÉHO CENTRA CcO

V CcO boli identifikované dva kanály (**K** a **D**), prostredníctvom ktorých sa protóny z matrixu mitochondrií dostávajú do katalytického centra.

D-kanál (pomenovanie podľa aminokyselinového zvyšku **D (Asp) 91**, ktorý sa nachádza na povrchu CcO v matrixe mitochondrií) Tento kanál je tvorený viacerými aminikyselinovými zvyškami, začína sa na vyššie spomenutom Asp 91 a obsahuje molekuly Asn 98, 80, Ser 101, 157, Tyr 19 a **Glu 242** (táto aminokyselina tvorí koniec D-kanála a zohráva významnú úlohu pri prenose protónov do katalytického centra a pravdepodobne aj do oblastí, z ktorých sú potom protóny transportované do medzimembránového priestoru). Prostredníctvom D-kanála sa transportuje 6 alebo 7 protónov počas katalytického cyklu, 4 protóny sú pumpované a 2 alebo 3 protóny sa podieľajú na vzniku H_2O.

K-kanál (pomenovanie podĺa aminokyselinového zvyšku K (Lys) 319, ktorý sa nachádza v tomto kanáli. Vstupnou „bránou" pre tento kanál je Glu 60 a koncovým aminokyselinovým zvyškom je Tyr 244, ktorý sa nachádza v tesnej blźikosti katalytického centra. Prostredníctvom K-kanála sa transportuje 1 alebo 2 protóny v redukčnej fáze katalytického cyklu. Ukazuje sa, že rýchlosť transportu protónov cez K-kanál je rýchlosť limitujúcim krokom pre celý katalytický cyklus CcO.

KOMPLEX IV – KANÁLY PRE TRANSPORT PROTÓNOV DO KATALYTICKÉHO CENTRA CcO



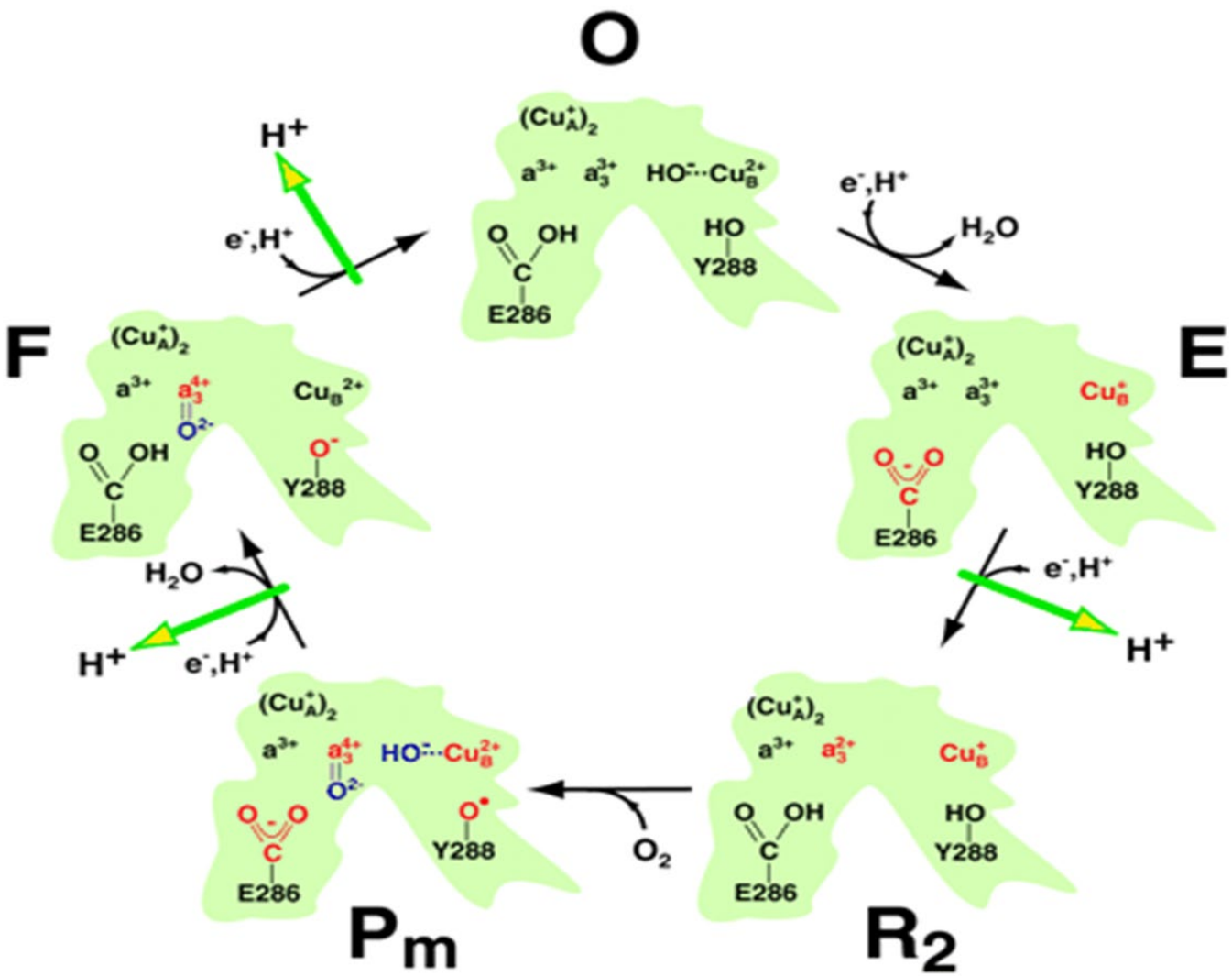
KOMPLEX IV – KATALYTICKÝ MECHANIZMUS CcO

V procese redukcie O_2 na H_2O v CcO sa katalytické miesto tohto enzýmu nachádza vo viacerých intermediátových stavoch:

O stav - plne oxidované katalytické centrum
E stav - jednoelektrónovo redukované katalytické centrum
R stav - plne redukované katalytické miesro
P (peroxy) forma
F (feryl) forma
H~ (metastabilná oxidovaná forma) (?)

Molekula O_2 sa viaže do R stavu, pričom následne prebehne redukcia O_2 štyrmi elektrónami (dva z Fe^{2+} hému a_3, jeden z Cu_B^+ a jeden z Tyr 244), čo spôsobuje zánik väzby medzi atómami kyslíka (vznik **P** formy). Následný prenos elektrónu z hemu a do katalytického centra a s ním spojený prenos protónu z matrixu do katalytického centra vedie k vzniku **F** formy. Obdobný proces (spriahnutý transport elektrónu a protónu) potom prináša transformáciu **F** formy na **O** formu.

KOMPLEX IV – KATALYTICKÝ MECHANIZMUS CcO



KOMPLEX IV – MECHANIZMUS PROTÓN PUMPOVANIA V CcO

Mechanizmus transportu protónov z matrixu mitochondrií do mitochondriálneho medzimembránového priestoru prostredníctvom CcO nie je doteraz jednoznačne určený. Za ostatných 30 rokov, doba od vyslovenia hypotézy o možnosti pumpovania protónov v CcO (M. Wikström, 1977), bolo navrhnutých viacero modelov tohto pumpovania.

V rámci jednotlivých modelov bolo už uvažované o každom z redoxných centier CcO ako mieste spriahnutia elektrónového a protónového transportu. Najpravdepodobnejšie sa zdá a najviac modelov je navrhnutých pre prípad zapojenia katalytického centra (hem a_3 + Cu_B) do tohto procesu.

V súčasnosti sa vedú „spory“, v ktorej časti katalytickéhio cyklu prebieha pumpovanie protónov.

1. P→F (2 protóny), F→O (2 protóny)

2. P→F (1 protón), F→H~ (1 protón), H~ → R (2 protóny)

Existencia metastabilného stavu **H~** však nebola doteraz experimentálne potvrdená.

KOMPLEX IV – MECHANIZMUS PROTÓN PUMPOVANIA V CcO

Okrem existencie špecifických aminokyselinových zvyškov, ktoré vytvárajú dráhy (D a K - kanály) pre transport protónov v CcO, musia v týchto kanáloch existovať reťazce molekúl H_2O, ktoré slúžia ako vodiče pre ióny H^+.

Z 3D štruktúry CcO sa usudzuje, že klaster pozostávajúci z propionátov hemu a_3, dvoch arginínových zvyškov a komplexu molekúl H_2O predstavuje akceptorové miesto pre protóny v tzv. výstupnej ceste (z angl. exit pathway) smerom k povrchu membrány v intermembránovom priestore. Inak povedané, protón z Glu 242 (D-kanál) môže byť prenesený do katalytického centra (vznik H_2O), alebo na tento klaster (pumpovanie).

Existencia špecifickej výstupnej cesty pre pumpované protóny bola podporená nasledujúcimi pozorovaniami:

- spätným tokom protónov z membránového povrchu v intermembránovom priestore,
- zmena membránového potenciálu stimuluje katalytickú aktivitu CcO, v ktorej je mutovaný D-kanál,
- inhibíciou spätného toku protónov mutovaním aminokyselinových zvyškov podieľajúcich sa na „výstavbe“ výstupnej cesty.

KOMPLEX IV – Čo ostáva neobjasnené v protónovom pumpovaní v CcO?

1. Ktoré sú kritické prvky protónového pumpovania spriahnutého s elektrónovým prenosom v CcO ?

2. Existuje presne definovaná výstupná cesta pre transport protónov od katalytického centra k membránovému povrchu v intermembránovom priestore?

3. Čo kontroluje protón pumpovanie? Koľko kontrolných bodov existuje v tomto procese a aká je ich fyzikálno-chemická podstata (termodynamické bariéry, kinetické bariéry, disipácia reťazcov molekúl H_2O)?

4. Existuje variabilita v efektívnosti protónového pumpovania? Akú úlohu zohráva spätný tok protónov?

5. Akú úlohu pri protónovom pumpovaní zohrávajú jednotlivé subjednotky CcO? Je efektivita protónového pumpovania regulovaná fyziologickým stavom bunky?

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať základnú štruktúru a funkciu jednotlivých komplexov v dýchacom reťazci
- Vysvetliť mechanizmus Q - cyklu v cytochróm c reduktáze
- Opísať katalytický mechanizmus v cytochróm c oxidáze

Oxidatívna fosforylácia - ATP-syntáza.

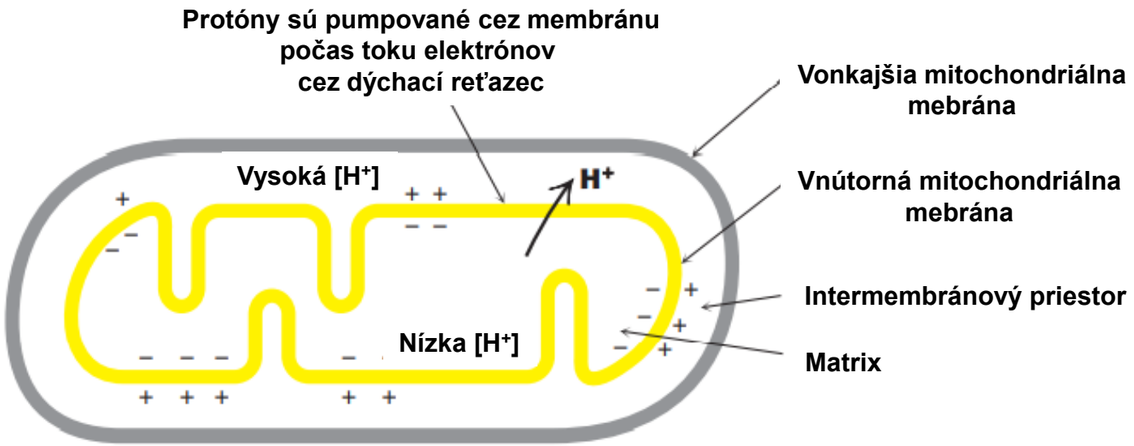
8

Štruktúra a funkcia ATP-syntázy
Mechanizmus syntézy ATP
ATP-syntázy z rôznych organizmov
Mitochondriálne transportéry

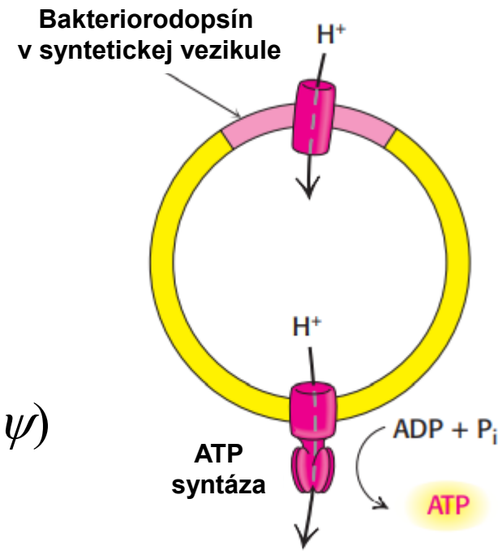
PROTÓNOVÝ GRADIENT POHÁŇA SYNTÉZU ATP

$$NADH + \frac{1}{2} O_2 + H^+ \rightleftharpoons H_2O + NAD^+ \qquad \Delta G^{0'} = -220.1 \text{ kJ/mol}$$

$$ADP + P_i + H^+ \rightleftharpoons ATP + H_2O \qquad \Delta G^{0'} = +30.5 \text{ kJ/mol}$$



Syntézu ATP uskutočňuje molekulový komplex nachádzajúci sa vo vnútornej mitochondriálnej membráne. Tento enzýmový komplex sa pôvodne nazýval **mitochondriálna ATPáza** alebo **F_1F_0 ATPáza**, pretože bol objavený prostredníctvom jeho katalýzy reverznej reakcie, hydrolýzy ATP. **ATP syntáza**, v súčasnosti preferovaný názov, zdôrazňuje jej skutočnú úlohu v mitochondriách. Nazýva sa tiež **komplex V** dýchacieho reťazca.

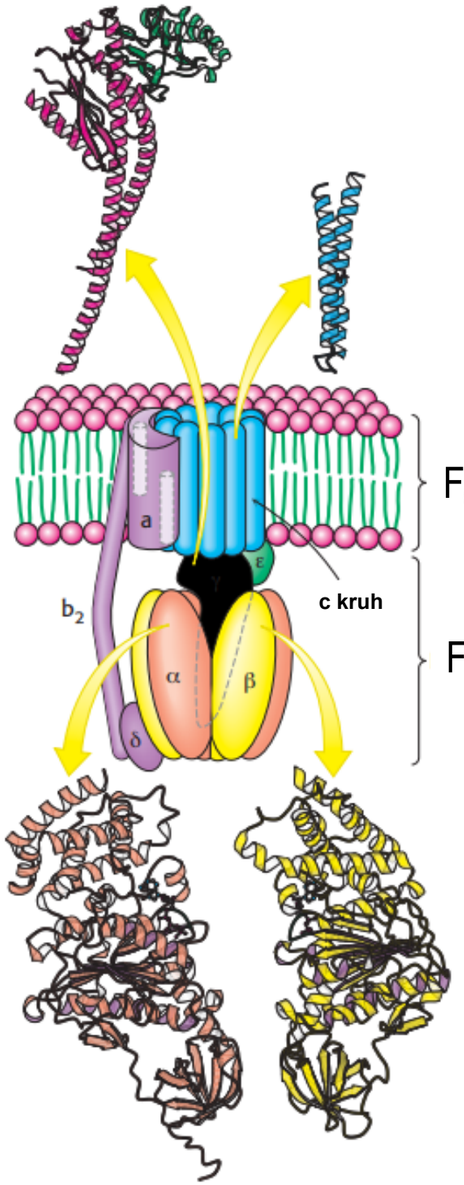


Test chemiosmotickej hypotézy. ATP sa syntetizuje, keď rekonštituované membránové vezikuly obsahujúce bakteriorhodopsín (protónová pumpa poháňaná svetlom) a ATP syntáza sú osvetlené. Orientácia ATP syntázy v tomto rekonštituovanom membránovom systéme je opačná ako v membráne mitochondrie.

Peter Mitchell vyslovil chemicko-osmotická teóriu v roku 1961.
V roku 1978 získal Nobelovu cenu za chémiu.

Protónový gradient (Δp) = Chemický gradient (ΔpH) + Nábojový gradient ($\Delta \psi$)

KOMPLEX V - ŠTRUKTÚRA



F_0: 8-14 c subjednotiek

F1: $\alpha_3+\beta_3+\gamma+\delta+\varepsilon$

ATP syntáza tvorí ATP z ADP a ortofosfátu:

$$ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \rightleftharpoons ATP^{4-} + H_2O$$

F_1F_o ATP - áza je membránový proteín, ktorý využíva membránový protónový gradient na syntézu ATP z ADP a anorganického fosfátu

Výskyt : vnútorná mitochondriálna membrána v eukaryotických bunkách
tylakoidná membrána v chloroplastoch
plazmatická membrána v baktériách

Tento enzým môžeme rozdeliť na **pohyblivú a stacionárnu časť**: (1) pohyblivá jednotka alebo rotor sa skladá z c podjednotiek a stonky $\gamma\varepsilon$ a (2) stacionárna jednotka alebo stator sa skladá zo zvyšku molekuly.

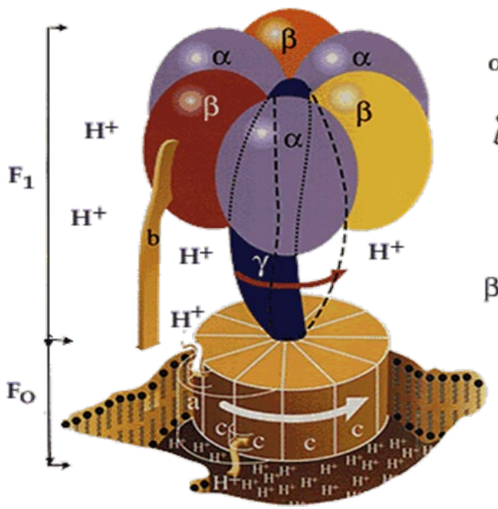
Miesta v ATP syntáze viažúce nukleotidy nie sú ekvivaletné. Podjednotka γ prechádza stredom hexaméru $\alpha_3\beta_3$ a v dôsledku rozdielnej interakcie s nimi odlišuje podjednotky β od seba.

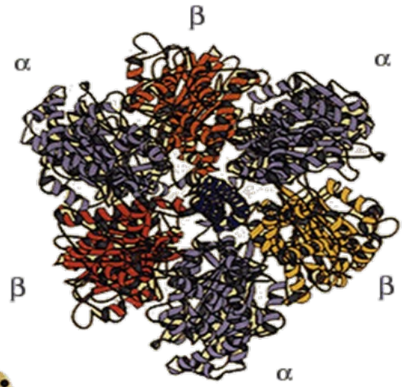
KOMPLEX V - FUNKCIA

F_o a F_1 – domény a ich funkcia

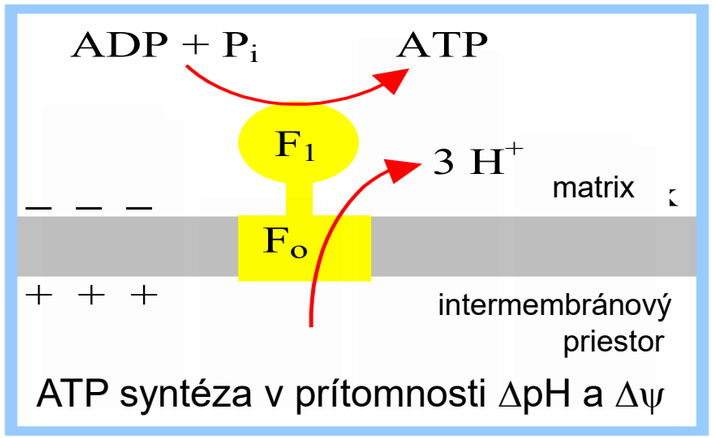
- hydrofóbna F_o doména sa nachádza vo vnútri membrány a umožňuje transport protónov cez membránu
  (dolný index o, pochádza z názvu oligomycín - inhibítor tejto domény)

- hydrofilná F_1 doména katalyzuje syntézu/hydrolýzu ATP

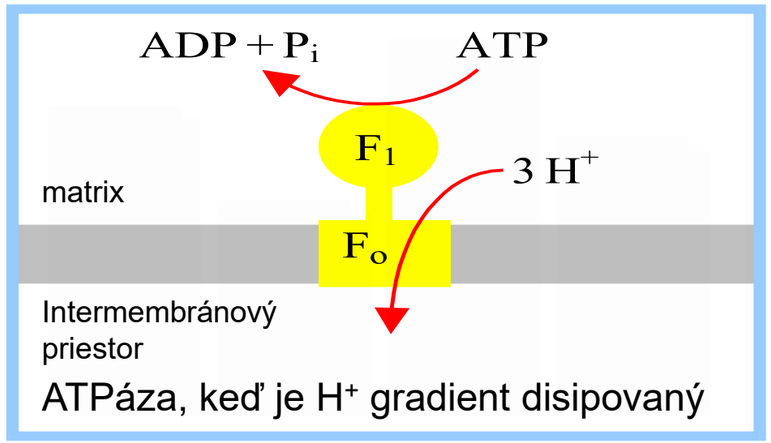




F_1 pohľad zospodu



ATP syntéza v prítomnosti ΔpH a $\Delta\psi$



ATPáza, keď je H^+ gradient disipovaný

Ak na membráne neexistuje ΔpH alebo $\Delta\psi$, tak je preferovaná spätná reakcia - **hydrolýza ATP.**

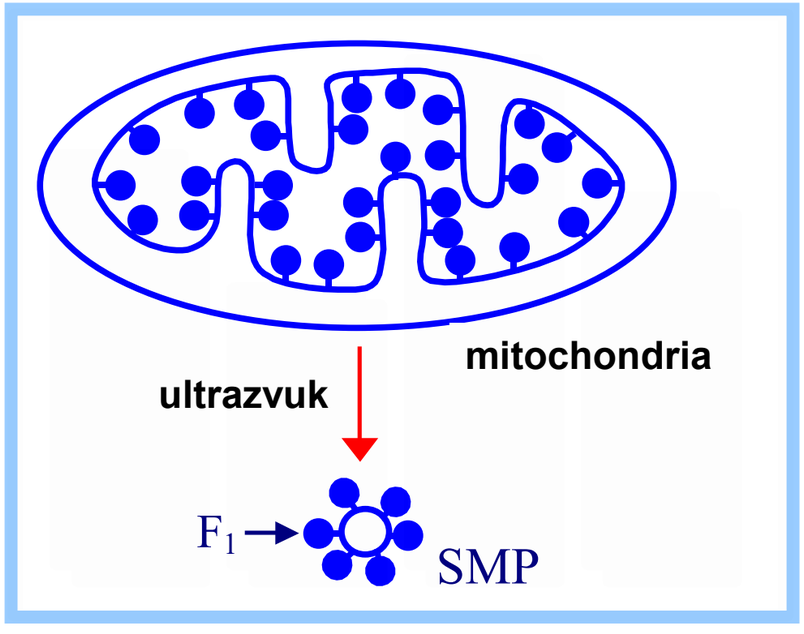
V niektorých baktériách zohráva reverzná reakcia fyziologickú úlohu, na plazmatickej membráne sa vytvára na ATP závislý protónový gradient, ktorý sa využíva pre energiu spotrebujúce procesy.

KOMPLEX V – FUNKCIE DOMÉN F_0 A F_1

Funkcia oboch domén bola určená pri štúdiu vlastností submitochondriálnych častíc (submitochondrial particles - SMP).

Pod vplyvom ultrazvuku sa vnútorná mitochondriálna membrána rozruší a následne sa tvoria štruktúry (SMP), v ktorých je F_1 orientovaná do vonkajšieho prostredia.

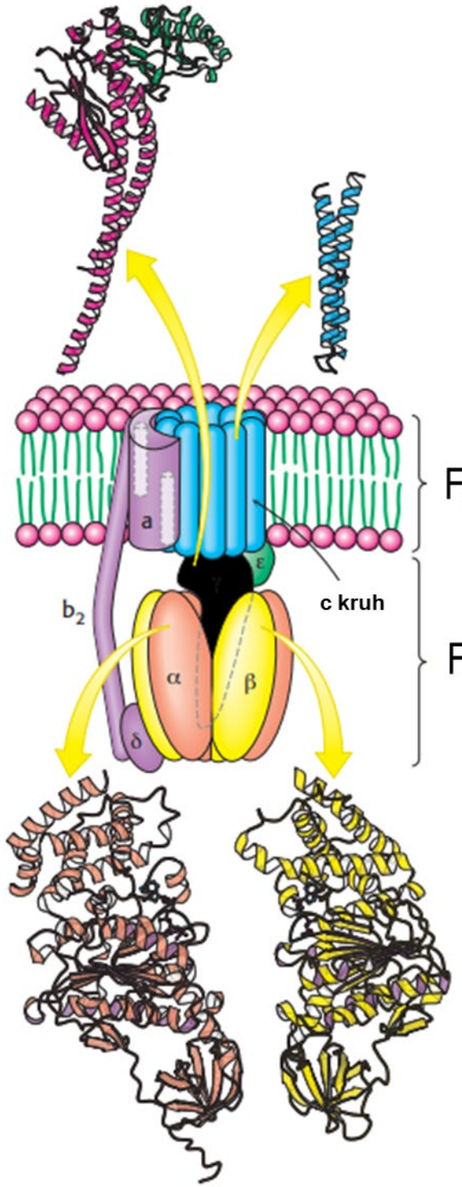
- Ak je **F_1** extrahovaná z SMP, spontánne katalyzuje hydrolýzu ATP
  F_1 - obsahuje katalytickú doménu
- Po odstránení **F_1** sú SMP obsahujúce **F_o** priepustné pre H^+, pretože **F_o** vo svojej štruktúre obsahuje H^+ kanál



Oligomycín a **DCCD** blokujú transport H^+ v membránach, v ktorých sa nenachádza F_1.

Oligomycín a DCCD inhibujú ATP syntázu prostredníctvom interakcie s F_o.

KOMPLEX V – ZLOŽENIE DOMÉNY F_1

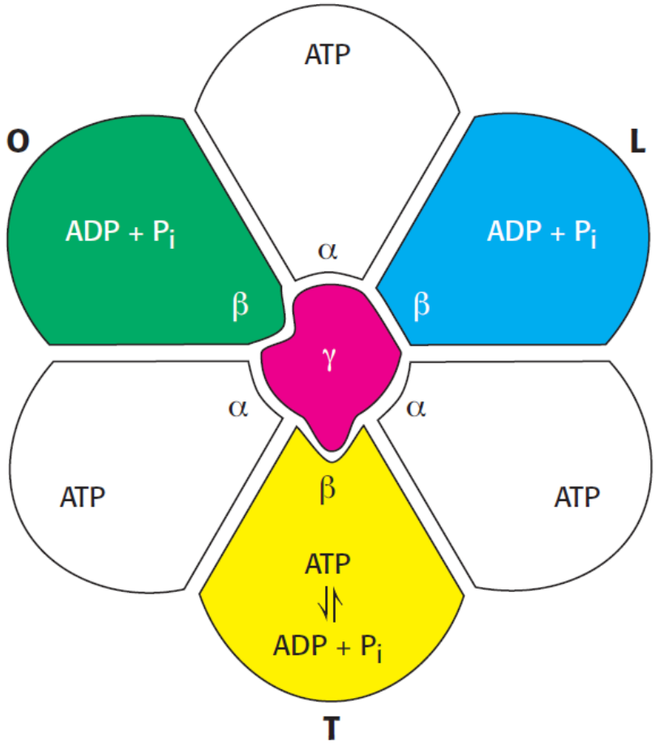


F_0: 8-14 c subjednotiek

F1: $\alpha_3+\beta_3+\gamma+\delta+\varepsilon$

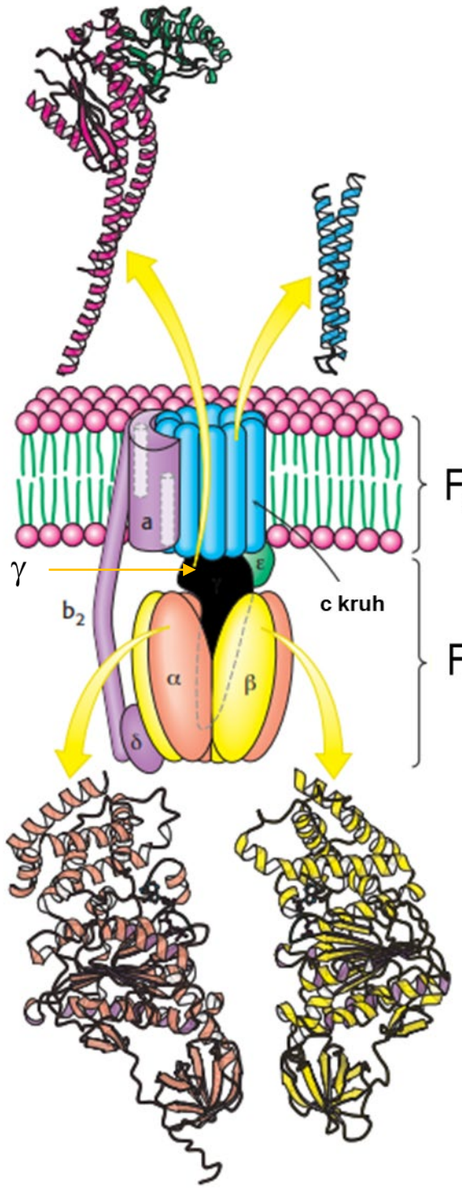
Zloženie podjednotiek v ATP – syntáze z *Escherichia coli*

Podjednotky v F_1 doméne sú označené písmenami gréckej abecedy a stochiometria týchto podjednotiek je α_3, β_3, γ, δ, ε.



Miesta viažuce nukleotidy na ATP syntáze nie sú ekvivalentné. Podjednotka γ prechádza stred cez hexameru $\alpha_3\beta_3$ a spôsobuje to, že miesta viažúce nukleotidy v podjednotkách β sa od seba líšia. Každá α–podjednotka obsahuje naviazané ATP, ale tieto nukleotidy sa nezúčastňujú žiadnych reakcií.

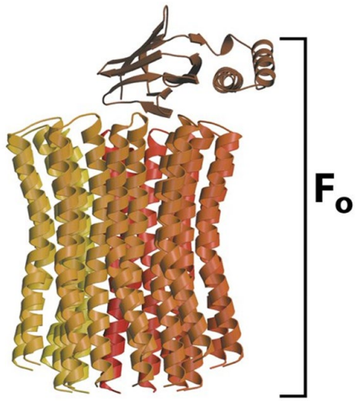
KOMPLEX V – ŠTRUKTÚRA DOMÉN F_0 A F_1



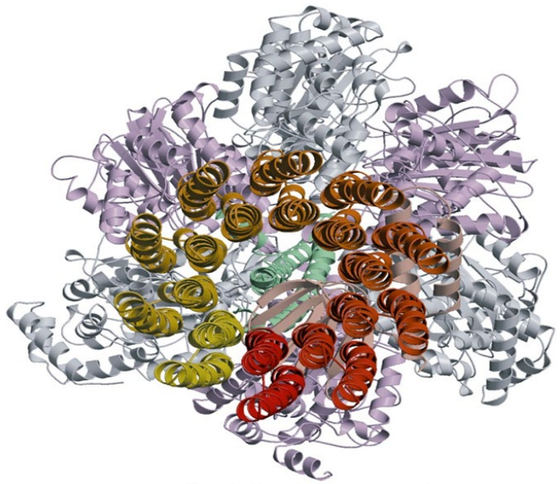
F_0: 8-14 c subjednotiek

F1: $\alpha_3+\beta_3+\gamma+\delta+\varepsilon$

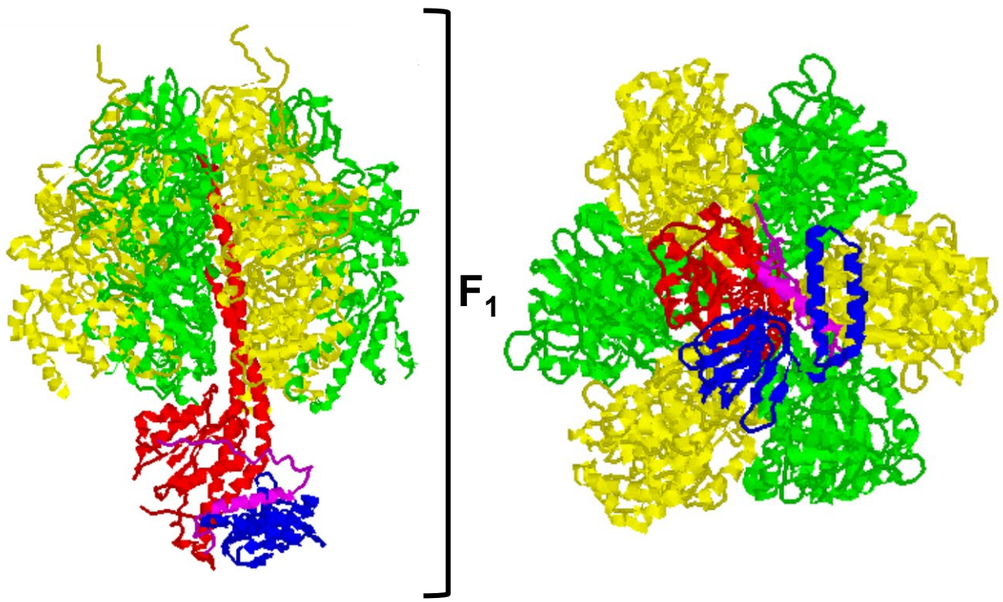
Subjednotky v F_o doméne sú označené písmenami latinskej abecedy a stochiometria týchto podjednotiek v *E. coli* je **a, b_2, c_{10}**.



Pohľad zboku



Pohľad zospodu

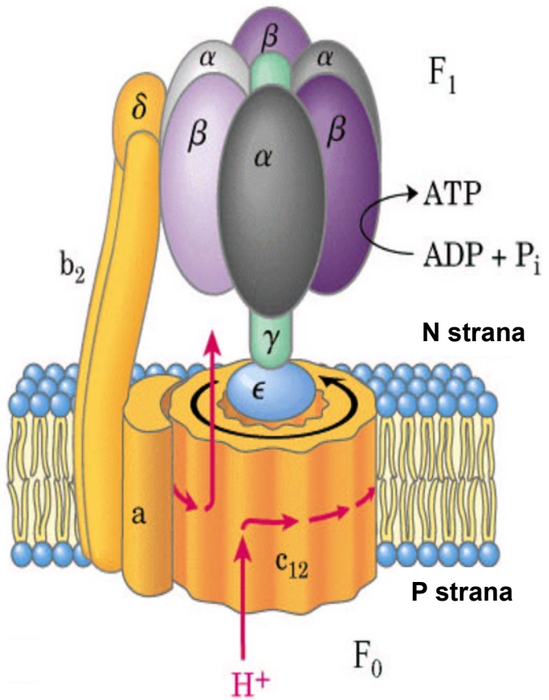


Odlišnosti v označovaní podjednotiek ATP-ázy z rôznych organizmov

- δ podjednotka z bovinnej ATP-ázy je homológna s ε subjednotkou v *E. coli*
- ε subjednotka v bovinnej ATP-áze je jedinečná
- podjednotka nazvaná **OSCP** (oligomycin sensitivity conferral protein (proteín citlivý na oligomycín)) je homológna s δ subjednotkou z *E. coli*
- bovinná ATP-áza navyše obsahuje podjednotky **d** a **F_6**

KOMPLEX V – MECHANIZMUS SYNTÉZY ATP

Transport protónov v smere koncentračného gradientu cez F_o doménu vyvoláva rotáciu F_o vzhľadom k F_1 doméne. Táto rotácia vedie k rotácii podjednotky γ vzhľadom k podjednotkám α a β. To vedie k syntéze ATP. Na syntézu jednej molekuly ATP je potrebný transport 3-4 protónov cez ATP-syntázu.



