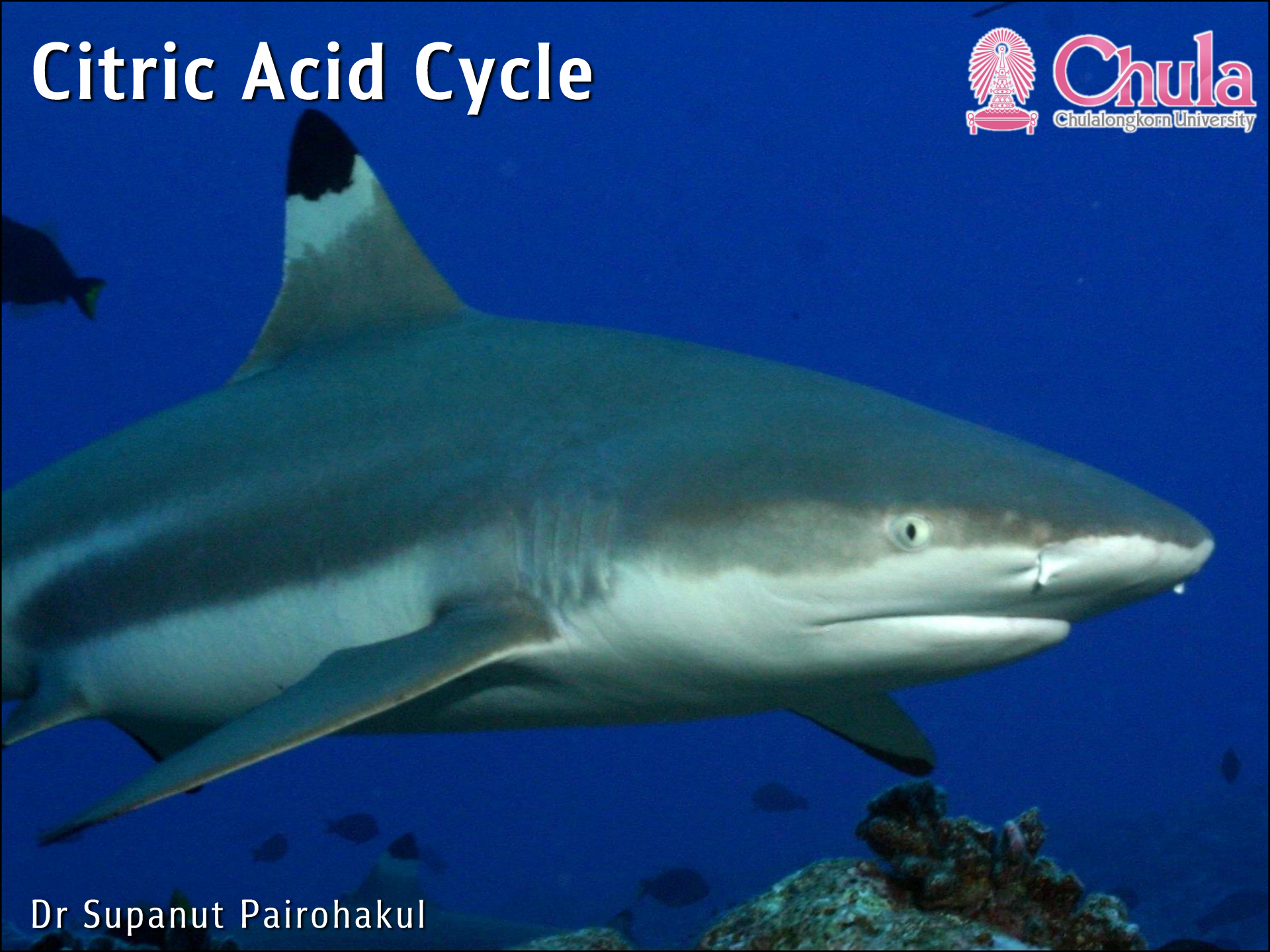
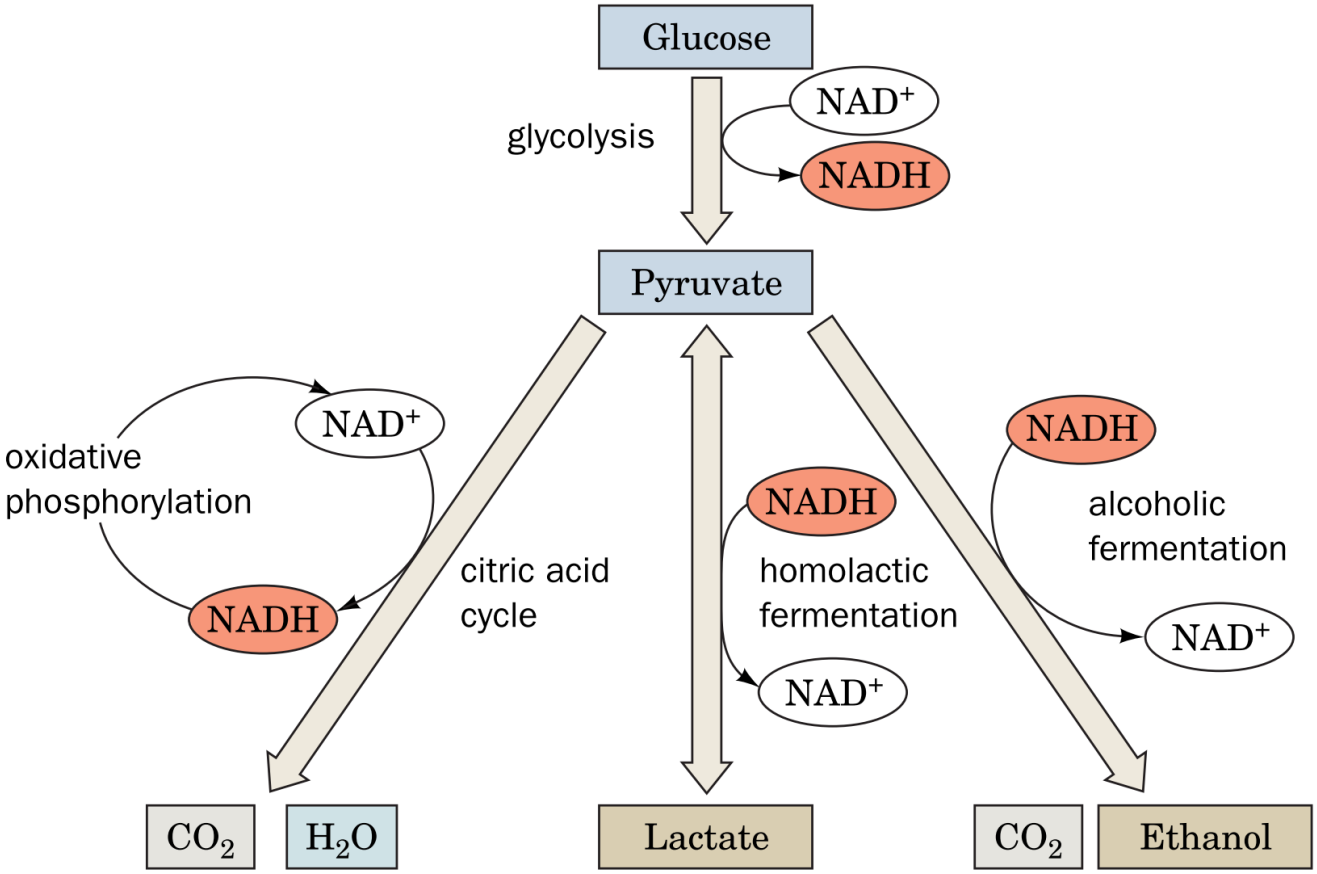
Citric Acid Cycle



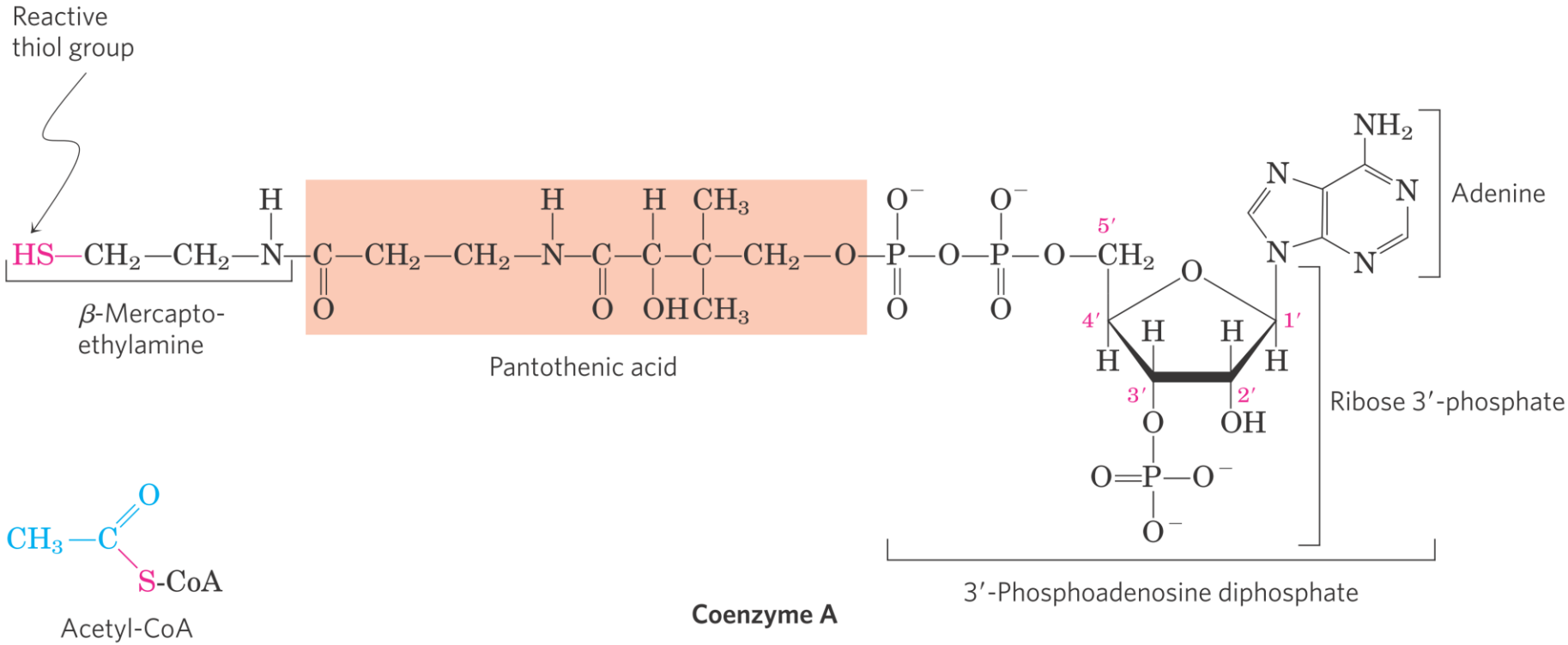
Dr Supanut Pairohakul

Introduction



Preparation for the Cycle

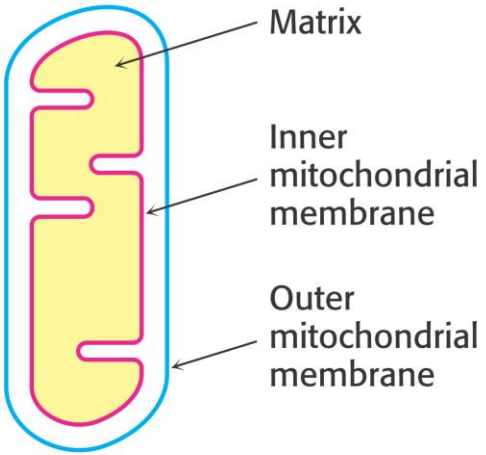
- การเตรียมการเข้าวัฏจักรกรดซิตริก (1)
  - ในภาวะที่มีแก๊สออกซิเจน (aerobic condition) ไพรูเวตจากไกลโคไลซิสจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีติลโคเอนไซม์ เอ (acetyl coenzyme A)



Preparation for the Cycle

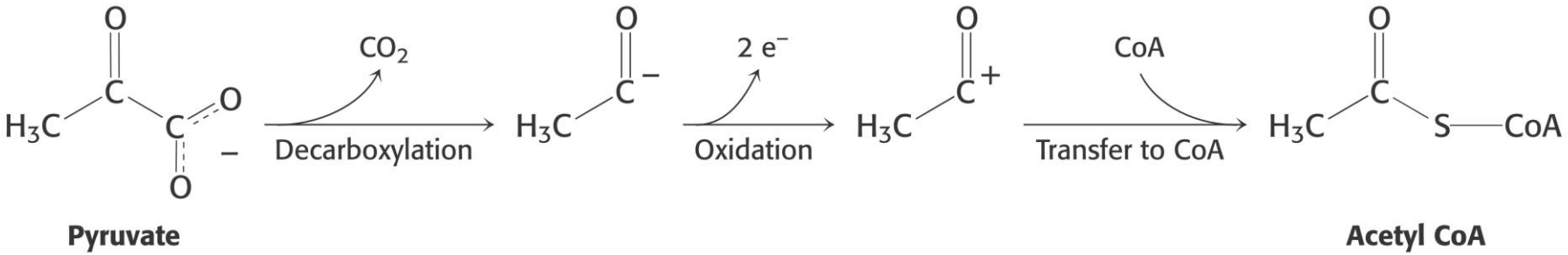
- การเตรียมการเข้าวัฏจักรกรดซิตริก (2)
  - เกิดที่ mitochondrial matrix
  - อาศัยการทำงานของ pyruvate dehydrogenase complex
  - จัดเป็น irreversible reaction ที่เชื่อมระหว่างไกลโคไลซิสกับวัฏจักรกรดซิตริก

$$\text{Pyruvate} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{acetyl CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$



Preparation for the Cycle

- การเตรียมการเข้าวัฏจักรกรดซิตริก (3) – ขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการ



Pyruvate **Acetyl CoA**

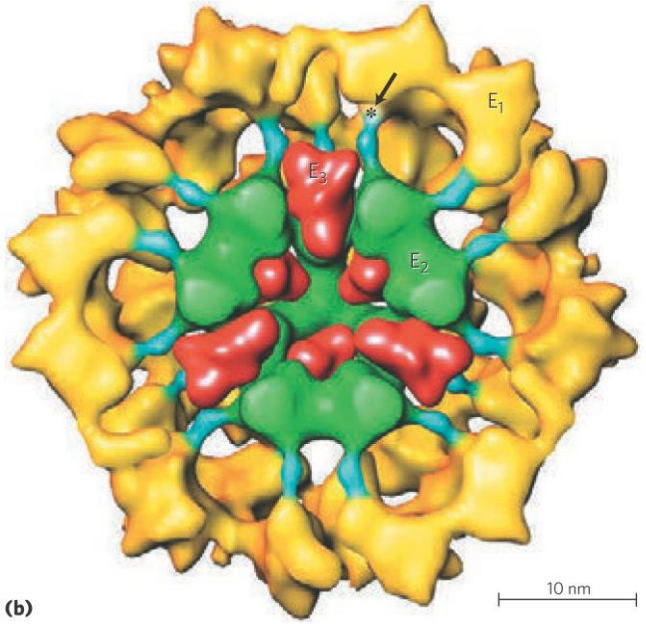
Preparation for the Cycle

- Pyruvate dehydrogenase complex

Table 18.1 Pyruvate dehydrogenase complex of *E. coli*

Enzyme	Abbreviation	Number of chains	Prosthetic group	Reaction catalyzed
Pyruvate dehydrogenase component	E_1	24	TPP	Oxidative decarboxylation of pyruvate
Dihydrolipoyl transacetylase	E_2	24	Lipoamide	Transfer of acetyl group to CoA
Dihydrolipoyl dehydrogenase	E_3	12	FAD	Regeneration of the oxidized form of lipoamide

Abbreviations: TPP, thiamine pyrophosphate; FAD, flavin adenine dinucleotide.