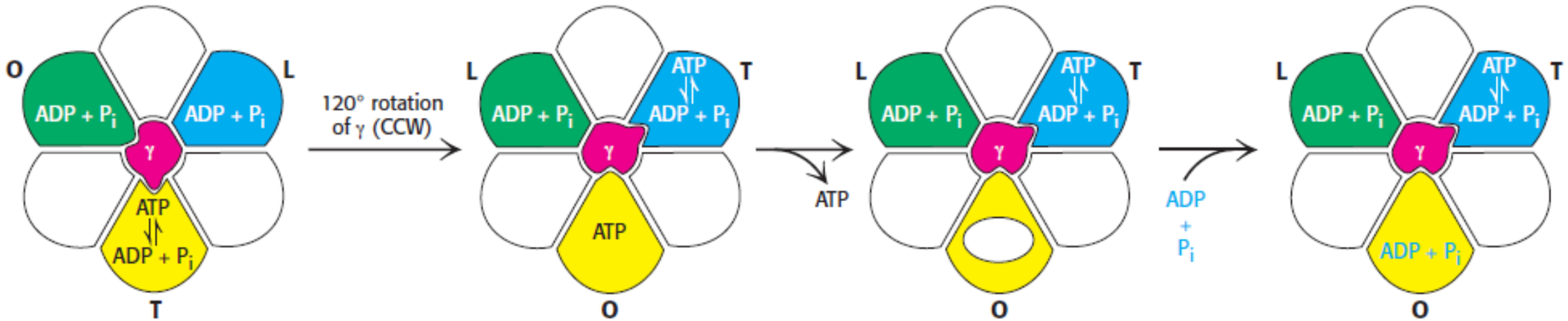
Mechanizmus zmeny väzobnej aktivity pre ATP, ADP a fosfátovú skupinu v štruktúre ATP-ázy bol navrhnutý Paulom Boyerom (za návrh tohto mechanizmu mu bola udelená Nobelová cena). Tento mechanizmus predpokladá existenciu troch katalytických miest v F_1 doméne.

- Je navrhnuté, že nepravidelný „hriadeľ“ spojený s F_o rotuje vzhľadom ku kruhovému útvaru pozostávajúcemu z 3 b podjednotiek.
- Táto rotácia je poháňaná tokom H^+ cez F_o doménu.

KOMPLEX V – MECHANIZMUS SYNTÉZY ATP

Konformácia jednotlivej β podjednotky sa postupne mení pri jej interakcii s rotujúcim „hriadeľom“:

- **voľná** (loose - L) konformácia, v ktorej katalytické miesto - voľne viaže ADP + P_i ,
- **pevná** (tight - T) konformácia, v ktorej sú substráty pevne viazané v katalytickom mieste a vytvára sa ATP,
- **otvorená** (open - O) konformácia, ktorá umožňuje disociáciu ATP z väzobného miesta.



Mechanizmus zmeny väzby pre ATP syntázu. Rotácia podjednotky γ interkonvertuje tri β podjednotky. Podjednotka v T (pevnej) forme interkonvertuje ADP a P_i a ATP, ale neumožňuje uvoľnenie ATP. Keď sa podjednotka γ otočí o 120 stupňov v smere proti smeru hodinových ručičiek (CCW), podjednotka tvaru T sa prevedie do formy O, čo umožní uvoľnenie ATP. ADP a P_i sa potom môžu viazať na podjednotku O-formu. Dodatočná rotácia o 120 stupňov (nie je zobrazená) zachytí tieto substráty v podjednotke tvaru L.

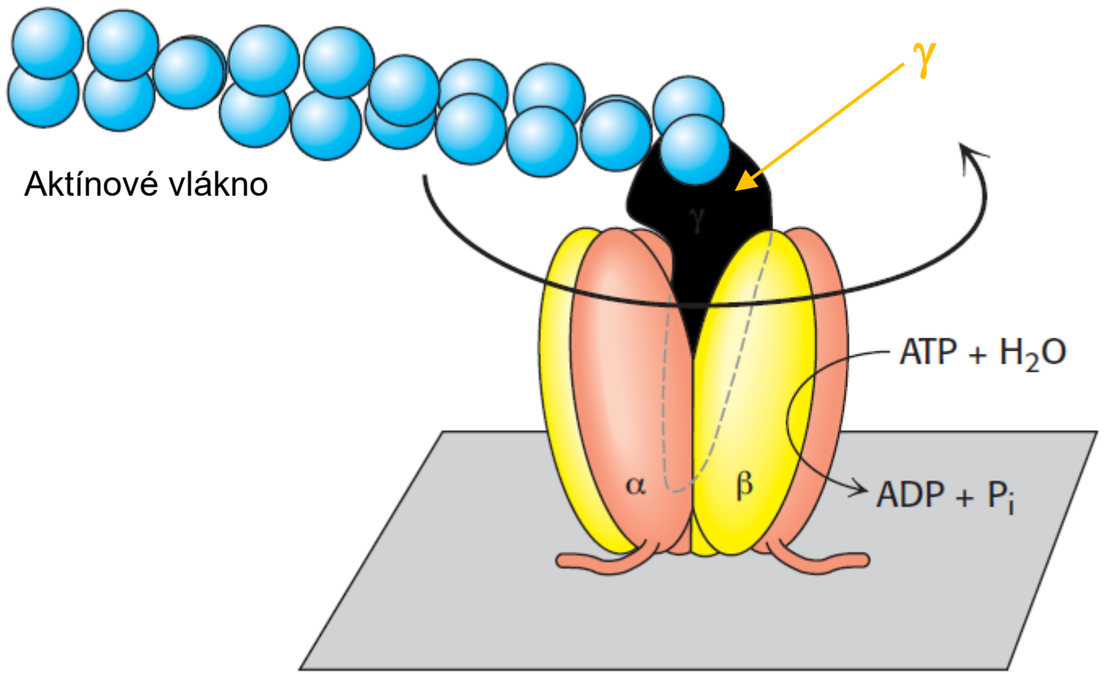
Postupná alternácia foriem troch aktívnych miest v ATP syntáze

Subjednotka 1	L → T → O → L → T → O……
Subjednotka 2	O → L → T → O → L → T……
Subjednotka 3	T → O → L → T → O → L……

Z experimentov vyplýva, že F_1 syntetizuje ATP aj bez prítomnosti protónového gradientu. Protónový gradient nie je dôležitý pre syntézu, ale pre uvoľnenie vytvorenej ATP.

KOMPLEX V – MECHANIZMUS SYNTÉZY ATP

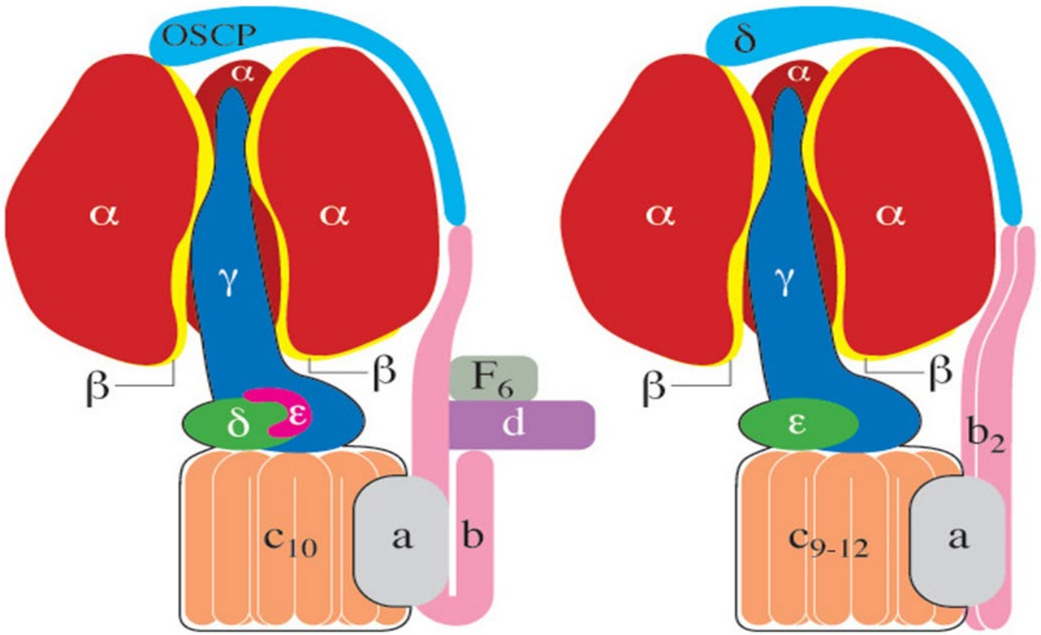
Štúdie vykonané viacerými technikami ukazujú, že rotácia γ–podjednotky prebieha prostredníctvom diskrétnych otočení o **120°**.



Hexamér $\alpha_3\beta_3$ ATP syntázy je pripevnený k povrchu a podjednotka γ vyčnievajúca nahor je spojená s fluorescenčne značeným aktínovým vláknom. Pridanie a následná hydrolýza ATP spôsobuje rotáciu podjednotky γ proti smeru hodinových ručičiek, ktorú je možné priamo vidieť pod fluorescenčným mikroskopom.

Niektoré pozorovania však naznačujú, že každé 120° otočenie pozostáva z čiastkových pootočení o **80-90°** a **30-40°**.

KOMPLEX V – MODELY ATP SYNTÁZ Z RÔZNYCH ORGANIZMOV



Mitochondriálna F_1F_0

F_1F_0 z *E. coli*

Inhibičný peptid v **mitochondriách** znemožňuje hydrolýzu ATP prostredníctvom F_1F_o , ak neexistuje protónový gradient, napr. pri anoxii.

„**Rotor**": pozostávajúci z 10 c podjednotiek a centrálny „hriadeľ"

- **γ** a **ε** v*E. coli*
- **γ**, **δ**, & **ε** v *mitochondriách*

E. coli **ε** (mitochondriálna **δ**) pomáha pripojiť **γ** k rotujúcemu kruhu **c** podjednotiek

„**Stator**" pozostáva z troch **α** a troch **β** podjednotiek F_1 domény a podjednotky **a** domény F_o, ako aj periférneho „hriadeľa", ktorý spája tieto dve oblasti.

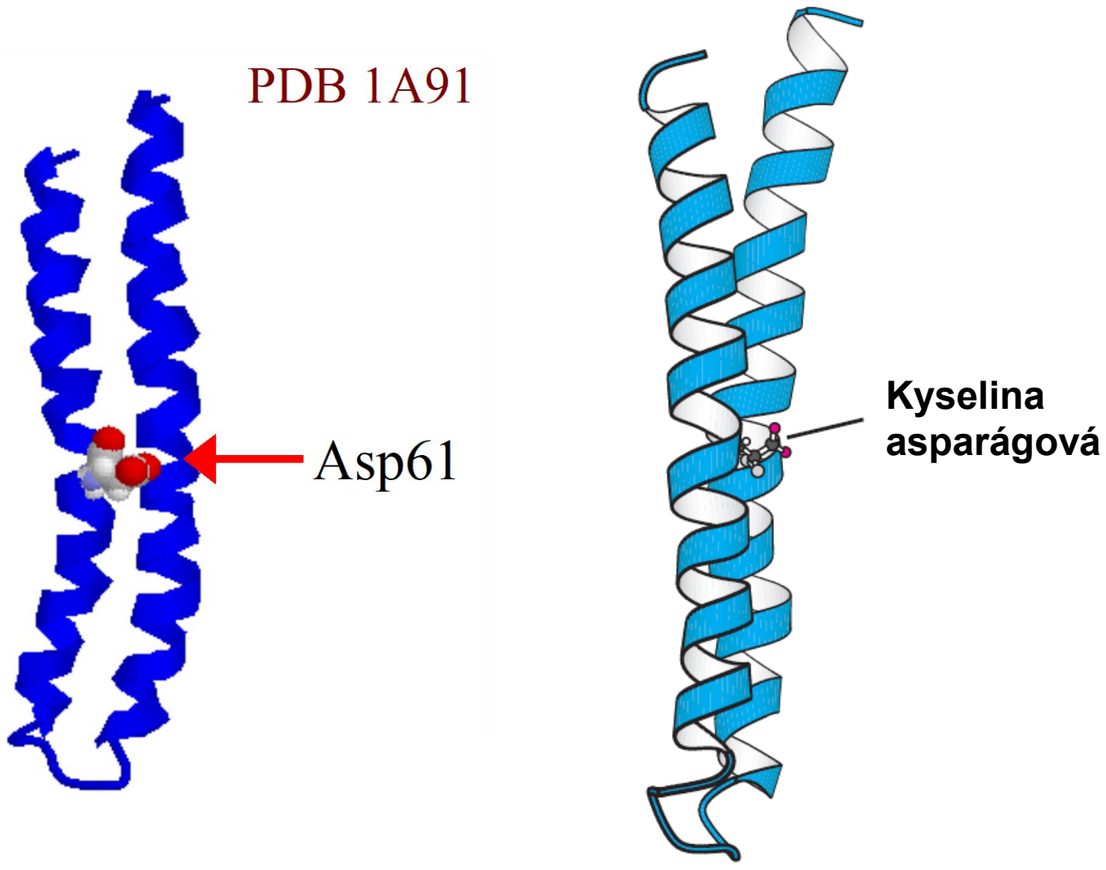
Periférny rotor pozostáva z **b** a **δ** podjednotiek v *E. coli* alebo z podjednotiek **b**, **d**, **F_6** a **OSCP** v ATP-syntáze z bovinných mitochondrií.

KOMPLEX V - ŠTRUKTÚRA PODJEDNOTKY C V F_0 DOMÉNE

Podjednotka c domény F_o má vlásenkovú štruktúru pozostávajúcu z 2 transmembránových α-helixov a krátkej spojovacej slučky.

Jeden z α-helixov obsahuje Asp alebo Glu zvyšok, ktorého karboxylová skupina reaguje s DCCD (Asp61 in *E. coli*).

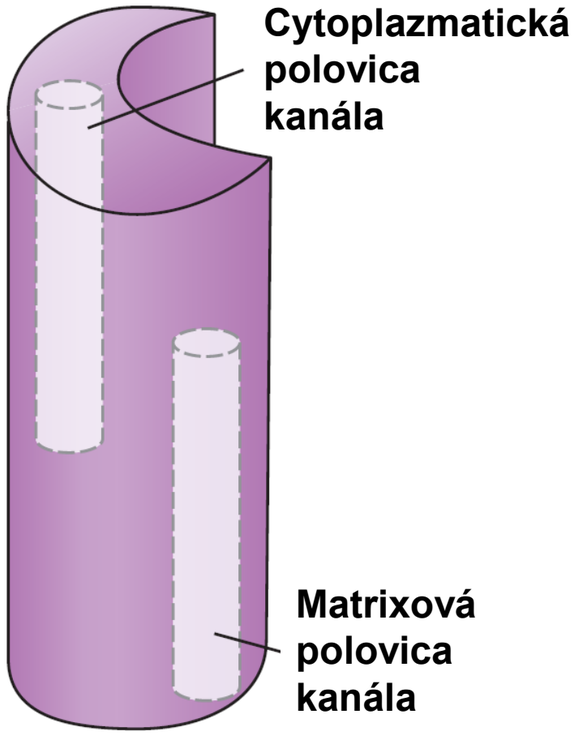
Táto, na DCCD citlivá karboxylová skupina, sa nachádza v strede membránovej dvojvrstvy a je podstatnou pre transport H^+ cez membránu.



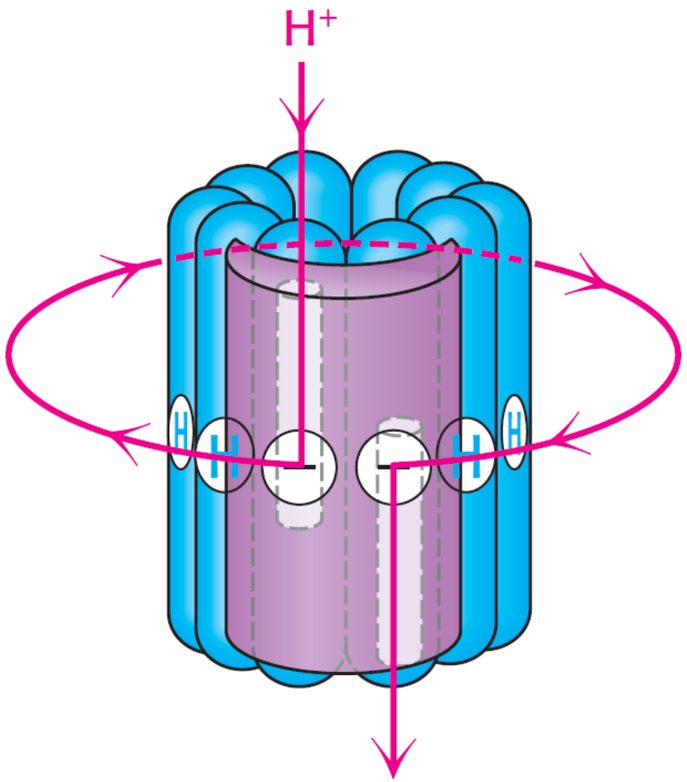
ŠTRUKTÚRA PODJEDNOTKY A V F_0 DOMÉNE

Podjednotka a obsahuje niekoľko (8-14) transmembránových α-helixov.

V tejto podjednotke sa nachádzajú dva kanály („half-channels/). alebo protónové dráhy (z angl. proton wires), ktoré pozostávajú z protónovateľných skupín a molekúl vody. Tieto kanály umožňujú prechod protónov z jednej strany membrány na druhú.

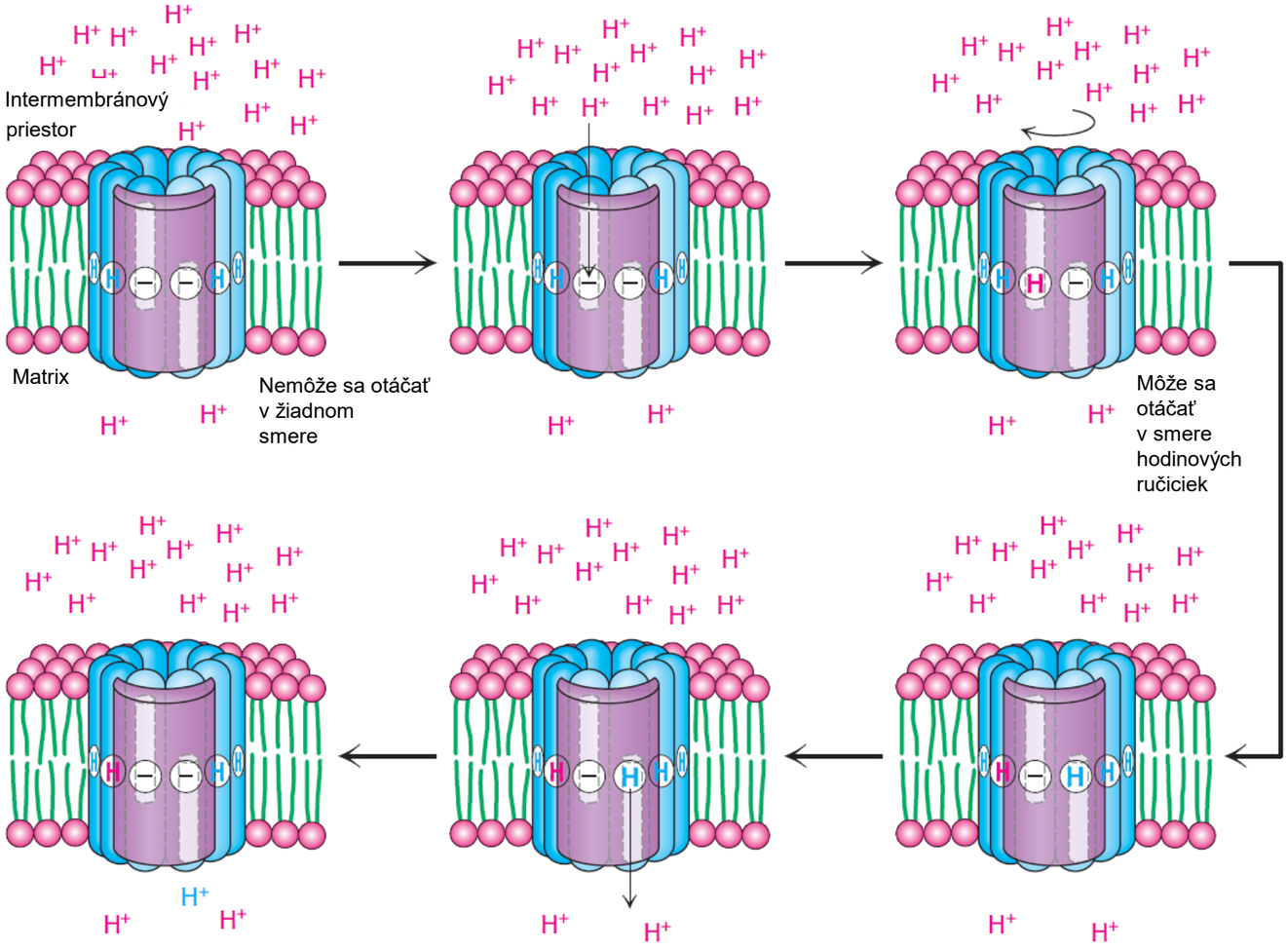


Štruktúra podjednotky a nebola ešte presne určená, ale zdá sa, že pobsahuje dva polovičné kanály, ktoré umožňujú protónom vstupovať a prechádzať subjednotku, ale nie úplne cez membránu.



Protónová cesta cez membránu. Každý protón vstupuje do cytoplazmatického polovičného kanála, nasleduje kompletná rotácia kruhu z c podjednotiek a protóny vystupuju cez ďalší polovičný kanál do matrixu.

KOMPLEX V – ROTÁCIA C KRUHU

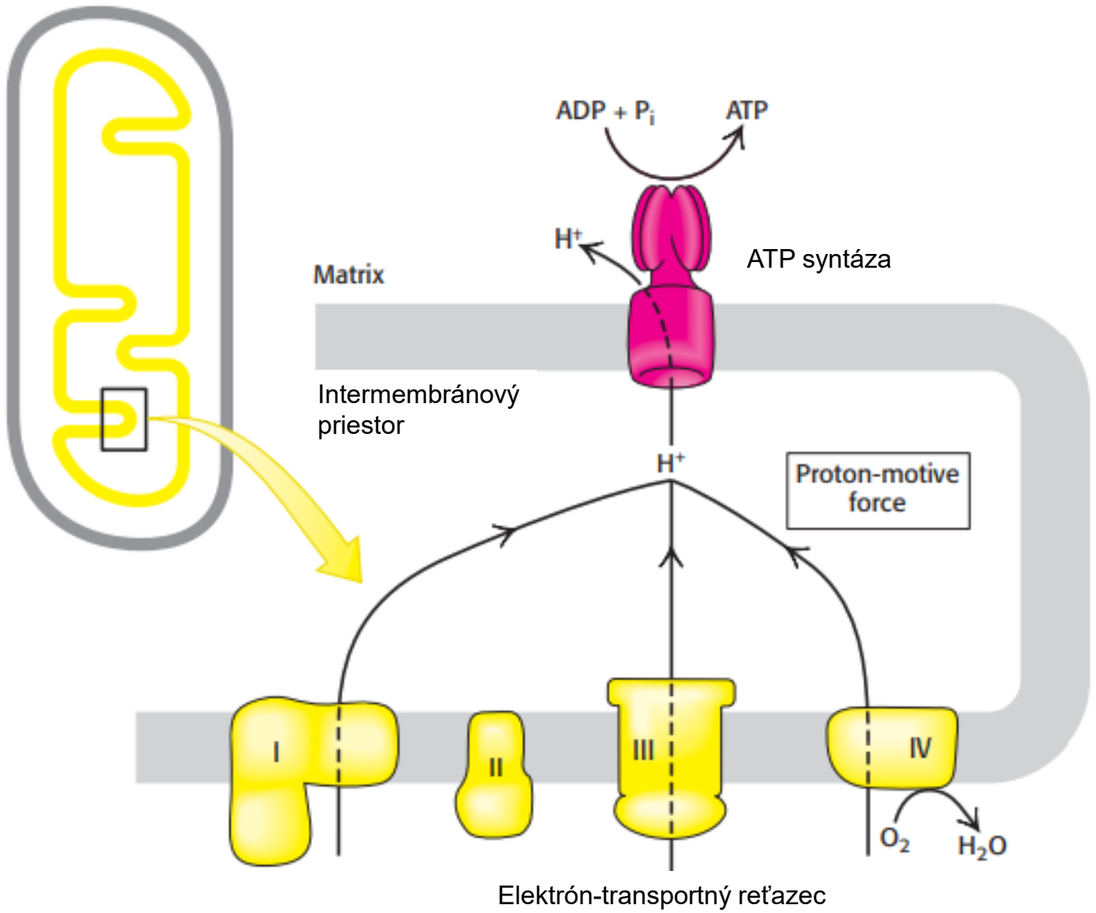


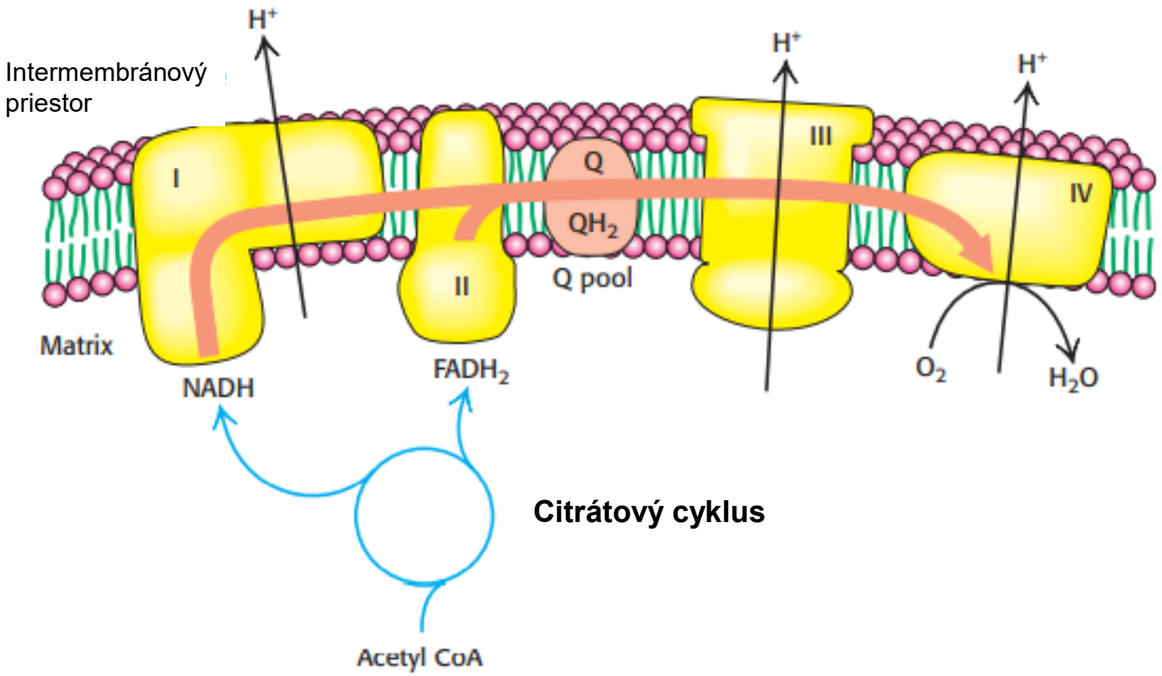
Pohyb protónov cez membránu riadi rotáciu c kruhu. Protón vstupuje z medzimembránového priestoru do cytoplazmatického polkanála, aby neutralizoval náboj aspartátového zvyšku v podjednotke c. Po neutralizácii tohto náboja sa kruhu c môže otáčať v smere hodinových ručičiek o jedna c podjednotka, pohybujúca zvyšok kyseliny asparágovej z membrány do matrixového polkanála.Tento protón sa môže pohybovať do matrixu a resetovať systém do pôvodného stavu.

Každá 360-stupňová rotácia podjednotky γ vedie k syntéze a uvoľneniu 3 molekúl ATP. Takže ak je v kruhu 10 podjednotiek (ako bolo pozorované v kryštalickej štruktúre kvasinkovej mitochondriálnej ATP syntázy), každý generovaný ATP vyžaduje transport 10/3 = 3,33 protónov. Pre zjednodušenie budeme predpokladať, že pre každú vytvorenú ATP musia do matrixu prúdiť tri protóny. Je potrebné si uvedomiť, že skutočná hodnota sa môže líšiť. Ako uvidíme, elektróny z NADH pumpujú dostatok protónov na generovanie 2,5 molekúl ATP, zatiaľ čo tie z $FADH_2$ poskytujú 1,5 molekuly ATP.

Ak odpočívajúci človek vyžaduje pre telesné funkcie 85 kg ATP denne, potom musí cez ATP syntázu pretiecť denne $3{,}3 \times 10^{25}$ protónov, alebo $3{,}3 \times 10^{21}$ protónov za sekundu.

GRAFICKÉ ZHRNUTIE – ZDROJE PROTÓNOV PRE ATP SYNTÁZU



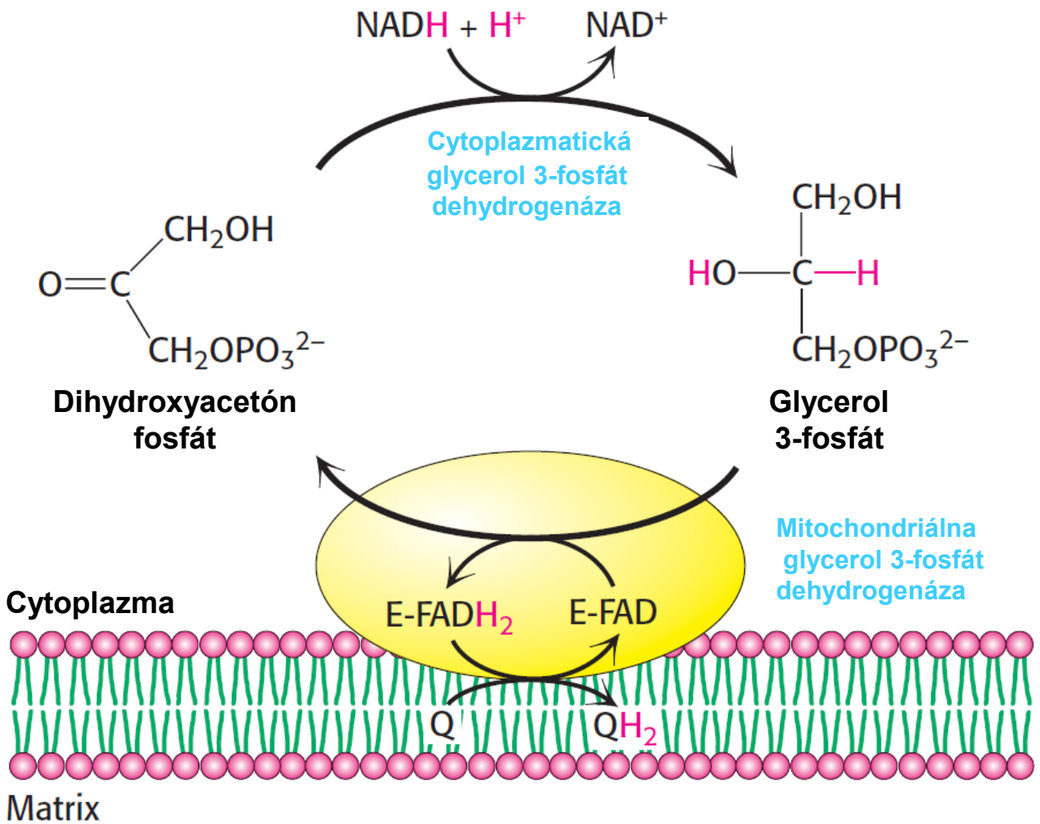


Elektrón-transportný reťazec.

„Vysoko-energetické! elektróny vo forme NADH a $FADH_2$ sú generované cyklom kyseliny citrónovej. Tieto elektróny pretekajú dýchacím reťazcom, ktorý poháňa pumpovanie protónov cez vnútornú mitochondriálnu membránu. V konečnom dôsledku to vedie k redukcii O_2 a vzniku ATP.

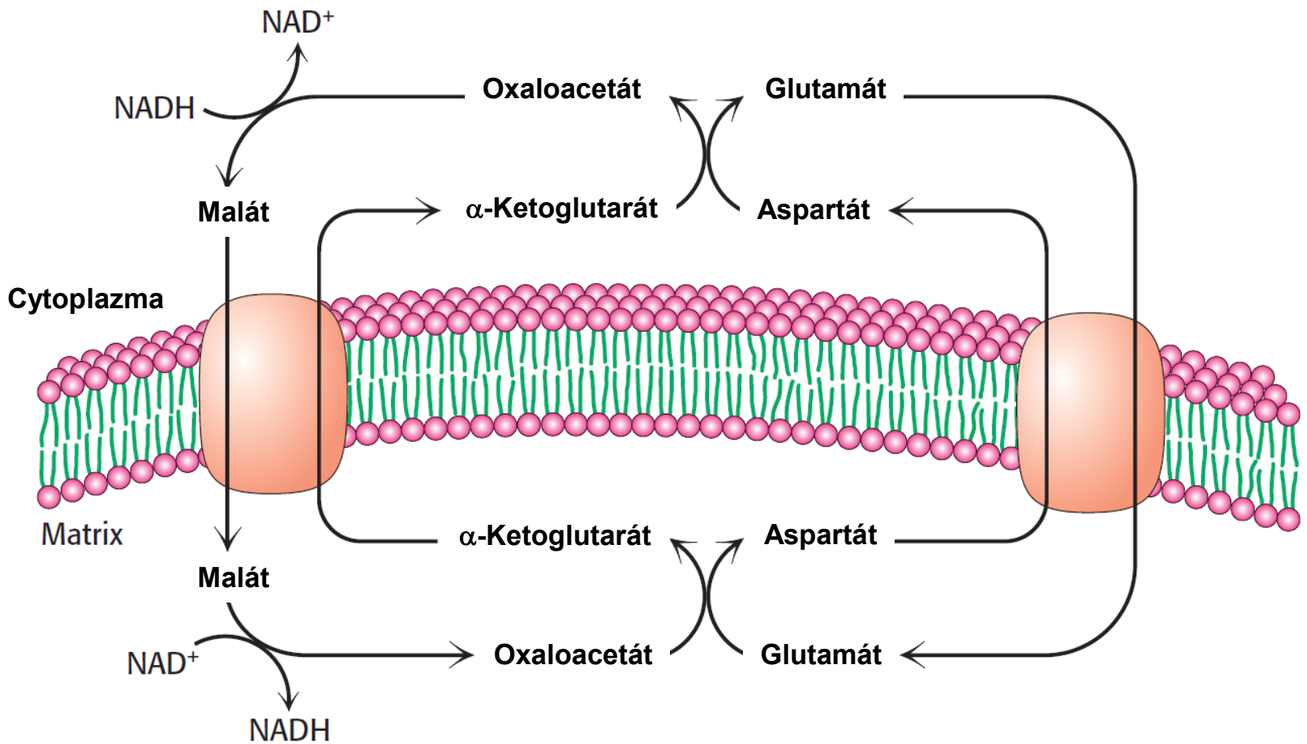
ELEKTRÓNY Z CYTOPLAZMATICKEJ NADH VSTUPUJÚ DO MITOCHONDRIÍ „KYVADLOVÝM PRENOSOM“

- vo svaloch **Glycerol 3-fosfátový prenos**



Elektróny z NADH môžu vstúpiť do mitochondriálneho transportného elektrónového reťazca tým, že sa používajú na redukciu dihydroxyacetónfosfátu na glycerol 3-fosfát. Glycerol 3-fosfát sa reoxiduje prenosom elektrónov na prostetickú skupinu FAD v glycerol 3-fosfát dehydrogenáze viazanej na membránu. Následný prenos elektrónov do Q za vzniku QH_2 umožňuje týmto elektrónom vstúpiť do elektrónového transportného reťazca.