Preparation for the Cycle

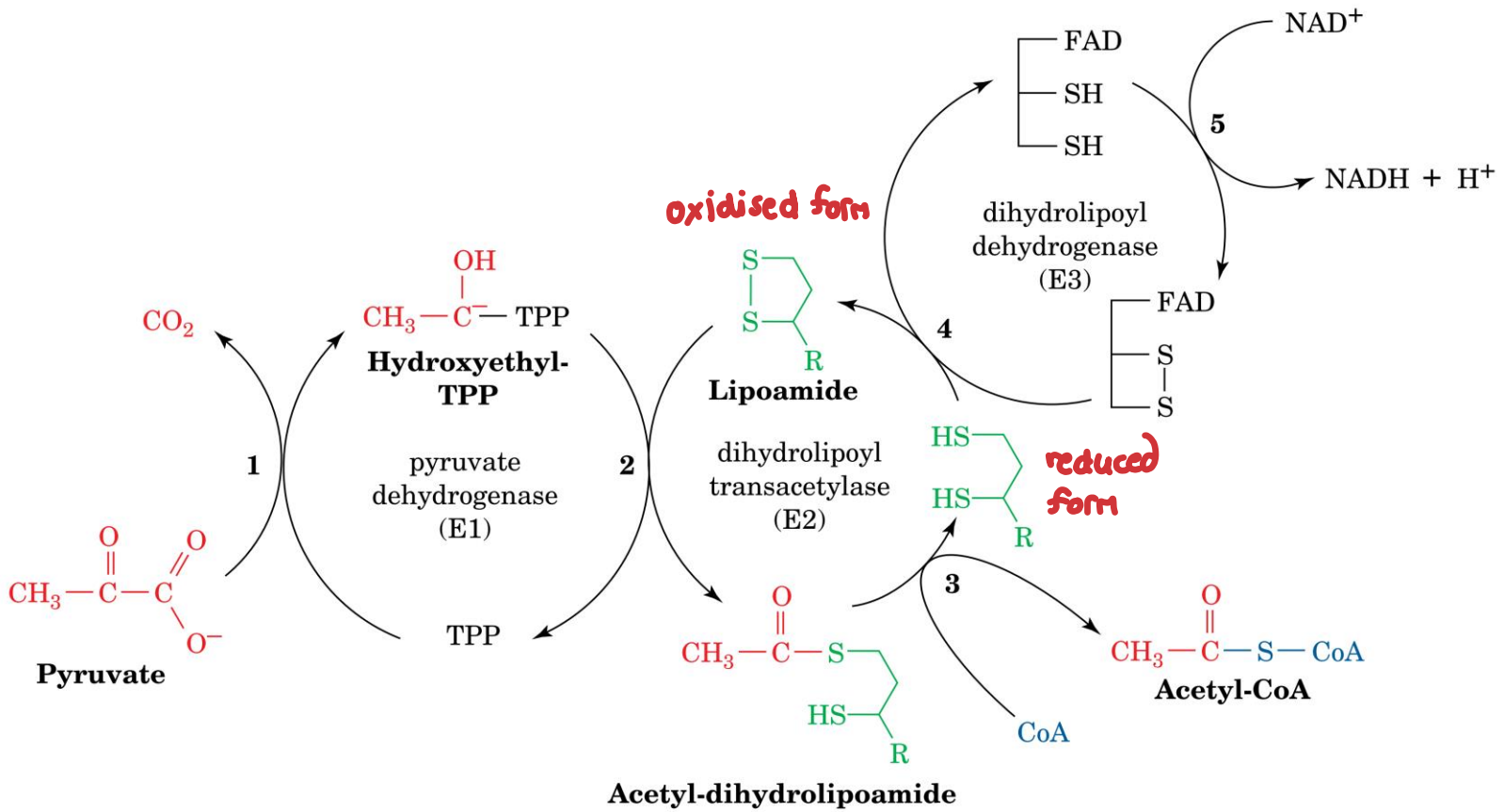


FIG. 17-6 The five reactions of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. E1 (pyruvate dehydrogenase) contains TPP and catalyzes Reactions 1 and 2. E2 (dihydrolipoyl transacetylase) contains lipoamide and catalyzes Reaction 3. E3 (dihydrolipoyl dehydrogenase) contains FAD and a redox-active disulfide and catalyzes Reactions 4 and 5.

? **What type of reaction occurs in each of the five steps?**

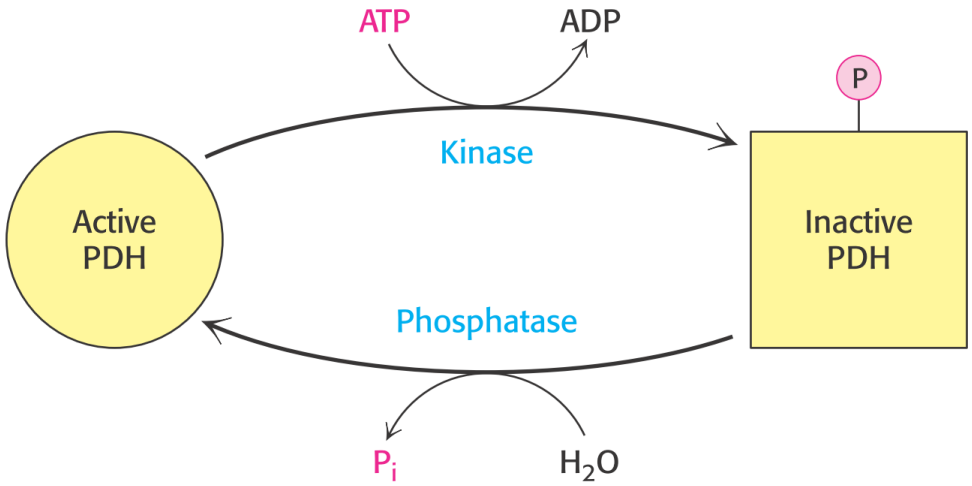
Preparation for the Cycle

TABLE 17-1 The Coenzymes and Prosthetic Groups of Pyruvate Dehydrogenase

Cofactor	Location	Function
Thiamine pyrophosphate (TPP)	Bound to E1	Decarboxylates pyruvate, yielding a hydroxyethyl–TPP carbanion
Lipoic acid	Covalently linked to a Lys on E2 (lipoamide)	Accepts the hydroxyethyl carbanion from TPP as an acetyl group
Coenzyme A (CoA)	Substrate for E2	Accepts the acetyl group from lipoamide
Flavin adenine dinucleotide (FAD)	Bound to E3	Reduced by lipoamide
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)	Substrate for E3	Reduced by $FADH_2$

Preparation for the Cycle

- การควบคุมการทำงานในกระบวนการ
  - PDC ถูกควบคุมได้ทั้ง allosteric regulation และ covalent modification
  - ATP ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิด phosphorylation ของ E_1 ใน PDC* และทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ PDC (inactivation) ได้ ด้วยการทำงานของ pyruvate dehydrogenase (PDH) kinase กระบวนการนี้สามารถเกิด deactivation ได้ด้วย pyruvate dehydrogenase (PDH) phosphatase



Preparation for the Cycle

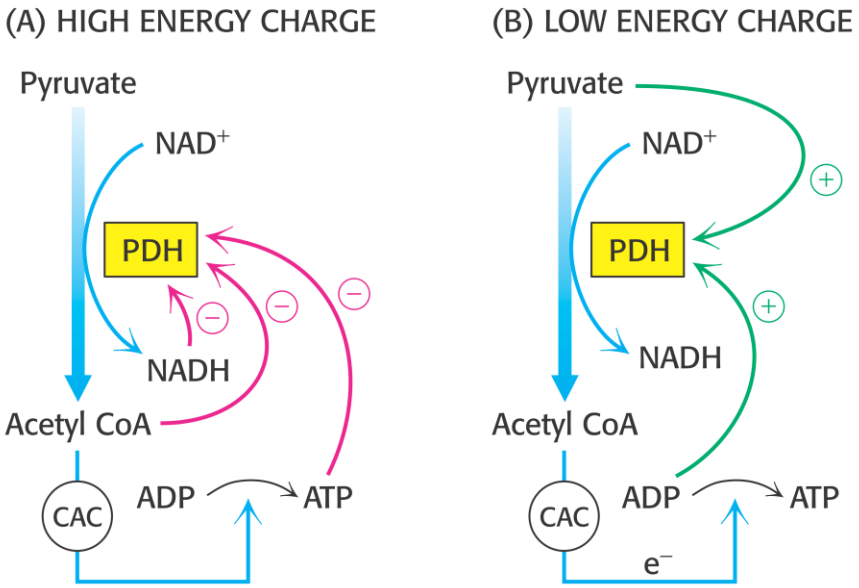
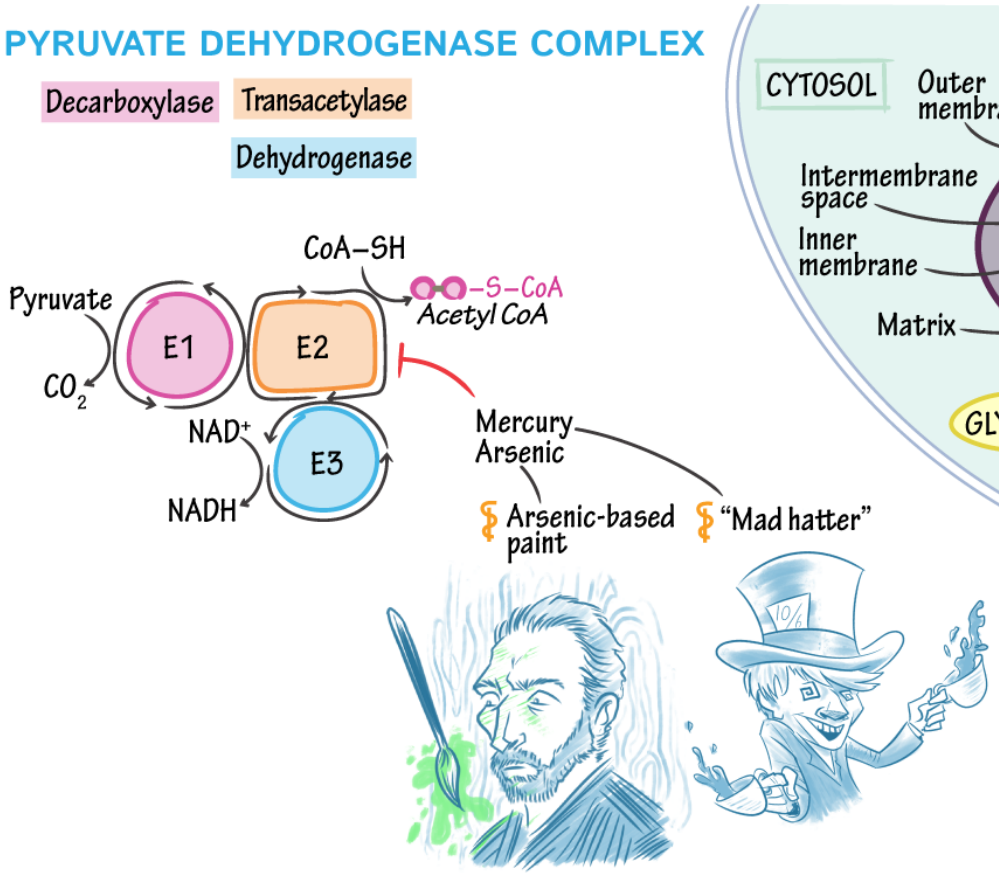