- v srdci a v pečeni **Malát-aspartátový prenos**



Glycerol 3-fosfátový prenos

$NADH + H^+ + E\text{–}FAD$

Cytoplazmatický — Mitochondriálny

↓

$NAD^+ + E\text{–}FADH_2$

Cytoplazmatický — Mitochondriálny

Malát-aspartátový prenos

$NADH + NAD^+$

Cytoplazmatický — Mitochondriálny

⇅

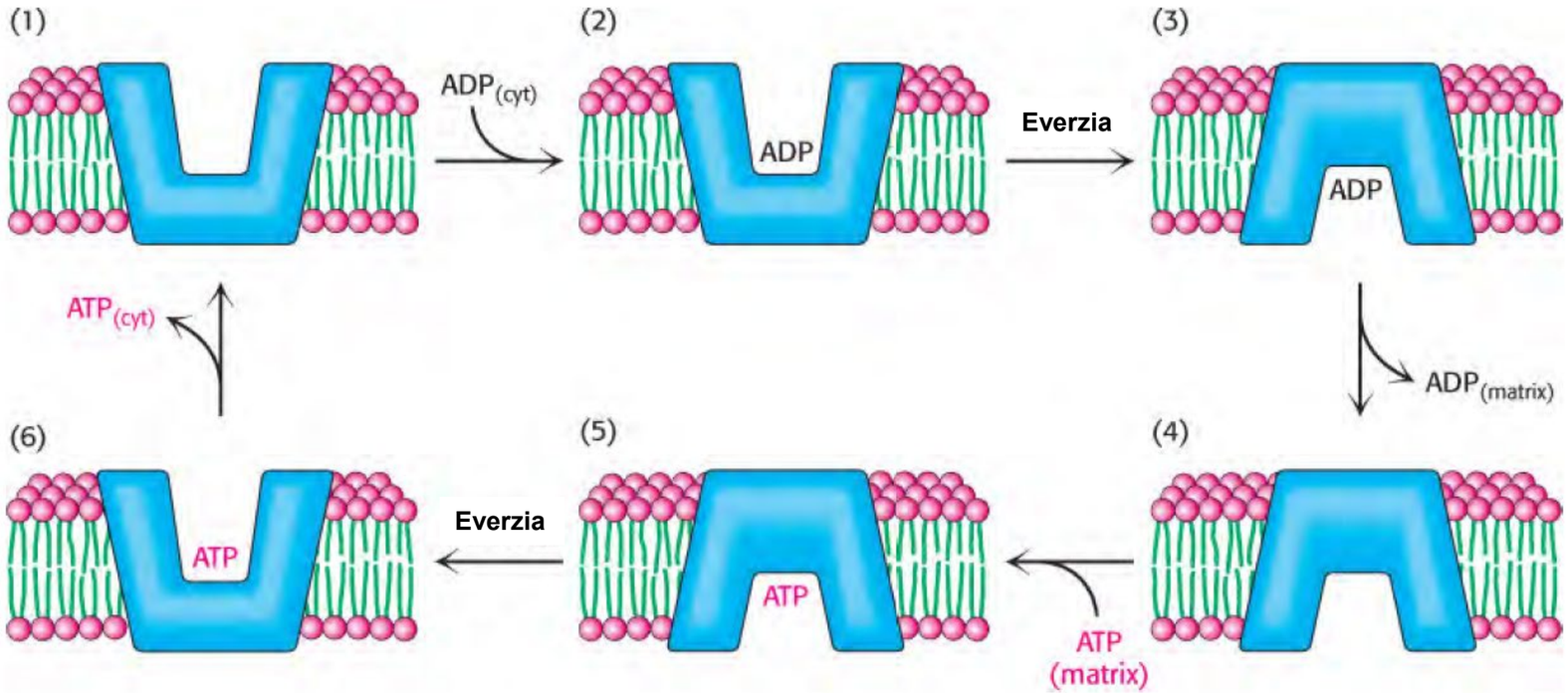
$NAD^+ + NADH$

Cytoplazmatický — Mitochondriálny

ATP-ADP TRANSLOKÁZA

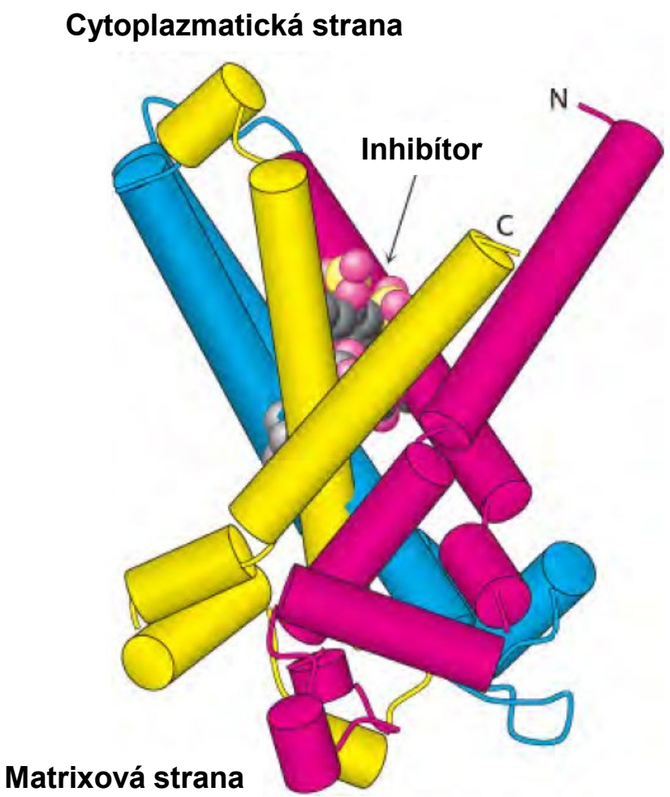
ATP-ADP translokáza tvorí ~15% proteínov vnútornej mitochondriálnej membrány. Špecifický transportný proteín, ATP-ADP translokáza, umožňuje týmto molekulám prekonať bariéru tvorenú membránou. Najdôležitejšie je, že toky ATP a ADP sú spojené. ADP vstupuje do mitochondriálneho matrixu iba v prípade, že ATP z neho vyjde, a naopak. Tento proces sa uskutočňuje cez translokázu, **antiporter**:

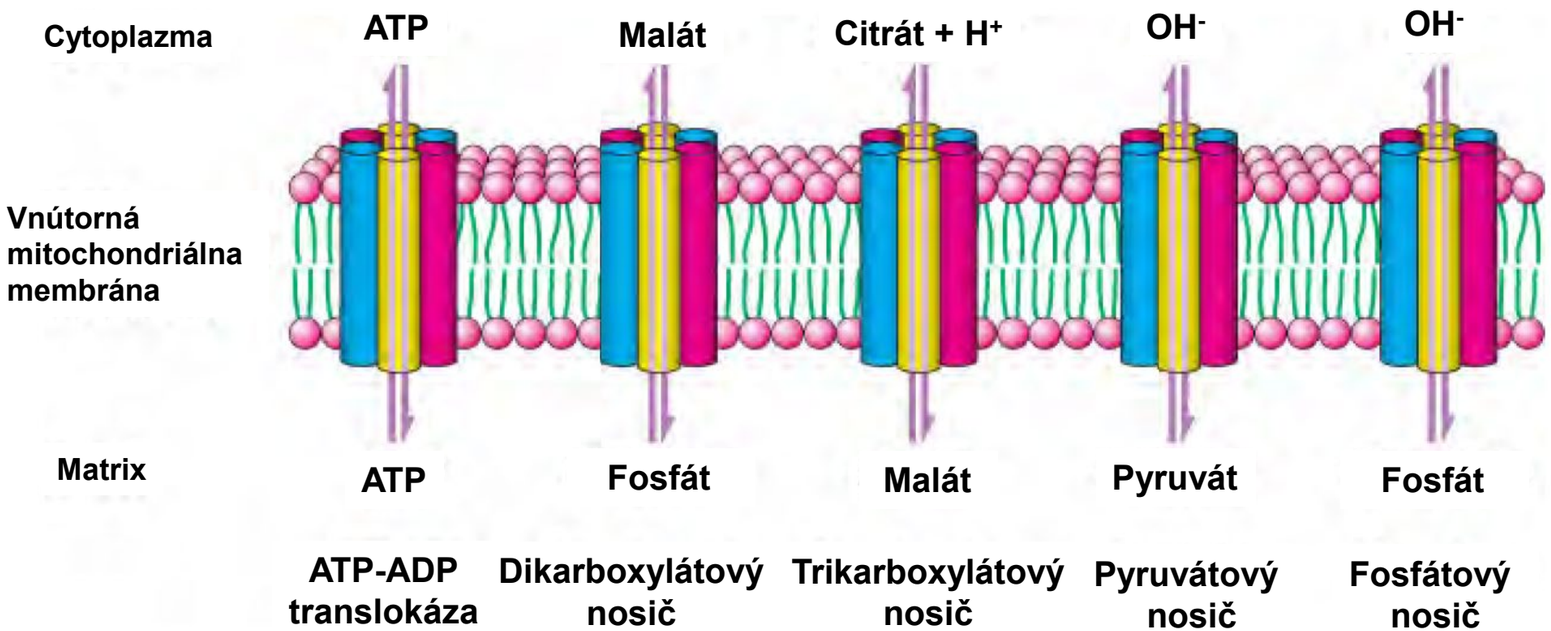
$$ADP^{3-}_{cytoplazma} + ATP^{4-}_{matrix} \rightarrow ADP^{3-}_{matrix} + ATP^{4-}_{cytoplazma}$$



Mechanizmus mitochondriálnej translokázy ATP-ADP. Translokáza katalyzuje spojený vstup ADP do matrixu a výstup ATP z neho. Väzba ADP (1) z cytoplazmy uprednostňuje evolúciu transportéra (2) na uvoľnenie ADP do matrixu (3). Následná väzba ATP z matrixu na evertedovú formu (4) podporuje everziu späť do pôvodnej konformácie (5) a uvoľňuje ATP do cytoplazmy (6).

MITOCHONDRIÁLNE TRANSPORTÉRY





Štruktúra mitochondriálnych transportérov. Je zobrazená štruktúra translokázy ATP-ADP. Táto štruktúra obsahuje tri podobné jednotky (zobrazené červenou, modrou a žltou farbou), ktoré sa spoja a vytvoria väzobné miesto, tu obsadené inhibítorom tohto transportéra. Ostatní členovia rodiny mitochondriálnych transportérov maju podobné tripartitné štruktúry.

Translokáza ATP-ADP je iba jedným z mnohých mitochondriálnych transportérov pre ióny a nabité metabolity. Fosfátový nosič, ktorý pracuje v zhode s translokázou ATP-ADP, sprostredkúva elektroneutrálnu výmenu $H_2PO_4^-$ za OH^-. Spoločná aktivita týchto dvoch transportérov vedie k výmene cytoplazmatického ADP a P_i za ATP z matrixu za cenu vstupu jedného H^+ (z dôvodu prepravy jednej molekuly OH^- z matrixu). Tieto dva transportéry, ktoré poskytujú ATP syntáze substráty, sú spojené so syntázou a tvoria veľký komplex nazývaný **ATP syntazóm**.

Vo vnútornej mitochondriálnej membráne sú prítomné aj ďalšie homológne nosiče. Viac ako 40 takýchto nosičov je kódovaných v ľudskom genóme.

ATP VÝŤAŽOK Z KOMPLETNEJ OXIDÁCIE GLUKÓZY

Reakcie	Produkcia ATP na 1 molekulu Glukózy
Glykolýza: Premena Glukózy na Pyruvát (v cytoplazme)	
Fosforylácia Glukózy	-1
Fosforylácia Fruktózy 6-fosfát	-1
Defosforylácia 2 molekúl 1,3-BPG	+2
Defosforylácia 2 molekúl Fosfoenolpyruvátu	+2
2 molekuy NADH sú vytvorené pri oxidácii 2 molekúl Glyceraldehyd 3-fosfátu	
Premena Pyruvátu na Acetyl-CoA (vnútri mitochondrií)	
2 molekuly NADH sú vytvorené	
Citrátový cyklus (vnútri mitochondrií)	
2 molekuly ATP sú vytvorené z 2 molekúl Sukcinyl-CoA	+2
6 molekúl NADH je vytvorených pri oxidácii 2 molekúl Izocitrátu, α-Ketoglutarátu a Malátu	
2 molekuly $FADH_2$ sú vytvorené pri oxidácii 2 molekúl Sukcinátu	
Oxidatívna fosforylácia (vnútri mitochondrií)	
2 molekuly NADH vytvorené v Glykolýze; každá vedie k tvorbe 1.5 molekuly ATP (predpokladajúc transport NADH Glycerol 3-fosfátovým transportom)	+3
2 molekuly NADH produkovaných oxidatívnou dekarboxyláciou pyruvátu; každá vedie k tvorbe 2.5 molekuly ATP	+3
2 molekuly $FADH_2$ produkovaných v Citrátovom cykle; každá vedie k tvorbe 1.5 molekuly ATP	+3
6 molekúl NADH vytvorených v Citrátovom cykle; každá vedie k tvorbe 2.5 molekuly ATP	+15
Počet molekúl ATP vytvorených z 1 molekuly Glukózy	**+30**

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

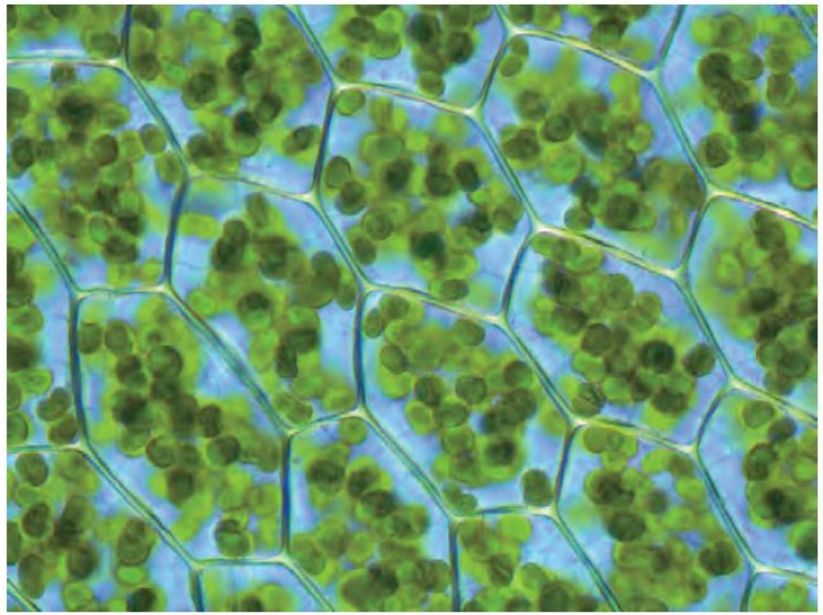
- Popísať základnú štruktúru a funkciu komplexu V v dýchacom reťazci
- Objasniť mechanizmus syntézy ATP v ATP syntáze
- Vysvetliť prepojenie medzi komplexami I - IV a komplexom V v dýchacom reťazci

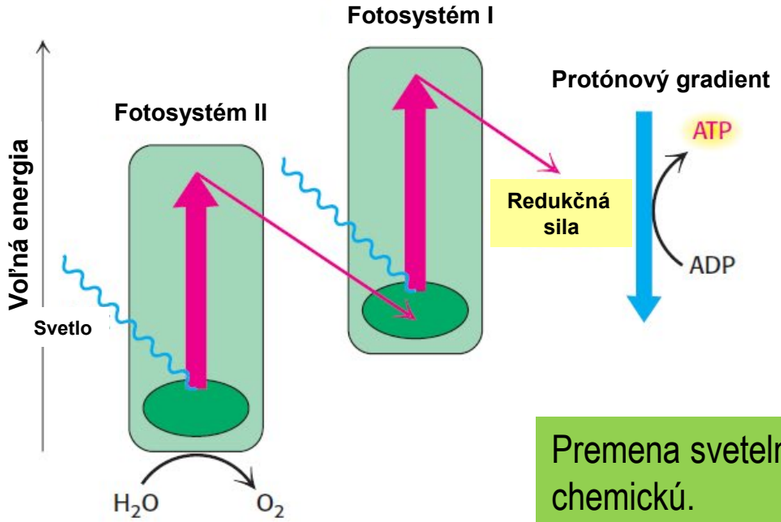
Fotosyntéza- svetlá fáza

9

Štruktúra a funkcia ATP-syntázy
Mechanizmus syntézy ATP
ATP-syntázy z rôznych organizmov
Mitochondriálne transportéry

FOTOSYNTÉZA





Chloroplasty (vľavo) premieňajú svetelnú energiu na chemickú. „Vysoko-energetické“ elektróny v chloroplastoch sú transportované cez dva fotosystémy (vpravo). V tomto procese, ktorý vrcholí generovaním redukčných látok, je ATP syntetizované spôsobom analogickým s mitochondriálnou syntézou ATP. V kontraste s mitochondriálnym transportom elektrónov, elektróny v chloroplastoch sú energizované svetlom.

Premena svetelnej energie (elektromagnetického žiarenia) na chemickú.

Zelené rastliny	cca 40%
Algae a baktérie	cca 60%

Tento process sa volá fotosyntéza a dá sa vyjadriť nasledujúcou rovnicou:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Svetlo}} (CH_2O) + O_2$$

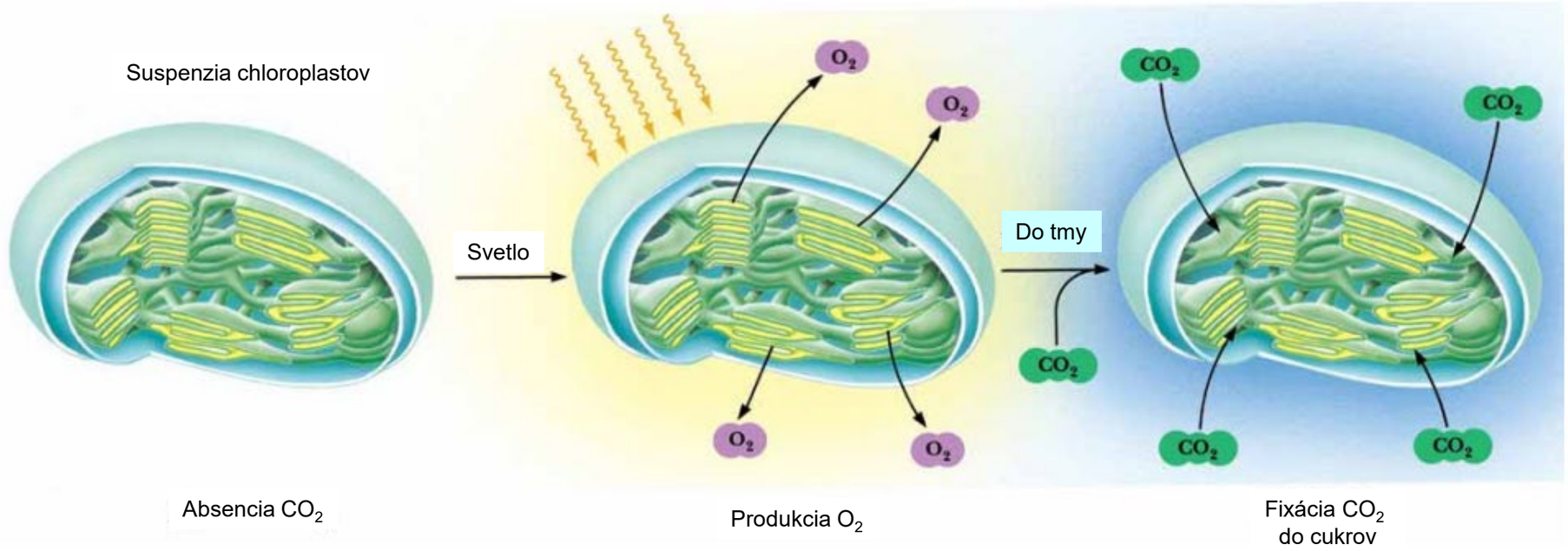
Fotosyntetické organizmy sa nazývajú **autotrofy** (doslova „samokŕmiče“), pretože môžu syntetizovať chemické zdroje energie, ako je glukóza, z oxidu uhličitého a vody pomocou slnečného žiarenia ako zdroja energie, a potom získať časť tejto energie zo syntetizovanej glukózy cez glykolytickú dráhu a aeróbny metabolizmus. Organizmy, ktoré získavajú energiu iba z chemického látok sa nazývajú **heterotrofy** a závisia od autotrofov, ktoré im poskytujú živiny a energiu.

FOTOSYNTÉZA POZOSTÁVA Z DVOCH ČASTÍ

Fotosyntéza pozostáva z dvoch častí:

(i) na svetle závislých reakcií – tvorba redukčnej „sily“ a ATP;

(ii) Calvinovho cyklu alebo na svetle nezávislých reakcií.

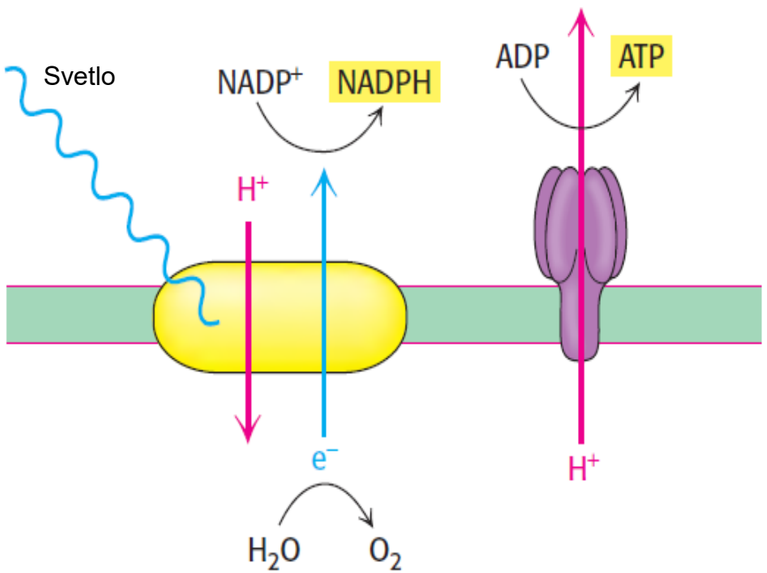


FOTOSYNTÉZA – ZÁKLADNÝ MECHANIZMUS

Svetelné reakcie fotosyntézy sa veľmi podobajú na procesy v oxidatívnej fosforylácii.
Bunkové dýchanie je oxidácia glukózy na CO_2 spojené s redukciou O_2 na vodu za tvorby ATP. Pri fotosyntéze tento proces je obrátený – dochádza k redukcii CO_2 a oxidácii H_2O a syntéze glukózy:

$$\text{Energia} + 6\,H_2O + 6\,CO_2 \xrightarrow{\text{Fotosyntéza}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \xrightarrow[\text{dýchanie}]{\text{Bunkové}} 6\,CO_2 + 6\,H_2O + \text{energia}$$



Kľúčom k obom procesom je generovanie „vysoko-energetických“ elektrónov. Cyklus kyseliny citrónovej oxiduje uhlíkové zlúčeniny na CO_2, aby sa vytvorili „vysoko-energetické“ elektróny. Tok týchto „vysoko-energetických“ elektrónov v dýchacom reťazci generuje elektrochemický protónový gradient. Tento gradient sa potom využíva ATP syntázou na tvorbu ATP. Pri syntéze glukózy z CO_2 sa „vysoko-energetické“ elektróny využívajú na dva účely:
(1) poskytujú energiu na tvorbu NADPH potrebného na redukciu CO_2 a
(2) na generovanie ATP.
Ako môžu byť „vysoko-energetické“ elektróny vyrobené bez použitia chemického paliva? Fotosyntéza využíva energiu zo svetla na tvorbu elektrónov s vysokou energiou.

FOTOSYNTÉZA - FOTOSYSTÉMY

Fotosyntéza v zelených rastlinách je sprostredkovaná **dvoma druhmi svetelných systémov:**

Fotosystém I a **Fotosystém II**

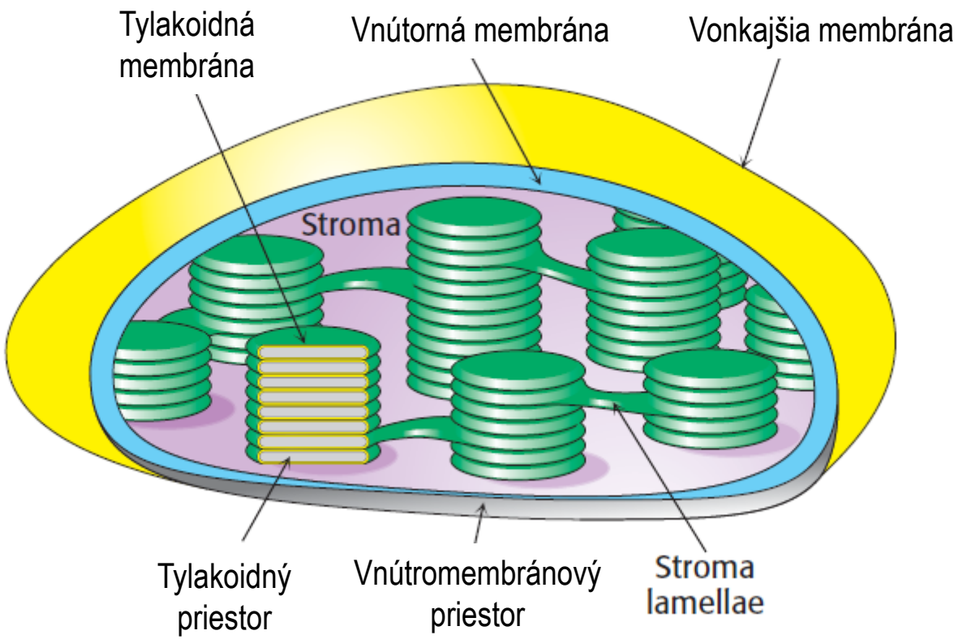
Fotosystém I generuje a uchováva energiu vo forme NADPH, pričom v dôsledku tohto procesu dochádza k nedostatku elektrónov.
Fotosystém **II** oxiduje vodu a prenáša elektróny na doplnenie elektrónov spotrebovaných fotosystémom I.
Vedľajším produktom tejto reakcie je O_2.
Tok elektrónov z fotosystému II do fotosystému I generuje transmembránový protónový gradient zväčšený o protóny uvoľňované oxidáciou vody, ktory sa využíva na syntézu ATP.

Tak procesy bunkového dýchania ako aj procesy fotosyntézy prebiehajú v špecifických organelách:

- bunkové dýchanie v mitochondriách,
- fotosyntéza v chloroplastoch.

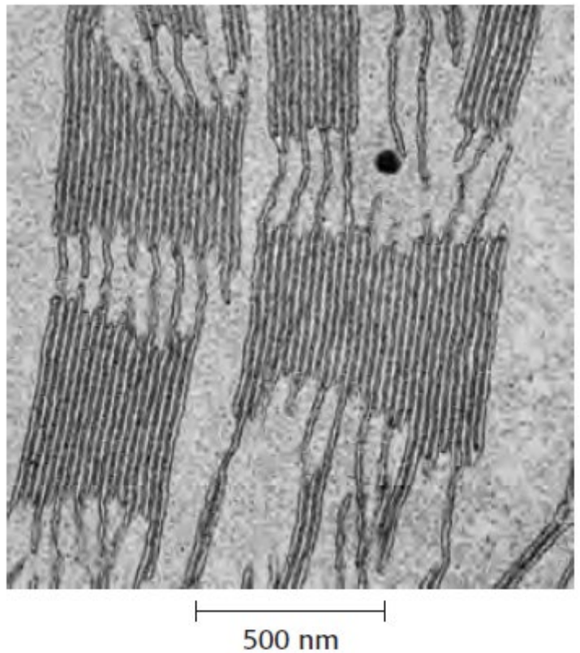
FOTOSYNTÉZA SA USKUTOČŇUJE V CHLOROPLASTOCH

Schematické zobrazenie chloroplastu



Cyanobacteria.

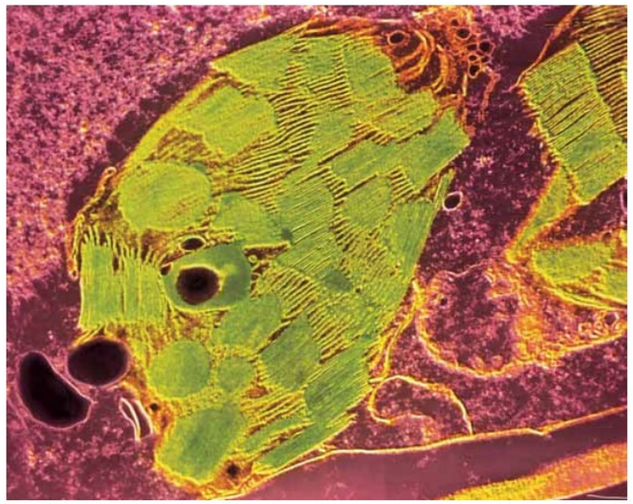
Chloroplasty sú dôsledkom endosymbiotického procesu, pri ktorom bol pravdepodobne predchodca cyanobaktérii pohltený eukrayotickou bunkou.

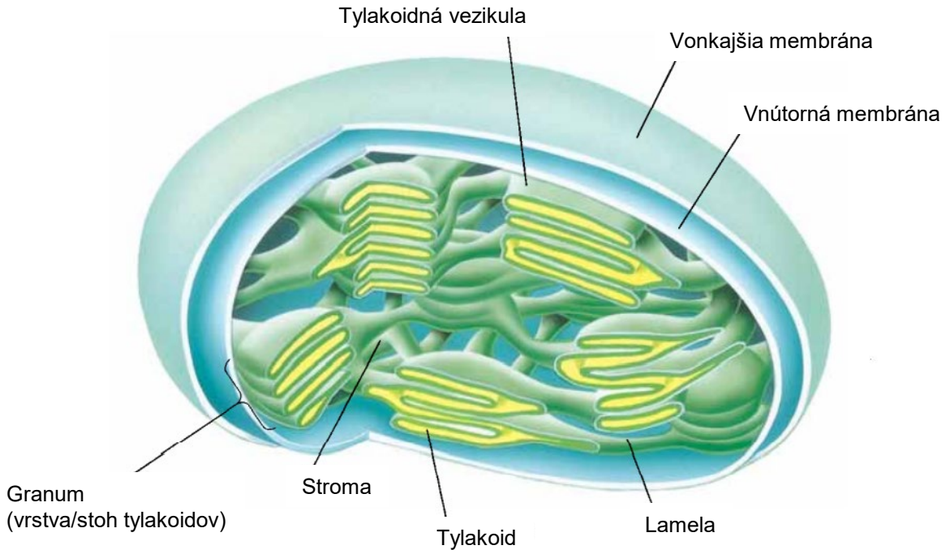


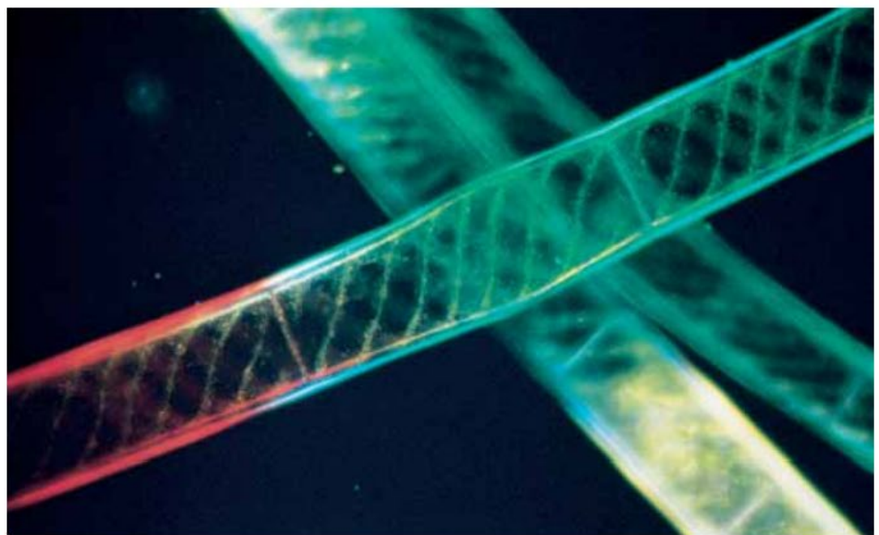
Elektrónová mikrofotografia chloroplastu zo špenátového listu. Tylakoidné membrány sa navzájom spájajú a vytvárajú grana.
[Dr. Kenneth Miller]

Bunky listov rastlín obsahujú od 1 do 100 chloroplastov, v zavislosti od typu bunky a podmienok rastu.
Primárne deje fotosyntézy sa odohrávajú v membráne tylakoidov, ktoré majú netradičné zloženie: 40% galaktolipidov, 4% sulfolipidov a cca 10% fosfolipidov. Zvyšok tvoria membránové proteíny.

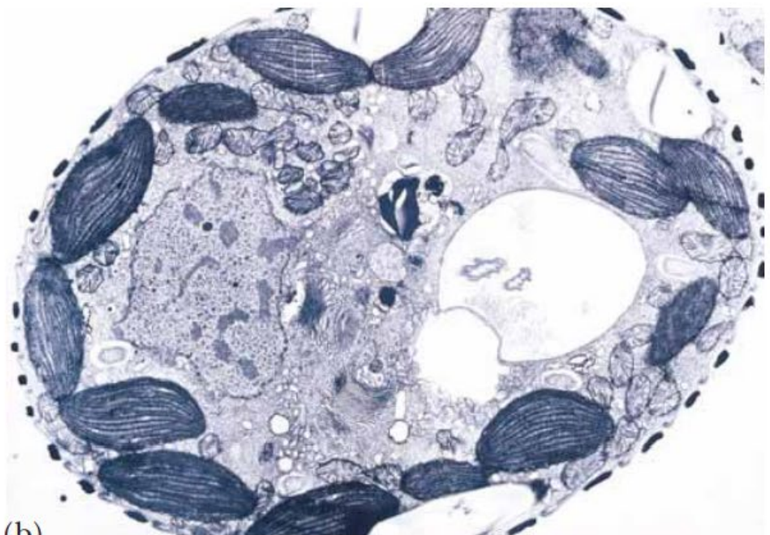
FOTOSYNTÉZA - CHLOROPLASTY







(a)

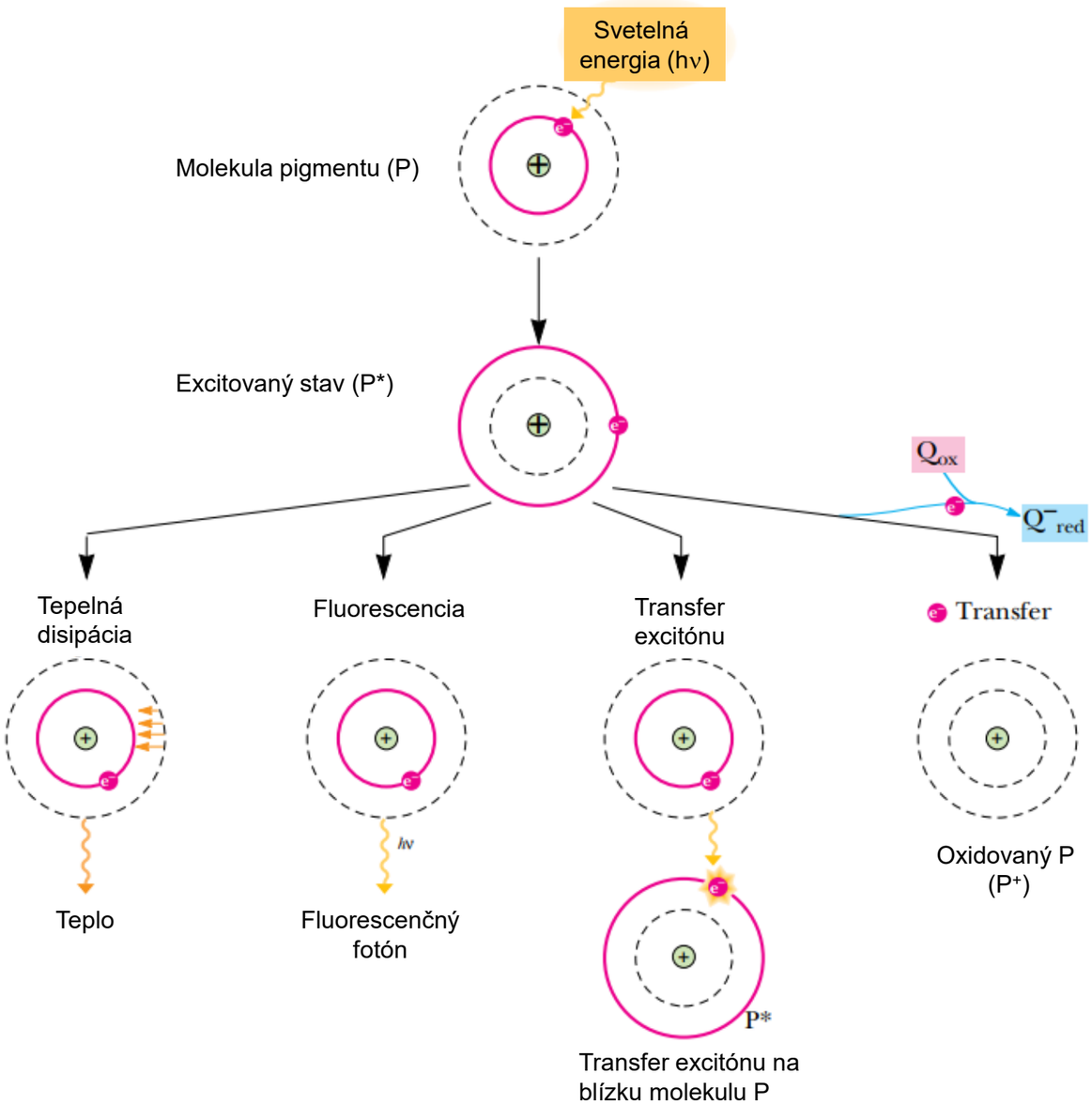


(b)

(a) Spirogyra – sladkovodná zelená algae. (b) Bunka vyšších rastlín. ((a) Micahel Siegel/Phototake NYC; (b) Biophoto Associates/Science Source.)