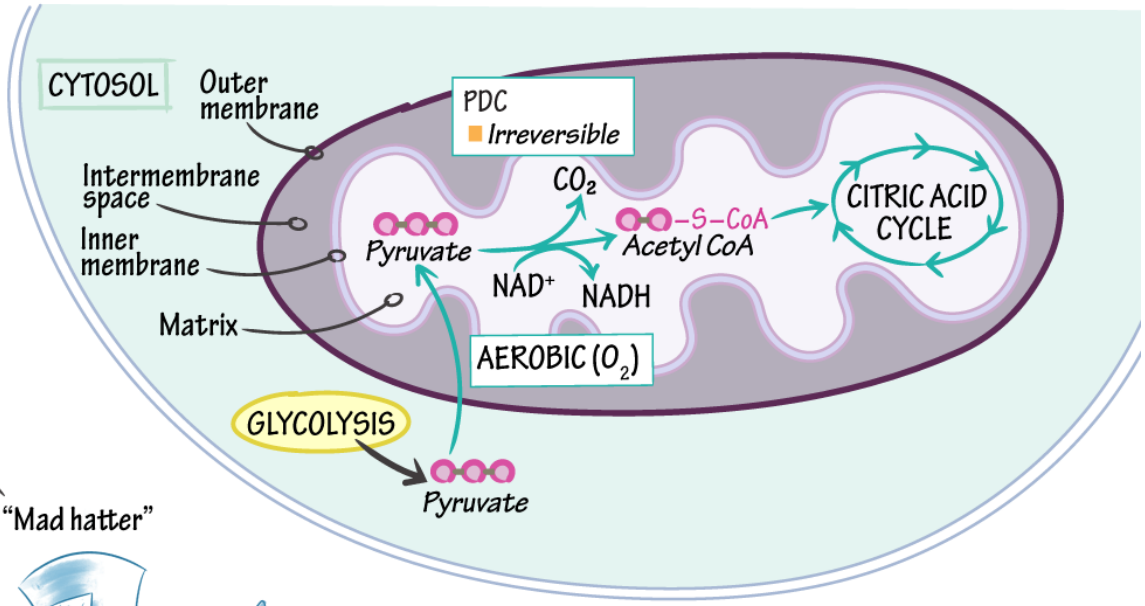
Figure 18.10 Response of the pyruvate dehydrogenase complex to the energy charge. The pyruvate dehydrogenase complex is regulated to respond to the energy charge of the cell. (A) The complex is inhibited by its immediate products, NADH and acetyl CoA, as well as by the ultimate product of cellular respiration, ATP. (B) The complex is activated by pyruvate and ADP, which inhibit the kinase that phosphorylates PDH.

Preparation of the Cycle

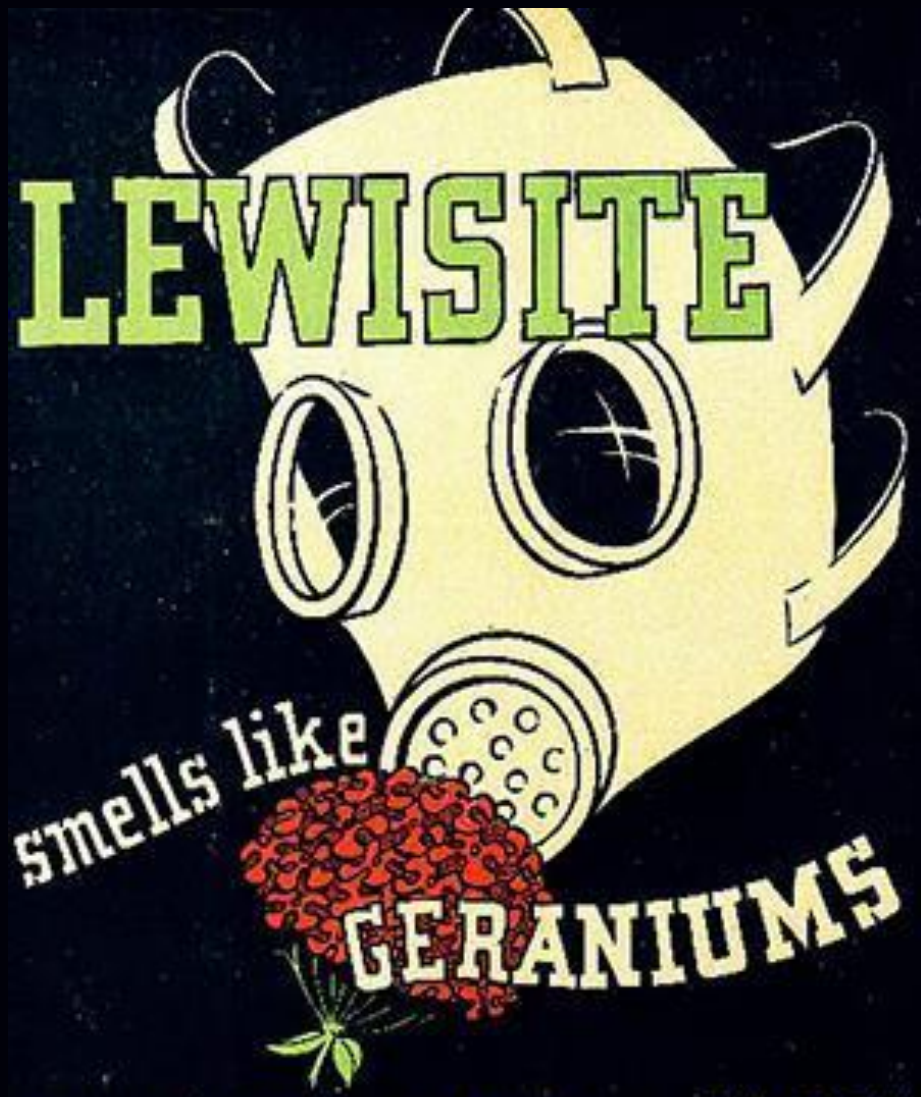
‘Mad as a hatter’