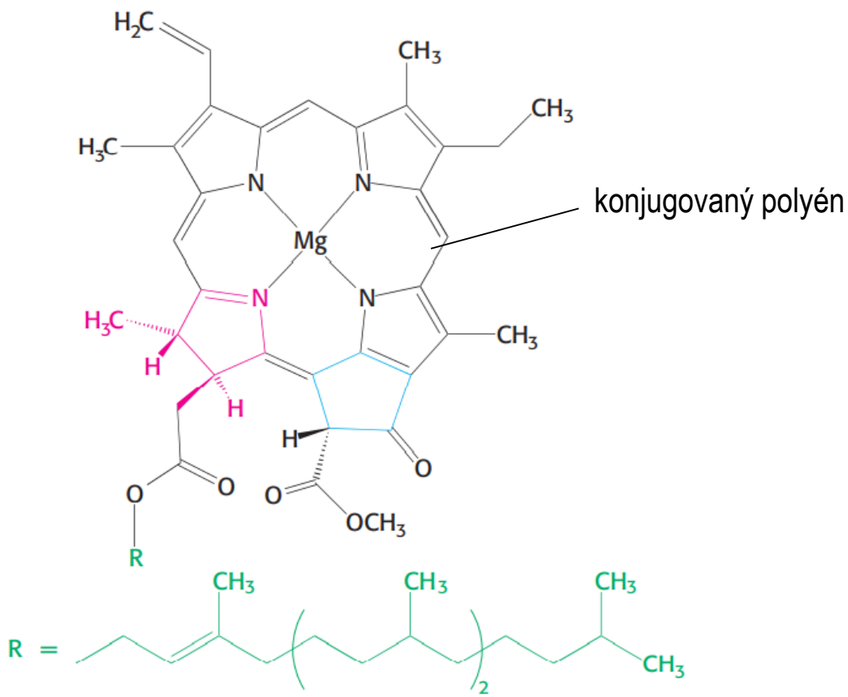
FOTOSYNTÉZA – FOTOSYNTETICKÉ PIGMENTY

Zachytenie svetelnej energie je kľúčovým faktorom pre fotosyntézu. Vzniknutý excitovaný stav fotosyntetických pigmentov môže viesť k rôznym scenárom prenosu, resp. prechodu týchto pigmentov do základného stavu.

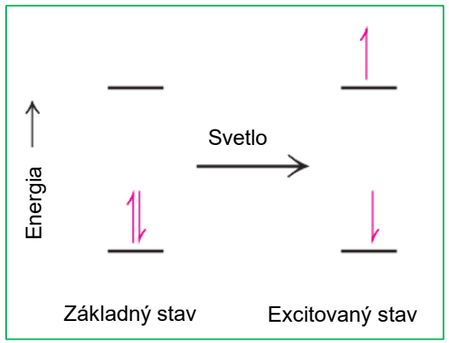


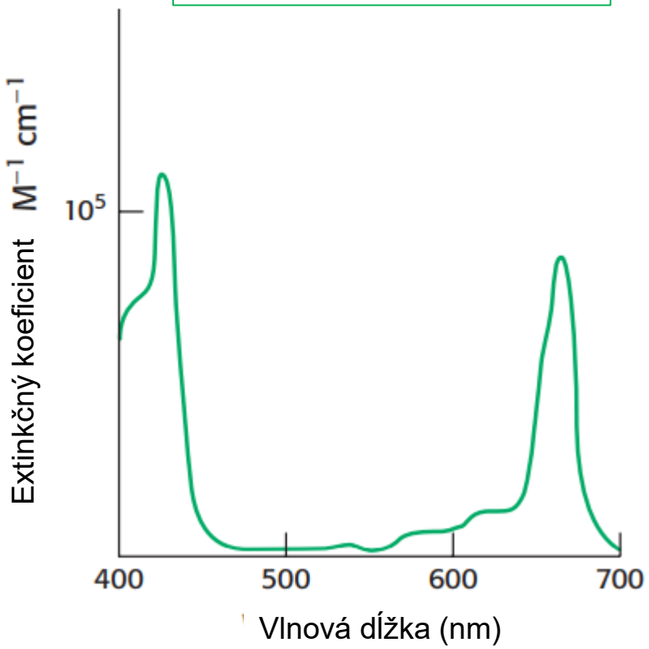
FOTOSYNTÉZA - CHLOROFYL

Zachytenie svetelnej energie je kľúčovým faktorom pre fotosyntézu. Základným fotoreceptorom v chloroplastoch väčšiny zelených rastlín je molekula pigmentu – ***chlorofyl a.***

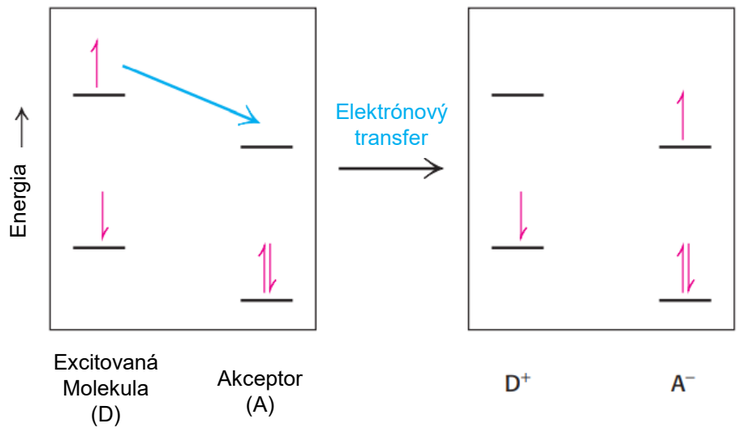


Chlorofyl. Rovnako ako hemy, aj chlorofyl a je cyklický tetrapyrrol. Jeden z pyrolových kruhov (zobrazený červenou farbou) je redukovaný a ďalší päťuhlíkový kruh (zobrazený modrou farbou) je naviazaný na ďalší pyrolový kruh. Fytolový reťazec (zobrazený zelenou farbou) je spojený esterovou väzbou. Ión horčíka sa viaže v strede štruktúry.





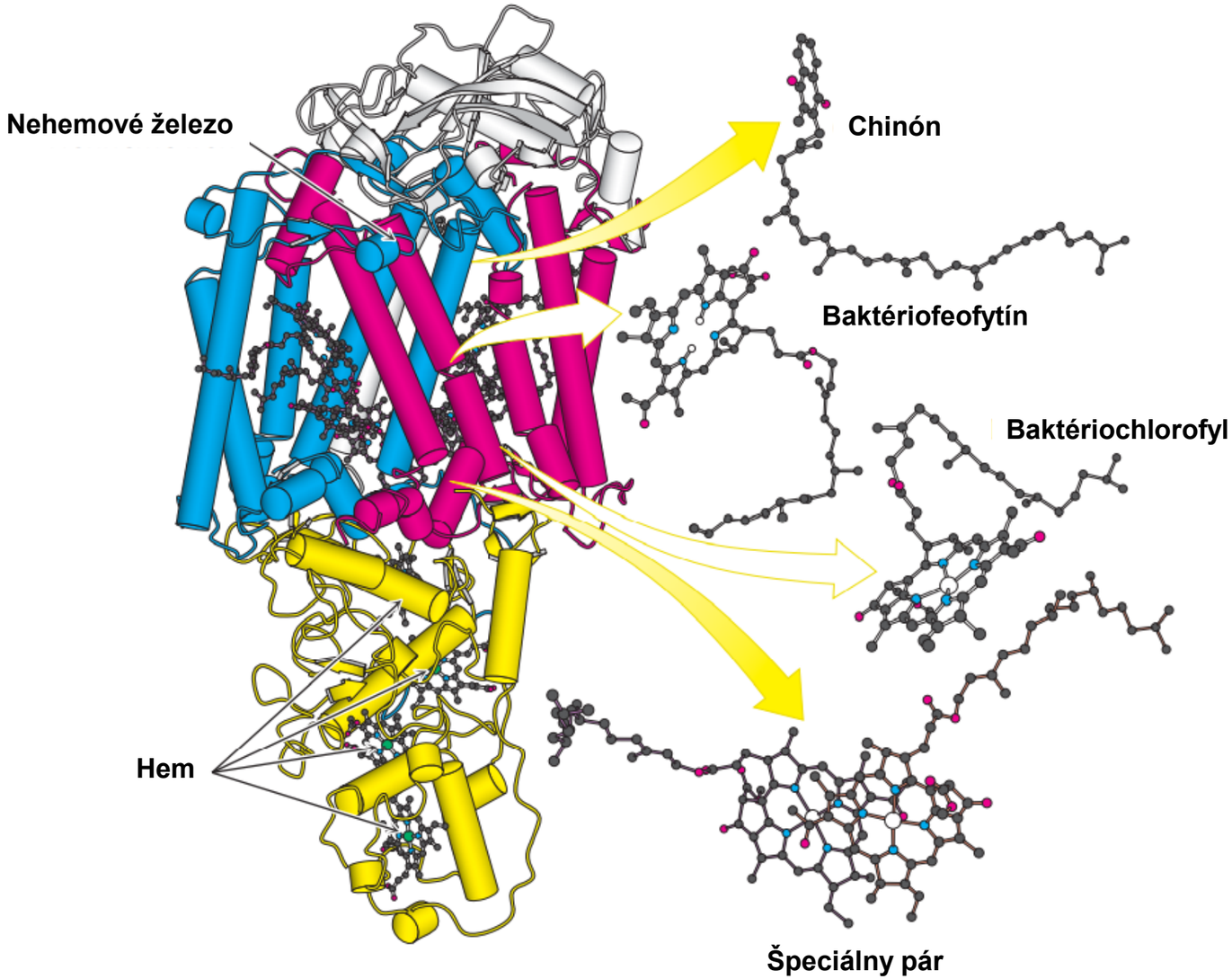
Absorpcia svetla chlorofylom a. Chlorofyl a účinne absorbuje viditeľné svetlo, čo sa hodnotí podľa koeficientu extinkcie shodnotou blízko 10^5 M^{-1} cm^{-1}.



Fotoindukované oddelenie náboja. Ak je v blízkosti vhodný akceptor elektrónov, môže sa elektrón, ktorý bol absorpciou svetla excitovaný na vyššiu energetickú hladinu, presunúť z excitovanej molekuly na akceptor.

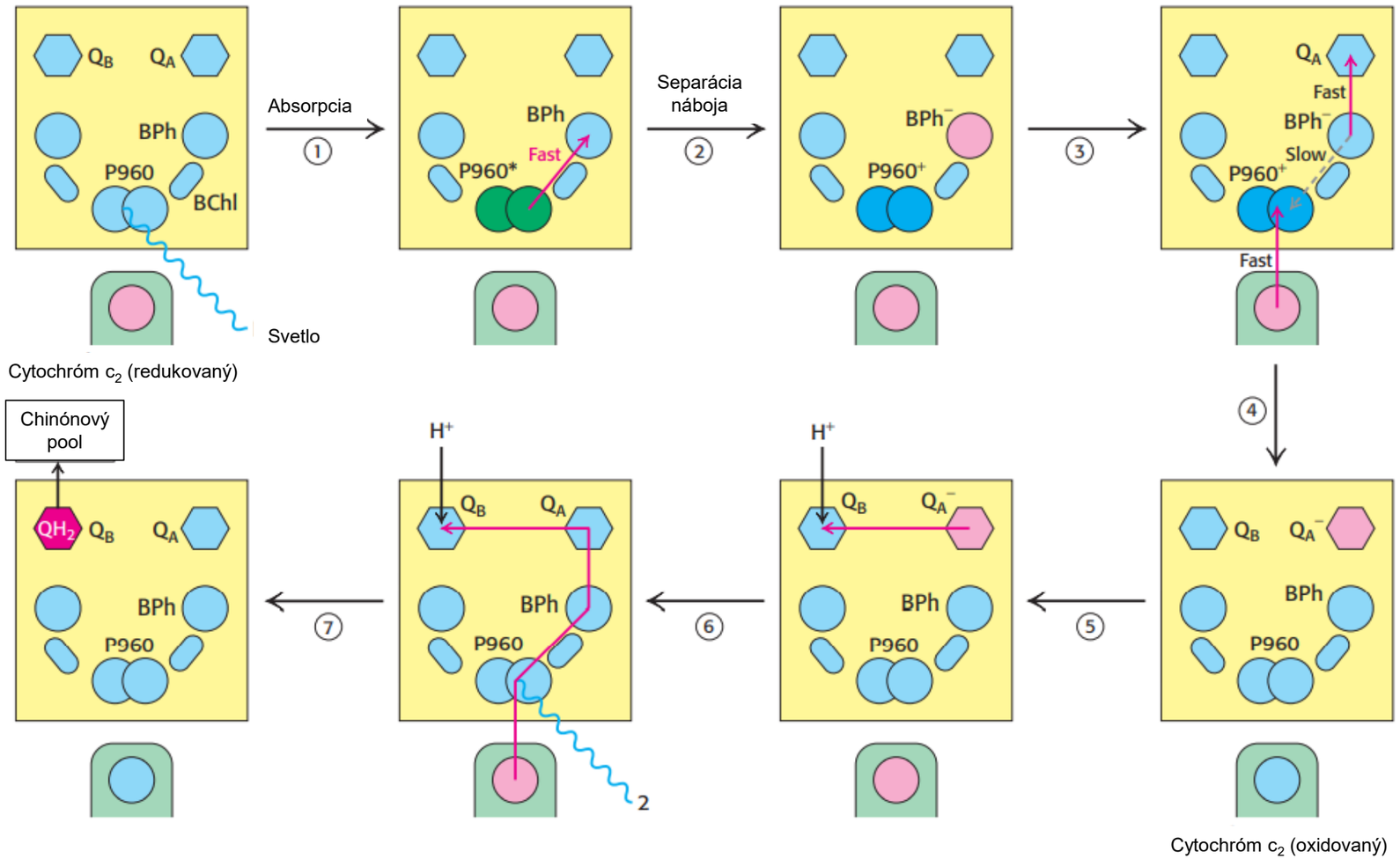
V chloroplastoch miesto, na ktorom dochádza k separácii náboja v rámci každého fotosystému, sa nazýva **reakčné centrum**. Fotosyntetický aparát je usporiadaný tak, aby maximalizoval fotoindukované oddelenie náboja a minimalizoval neproduktívny návrat elektrónu do základného stavu. Elektrón extrahovaný z pôvodného miesta absorpciou svetla nadúda redukčný potenciál: môže redukovať ďalšie molekuly a ukladať tak svetelnú energiu vo forme chemickej.

BAKTERIÁLNE FOTOSYNTETICKÉ REAKČNÉ CENTRUM



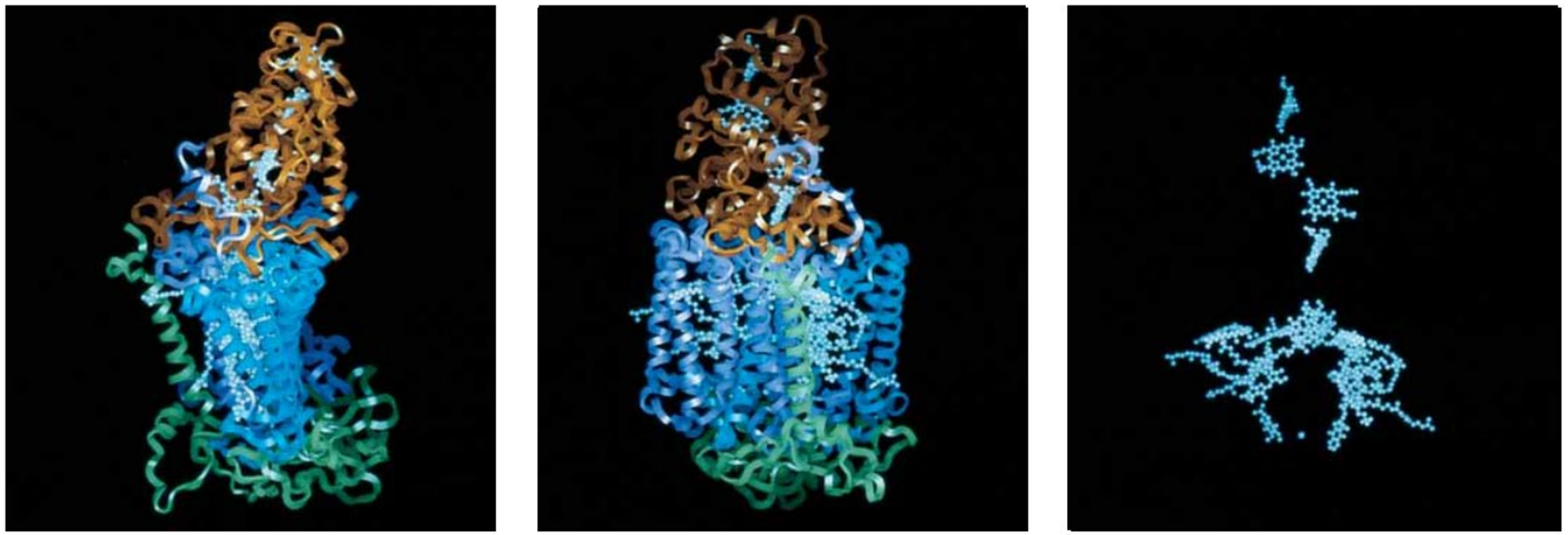
Bakteriálne fotosyntetické reakčné centrum. Jadro reakčného centra z *Rhodopseudomonas viridis* pozostáva z dvoch podobných reťazcov: L (červený) a M (modrý). Štruktúru dotvára reťazec H (biely) a cytochrómová podjednotka (žltá). Podjednotky L a M sú zložené prevažne z helixov, ktoré prechádzajú membránou. Reťazec prostetických skupín nesúcich elektróny, počnúc špeciálnym párom bakteriochlorofylov a končiacim viazaným chinónom, prechádza v tomto pohľade štruktúrou zdola nahor. [Čerpané z 1PRC.pdb.]

BAKTERIÁLNE FOTOSYNTETICKÉ REAKČNÉ CENTRUM



Elektrónový reťazec vo fotosyntetickom bakteriálnom reakčnom centre. Absorpcia svetla špeciálnym párom (P960) vedie k rýchlemu prenosu elektrónu z tohto miesta na bakteriofeofytín (BPh), vytvorenie fotoindukovanej separácie náboja (kroky 1 a 2). (Hviezdička pri P960 znamená excitovaný stav.) Možný návrat elektrónu z feofytínu na oxidovaný špeciálny pár je potlačený „dierou“ v špeciálnom páre, ktorá je znovu naplnená elektrónom z cytochrómovej podjednotky a elektrón z feofytín je prenesený na chinón (Q_A), ktorý je ďalej od špeciálneho páru (kroky 3 a 4). Q_A odovzdá elektrón na Q_B. Redukcia chinónu (Q_B) na cytoplazmatickej strane membrány vedie k absorpcii dvoch protónov z cytoplazmy (kroky 5 a 6). Redukovaný chinón sa môže presunúť do chinónového „pool“-u v membráne (krok 7).

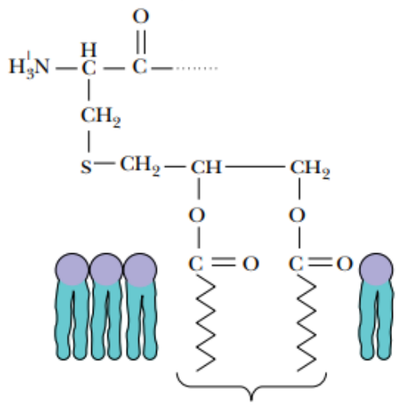
BAKTERIÁLNE FOTOSYNTETICKÉ REAKČNÉ CENTRUM

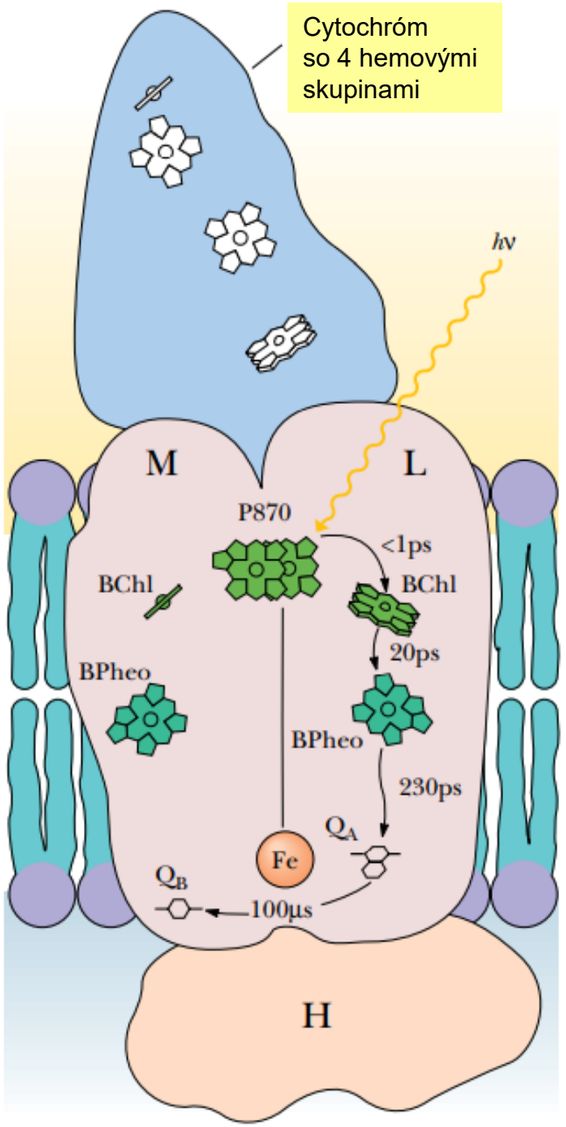


(a) (b) (c)

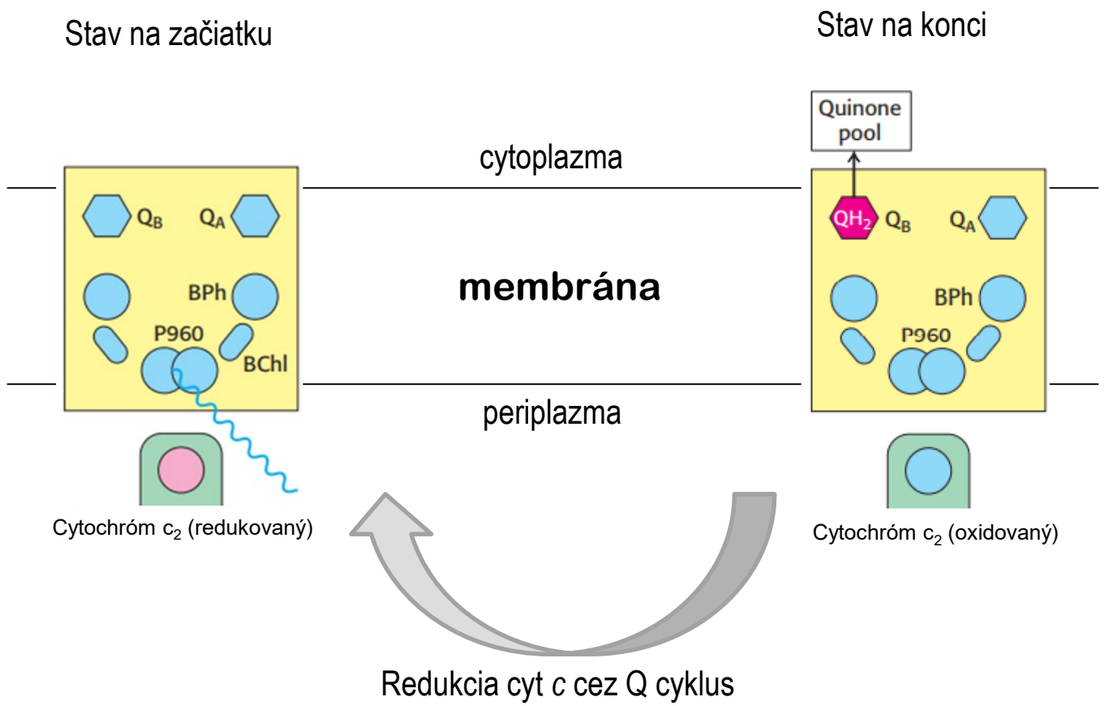
Model reakčného centra *R. viridis*. Podjednotky M a L sú označené fialovou a modrou farbou. Cytochrómová podjednotka je hnedá, podjednotka H je zelená. Tieto proteíny tvoria podpornú kostru pre prostetické skupiny reakčného centra pre efektívny elektrónový prenos. Panel (c) ukazuje priestorové umiestnenie rôznych prostetických skupín (4 hemy, P870, 2 BChl, 2 Bpheo, 2 chinóny a atóm železa) v tom istom pohľade ako v (b), avšak bez proteínového matrixu.

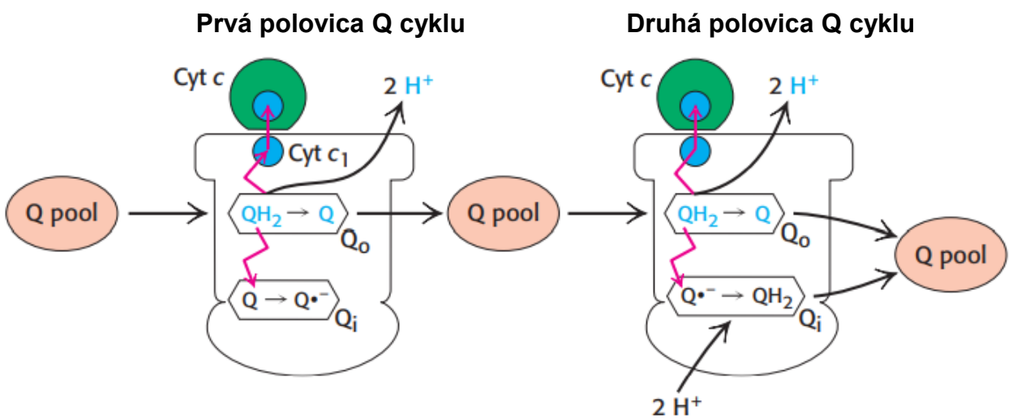
Cytochrómová subjedntoka je asociovaná s membránou cez diacylglycerol na jeho N-terminálnom konci Cys:



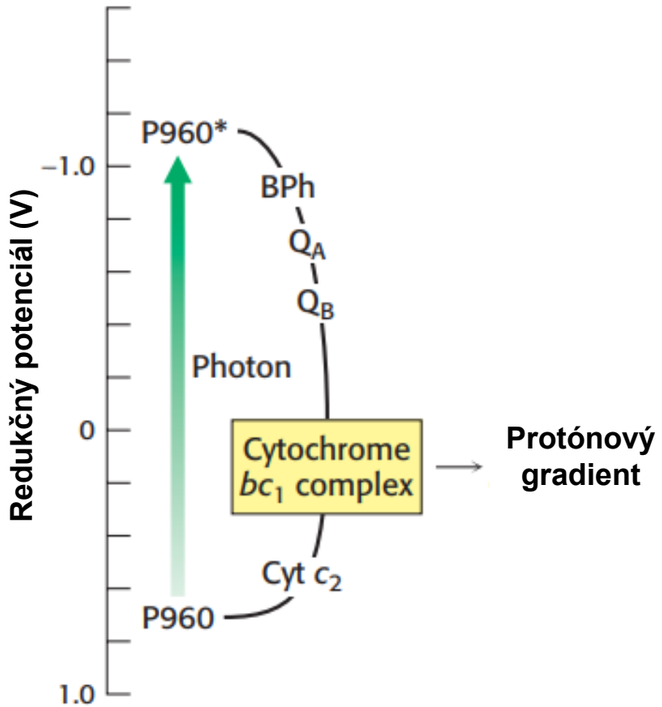


BAKTERIÁLNE FOTOSYNTETICKÉ REAKČNÉ CENTRUM





Q cyklus



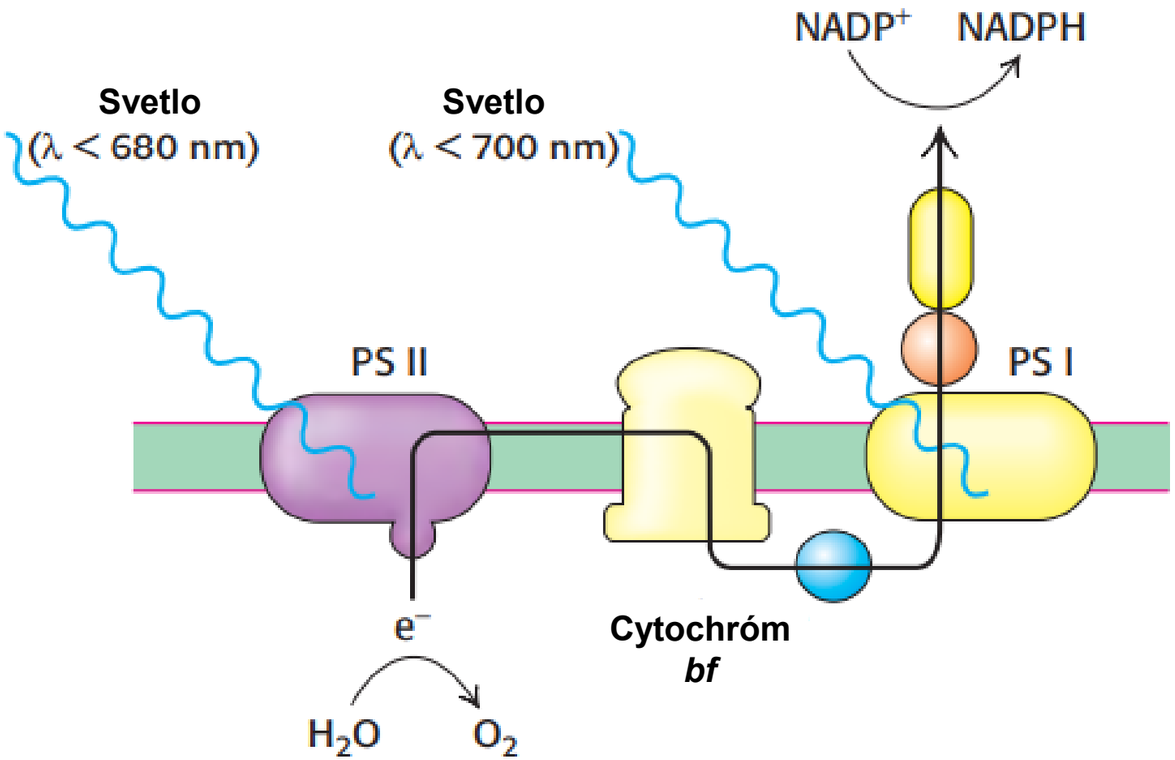
Cyklický tok elektrónov v bakteriálnom reakčnom centre. Excitované elektróny z reakčného centra P960 prúdia cez bakteriofeofytín (BPh), pár chinónových molekúl (Q_A a Q_B), komplex cytochrómu bc_1 a nakoniec cez cytochróm c_2 do reakčného centra. Komplex cytochrómu bc_1 pumpuje protóny v dôsledku toku elektrónov, ktorý poháňa tvorbu ATP.

FOTOSYNTÉZA V ZELENÝCH RASTLINÁCH

V zelených rastlinách sa nachádzajú dva membránové fotocitlivé komplexy:

(i) Fotosystém I (PS I)
(ii) Fotosystém II (PS II)

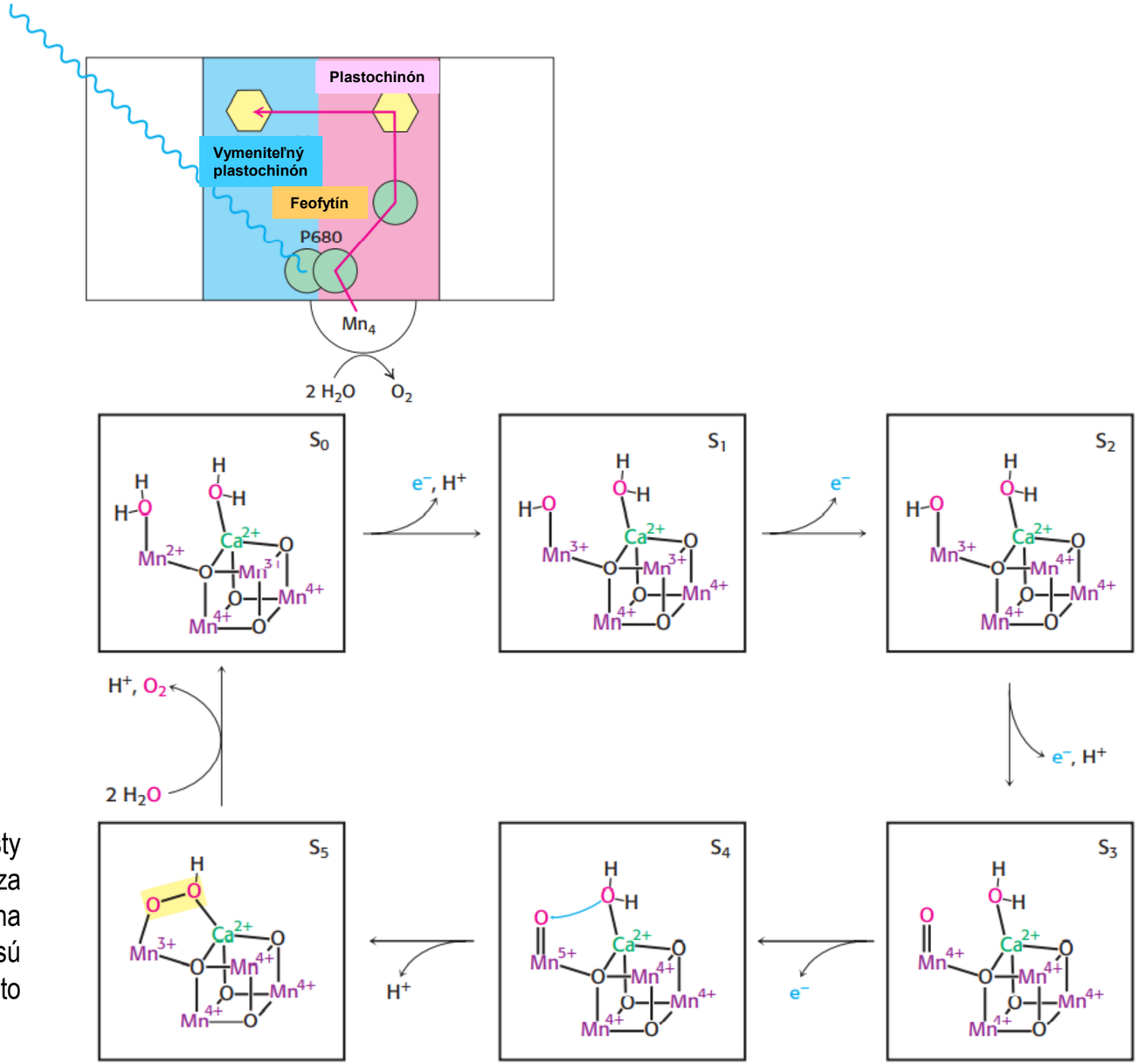
a ich funkcia je produkcia ATP a NADPH.



FOTOSYNTÉZA V ZELENÝCH RASTLINÁCH – FOTOSYSTÉM II

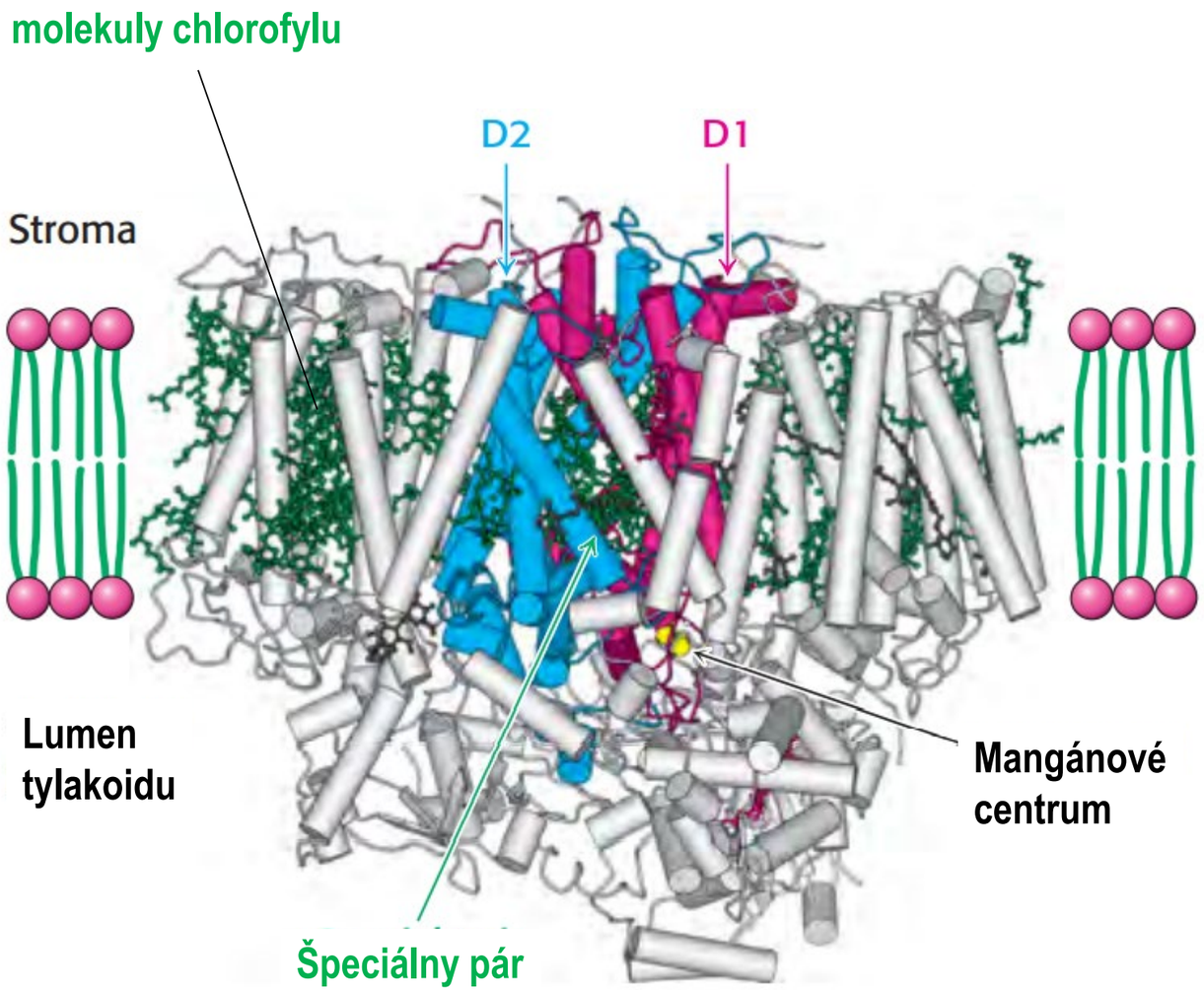
PS II prenáša elektróny z vody na plastochinón a vytvára protónový gradient na tylakoidnej membráne.

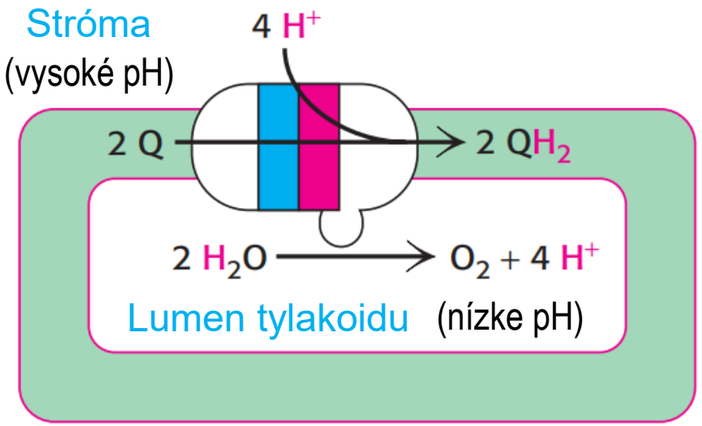
$$2\,Q + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{Svetlo}} O_2 + 2\,QH_2$$



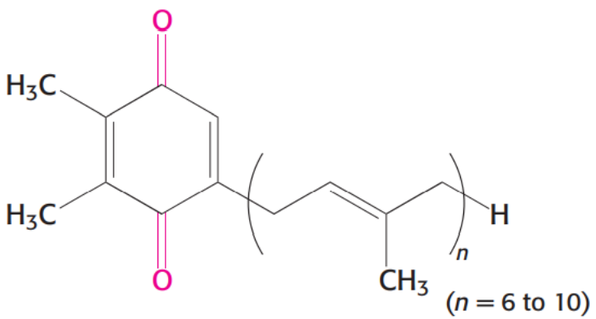
Na generovanie jednej molekuly kyslíka sú potrebné štyri fotóny. Keď sú chloroplasty adaptované na tmu vystavené krátkemu záblesku svetla, jeden elektrón prechádza fotosystémom II. Monitorovanie O_2 uvoľneného po každom záblesku ukazuje, že na vygenerovanie každej molekuly O_2 sú potrebné štyri záblesky. Vrcholy v uvoľňovaní O_2 sú po 3., 7. a 11. bliknutí, pretože chloroplasty adaptované na tmu začínajú v stave S1 - to znamená v stave redukovanom jedným elektrónom.

FOTOSYNTÉZA – ŠTRUKTÚRA FOTOSYSTÉMU II

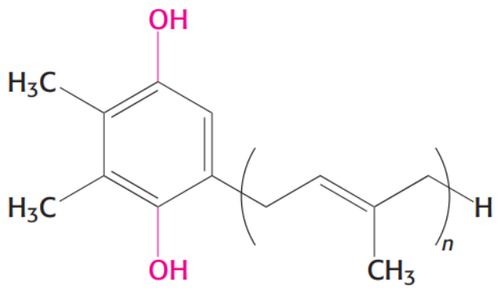




Fotosystem II uvoľňuje protóny do lumenu tylakoidu a prijíma ich zo strómy. Výsledkom je tvorba gradientu pH cez tylakoidnú membránu s nadbytkom protónov (nízke pH) vo vnútri tylakoidov..



Plastochinón
(oxidovaná forma, Q)

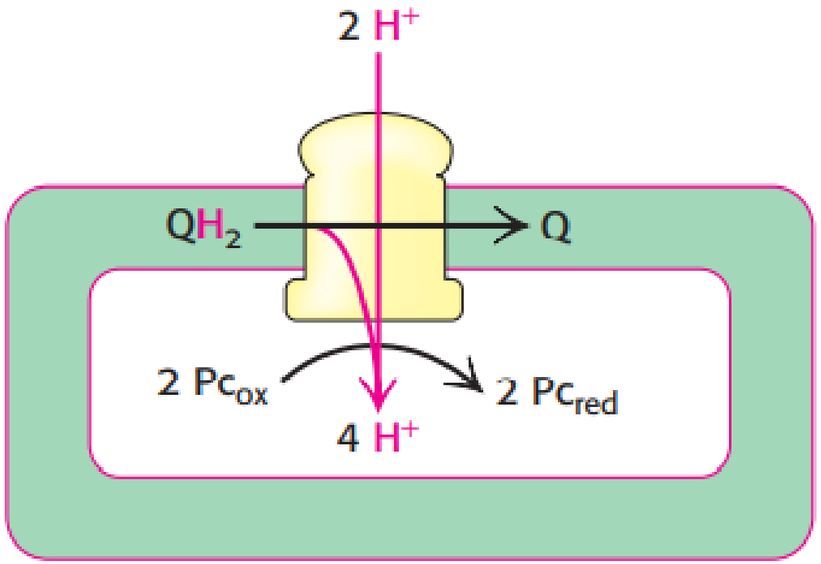


Plastochinol
(redukovaná forma, QH_2)

CYTOCHRÓM *BF* SPÁJA FOTOSYSTÉM II S FOTOSYSTÉMOM I

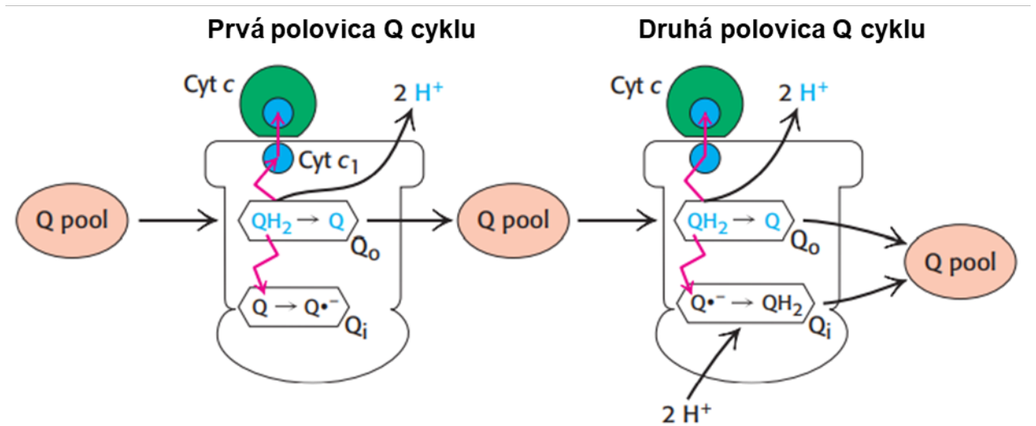
Elektróny prúdia z fotosystému II do fotosystému I cez komplex **cytochróm *bf***. Tento komplex katalyzuje prenos elektrónov z plastochinolu (QH_2) na plastocyanín (Pc), malý, rozpustný proteín obsahujúci meď v lumene tylakoidu.

$$QH_2 + 2\,Pc(Cu^{2+}) \rightarrow Q + 2\,Pc(Cu^{+}) + 2\,H^{+}_{\text{lumen tylakoidu}}$$

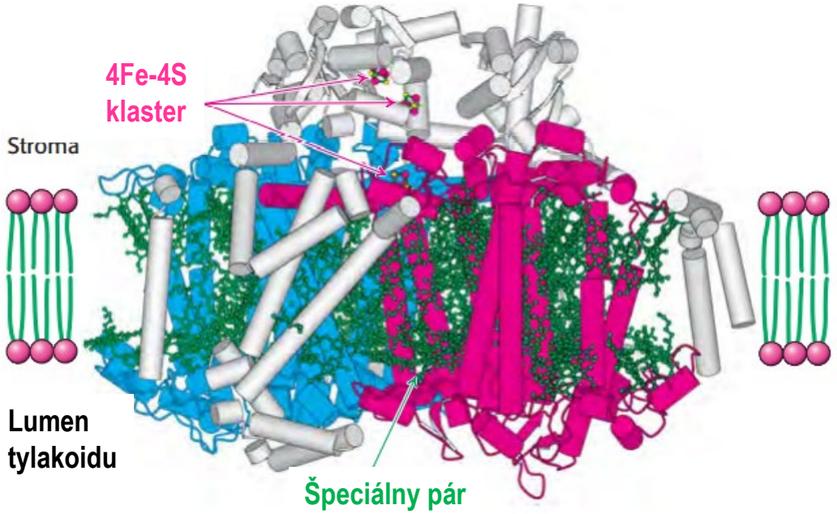


Príspevok cytochrómu bf k tvorbe gradientu protónov. Komplex cytochrómu bf oxiduje QH_2 na Q počas Q cyklu. V každom cykle sa do lumenu tylakoidu uvoľnia štyri protóny.

Dva protóny z plastochinolu sa uvoľňujú do lumenu tylakoidu. Táto reakcia pripomína reakciu katalyzovanú komplexom III v oxidatívnej fosforylácii a väčšina zložiek komplexu cytochrómu bf je homológna so zložkami komplexu III.



FOTOSYSTÉM I VYUŽÍVA SVETELNÚ ENERGIU NA TVORBU REDUKOVANÉHO FERREDOXINU

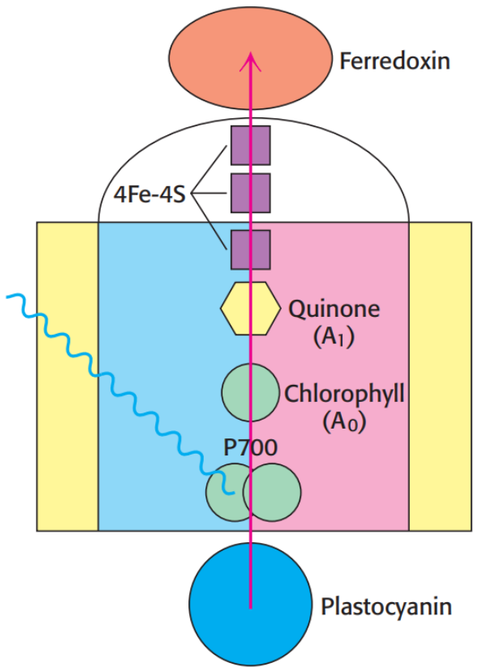


Štruktúra fotosystému I. Podjednotky psaA a psaB sú zobrazené červenou, respektíve modrou farbou. Početné viazané molekuly chlorofylu sú zobrazené zelenou farbou vrátane špeciálneho páru, ako aj zhluky železa a síry, ktoré uľahčujú prenos elektrónov zo strómy. [Čerpané z 1JB0.pdb.]

Celková reakcia katalyzovaná fotosystémom I je jednoduchá jedno-elektrónová oxidačno-redukčná reakcia:

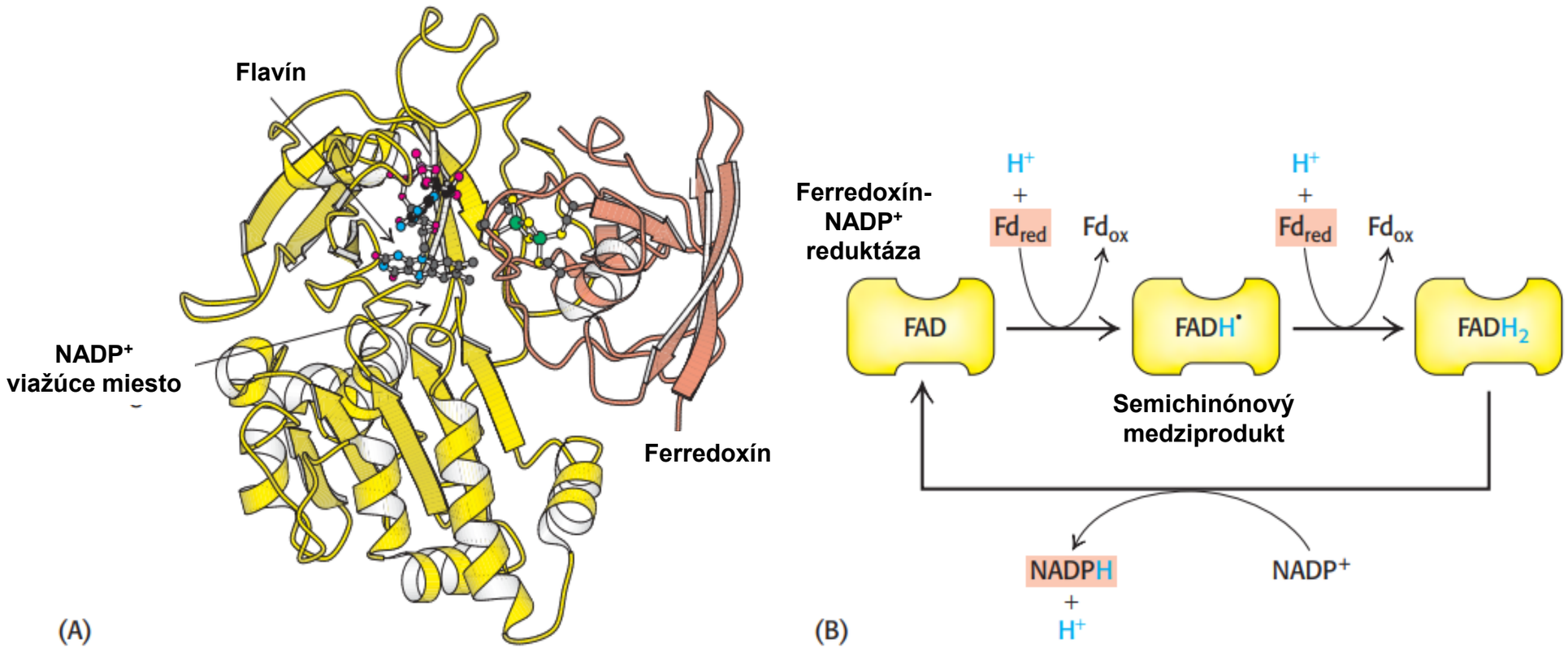
$$Pc(Cu^{+}) + Fd_{ox} \xrightarrow{\text{Svetlo}} Pc(Cu^{2+}) + Fd_{red}$$

Vzhľadom na to, že redoxné potenciály pre plastocyanín a ferredoxín sú +0,37 V respektíve -0,45 V, zmena štandardnej Gibbsovej energie pre túto reakciu je +79,1 kJ/mol. Táto reakcia je umožnená absorpciou 700-nm fotónu, ktorý má energiu 171 kJ/mol.



Prietok elektrónov cez fotosystém I na ferredoxín. Absorpcia svetla indukuje prenos elektrónov z P700 na molekulu chlorofylu, molekulu chinónu a tri klastre 4Fe-4S, ktoré dosahuju ferredoxín. Kladný náboj zostávajúci na P700 je neutralizovaný elektrónovým prenosom z redukovaného plastocyanínu.

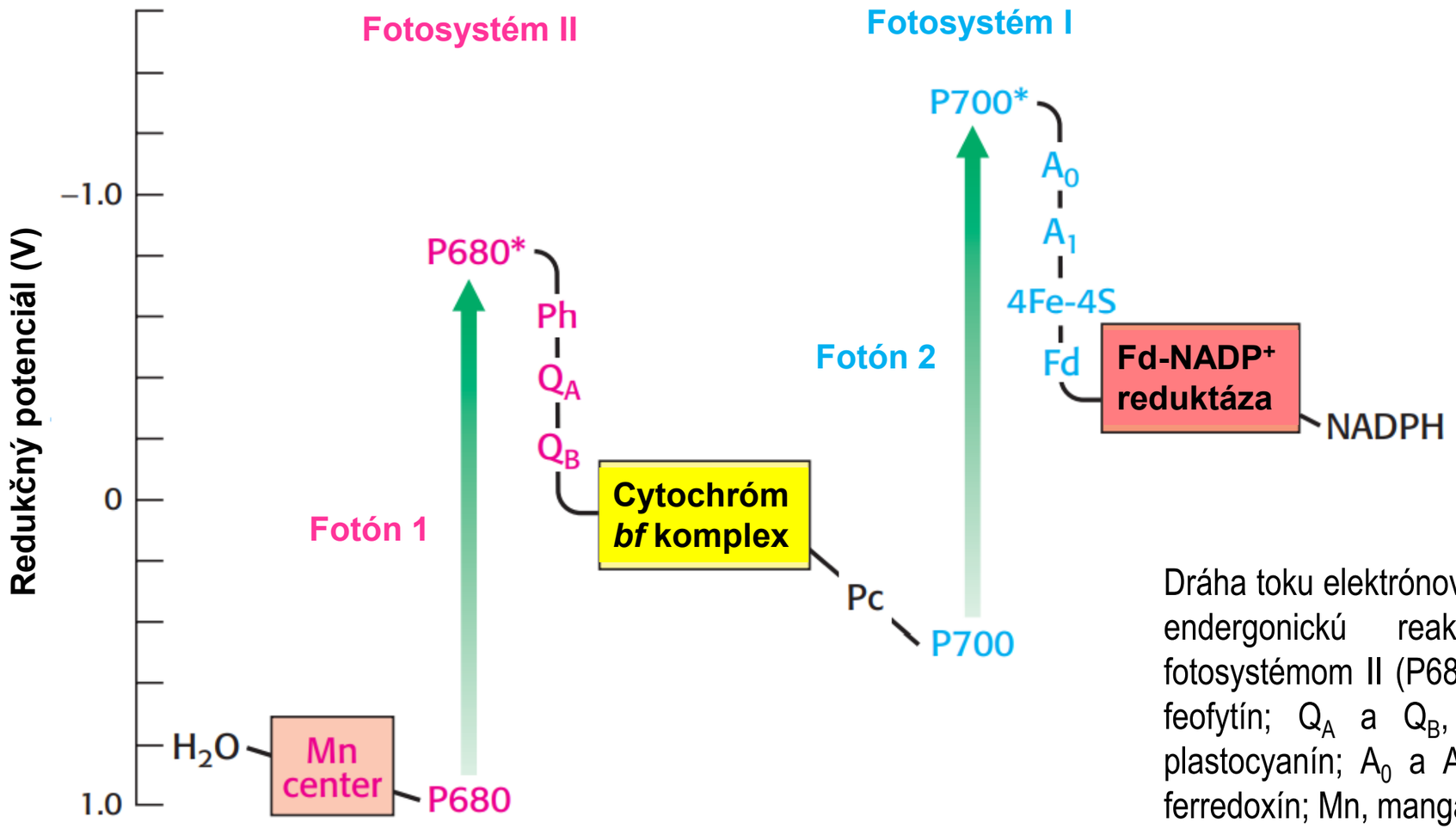
FERREDOXIN-NADP⁺ REDUKTÁZA PREMIEŇA NADP⁺ NA NADPH



Štruktúra a funkcia ferredoxín–NADP⁺ reduktázy. (A) Štruktúra ferredoxín-NADP⁺ reduktázy. Tento enzým prijíma elektróny jeden po druhom z ferredoxínu (zobrazený oranžovou farbou). (B) Ferredoxín-NADP⁺ reduktáza najskôr prijíma dva elektróny a dva protóny z dvoch molekúl redukovaného ferredoxínu (Fd) za vzniku $FADH_2$, ktorý potom prenáša dva elektróny a protón na NADP⁺ za vzniku NADPH. [Čerpané z 1EWY.pdb.]

Z SCHÉMA FOTOSYNTÉZY

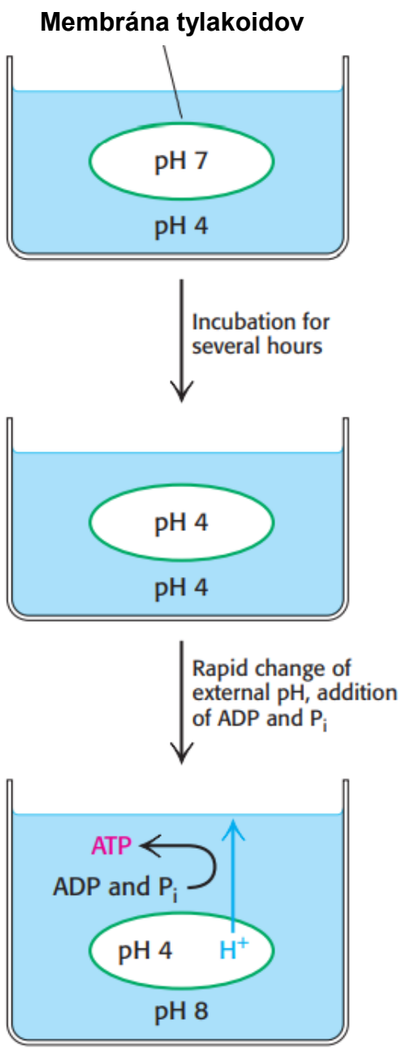
Spolupráca medzi fotosystémom I a fotosystémom II vytvára tok elektrónov z H_2O na $NADP^+$. Dráha toku elektrónov sa nazýva Z schéma fotosyntézy, pretože redoxný diagram od P680 do P700* vyzerá ako písmeno Z.

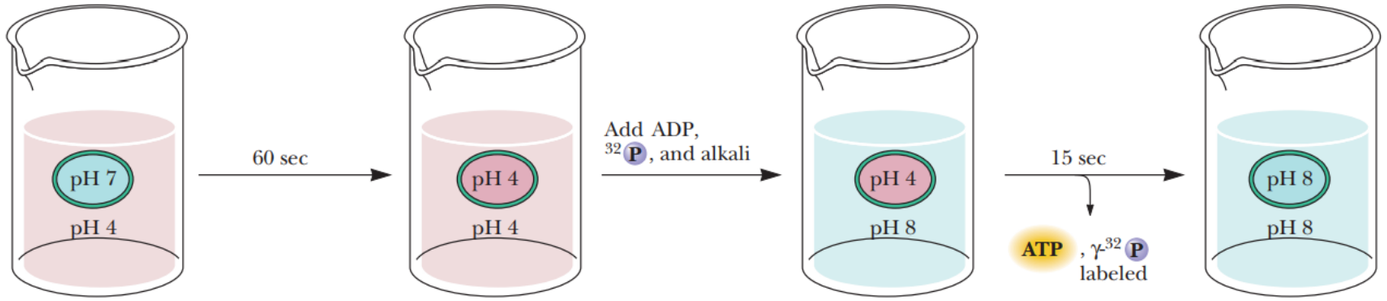


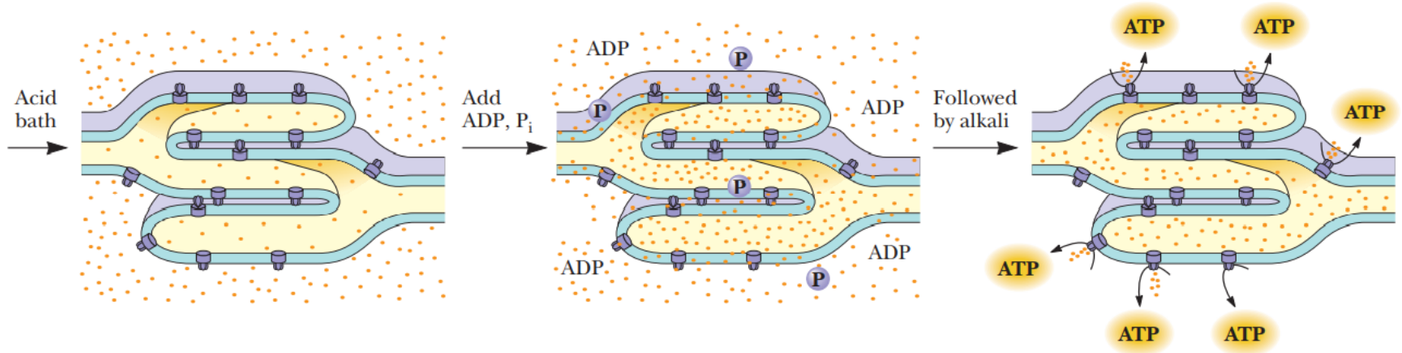
Dráha toku elektrónov z H_2O na $NADP^+$ vo fotosyntéze. Túto endergonickú reakciu umožňuje absorpcia svetla fotosystémom II (P680) a fotosystém I (P700). Skratky: Ph, feofytín; Q_A a Q_B, proteíny viažuce plastochinón; Pc, plastocyanín; A_0 a A_1, akceptory elektrónov z P700*; Fd, ferredoxín; Mn, mangán.

PROTÓNOVÝ GRADIENT NA MEMBRÁNE TYLAKOIDOV VEDIE K SYNTÉZE ATP

Experiment André Jagendorfa a Ernesto Uribeho v roku 1966

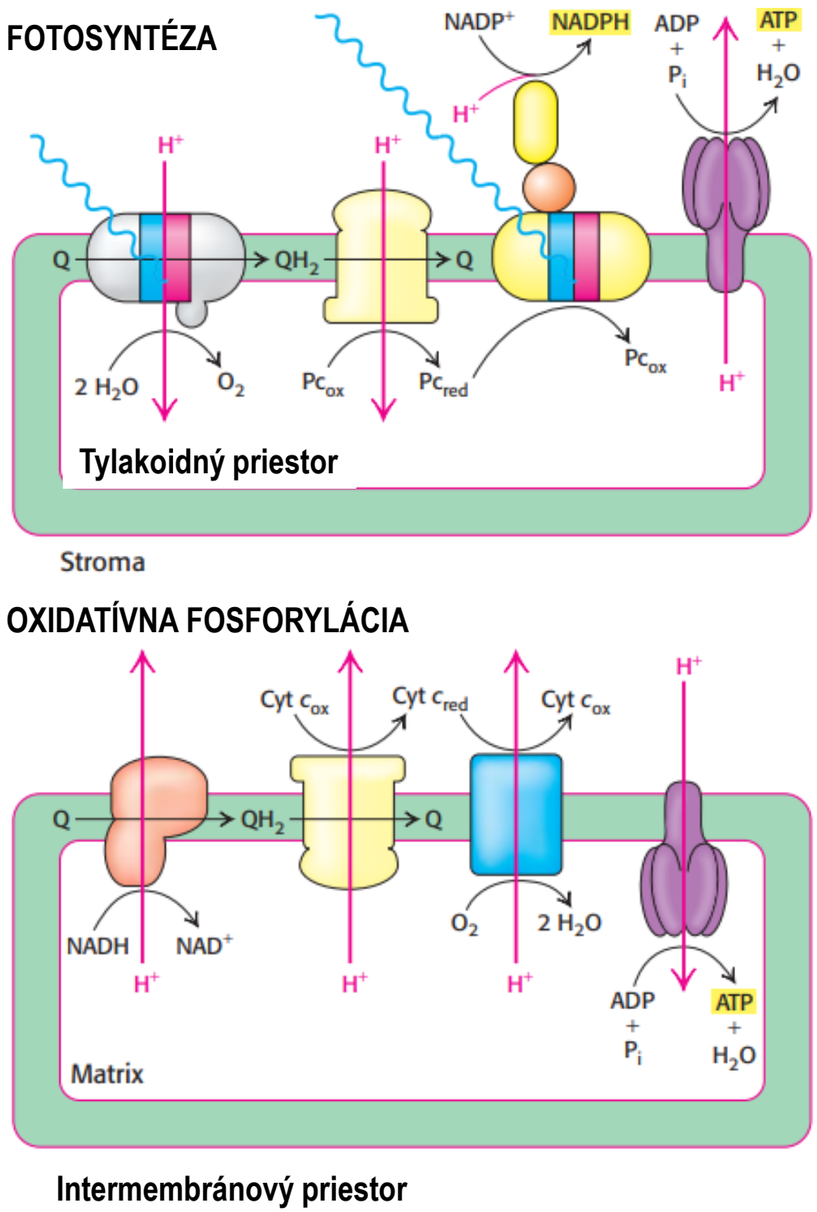






Energia inherentná protónovému gradientu, ktorá sa nazýva sila protónového pohonu (Δp), je opísaná ako súčet dvoch zložiek: gradientu náboja a chemického gradientu. V chloroplastoch je Δp tvorený takmer výlučne z gradientu pH, zatiaľ čo v mitochondriách je príspevok z membránového potenciálu väčší. Dôvodom tohto rozdielu je, že tylakoidná membrána je celkom priepustná pre Cl^- a Mg^{2+}. Svetlom indukovaný prenos H^+ do tylakoidného priestoru je sprevádzaný prenosom buď Cl^- v rovnakom smere, alebo Mg^{2+} (1 Mg^{2+} na 2 H^+) v opačnom smere. Následne je zachovaná elektrická neutralita a nie je generovaný žiadny membránový potenciál. Príliv Mg^{2+} do strómy hrá úlohu v regulácii Calvínovho cyklu. Gradient pH 3.5 jednotky na tylakoidnej membráne zodpovedá protónovo-hybnej sile 0.20 V alebo ΔG=–20,0 kJ/mol.

POROVNANIE FOTOSYNTÉZY A OXIDATÍVNEJ FOSFORYLÁCIE

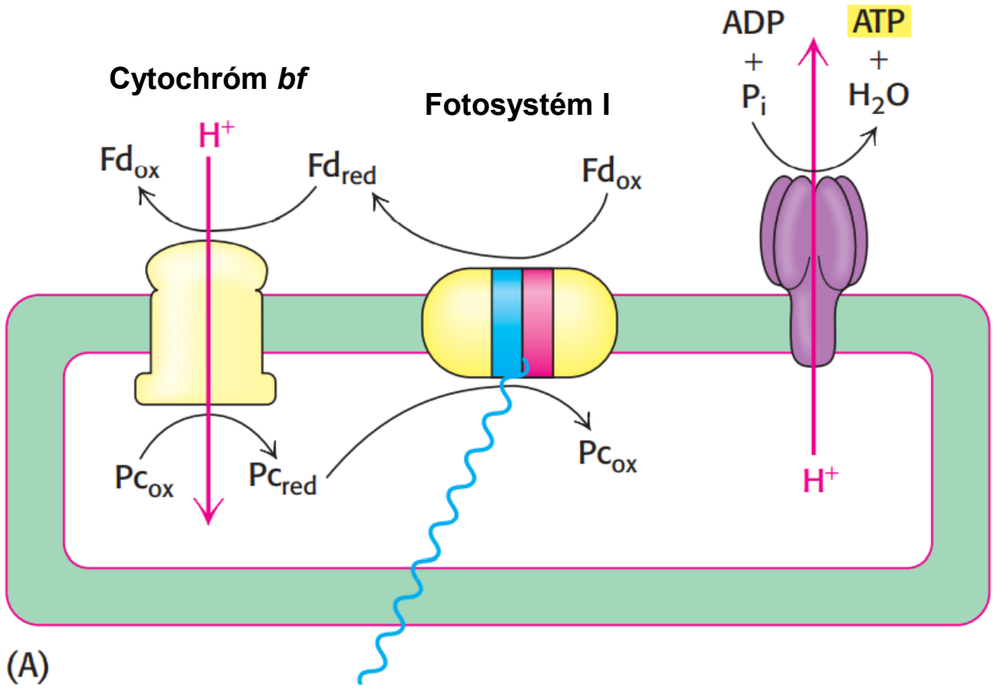


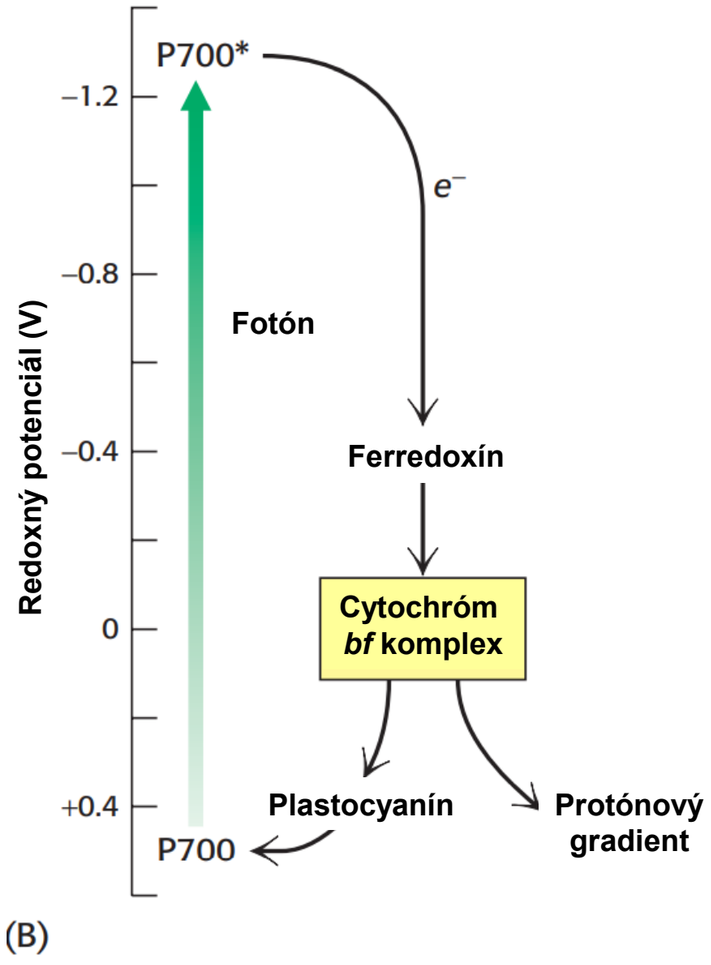
Porovnanie fotosyntézy a oxidatívnej fosforylácie. Svetlom indukovaný prenos elektrónov vo fotosyntéze umožňuje transfer protónov do lumenu tylakoidu. Prebytok protónov sa transferuje z lumenu cez ATP syntázu a tak sa vytvára ATP v stróme.

V oxidatívnej fosforylácii tok elektrónov v smere elektrónového transportného reťazca vedie k pumpovaniu protónov z mitochondriálneho matrixu do intermembránového priestoru. Následne protóny z intermembránového priestoru prúdia do matrixu cez ATP syntázu za tvorby ATP.

CYKLICKÝ TOK ELEKTRÓNOV CEZ PS I VEDIE K PRODUKCII ATP NAMIESTO NADPH

V prípade, keď je pomer NADPH k $NADP^+$ príliš veľký, dochádza k cyklickému toku elektrónov.