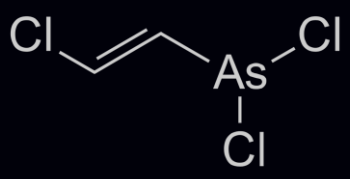
Preparation for the Cycle



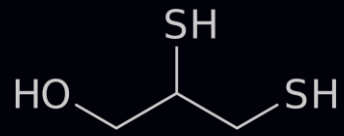


Preparation of the Cycle





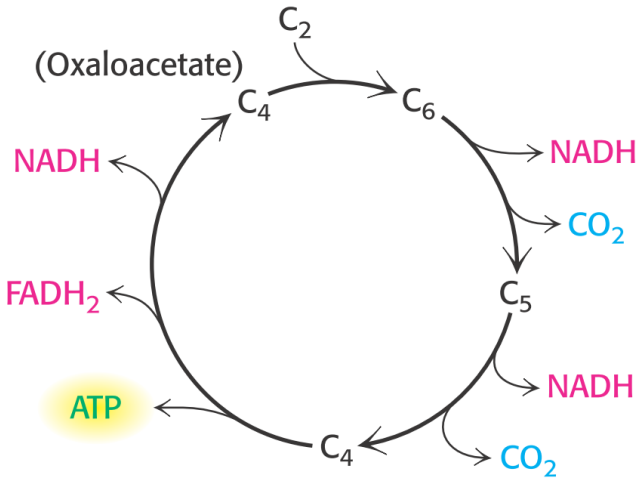
Lewisite



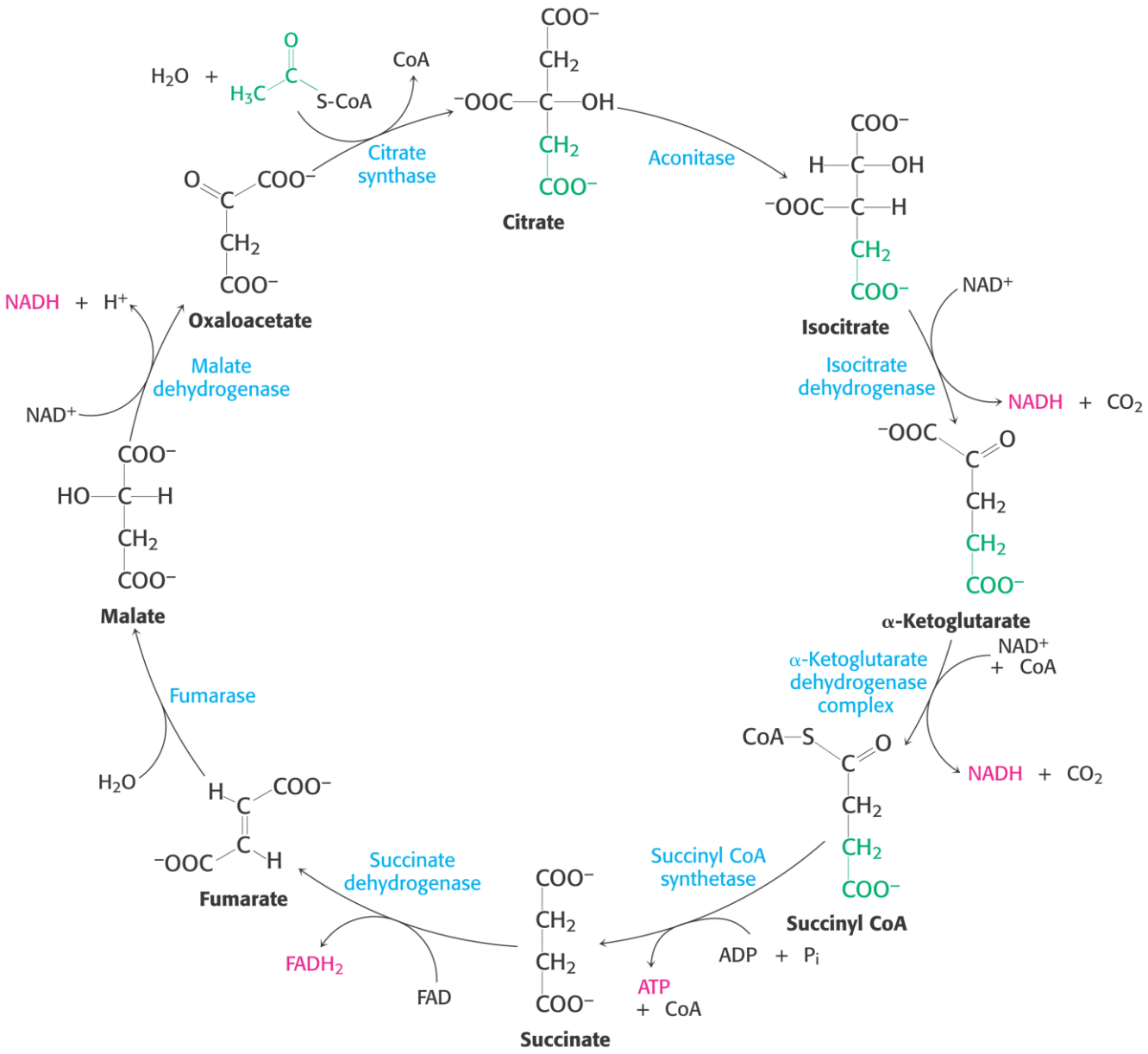
2,3-dimercaptopropanol
BAL (British *anti*-lewisite)

Citric Acid Cycle

- วัฏจักรกรดซิตริก (Citric Acid Cycle)
  - วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) หรือ tricarboxylic acid (TCA) cycle
  - เกิดที่ mitochondrial matrix (ต่อเนื่องมาจากขั้นตอนการเตรียม)
  - ประกอบด้วย redox reaction ต่อเนื่องกันจำนวนมาก
  - ขั้นตอนที่มีการ oxidation สาร acetyl CoA ให้เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)
  - มี 2 ขั้นตอนหลัก คือ
    - การ oxidation ของสารประกอบคาร์บอนเป็น CO_2
    - การ regeneration ของ oxaloacetate

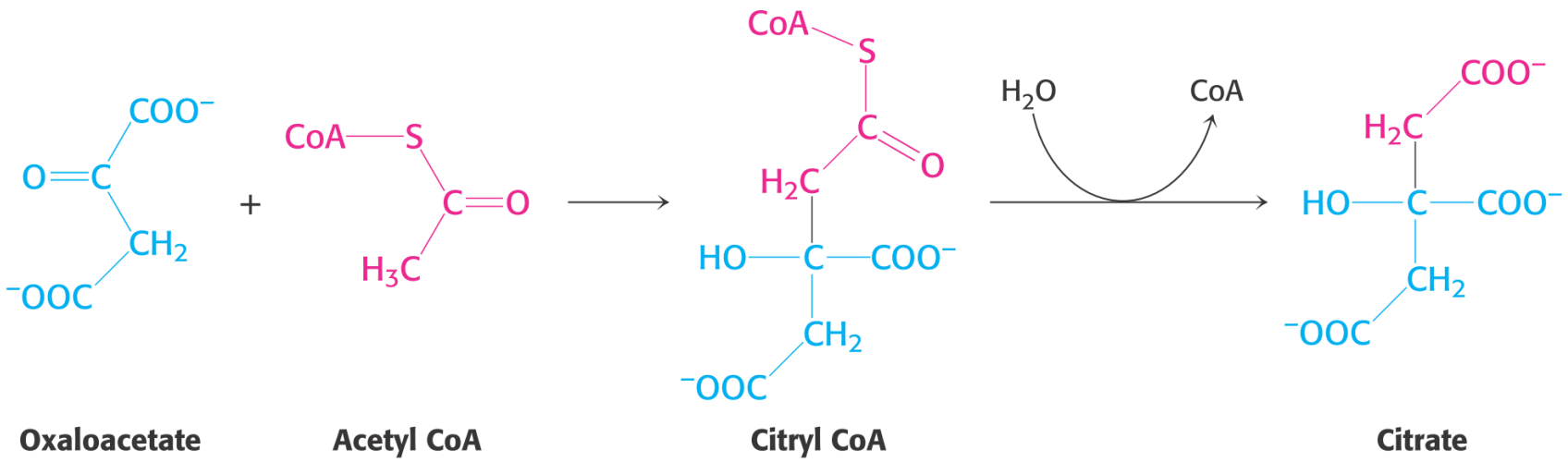


Citric Acid Cycle



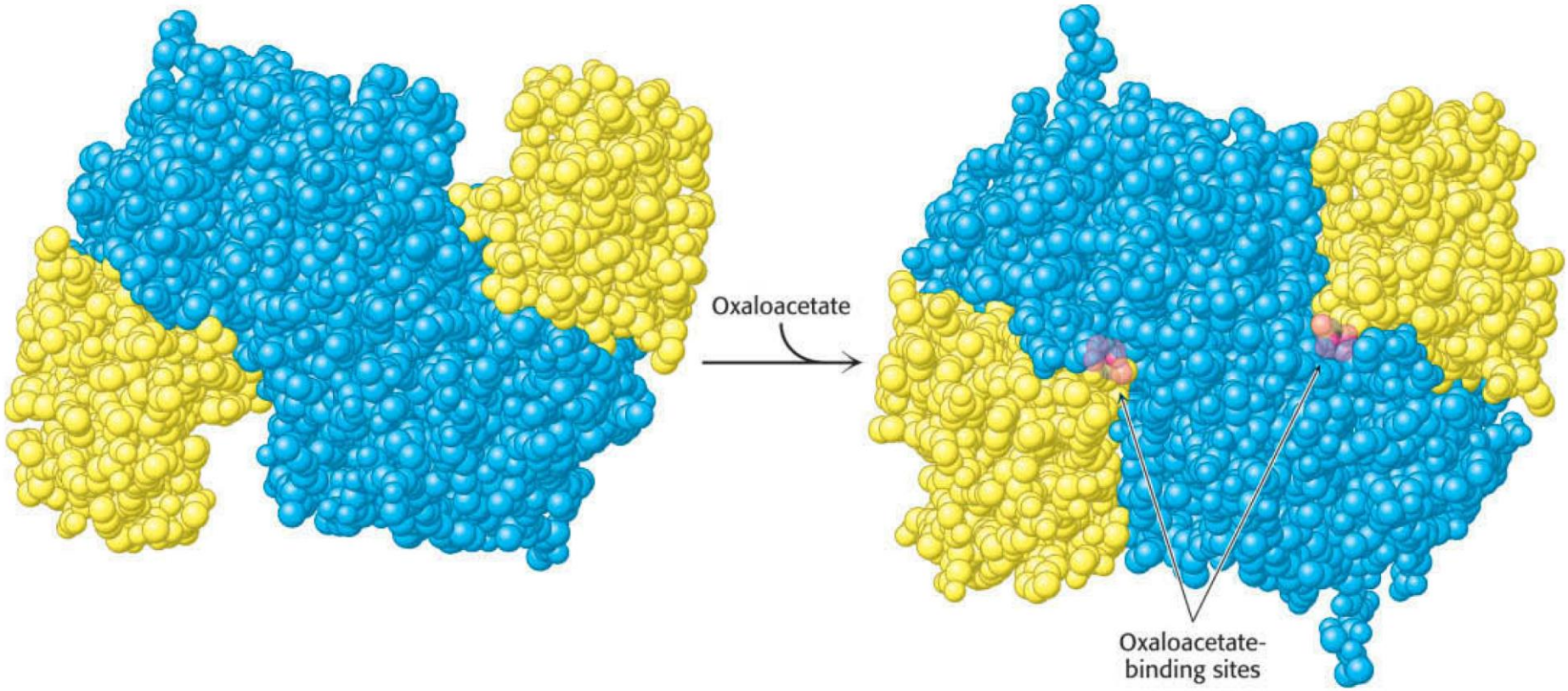
Citric Acid Cycle

- ขั้นตอนที่ 1
  - Oxaloacetate รวมกับ acetyl coA เกิดเป็น citrate
  - เอนไซม์ที่กระตุ้นกระบวนการนี้ คือ citrate synthase