Cyklická fotofosforylácia. (A) V tejto dráhe sa elektróny z redukovaného ferredoxínu prenášajú skôr na **cytochróm *bf* komplex** ako na **ferredoxín-$NADP^+$ reduktázu**. Tok elektrónov cez cytochróm bf vedie k pumpovaniu protónov do lumenu tylakoidu. Tieto protóny prúdia cez ATP syntázu a generujú ATP. Touto cestou nie je generovaný NADPH ani O_2. (B) Schéma ukazujúca energetickú podstatu cyklickej fotofosforylácie.
Skratky: Fd, ferredoxín; Pc, plastocyanín.

ABSORPCIA ÔSMICH FOTÓNOV VEDIE K TVORBE JEDNEJ MOLEKULY O_2, DVOCH NADPH A TROCH ATP MOLEKÚL

Absorpcia štyroch fotónov fotosystémom II generuje jednu molekulu O_2 a uvoľňuje 4 protóny do tylakoidného lumenu. Dve molekuly plastochinolu sú oxidované v Q cykle komplexom cytochrómu *bf* za uvoľnenia 8 protónov do lumenu. Nakoniec sú elektróny zo štyroch molekúl redukovaného plastocyanínu prenesené na ferredoxín absorpciou ďalších štyroch fotónov. Štyri molekuly redukovaného ferredoxínu generujú dve molekuly NADPH. Celková reakcia teda je:

$$2\ H_2O + 2\ NADP^+ + 10\ H^+_{stroma} \rightarrow O_2 + 2\ NADPH + 12\ H^+_{lumen}$$

12 protónov uvoľnených v lumene potom môže pretekať cez ATP syntázu. Vzhľadom na to, že v CF_0 existuje 12 komponentov podjednotky III, cez CF_0 musí prejsť 12 protónov, aby dokončili jednu úplnú rotáciu CF_1. Jedna rotácia generuje tri molekuly ATP. Vzhľadom na pomer 3 ATP pre 12 protónov je celková reakcia:

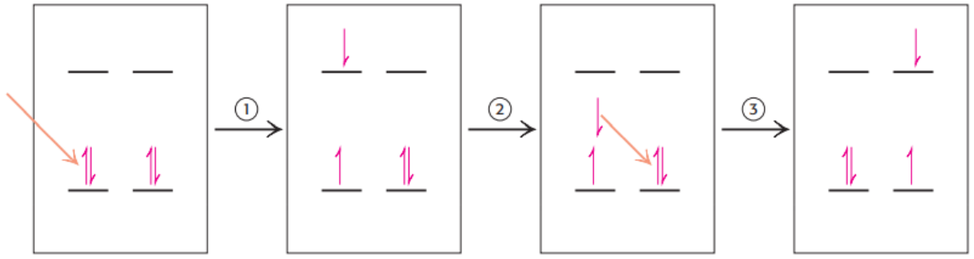
$$2\ H_2O + 2\ NADP^+ + 10\ H^+_{stroma} \rightarrow O_2 + 2\ NADPH + 12\ H^+_{lumen}$$
$$3\ ADP^{3-} + 3\ P_i^{2-} + 3\ H^+ + 12\ H^+_{lumen} \rightarrow 3\ ATP^{4-} + 3\ H_2O + 12\ H^+_{stroma}$$

$$\mathbf{2\ NADP^+ + 3\ ADP^{3-} + 3\ P_i^{2-} + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + 2\ NADPH + 3\ ATP^{4-} + H_2O}$$

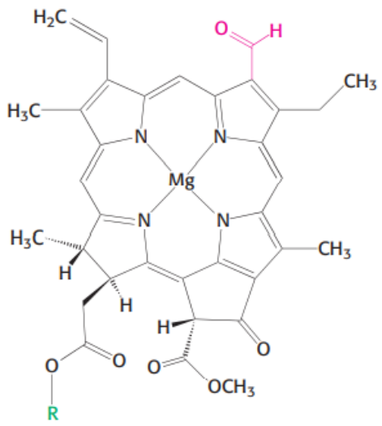
Osem fotónov je potrebných na získanie troch molekúl ATP (2,7 fotón/ATP).

„LIGHT-HARVESTING SYSTEM“ – SVETLO-ZBIERAJÚCI SYSTÉM

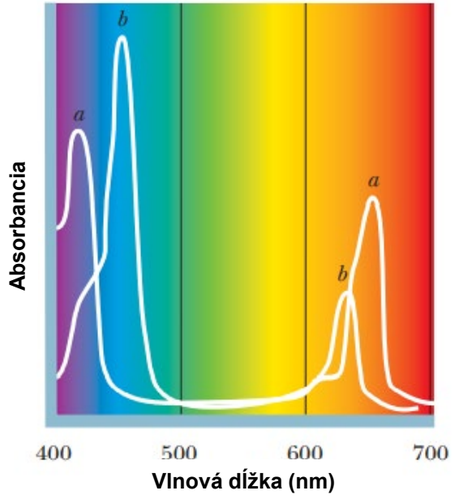
.Svetlo zbierajúci komplex obsahuje dodatočné molekuly chlorofylu a karotenoidov, ktoré prenášajú energiu do reakčného centra rezonančným transferom energie



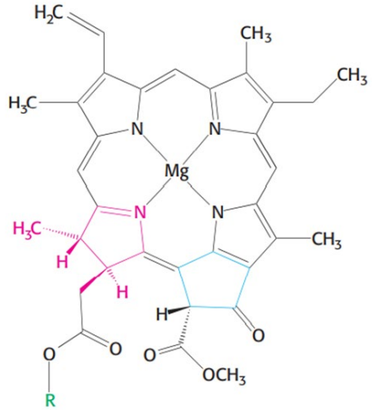
Prenos rezonančnej energie. (1) Elektrón môže prijímať energiu elektromagnetického žiarenia vhodnej vlnovej dĺžky a preskočiť do stavu s vyššou energiou. (2) Keď excitovaný elektrón prejde späť do stavu s nižšou energiou, absorbovaná energia sa uvoľní. (3) Uvoľnenú energiu môže absorbovať elektrón v blízkej molekule a tento elektrón sa dostane do excitovaného stavu.



Chlorofyl b

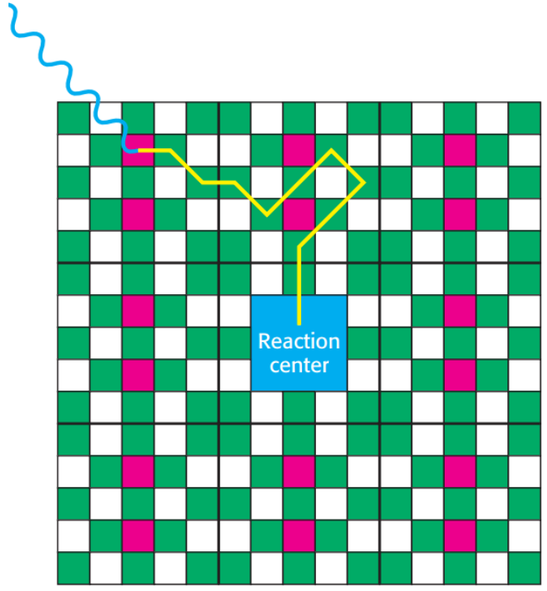


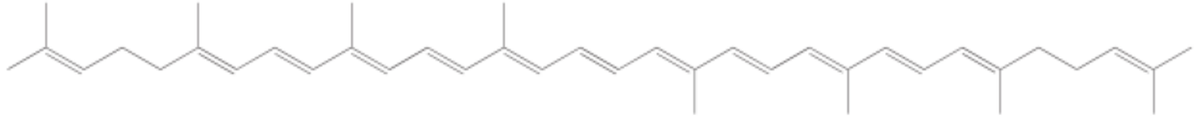
Absorpčné spektrá **chlorophylov a** a **b**.



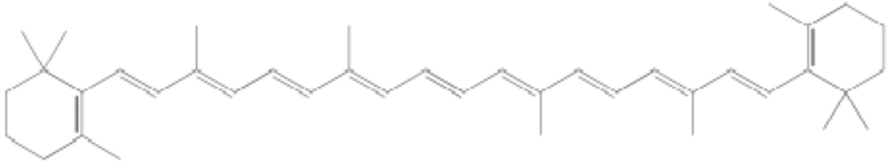
Chlorofyl a

Prenos energie z doplnkových pigmentov do reakčného centra. Svetelná energia absorbovaná prídavnými molekulami chlorofylu alebo inými pigmentami sa môže preniesť do reakčného centra, čo spôsobí fotoindukované oddelenie náboja. Zelené štvorčeky predstavujú prídavné molekuly chlorofylu a červené štvorce predstavujú molekuly karotenoidu; biele štvorce označujú proteín.



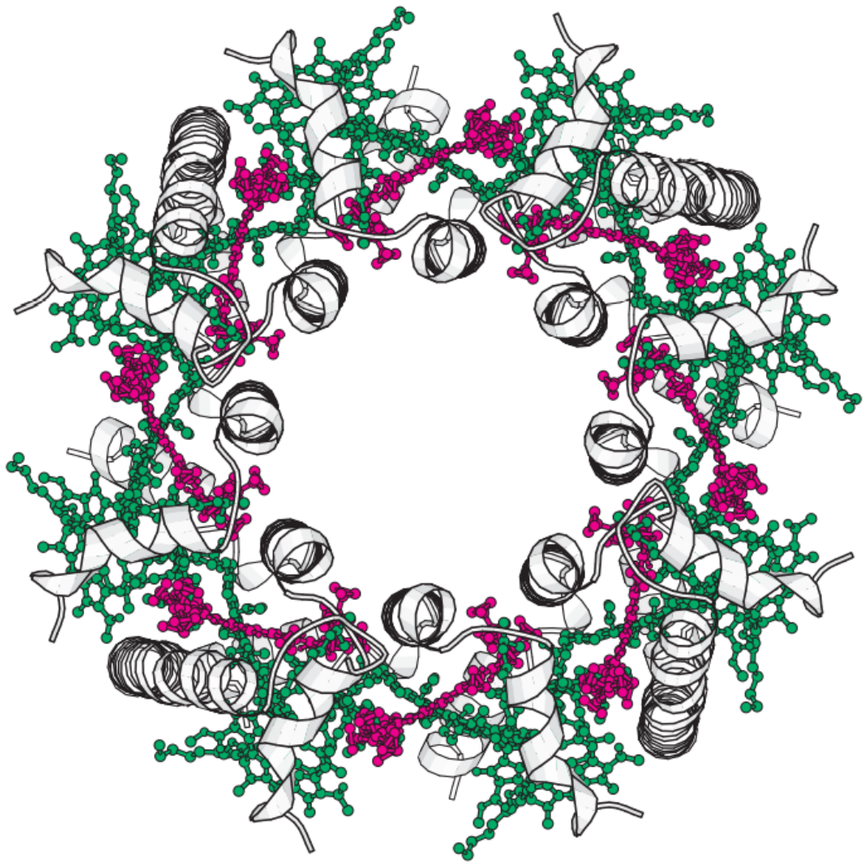


Lykopén

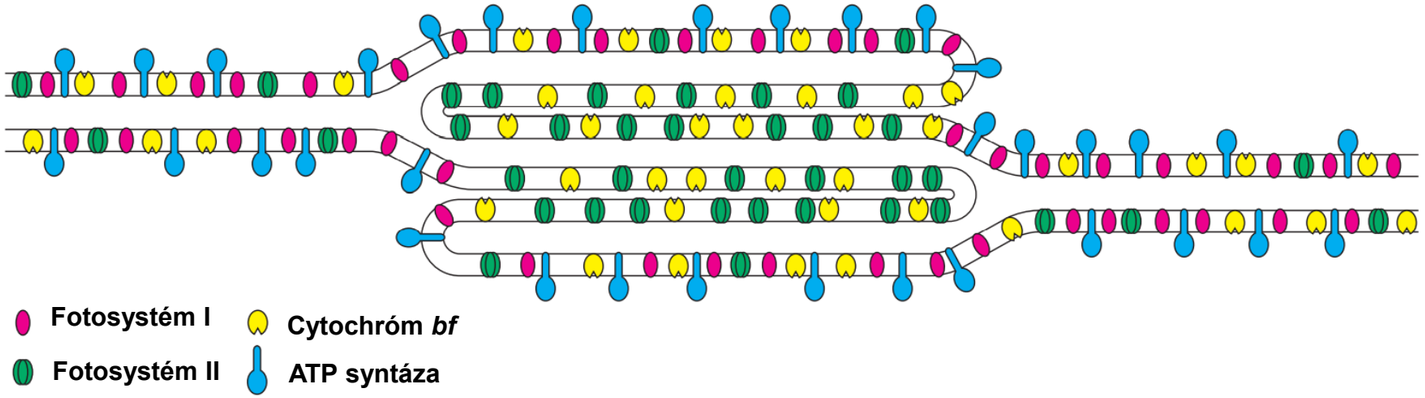


β-karotén

„LIGHT-HARVESTING“ SYSTEM – SVETLO-ZBIERAJÚCI SYSTÉM

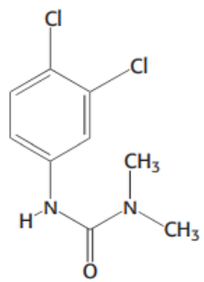


Štruktúra bakteriálneho LH komplexu. Osem polypeptidov, z ktorých každý viaže tri molekuly chlorofylu (zelená) a molekula karotenoidu (červená), obklopujú centrálnu dutinu, ktorá obsahuje reakčné centrum (nezobrazené). Všimnite si vysokú koncentráciu doplnkových pigmentov, ktoré obklopujú reakčné centrum. [Čerpané z 1LGH.pdb].

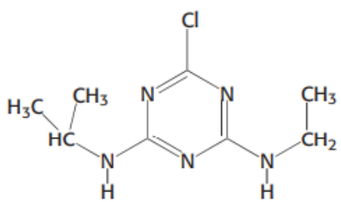


Umiestnenie komponentov fotosyntézy. Fotosyntetické systémy sú diferencovane distribuované v stohovaných (stlačených) a neskladaných (nestlačených) oblastiach tylakoidovej membrány [Kresba Dr. Jan M. Anderson and Dr. Bertil Andersson].

Mnohé herbicídy inhibujú svetelné reakcie fotosyntézy



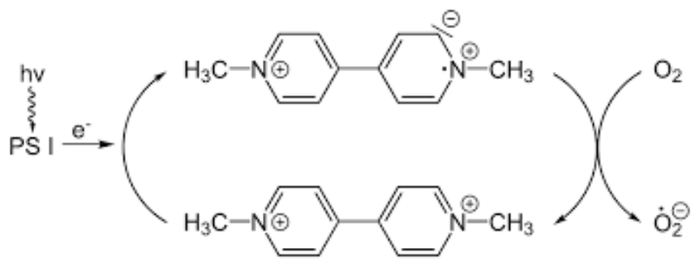
Diuron



Atrazin

Inhibítory fotosystému II zahŕňajú deriváty močoviny, ako je **diurón**, a triazínové deriváty, ako je **atrazín**. Tieto zlúčeniny sa viažu na Q_B miesto podjednotky D_1 fotosystému II a blokujú tvorbu plastochinolu (QH_2).

Fotosystém I - inhibítor paraquat.



ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať štruktúru chloroplastov
- Popísať procesy spojené s absorbciou svetelnej energie v bakteriálnom reakčnom centre a v chloroplastoch
- Vysvetliť úlohu fotosystému I a fototosystému II vo fotosyntéze
- Opísať Z-mechanizmus fotosyntézy
- Popísať úlohu LHC – svetlo-zbierajúceho komplexu

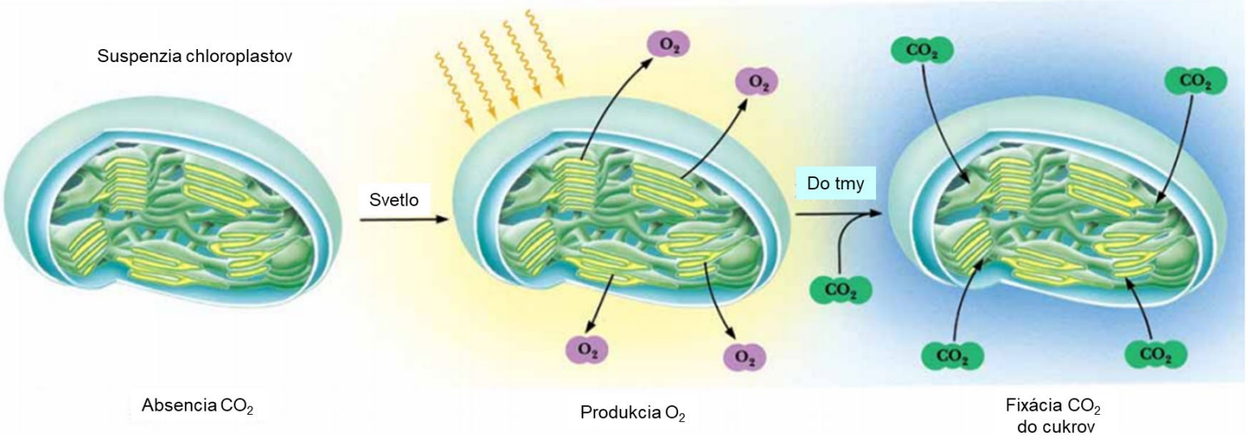
Fotosyntéza – tmavá fáza

10

Calvinov cyklus
Pentózofosfátová dráha

CALVINOV A PENTÓZOFOSFÁTOVÝ CYKLUS

Fotosyntetické procesy pozostávajú z 2 častí: (i) na svetle závislých reakcií a (ii) reakciách prebiehajúcich v tme



Pentózofosfátová dráha, hexóza-monofosfátová cesta, fosfoglukonátová cesta alebo pentózova výhybka (angl. shunt) sa vyskytuje vo všetkých organizmoch. Táto cesta poskytuje spôsob, pomocou ktorého je možné oxidovať glukózu za vzniku NADPH, všeobecne používané redukovadlo v bunkách. Fosforylová skupina na 2'-hydroxylovej skupine jednej z ribózových jednotiek NADPH odlišuje NADPH od NADH. Existuje zásadný rozdiel medzi NADPH a NADH v biochémii: NADH je oxidovaný dýchacím reťazcom, zatiaľ čo NADPH slúži ako reduktant v biosyntetických procesoch.

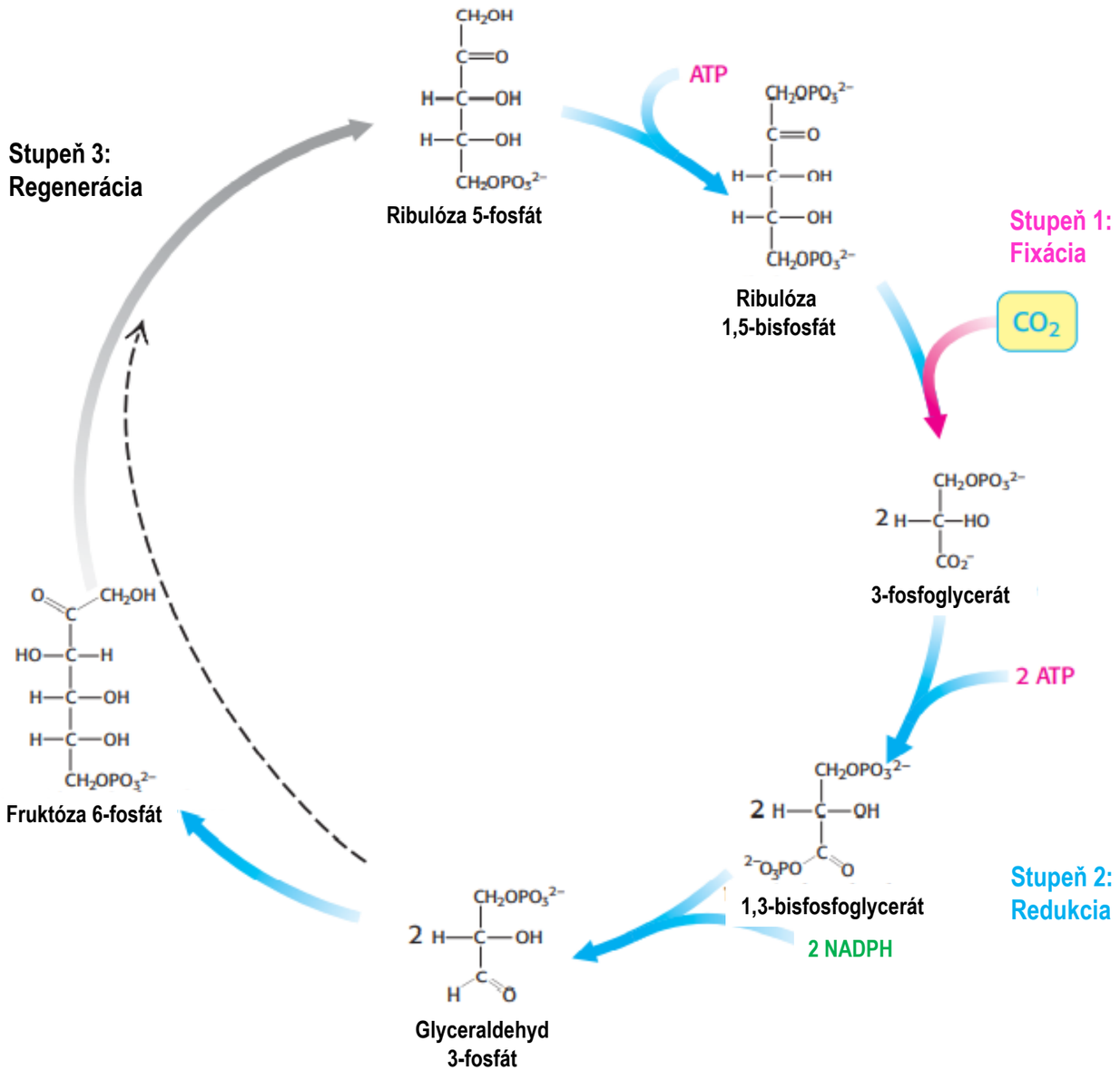
Svetelné reakcie transformujú energiu svetla na ATP a biosyntetickú redukčnú silu, NADPH. Tmavé reakcie používajú ATP a NADPH produkované svetelnými reakciami na redukciu atómov uhlíka z ich úplne oxidovaného stavu, oxidu uhličitý, na viac redukovaný stav, napr. hexóza. Oxid uhličitý sa tak zachytáva vo forme, ktorá je užitočná pre mnoho procesov. Spoločne svetelné reakcie a tmavé reakcie fotosyntézy spolupracujú na transformácii energie svetla na enrgiu uchovanú v molekulách obsahujúcich uhlík. Tmavé reakcie sa tiež nazývajú **Calvinov cyklus**, po Melvinovi Calvinovi, biochemikovi, ktorý objasnil túto dráhu. Zložky Calvinovho cyklu sa nazývajú tmavé reakcie, pretože priamo nezávisia od prítomnosti svetla.

Pentózofosfátová dráha môže byť tiež využívaná na katabolizmus pentózových cukrov z potravy, na syntézu pentózových cukrov pre biosyntézu nukleotidov a katabolizmus a syntézu menej obvyklých štvor- a sedem-uhlíkových cukrov. Pentózofosfátová dráha a Calvinov cyklus majú spoločných niekoľko enzýmov a medziproduktov, ktoré potvrdzujú evolučné príbuzenstvo. Rovnako ako glykolýza a glukoneogenéza sú tieto dráhy vzájomným zrkadlovým obrazom, Calvinov cyklus používa NADPH na redukciu oxidu uhličitého na generovanie hexóz, zatiaľ čo pentózofosfátová dráha štiepi glukózu na oxid uhličitý a tvorí sa NADPH.

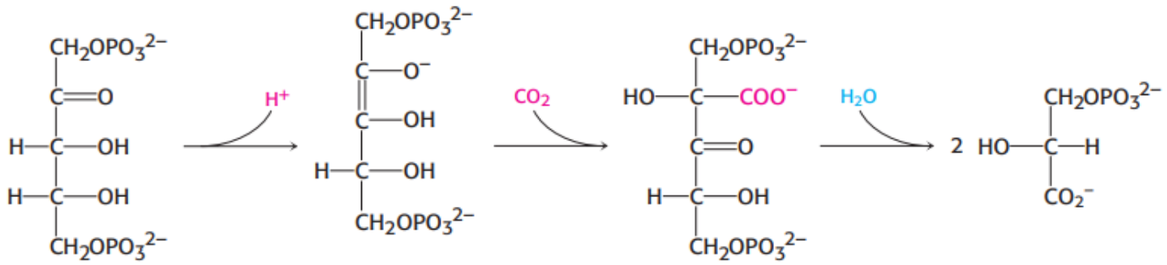
CALVINOV CYKLUS

Calvinov cyklus pozostáva z troch stupňov a odohráva sa v stróme chloroplastov:

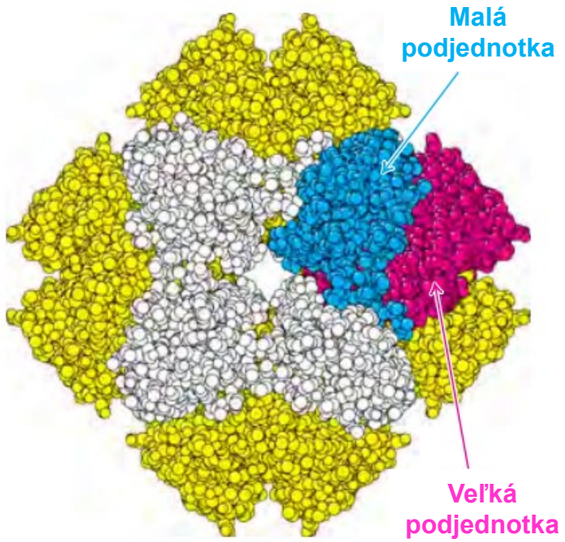
1. **Fixácia** CO_2 ribulóza 1,5-bisfosfátu za vzniku 2 molekúl 3-fosfoglycerátu,
2. **Redukcia** 3-fosfoglycerátu za vzniku hexózových cukrov,
3. **Regenerácia** ribulóza 1,5-bisfosfátu, aby sa ďalšie molekuly CO_2 mohli fixovať.



CALVINOV CYKLUS – 1. FIXÁCIA CO_2



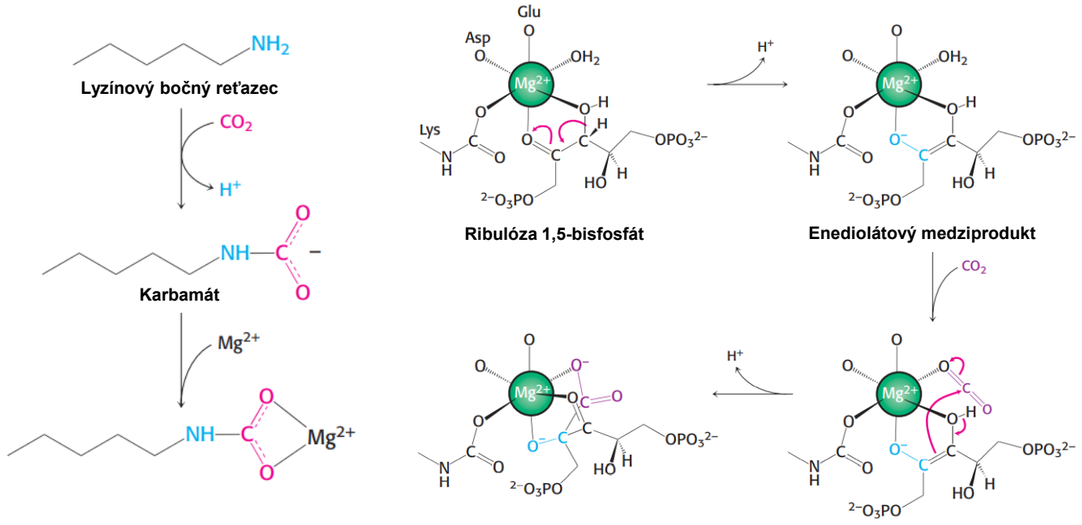
Reakcia katalyzovaná enzýmom **ribulóza 1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza** – ***Rubisco;*** **k_{cat} 3 s^{-1}.**



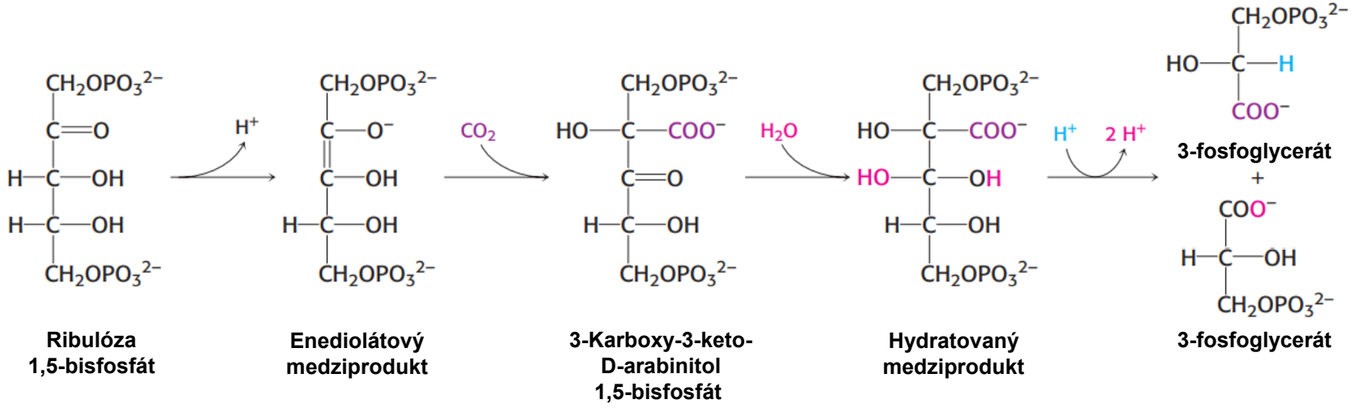
Štruktúra Rubisca. Enzým ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza (Rubisco) obsahuje osem veľkých podjednotiek (jedna je zobrazená červenou farbou a ostatné žltou farbou) a osem malých podjednotiek (jedna zobrazená modrou farbou a druhá bielou farbou). Aktívne miesta ležia vo veľkých podjednotkách. [Čerpané z 1RXO.pdb.]

Tento enzým je hojne zastúpený v chloroplastoch a predstavuje približne 30% celkového množstva proteínov v listoch v niektorých rastlinách. Rubisco je najrozšírenejší enzým a pravdepodobne aj najhojnejší proteín v biosfére.

Aktivita Rubisco závisí na **horčíku** a **karbamáte**



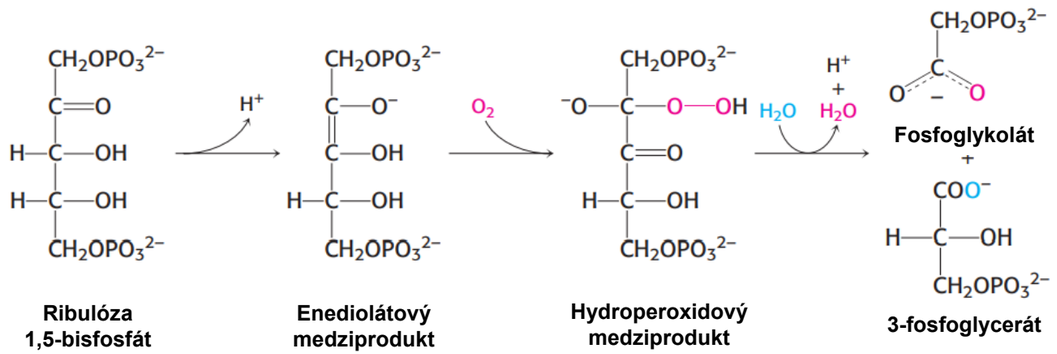
Úloha horčíkového iónu v mechanizme Rubisco. Ribulóza 1,5-bisfosfát sa viaže na ión horčíka, ktorý je viazaný na Rubisco cez glutamátový zvyšok, aspartátový zvyšok a lyzínkarbamát. Koordinovaný 1,5-bisfosfát ribulózy sa vzdáva protónu a vytvára reaktívne látky enediolátu, ktoré reagujú s CO_2 za vzniku novej väzby uhlík-uhlík.



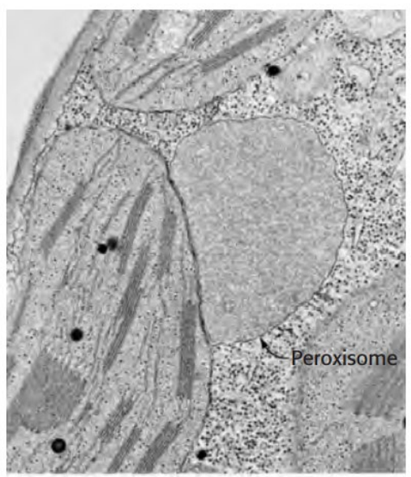
Tvorba 3-fosfoglycerátu. Celková cesta premeny ribulózy 1,5-bisfosfátu a CO_2 na dve molekuly 3-fosfoglycerátu. Aj keď sú jednotlivé molekuly zobrazené ako voľné druhy, tieto kroky prebiehajú na ióne horčíka.

RUBISCO KATALYZUJE ZBYTOČNÚ REAKCIU: KATALYTICKÁ NEDOKONALOSŤ (?)

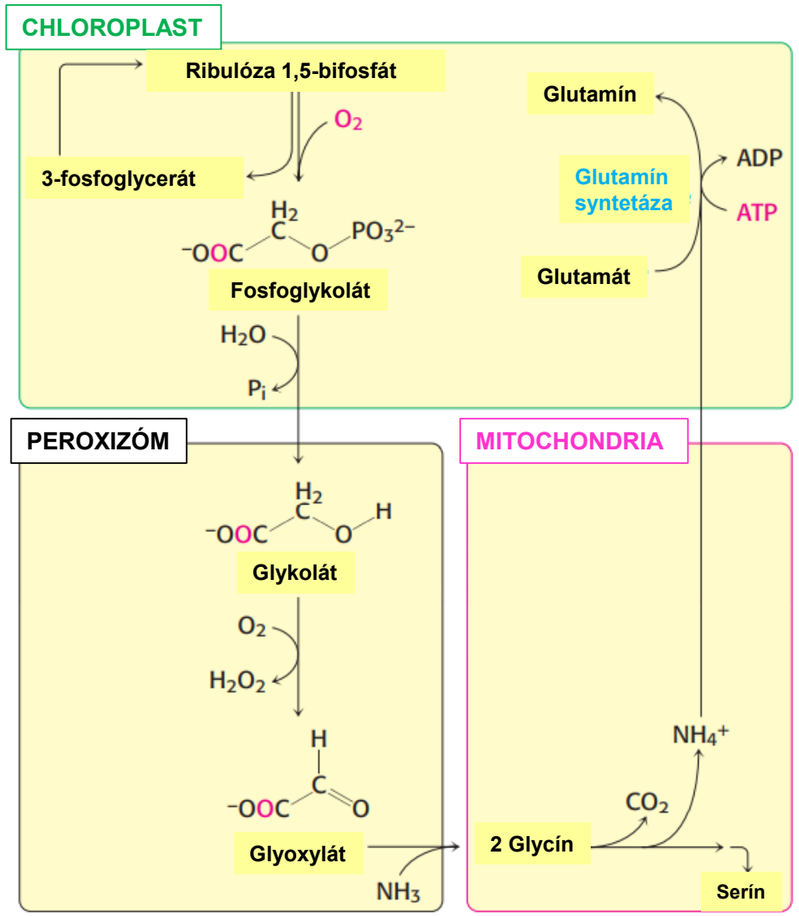
Rýchlosť karboxyláznej reakcie je 4x rýchlejšia ako oxygenáznej reakcie za normálnych atmosférických podmienok pri 25 °C; stromálna koncentrácia CO_2 je vtedy 10 μM a O_2 je 250 μM.



Zbytočná vedľajšia reakcia. Reaktívny enediolátový medziprodukt na Rubiscu tiež reaguje s molekulárnym kyslíkom za vzniku hydroperoxidového medziproduktu, ktorý potom vedie k tvorbe jednej molekuly 3-fosfoglycerátu a jednej molekuly fosfoglykolátu.

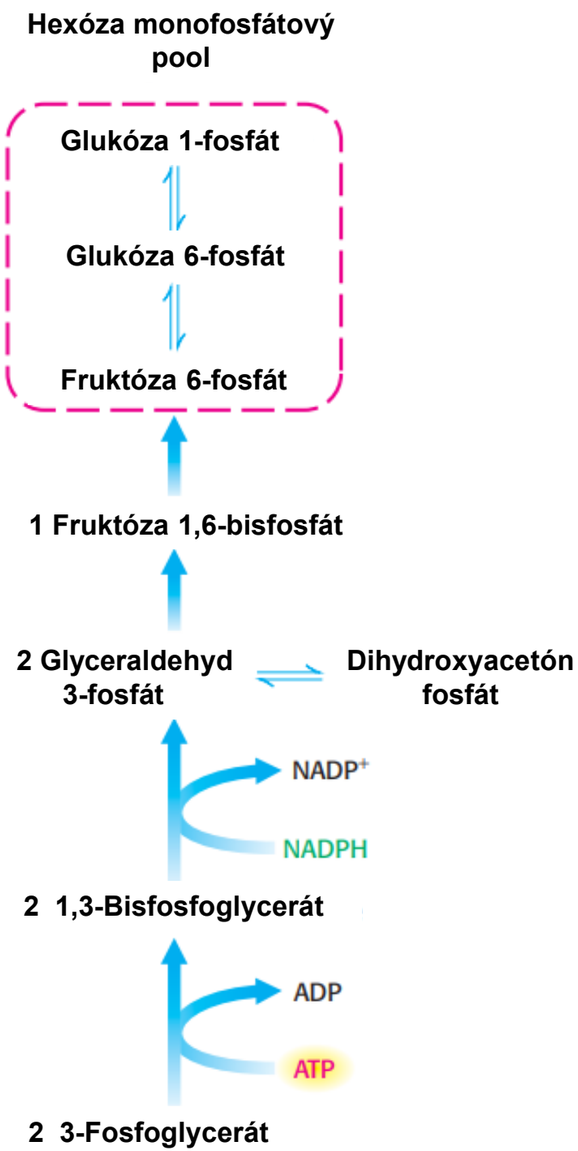


Elektrónová mikrofotografia **peroxizómu** zasadeného medzi dvoma chloroplastmi. [Dr. Sue Ellen Frederick.]



Fotorespiračné reakcie. Fosfoglykolát sa vytvára ako produkt oxygenázovej reakcie v chloroplastoch. Po defosforylácii sa glykolát transportuje do peroxizómov, kde sa prevedie na glyoxylát a potom na glycín. V mitochondriách sa dva glycíny prevedú na serín po strate uhlíka vo forme CO_2 a amónneho iónu. Amónny ión je zachránený v chloroplastoch.

HEXÓZA FOSFÁTY SÚ VYTVORENÉ Z FOSFOGLYCERÁTU

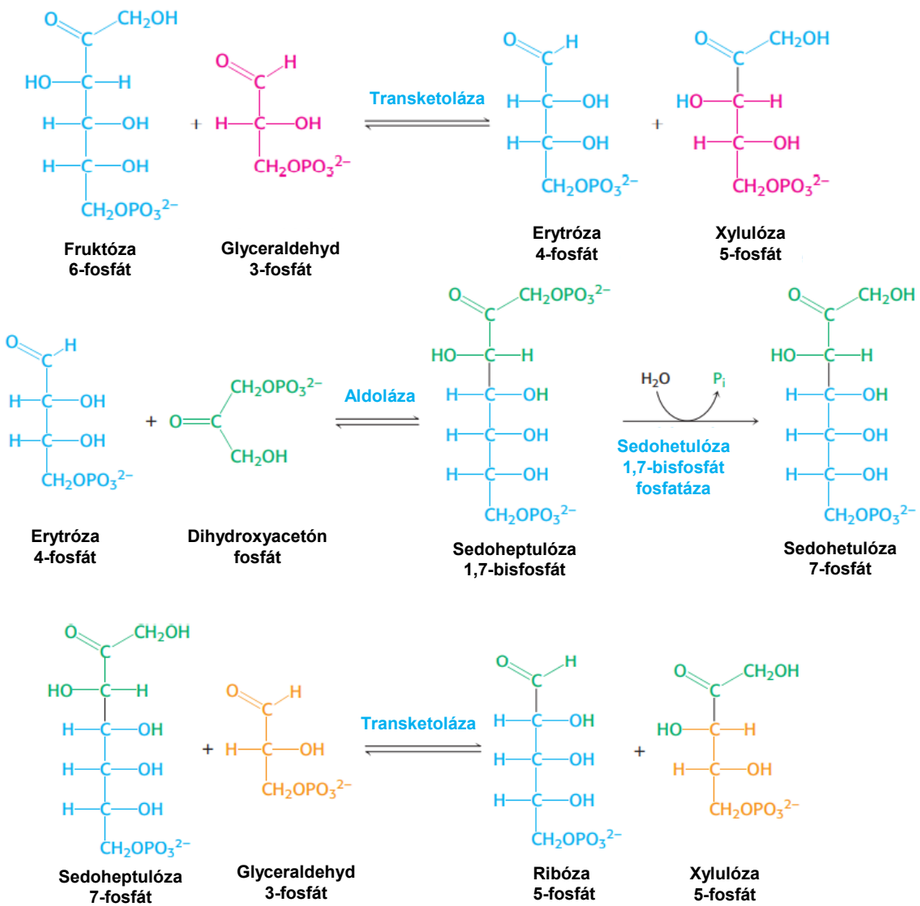


Tvorba hexóza fosfátu. 3-fosfoglycerát sa premieňa na fruktóza-6-fosfát cestou paralelnou s glukoneogenézou.

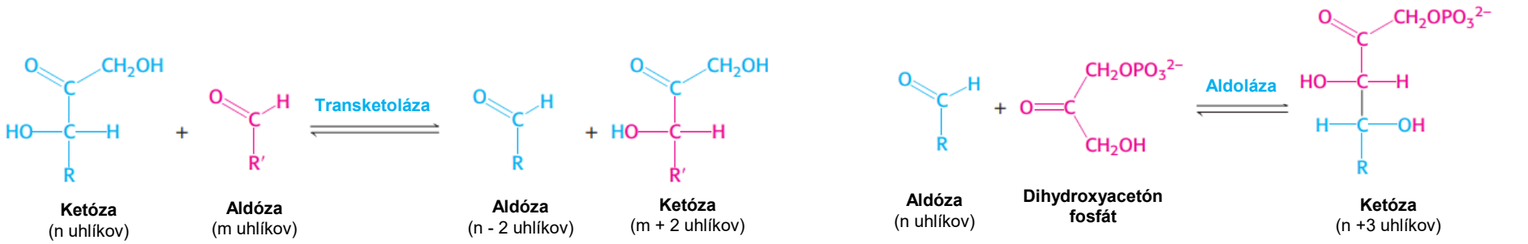
Tieto reakcie a reakcie katalyzované Rubiscom dostávajú CO_2 na úroveň hexózy, premieňajúc tak CO_2 na energeticky bohaté chemické molekuly, na úkor NADPH a ATP, ktoré sú generované zo svetelných reakcií.

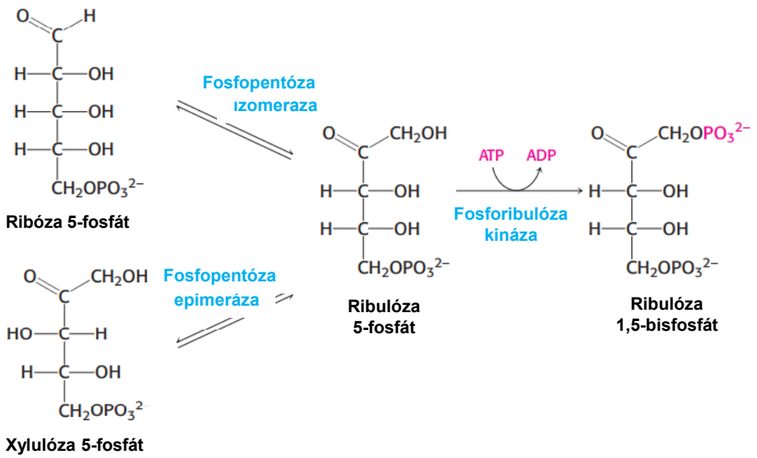
REGENERÁCIA RIBULÓZA 1,5-BISFOSFÁTU

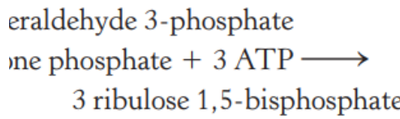
Ako vytvoriť 5-uhlíkový cukor zo 6-uhlíkového a 3-uhlíkového cukra?



Tvorba päťuhlíkových cukrov. Najskôr transketoláza prevádza šesťuhlíkový cukor a trojuhlíkový cukor na štvoruhlíkový a päťuhlíkový. Potom aldoláza kombinuje štvoruhlíkový produkt a trojuhlíkový cukor za vzniku sedemuhlíkového cukru. Nakoniec tento sedemuhlíkový cukor reaguje s ďalším trojuhlíkovým cukrom za vzniku ďalších dvoch päťuhlíkových cukrov.





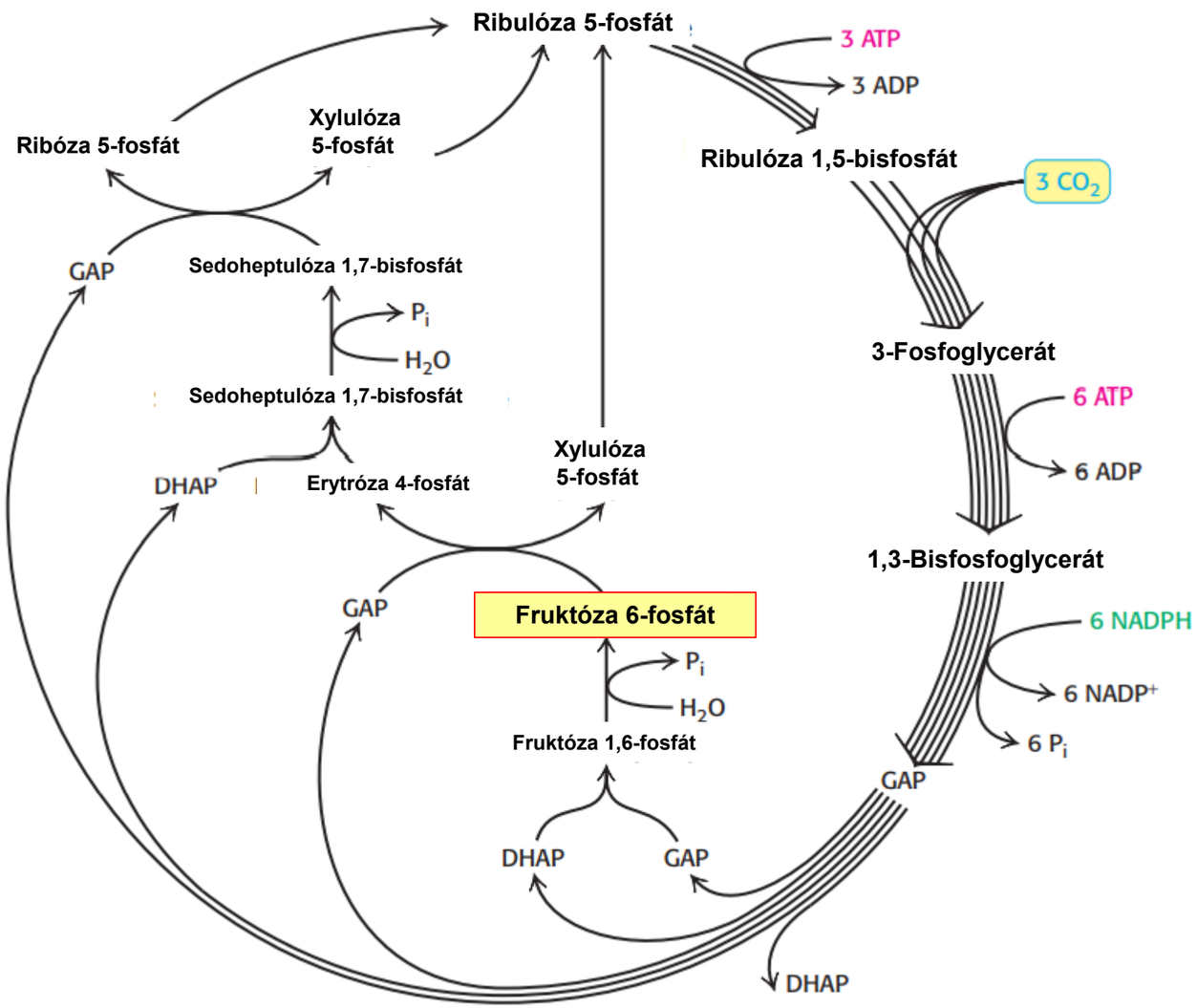


Regenerácia 1,5-bisfosfátu ribulózy. Aj ribóza-5-fosfát, aj xylulóza-5-fosfát sa premieňajú na ribulóza-5-fosfát, ktorý sa potom fosforyluje a dokončuje tak regeneráciu 1,5-bisfosfátu ribulózy.

Sumárna reakcia:

Fruktóza 6-fosfát + 2 Glyceraldehyd 3-fosfát + Dihydroxyacetón fosfát + 3 ATP
→ 3 Ribulóza 1,5-bisfosfát + 3 ADP

CALVINOV CYKLUS – SCHEMATICKÉ ZNÁZORNENIE



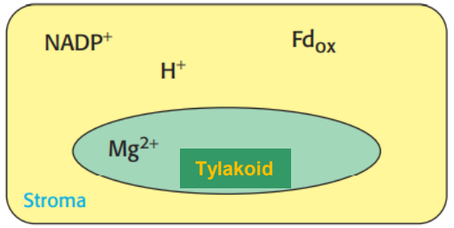
Výslednú chemická rovnica pre Calvinov cyklus má tvar:

$$6\ CO_2 + 18\ ATP + 12\ NADPH + 12\ H2O \rightarrow C6H12O6 + 18\ ADP + 18\ Pi + 12\ NADP+ + 6\ H+$$

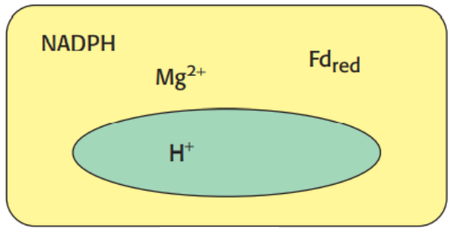
Spotrebované sú tri molekuly ATP a dve molekuly NADPH na inkorporáciu jednej molekuly CO_2 do hexózy, ako je glukóza alebo fruktóza.

AKTIVITA CALVINOVHO CYKLU ZÁVISÍ NA PODMIENKACH

Rubisco je aktivované svetlom-indukovanými zmenami v koncentrácii protónov a horčíkových iónov



TMA



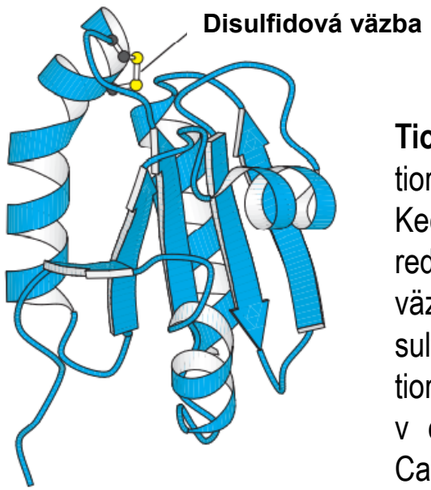
SVETLO

Regulácia Calvinovho cyklu svetlom. Svetelné reakcie fotosyntézy prenášajú elektróny z tylakoidného lumenu do strómy a prenášajú protóny zo strómy do tylakoidného lumenu. V dôsledku týchto procesov sú koncentrácie NADPH, redukovaného ferredoxínu (Fd) a Mg^{2+} v stróme vyššie na svetle ako v tme, zatiaľ čo koncentrácia H^+ je v tme nižšia. Každá z týchto koncenztračbých zmien pomáha spájať reakcie Calvinovho cyklu so svetelnými reakciami.

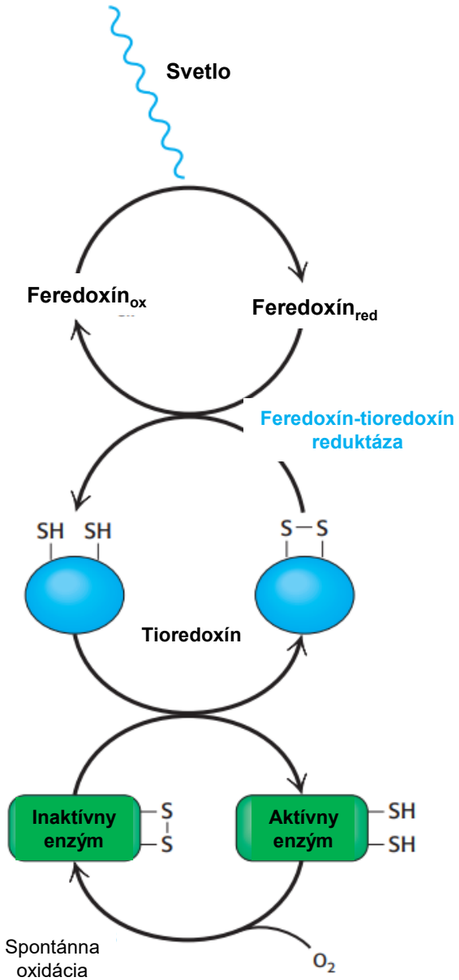
Tioredoxín hrá kľúčovú úlohu v regulácii Calvinovho cyklu

Enzýmy regulované tioredoxínom

Enzým	Metabolická dráha
Rubisco	Fixácia uhlíka v Calvinovom cykle
Fruktóza 1,6-bisfosfatáza	Glukoneogenéza
Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	Calvinov cyklus, Glukoneogenéza, Glykolýza
Sedoheptulóza 1,7-bisfosfatáza	Calvinov cuklus
Glukóza 6-fosfát dehydrogenáza	Pentózofosfátová dráha
Fenylalanín amoniakálna lyáza	Syntéza lignínu
Fosforibulóza kináza	Calvinov cyklus
$NADP^+$-malát dehydrogenáza	C_4 dráha



Tioredoxín. Oxidovaná forma tioredoxínu obsahuje disulfidovú väzbu. Keď sa tioredoxín redukuje redukovaným ferredoxínom, disulfidová väzba sa prevedie na dve voľné sulfhydrylové skupiny. Redukovaný tioredoxín môže štiepiť disulfidové väzby v enzýmoch, aktivovať určité enzýmy Calvinovho cyklu a deaktivovať niektoré degradačné enzýmy [F9M.pdb.]

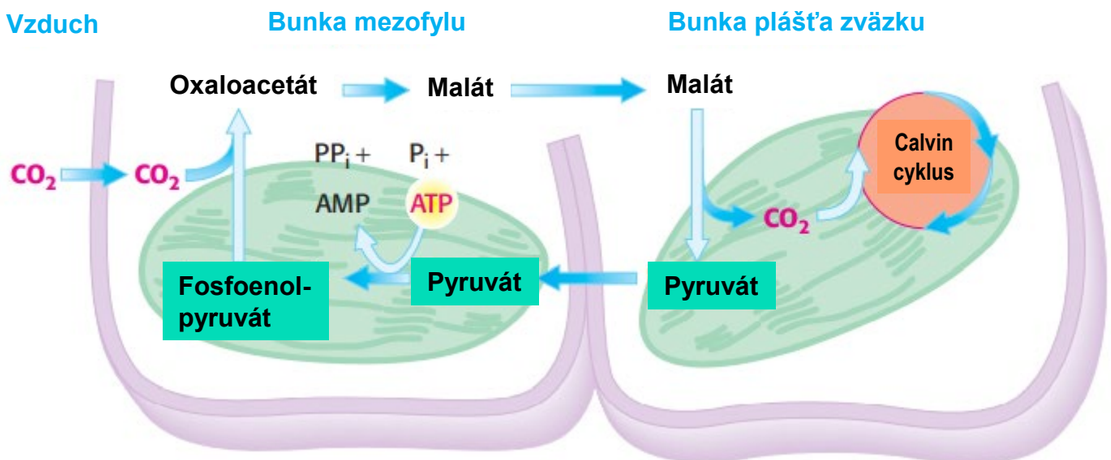


Aktivácia enzýmu tioredoxínom. Redukovaný tioredoxín aktivuje určité enzýmy Calvinovho cyklu štiepením regulačných disulfidových väzieb.

C_4 DRÁHA V TROPICKÝCH RASTLINÁCH AKCELERUJE FOTOSYNTÉZU KONCENTROVANÍM CO_2

Zlúčeniny so štyrmi uhlíkmi (C_4), ako sú oxaloacetát a malát, prenášajú CO_2 z mezofylových buniek, ktoré sú v kontakte so vzduchom, do buniek plášťa, ktoré sú hlavnými miestami fotosyntézy. Bunky mezofylu a plášťa zväzku majú štrukturne a funkčne odlišné chloroplasty. Bunky mezofylu majú tenké bunkové steny a náhodne usporiadané chloroplasty s naskladanými tylakoidmi. Nemajú škrobové granule. Na druhej strane majú bunky plášťa zväzku hrubé bunkové steny a odstredivo usporiadané chloroplasty s veľkými škrobovými granulami.
Reakciu C_4 dráhy je možné popísať nasledovne:

$$CO_2 \text{ (bunka mezofylu)} + ATP + 2\ H_2O \rightarrow CO_2 \text{ (bunka plášťa zväzku)} + AMP + 2\ P_i + 2\ H^+$$

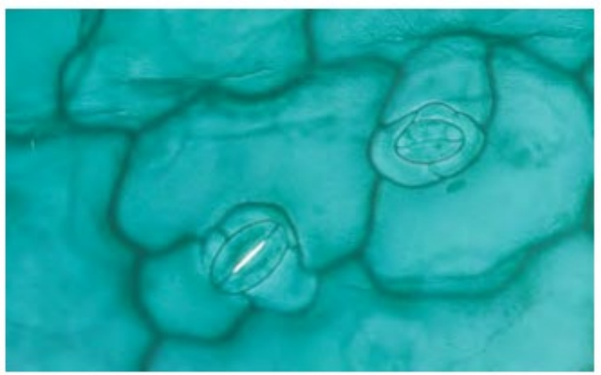


Keď dráha C_4 a Calvinov cyklus fungujú spoločne, výsledná reakcia je:

$$6\ CO_2 + 30\ ATP + 12\ NADPH + 24\ H_2O \rightarrow C_6H_{12}O6 + 30\ ADP + 30\ P_i + 12\ NADP^+ + 18\ H^+$$

30 molekúl ATP sa spotrebuje na vytvorenie molekuly hexózy, keď dráha C_4 dodáva CO_2 do Calvinovho cyklu, na rozdiel od 18 molekúl ATP, ktoré sa využívajú na tvorbu molekulu hexózy v neprítomnosti dráhy C4.

Mnoho rastlín rastúcich v horúcom a suchom podnebí uchováva prieduchy svojich listov zatvorené v horúčave dňa, aby sa zabránilo strate vody. Dôsledkom je, že CO_2 nemôže byť absorbovaný počas denného svetla, ak je potrebný na syntézu glukózy. CO_2 skôr vstupuje do listu, keď sú prieduchy otvorené pri chladnejších nočných teplotách. Na uloženie CO_2, až kým nebude možné ho použiť,, využívajú rastliny adaptáciu zvanú **crassulacean acid metabolizmus** (CAM), pomenovanú podľa rodu *Crassulacea* (sukulenty). Oxid uhličitý je cestou C_4 fixovaný na malát, ktorý je skladovaný vo vakuolách. Počas dňa je malát dekarboxylovaný a CO_2 sa stane dostupným pre Calvinov cyklus. Na rozdiel od rastlín C_4, CAM rastliny oddeľujú CO_2 akumuláciu od CO_2 využitia v čase a nie v priestore.



Elektrónový mikrograf otvorenej a zatvorenej strómy
[Herb Charles Ohlmeyer/Fran Heyl Associates.]

PENTÓZOFOSFÁTOVÁ DRÁHA

Pentózofosfátová dráha je rozhodujúcim zdrojom NADPH pre použitie pri reduktívnej biosyntéze, ako aj na ochranu pred oxidačným stresom. Táto cesta pozostáva z dvoch fáz: (1) oxidačná tvorba NADPH a (2) neoxidačná vzájomná premena cukrov.

Dráhy vyžadujúce NADPH:

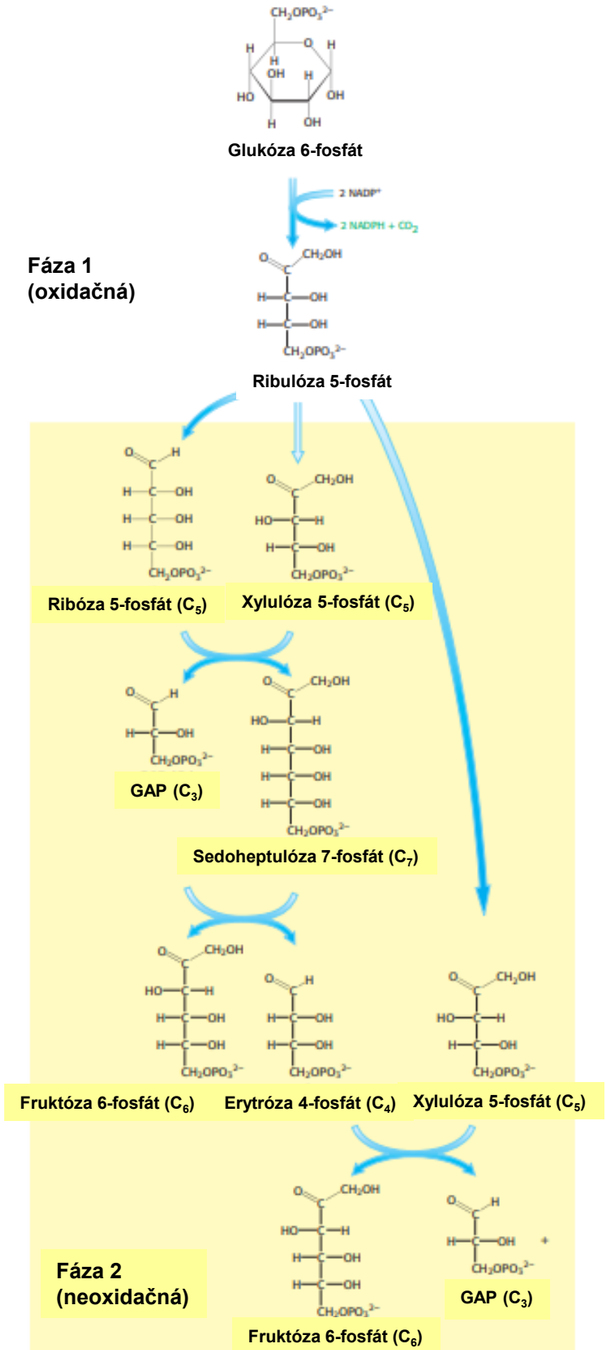
Syntéza
Biosyntéza mastných kyselín
Biosyntéza cholestreolu
Biosyntéza neurotransmiterov
Biosyntéza nukleových kyselín
Detoxifikácia
Redukcia oxidovaného glutatiónu
Cytochróm P450 monooxygenázy

V oxidačnej fáze sa NADPH vytvára, keď sa glukóza 6-fosfát oxiduje na ribulózu-5-fosfát, ktorý je následne premenený na ribóza-5-fosfát. Ribóza-5-fosfát a jeho deriváty sú zložkami RNA a DNA, ako aj ATP, NADH, FAD a koenzýmu A.

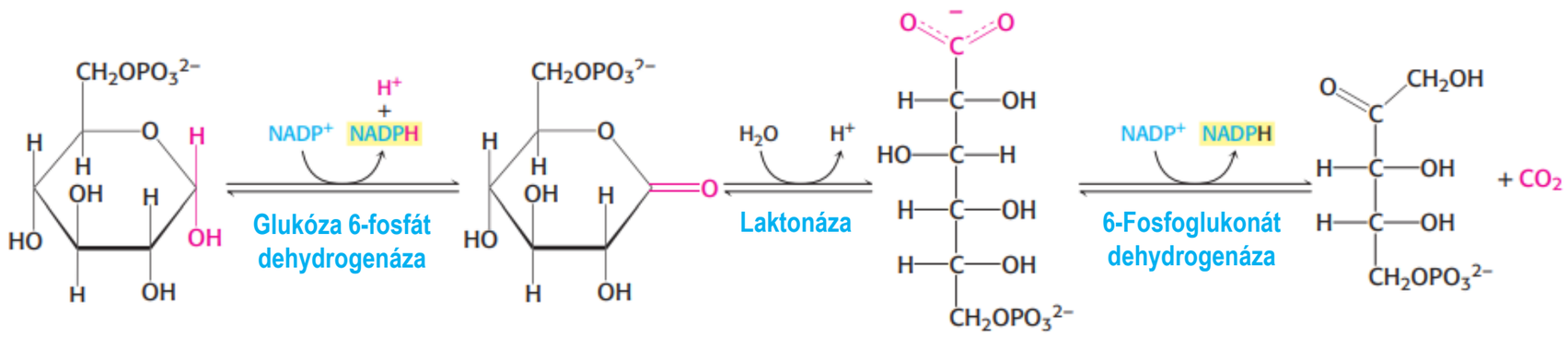
Fáza 1 – oxidačná:

$$\text{Glukóza 6-fosfát} + 2\ NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{Ribulóza 5-fosfát} + 2\ NADPH + 2\ H^+ + CO_2$$

V neoxidačnej fáze katalyzuje dráha interkonverziu troj-, štvor-, päť-, šesť- a sedem-uhlíkových cukrov v sérii neoxidačných reakcií. Nadbytok päť-uhlíkových cukrov sa môže premeniť na medziprodukty glykolytickej cesty. Všetky tieto reakcie prebiehajú v cytoplazme. Tieto premeny využívajú rovnaké reakcie, ktoré vedú k regenerácii ribulózy 1,5-bisfosfátu v Calvinovom cykle.

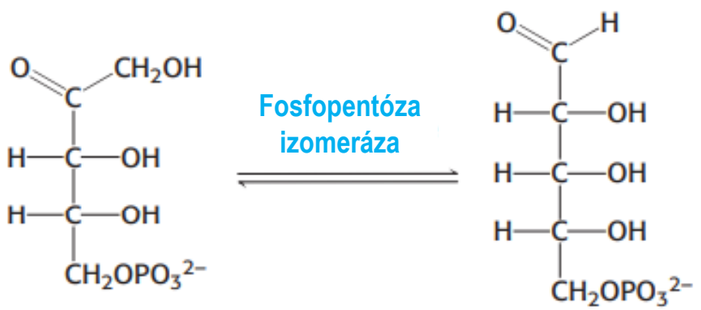


PENTÓZOFOSFÁTOVÁ DRÁHA – 1.FÁZA - OXIDAČNÁ



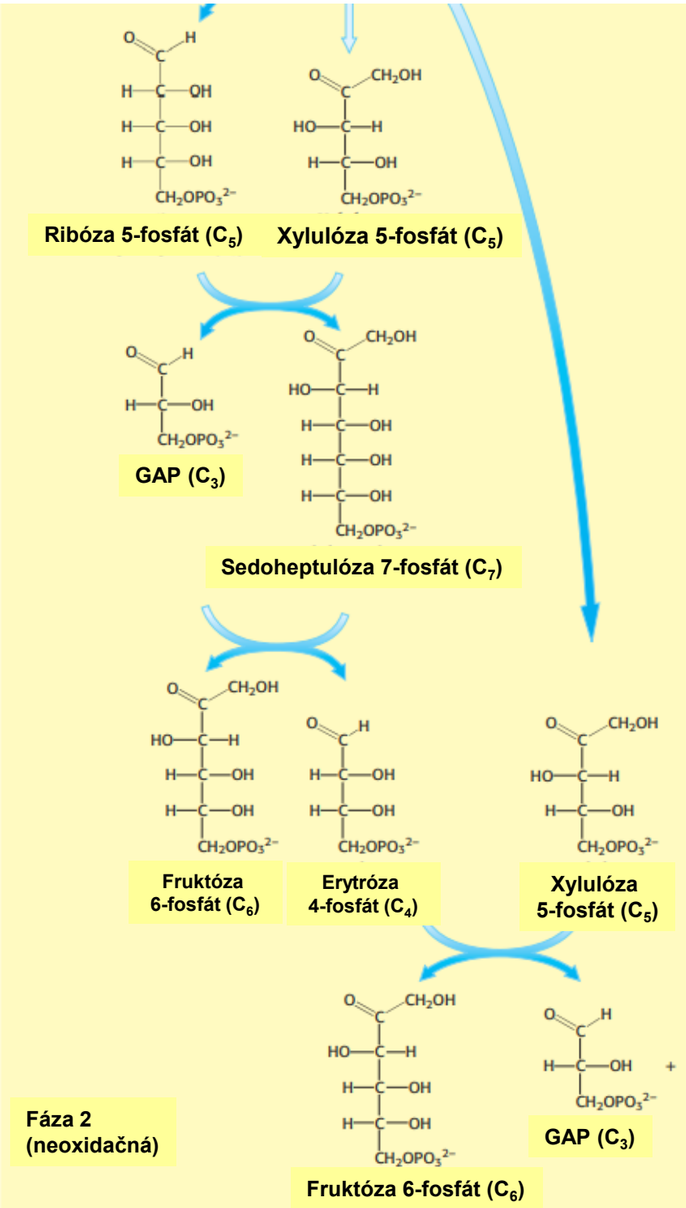
Glukóza 6-fosfát **6-Fosfoglukono-δ-laktón** **6-Fosfo-glukonát** **Ribulóza 5-fosfát**

Oxidačná fáza dráhy pentózofosfátu. Glukóza-6-fosfát sa oxiduje na 6-fosfoglukono-δ-laktón za vzniku jednej molekuly NADPH. Laktónový produkt je hydrolyzovaný na 6-fosfoglukonát, ktorý je oxidačne dekarboxylovaný na ribulóza-5-fosfát za vzniku molekuly NADPH.