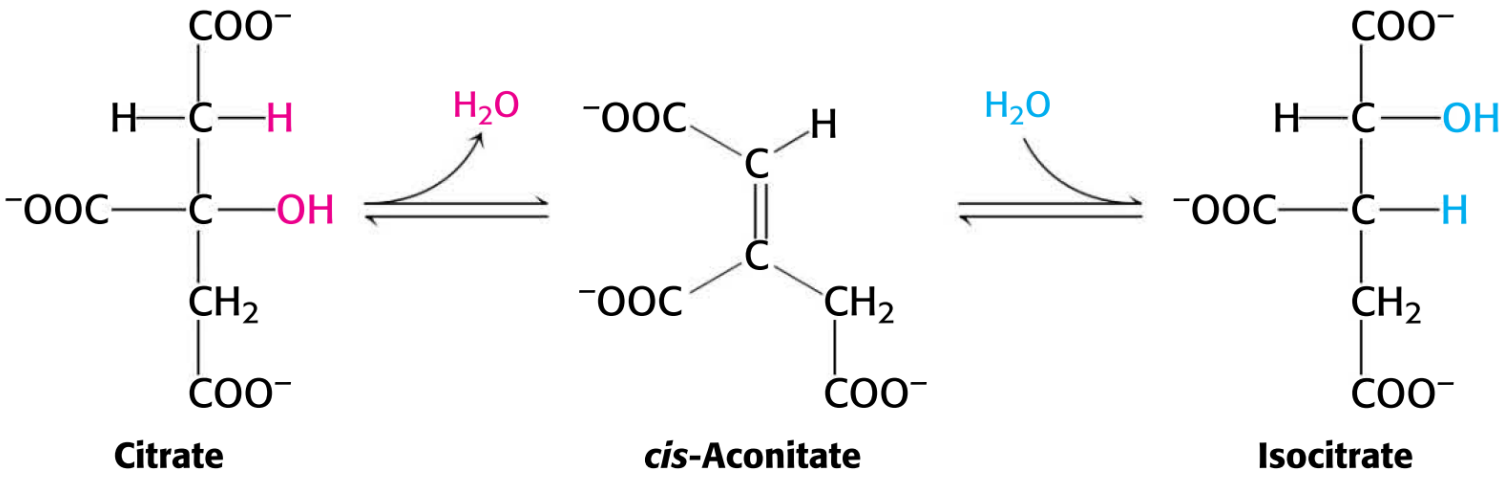
Citric Acid Cycle

- ขั้นตอนที่ 1 (ต่อ) – การทำงานของ citrate synthase



Citric Acid Cycle

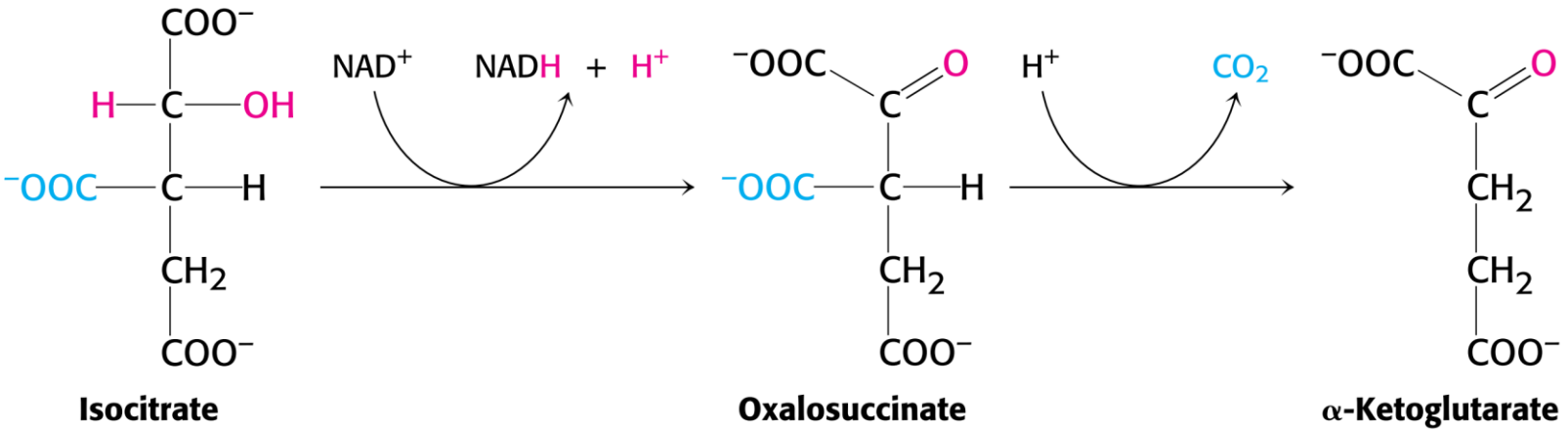
- ขั้นตอนที่ 2
  - การเกิด isomerization ของ citrate เป็น isocitrate
  - เอนไซม์ที่กระตุ้นกระบวนการนี้ คือ aconitase (มี *cis*-aconitate เป็นสารตัวกลาง)



Citrate ***cis*-Aconitate** **Isocitrate**

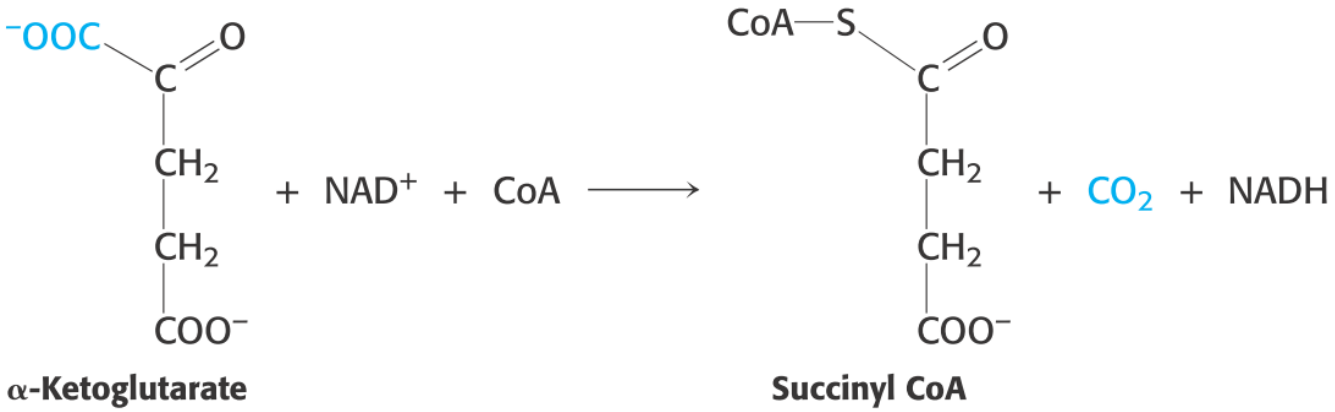
Citric Acid Cycle

- ขั้นตอนที่ 3
  - Isocitrate ถูก oxidation และ decarboxylation เป็น α-ketoglutare
  - เอนไซม์ที่ใช้กระตุ้นกระบวนการนี้ คือ isocitrate dehydrogenase



Citric Acid Cycle

- ขั้นตอนที่ 4
  - α-ketoglutarate ถูก oxidation และ decarboxylation เป็น succinyl CoA
  - เอนไซม์ที่กระตุ้นกระบวนการนี้ คือ α-ketoglutarate dehydrogenase complex

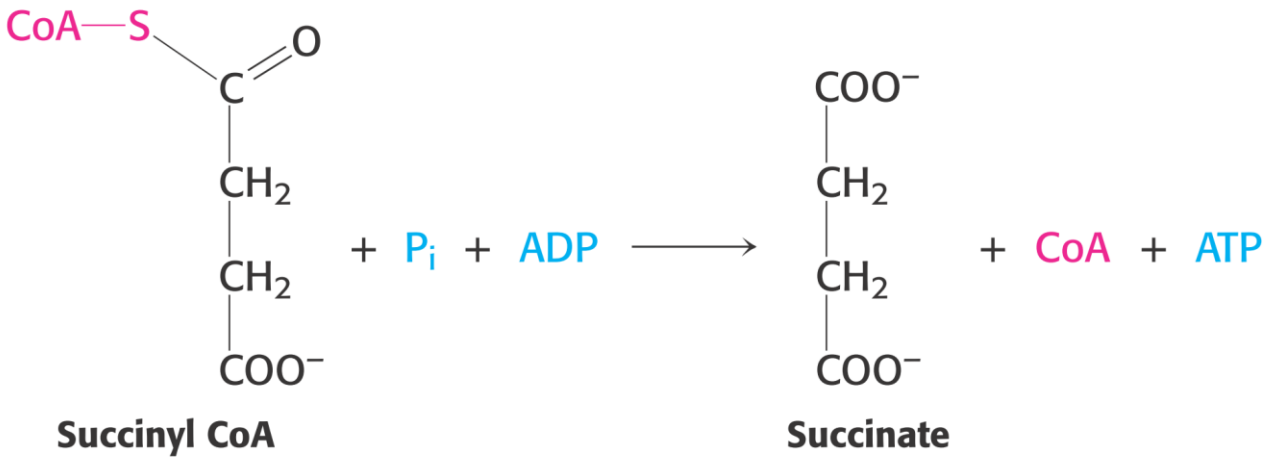


$$\text{Pyruvate} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{Pyruvate dehdrogenase complex}} \text{acetyl CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\alpha\text{-Ketoglutarate} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\alpha\text{-Ketoglutate dehdrogenase complex}} \text{succinyl CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$$

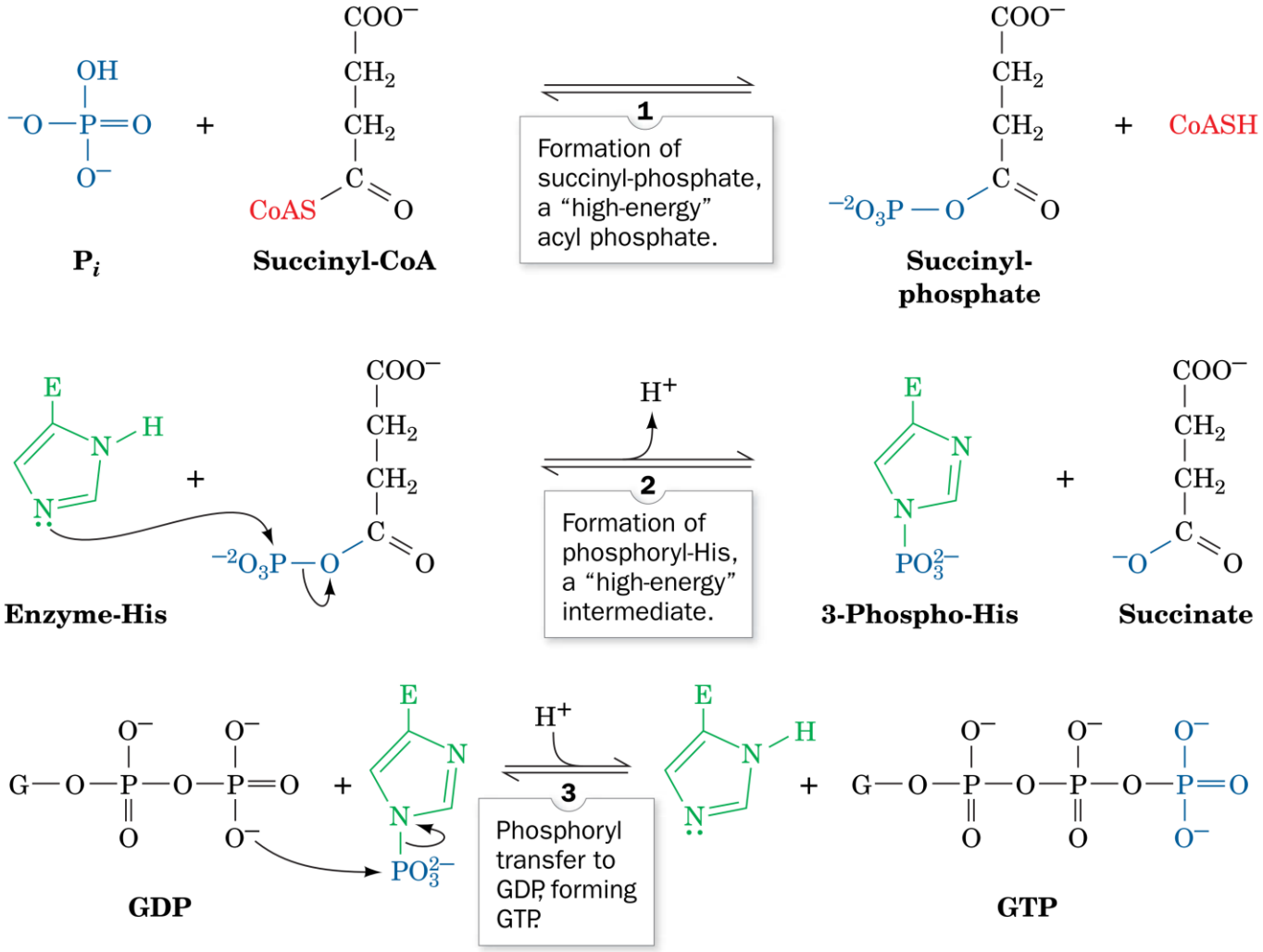
Citric Acid Cycle

- ขั้นตอนที่ 5
  - Succinyl CoA ถูกเปลี่ยนเป็น succinate
  - เอนไซม์ที่กระตุ้นกระบวนการนี้ คือ succinyl CoA synthetase



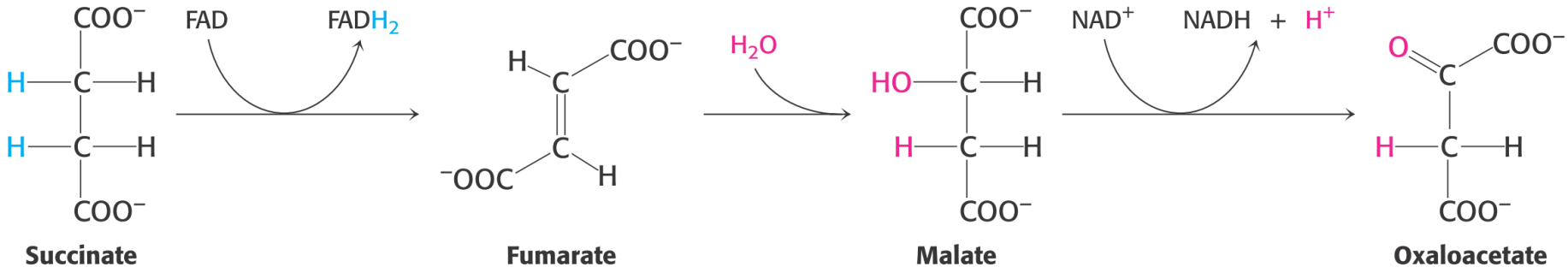
Citric Acid Cycle

- ขั้นตอนที่ 5 (ต่อ)



Citric Acid Cycle

- ขั้นตอนที่ 6 – 8
  - Succinate เปลี่ยนเป็น fumarate, malate และ oxaloacetate ตามลำดับ
  - เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ คือ succinate dehydrogenase, fumarase และ malate dehydrogenase



Citric Acid Cycle

Table 19.1 Citric acid cycle

Step	Reaction	Enzyme	Prosthetic group	Type*	$\Delta G^{o\prime}$ kJ mol^{-1}	$\Delta G^{o\prime}$ kcal mol^{-1}
1	Acetyl CoA + oxaloacetate + H_2O ⟶ citrate + CoA + H^+	Citrate synthase		a	−31.4	−7.5
2a	Citrate ⇌ *cis*-aconitate + H_2O	Aconitase	Fe-S	b	+8.4	+2.0
2b	*cis*-Aconitate + H_2O ⇌ isocitrate	Aconitase	Fe-S	c	−2.1	−0.5
3	Isocitrate + NAD^+ ⇌ α-ketoglutarate + CO_2 + NADH	Isocitrate dehydrogenase		d + e	−8.4	−2.0
4	α-ketoglutarate + NAD^+ + CoA ⇌ succinyl CoA + CO_2 + NADH	α-ketoglutarate dehydrogenase complex	Lipoic acid, FAD, TPP	d + e	−30.1	−7.2
5	Succinyl CoA + P_i + ADP ⇌ succinate + ATP + CoA	Succinyl CoA synthetase		f	−3.3	−0.8
6	Succinate + FAD (enzyme-bound) ⇌ fumarate + $FADH_2$ (enzyme-bound)	Succinate dehydrogenase	FAD, Fe-S	e	0	0
7	Fumarate + H_2O ⇌ L-malate	Fumarase		e	−3.8	−0.9
8	L-Malate + NAD^+ ⇌ oxaloacetate + NADH + H^+	Malate dehydrogenase		e	+29.7	+7.1

*Reaction type: a, condensation; b, dehydration; c, hydration; d, decarboxylation; e, oxidation; f, substrate-level phosphorylation.