Ribulóza 5-fosfát **Ribóza 5-fosfát**

PENTÓZOFOSFÁTOVÁ DRÁHA – 2.FÁZA - NEOXIDAČNÁ



Ribulóza 5-fosfát — Xylulóza 5-fosfát

$$C_5 + C_5 \xrightleftharpoons{\text{Transketoláza}} C_3 + C_7$$

$$C_3 + C_7 \xrightleftharpoons{\text{Transaldoláza}} C_6 + C_4$$

$$C_4 + C_5 \xrightleftharpoons{\text{Transketoláza}} C_6 + C_3$$

Čistým výsledkom týchto reakcií je tvorba dvoch hexóz a jednej triózy z troch pentóz:

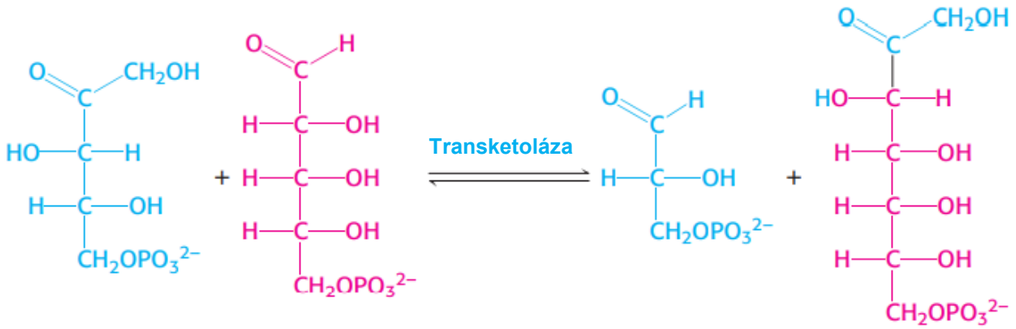
$$3\,C_5 \rightleftharpoons 2\,C_6 + C_3$$

Sumárnu reakciu je možné zapísať nasledovne:

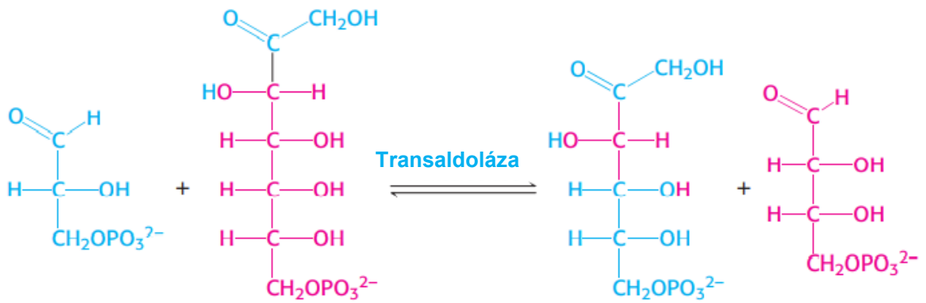
2 Xylulóza 5-fosfát + Ribóza 5-fosfát $\rightleftharpoons$ 2 Fruktóza 6-fosfát + Glyceraldehyd 3-fosfát

alebo

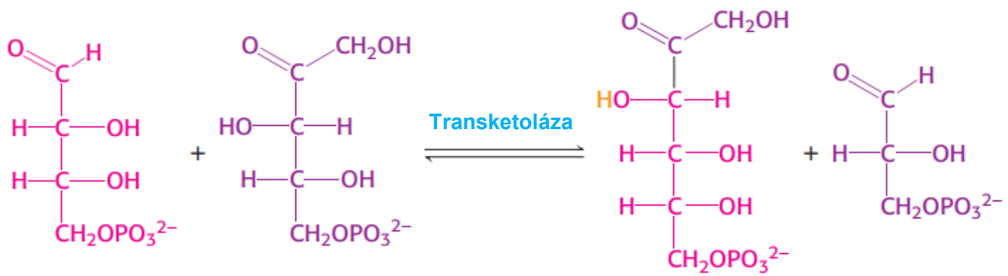
3 Ribóza 5-fosfát $\rightleftharpoons$ 2 Fruktóza 6-fosfát + Glyceraldehyd 3-fosfát



Xylulóza 5-fosfát + Ribóza 5-fosfát $\rightleftharpoons$ Glyceraldehyd 3-fosfát + Sedoheptulóza 7-fosfát



Glyceraldehyd 3-fosfát + Sedoheptulóza 7-fosfát $\rightleftharpoons$ Fruktóza 6-fosfát + Erytróza 4-fosfát



Erytróza 4-fosfát + Xylulóza 5-fosfát $\rightleftharpoons$ Fruktóza 6-fosfát + Glyceraldehyd 3-fosfát

PENTÓZOFOSFÁTOVÁ DRÁHA - ZHRNUTIE

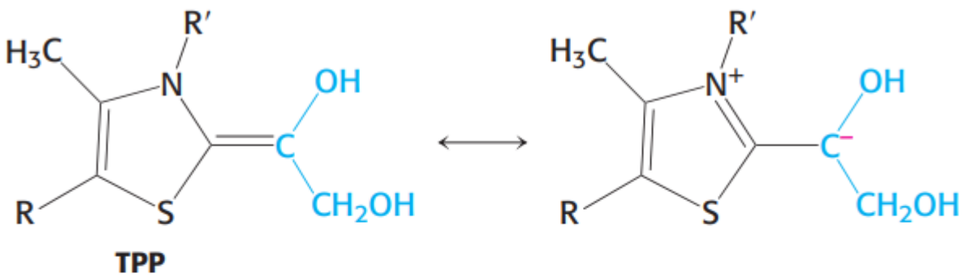
Reakcia	Enzým
Oxidačná fáza	
Glukóza 6-fosfát + $NADP^+ \rightarrow$ 6-Fosfoglukono-δ-laktón + NADPH + H^+	Glukóza 6-fosfát dehydrogenáza
6-Fosfoglukono-δ-laktón + $H_2O \rightarrow$ 6-Fosfoglukonát + H^+	Laktonáza
6-Fosfoglukonát + $NADP^+ \rightarrow$ Ribulóza-5-fosfát + CO_2 + H^+	6-Fosfoglukonát dehydrogenáza
Neoxidačná fáza	
Ribulóza 5-fosfát ↔ Ribóza 5-fosfát	Fosfopentóza izomeráza
Ribulóza 5-fosfát ↔ Xylulóza 5-fosfát	Fosfopentóza epimeráza
Xylulóza 5-fosfát + Ribóza 5-fosfát ↔ Sedoheptulóza 7-fosfát + Glyceraldehyd 3-fosfát	Transketoláza
Sedoheptulóza 7-fosfát + Glyceraldehyd 3-fosfát ↔ Fruktóza 6-fosfát + Erytróza 4-fosfát	Transaldoláza
Xylulóza 5-fosfát + Erytróza 4-fosfát ↔ Fruktóza 6-fosfát + Glyceraldehyd 3-fosfát	Transketoláza

Tkanivá s aktívnou pentózofosfátovou dráhou

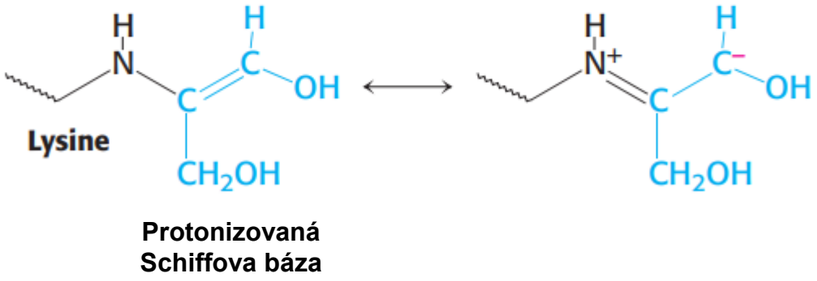
Tkanivo	**Funkcia**
Adrenálna žľaza	Syntéza steroidov
Pečeň	Syntéza mastných kyselín a cholesterolu
Semeníky	Syntéza steroidov
Tukové tkanivo	Syntéza mastných kyselín
Vaječníky	Syntéza steroidov
Prsná žľaza	Syntéza mastných kyselín
Červená krvinka	Redukcia glutatiónu

TRANSKETOLÁZA A TRANSALDOLÁZA

Transketoláza a **transladoláza** stabilizujú karbaniónový intermediát rozdielnymi (ale podobnými) mechanizmami



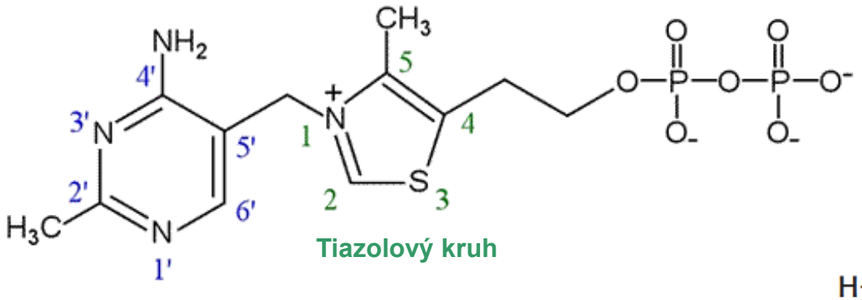
2 uhlíkový transport

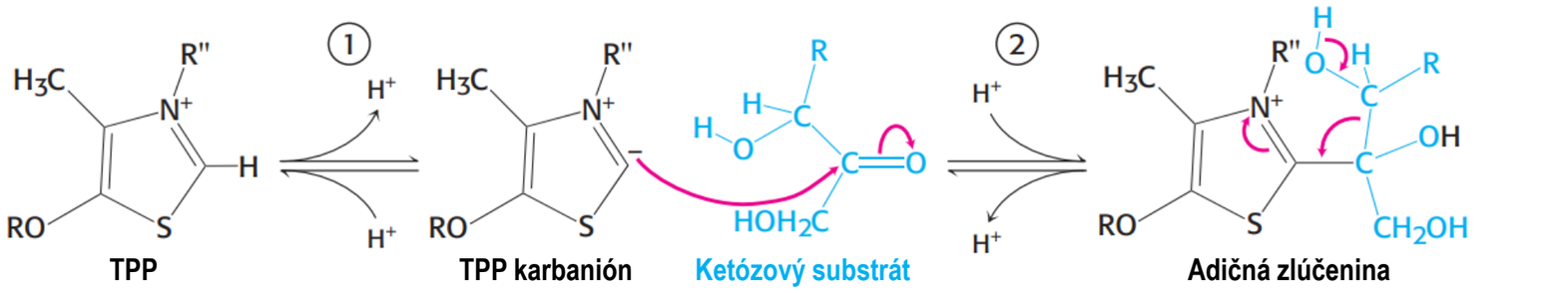


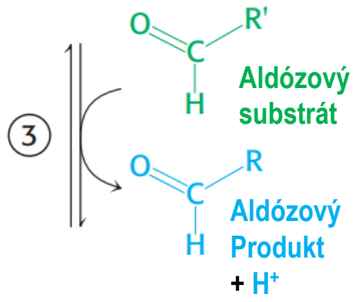
3 uhlíkový transport

Karbaniónové medziprodukty. Pre **transketolázu** a **transaldolázu** je karbaniónový medziprodukt stabilizovaný rezonanciou. V transketoláze stabilizuje tento medziprodukt TPP; v transaldoláze hrá túto úlohu protnizovaná Schiffova báza.

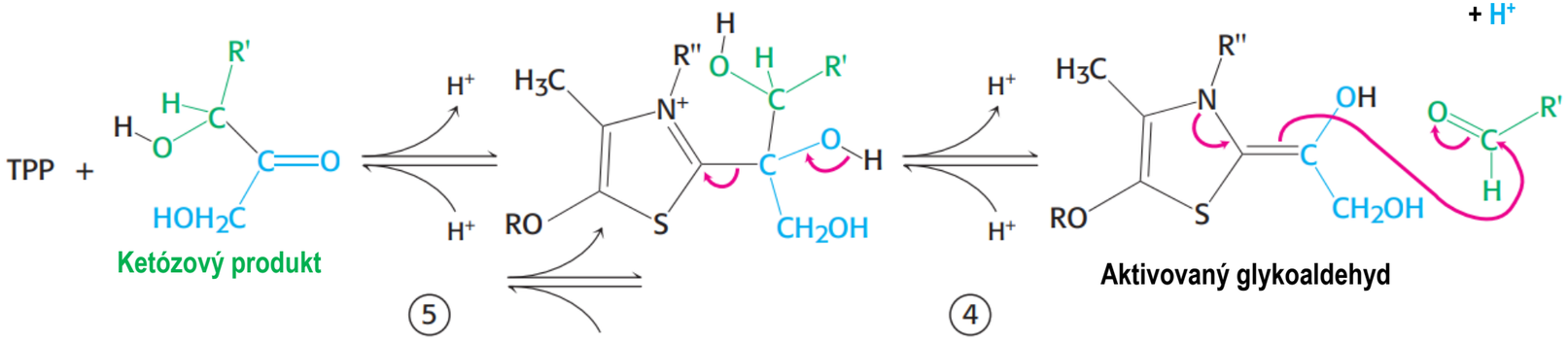
MECHANIZMUS PÔSOBENIA TRANSKETOLÁZY



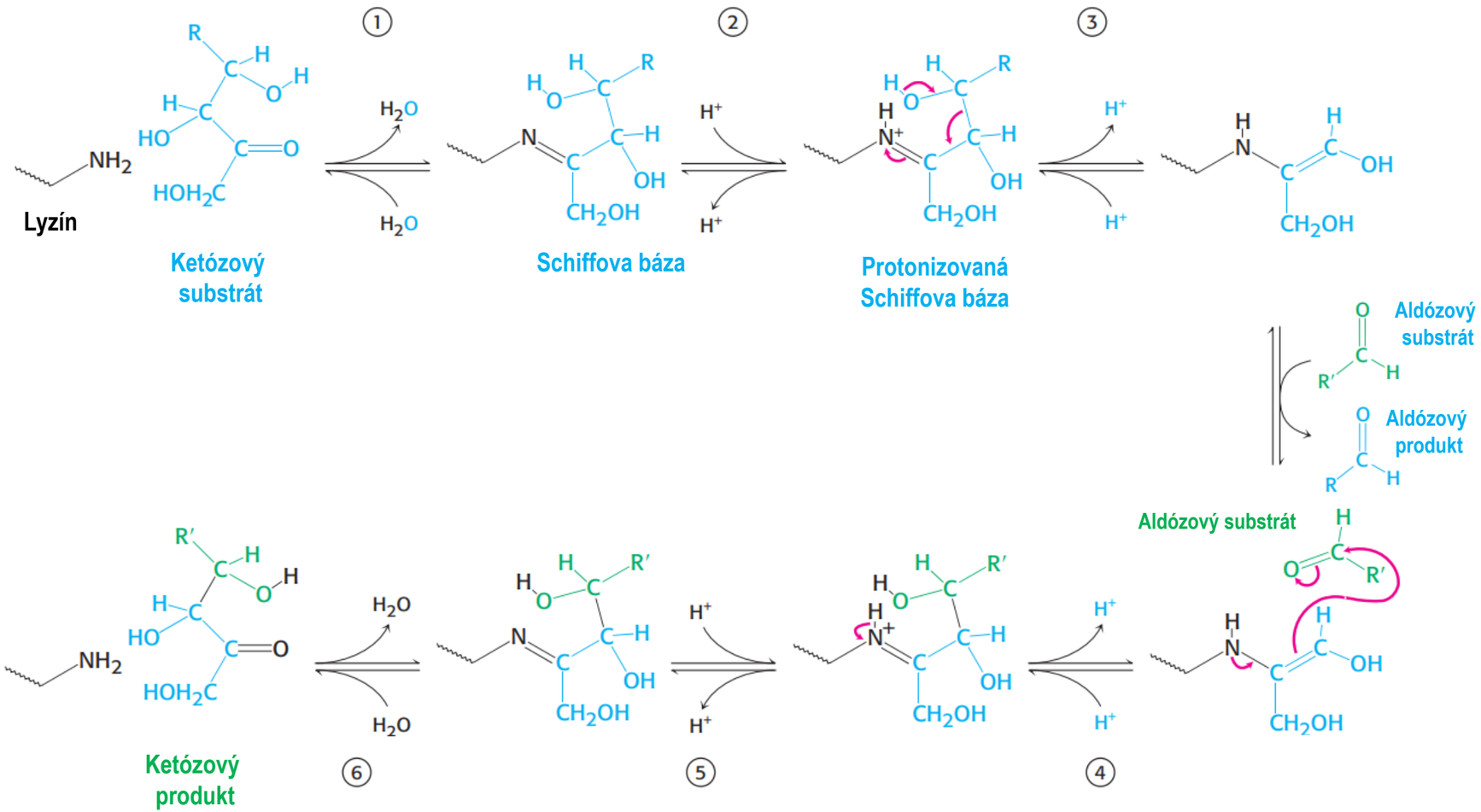




Mechanizmus transketolázy. (1) Tiamínpyrofosfát (TPP) sa ionizuje za vzniku karbaniónu. (2) Karbanión TPP napáda ketózový substrát. (3) Rozštiepením väzby uhlík-uhlík sa uvoľní aldózový produkt a ponechá sa dvojuhlíkový fragment spojený s TPP. (4) Tento aktivovaný medziprodukt glykoaldehydu napáda aldózový substrát a vytvára novú väzbu uhlík-uhlík. (5) Ketózový produkt sa uvoľní, čím sa uvoľní TPP pre ďalší reakčný cyklus.

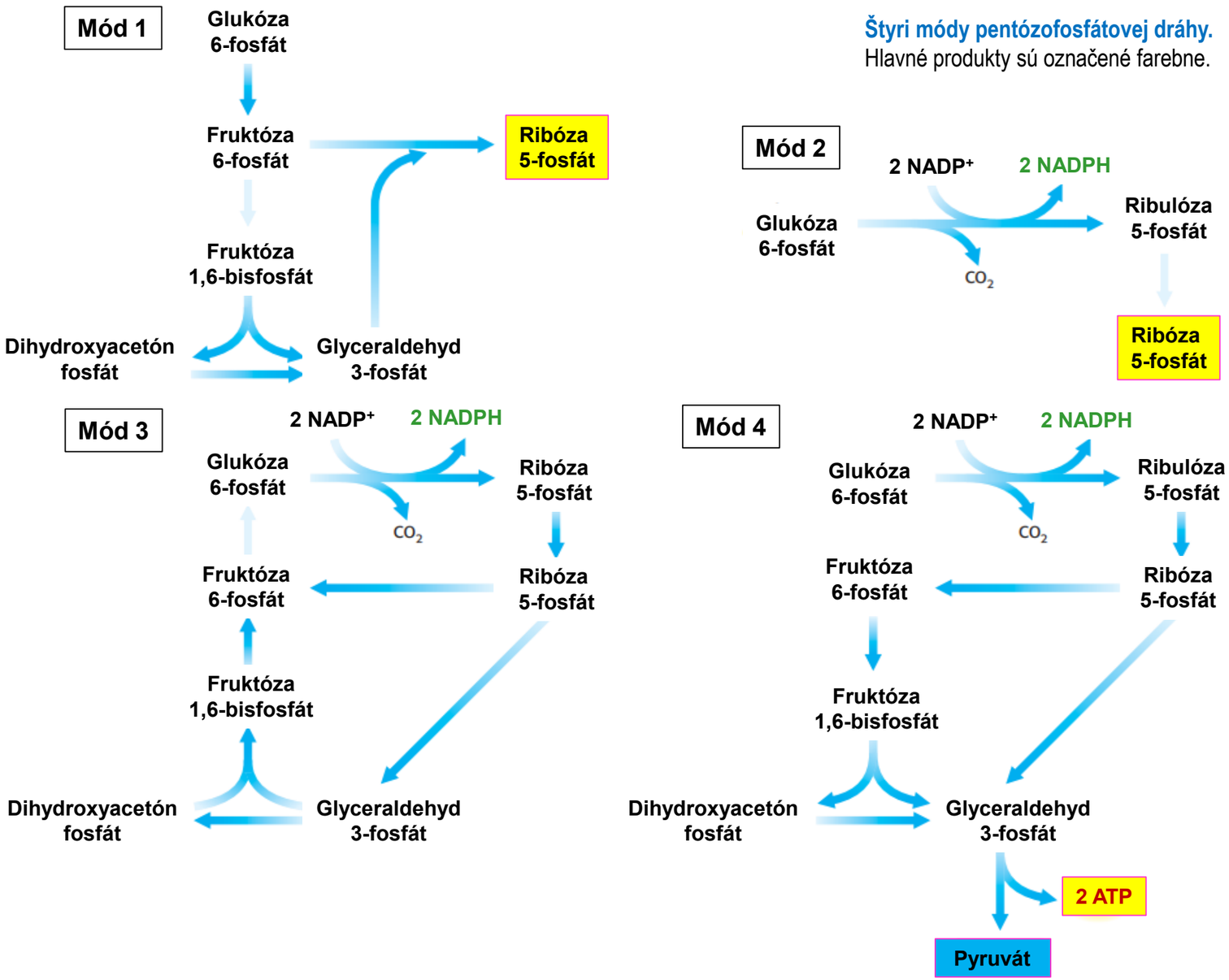


MECHANIZMUS PÔSOBENIA TRANSALDOLÁZY



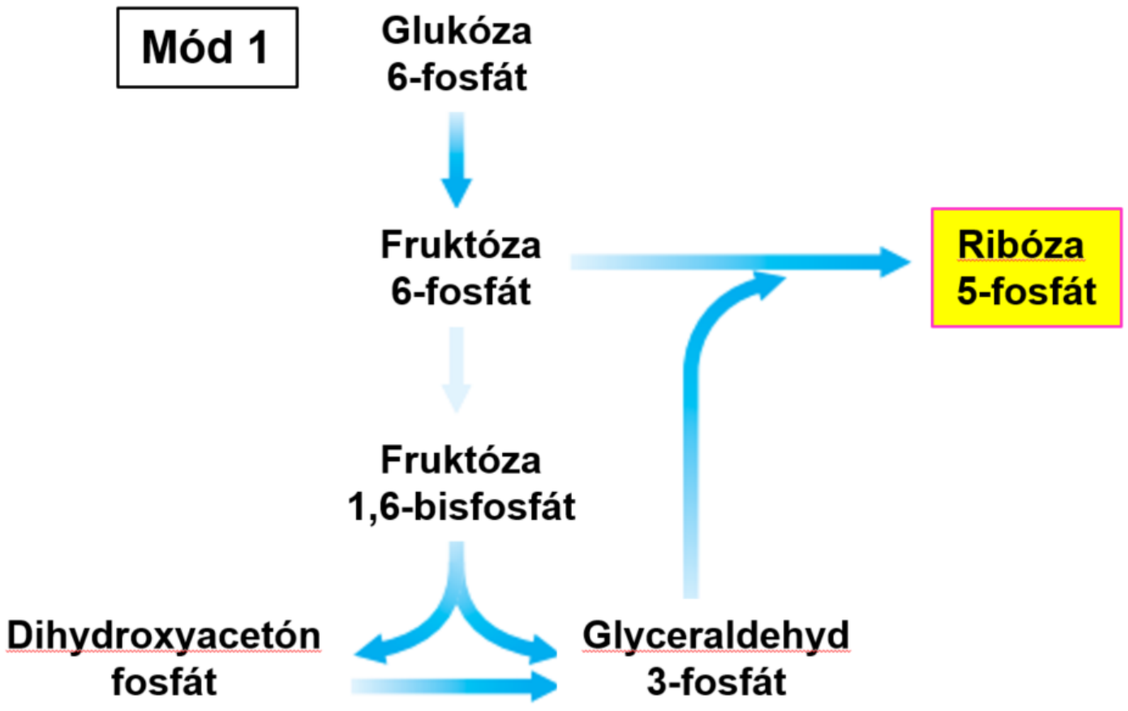
Mechanizmus pôsobenia transaldolázy.
(1) Reakcia začína tvorbou Schiffovej bázy medzi lyzínovým zvyškom v transaldoláze a ketózovým substrátom. Protonácia Schiffovej bázy (2) vedie k uvoľneniu aldózového produktu (3), pričom k lyzínovému zvyšku zostane pripojený trojuhlíkový fragment. (4) Tento medziprodukt sa pridáva k aldózovému substrátu so súčasnou protonáciou za vzniku novej väzby uhlík-uhlík. Následná deprotonácia (5) a hydrolýza Schiffovej bázy (6) uvoľňujú ketózový produkt z bočného reťazca lyzínu, čím sa dokončí reakčný cyklus.

METABOLIZMUS GLUKÓZA-6-FOSFÁTU V PENTÓZOFOSFÁTOVEJ DRÁHE JE KOORDINOVANÝ S GLYKOLÝZOU



METABOLIZMUS GLUKÓZA-6-FOSFÁTU V PENTÓZOFOSFÁTOVEJ DRÁHE JE KOORDINOVANÝ S GLYKOLÝZOU

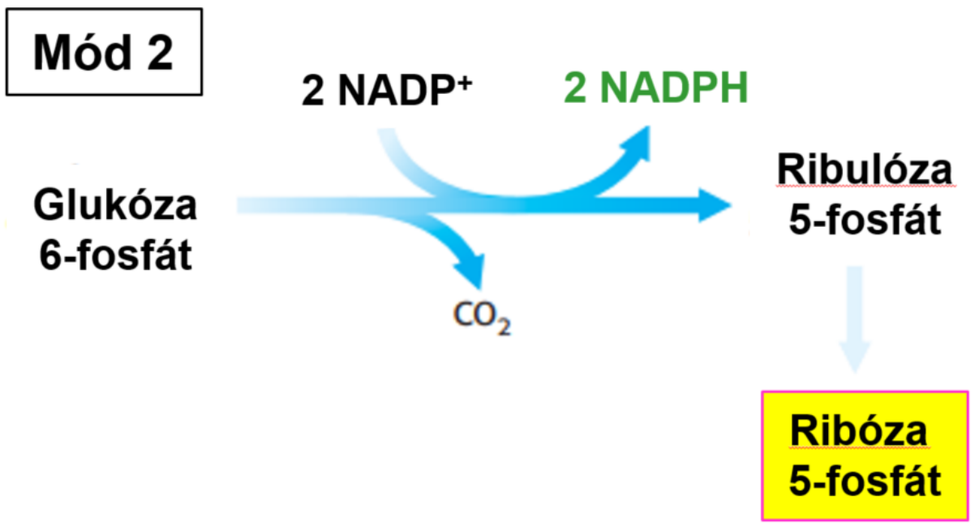
Mód 1. Je potrebné viac ribózy 5-fosfátu než NADPH.



5 Glukóza 6-fosfát + ATP → **6 Ribóza 5-fosfát** + ADP + 2 H^+

METABOLIZMUS GLUKÓZA-6-FOSFÁTU V PENTÓZOFOSFÁTOVEJ DRÁHE JE KOORDINOVANÝ S GLYKOLÝZOU

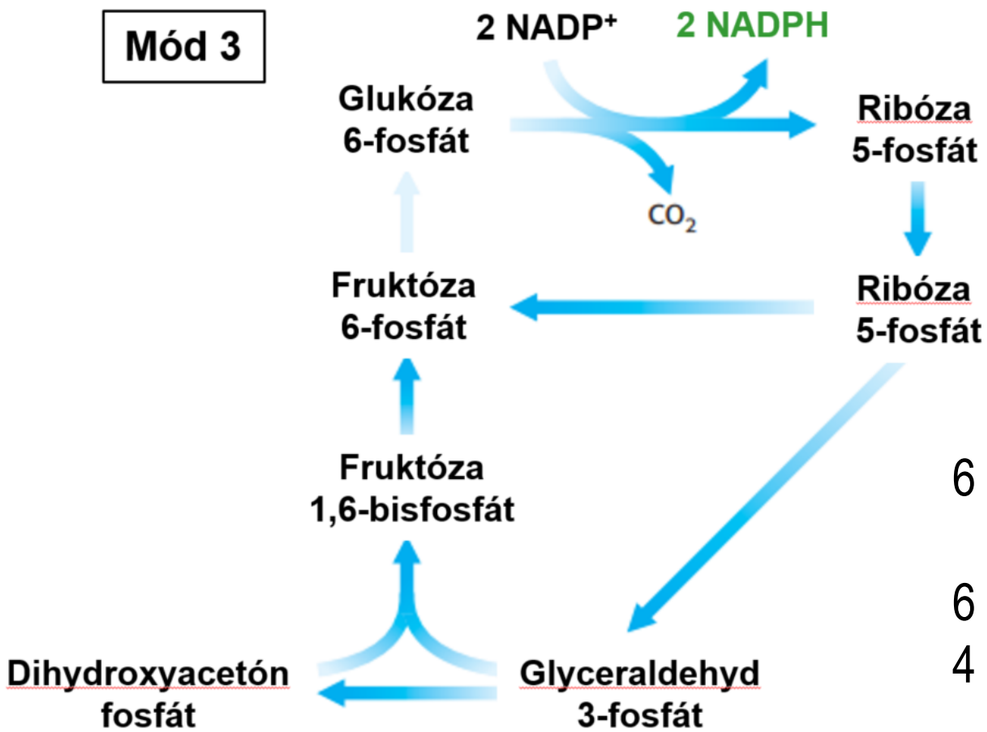
Mód 2. Potreba NADPH a ribózy 5-fosfátu je vyrovnaná.



Glukóza 6-fosfát + 2 $NADP^+$ + H_2O → **Ribóza 5-fosfát** + **2 NADPH** + 2 H^+ + CO_2

METABOLIZMUS GLUKÓZA-6-FOSFÁTU V PENTÓZOFOSFÁTOVEJ DRÁHE JE KOORDINOVANÝ S GLYKOLÝZOU

Mód 3. Je potrebné oveľa viac NADPH než ribózy 5-fosfát.



6 Glukóza 6-fosfát + 12 $NADP^+$ + 6 H_2O → 6 Ribóza 5-fosfát + 12 NADPH + 12 H^+ + CO_2

6 Ribóza 5-fosfát → 4 Fruktóza 6-fosfát + 2 Glyceraldehyd 3-fosfát

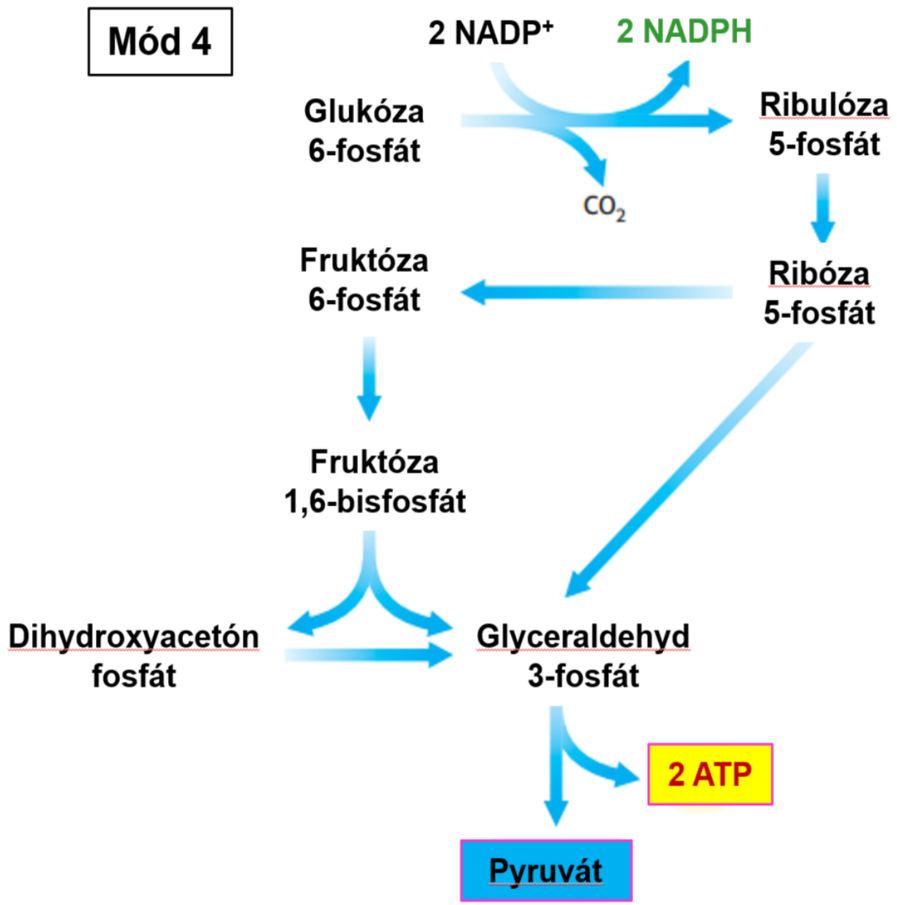
4 Fruktóza 6-fosfát + 2 Glyceraldehyd 3-fosfát + H_2O → 5 Glukóza 6-fosfát + P_i

Sumárna reakcia týchto troch reakcií je:

Glukóza 6-fosfát + 12 $NADP^+$ + 7 H_2O → 6 CO_2 + **12 NADPH** + 12 H^+ + P_i

METABOLIZMUS GLUKÓZA-6-FOSFÁTU V PENTÓZOFOSFÁTOVEJ DRÁHE JE KOORDINOVANÝ S GLYKOLÝZOU

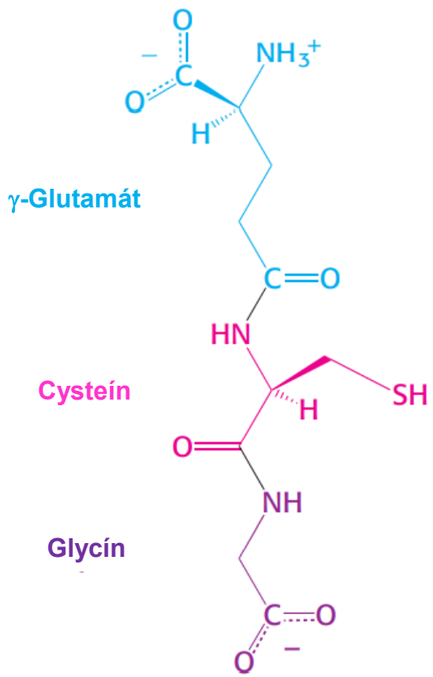
Mód 4. Obidve zlúčeniny NADPH a ATP sú rovnako potrebné



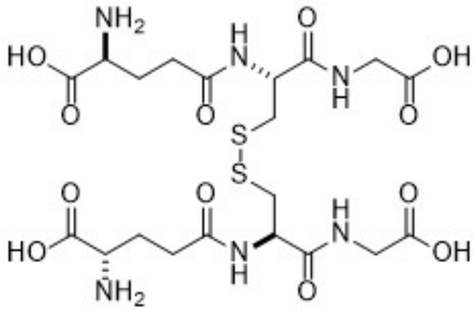
$$3\ \text{Glukóza 6-fosfát} + 6\ NADP^+ + 5\ NAD^+ + P_i + 8\ ADP \rightarrow \mathbf{5\ Pyruvát} + 3\ CO_2 + 6\ NADPH + 5\ NADH + \mathbf{8\ ATP} + 2\ H_2O + 8\ H^+$$

GLUKÓZA 6-FOSFÁT DEHYDROGENÁZA HRÁ KĽÚČOVÚ ÚLOHU V OCHRANE VOČI ROS

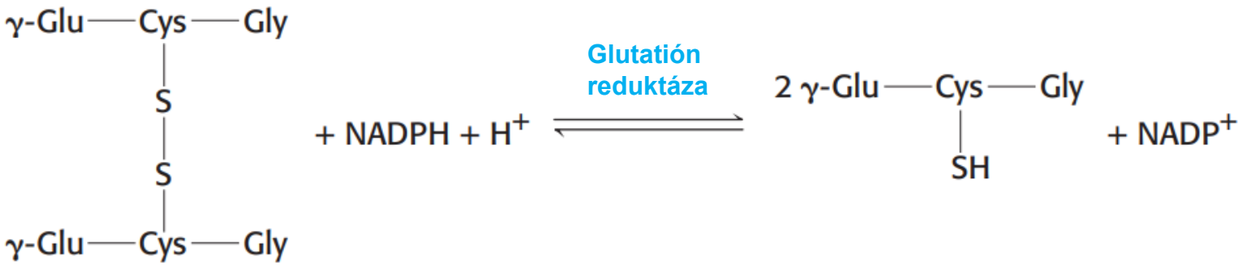
GSH vs GSSG



Glutatión (redukovaný)
(γ-Glutamylcysteinylglycín)

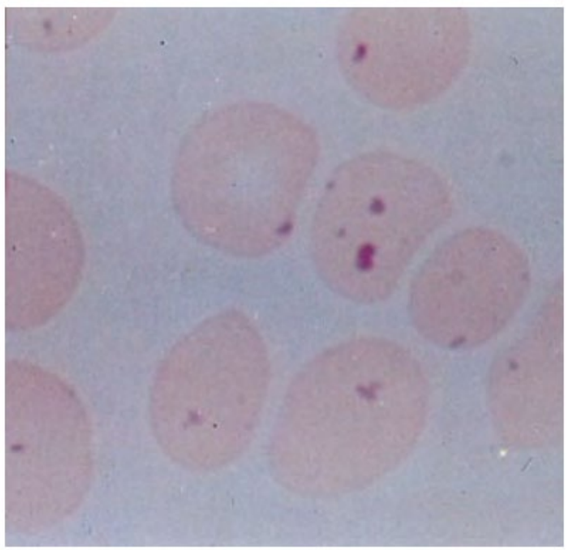


Vicia faba. Stredozemská rastlina Vicia faba je zdrojom fava fazulí, ktoré obsahujú purín glycoside vicine.



Oxidovaný glutatión (GSSG) **Redukovaný glutatión (GSH)**

Pamaquine – antimalarické liečivo - je oxidačné činidlo, ktoré vedie k tvorbe peroxidov, reaktívnych foriem kyslíka, ktoré môžu poškodiť membrány, ako aj iné biomolekuly. Peroxidy sa zvyčajne eliminujú enzýmom glutatiónperoxidázou, ktorý ako redukčné činidlo používa redukovaný glutatión. V neprítomnosti glukóza-6-fosfátdehydrogenázy pokračujú peroxidy v poškodzovaní membrány, pretože sa nevyrába žiadny NADPH na obnovu redukovaného glutatiónu.



Redukovaný glutatión je tiež nevyhnutný na udržanie normálnej štruktúry červených krviniek udržiavaním štruktúry hemoglobínu.

Červené krvinky s **Heinzovými telieskami**. Svetelná mikrofotografia ukazuje červené krvinky získané od osoby s nedostatkom glukóza-6-fosfátdehydrogenázy. Tmavé častice, nazývané Heinzove telieska, sú vo vnútri buniek zhluky denaturovaného hemoglobínu, ktoré sa adherujú na plazmatickú membránu a farbia bázickými farbivami. Červené krvinky u týchto ľudí sú vysoko náchylné na oxidačné poškodenie. [Dr. Stanley Schrier.]

ČO BY STE MALI VEDIEŤ

- Popísať Calvinov cyklus. Jeho význam.
- Popísať pentózofosfátovú dráhu a uviesť jej význam.
- Popísať vzťah medzi Calvinovým cyklom a pentózofosfátovou dráhou.

Bioenergetika
Vysokoškolský učebný text

Autori: doc. Mgr. Daniel Jancura, PhD.
doc. RNDr. Erik Sedlák, DrSc.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2021
Počet strán: 244
Rozsah: 6 AH
Vydanie: prvé

DOI: https://doi.org/10.33542/BE2021-0022-6
ISBN 978-80-574-0022-6 (e-publikácia)