Citric Acid Cycle – Regulation

- การควบคุมวัฏจักรกรดซิตริก
  - Isocitrate dehydrogenase
    - ถูกกระตุ้นด้วย ADP (allosterically control)
    - ถูกยับยั้งด้วย NADH ที่เพิ่มขึ้น
  - α-ketoglutarate dehydrogenase – ควบคุม rate-limiting step
    - ถูกยับยั้งเมื่อ ATP และ NADH เพิ่มขึ้น รวมถึง succinyl CoA

Citric Acid Cycle – Regulation

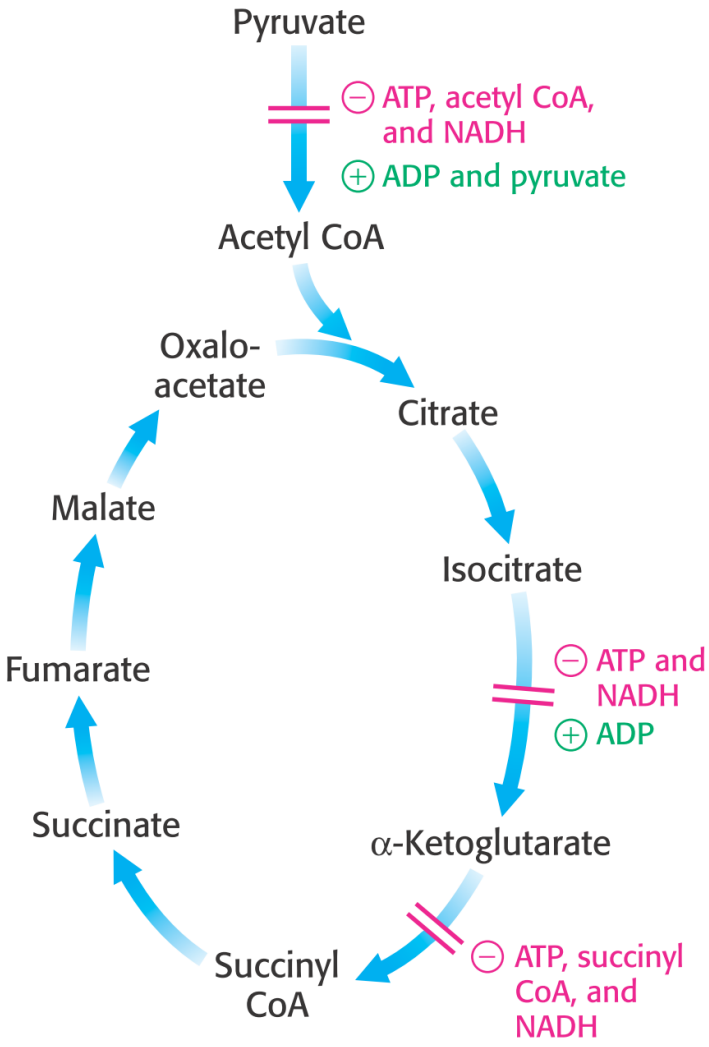
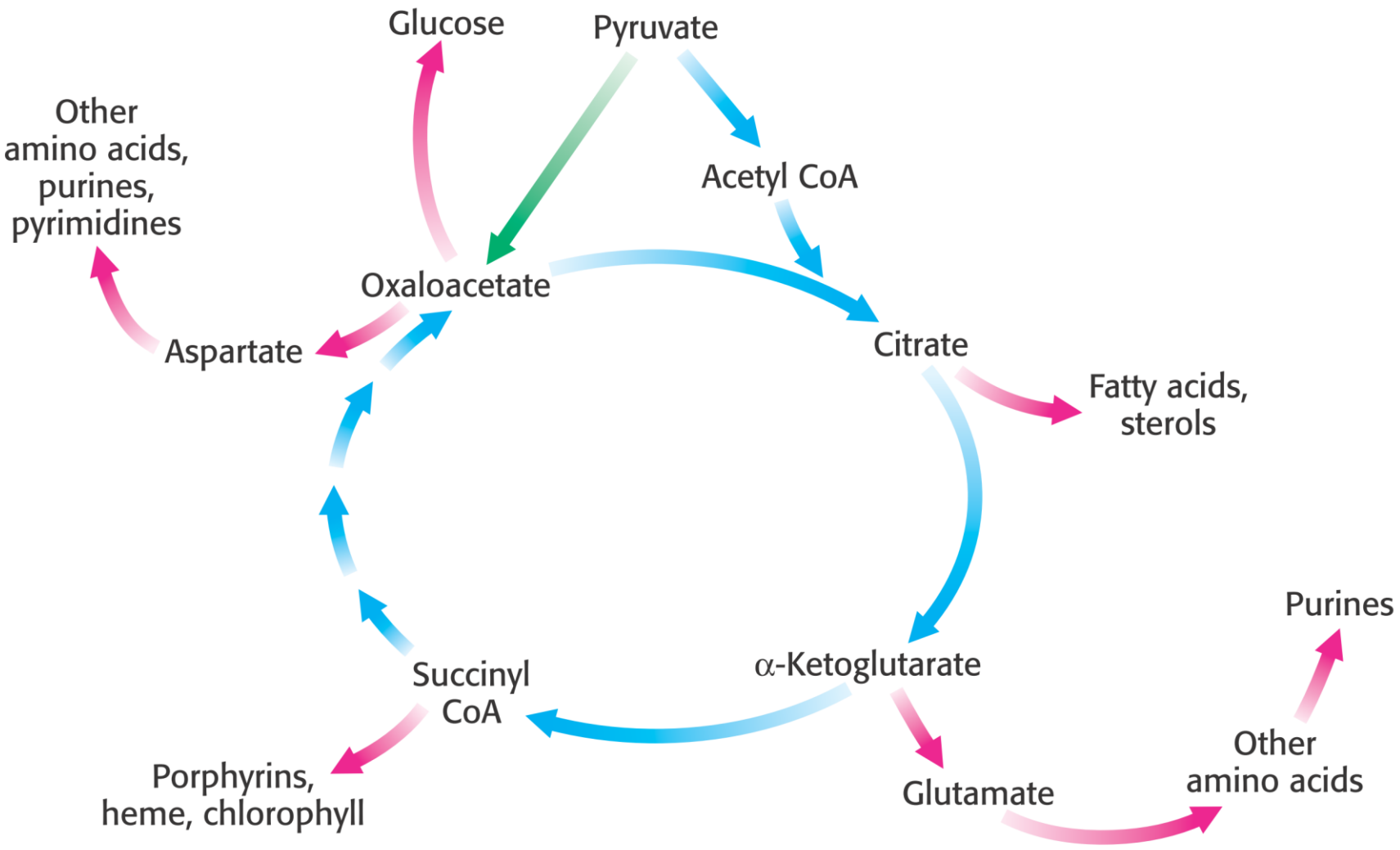


Figure 19.7 Control of the citric acid cycle. The citric acid cycle is regulated primarily by the concentrations of ATP and NADH. The key control points are the enzymes isocitrate dehydrogenase and α-ketoglutarate dehydrogenase.

Citric Acid Cycle – Biosynthetic Precursor



Citric Acid Cycle – Biosynthetic Precursor

$$\text{Pyruvate} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + P_i + 2H^+$$

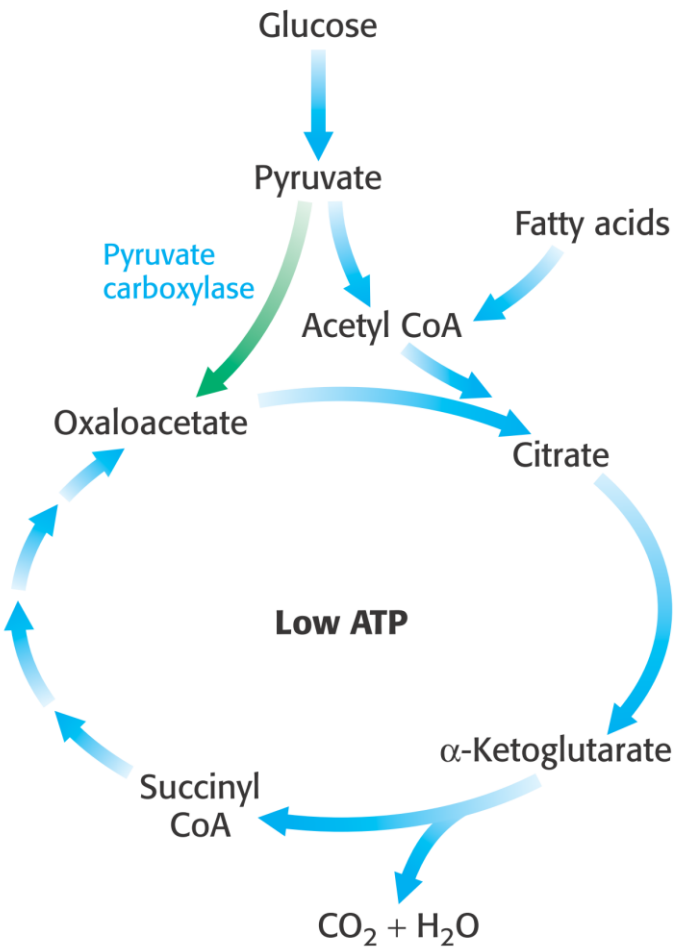


Figure 19.9 Pyruvate carboxylase replenishes the citric acid cycle. The rate of the citric acid cycle increases during exercise, requiring the replenishment of oxaloacetate and acetyl CoA. Oxaloacetate is replenished by its formation from pyruvate (green arrow). Acetyl CoA can be produced from the metabolism of both pyruvate and fatty acids.