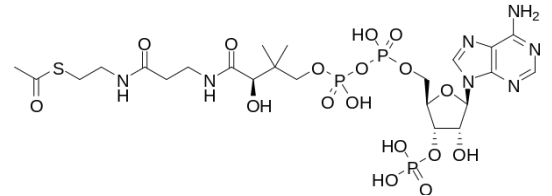


## CAPÍTOL 8 – CICLE DE KREBS

El **cicle de Krebs**, també conegut com a **cicle de l'àcid cítric** o **cicle dels àcids tricarboxílics (TCA)**, és una ruta metabòlica que forma part de la respiració cel·lular. És el punt de convergència del catabolisme de glúcids, lípids i proteïnes i té lloc a les mitocondries, concretament a la matriu mitocondrial. Durant aquest cicle es desenvolupen quatre funcions principals:

- Oxidació de l'Acetil-CoA fins a 2 CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O.
- Obtenció d'energia química en forma de poder reductor: 3 NADH i FADH<sub>2</sub>.
- Obtenció d'energia en forma de GTP.
- Obtenció de precursors metabòlics.

El caràcter cíclic es deu al fet que, després d'una sèrie de reaccions, es regenera el compost de partida, l'oxalacetat.

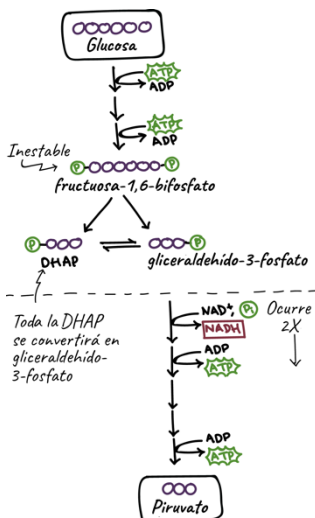


### 1. PRODUCCIÓ D'ACETIL-CoA

Abans d'entrar al Cicle de Krebs les molècules de glúcids, lípids i proteïnes s'han de sotmetre a diferents reaccions que les transformin en **acetil Co-A**, el substrat del cicle de Krebs i una molècula clau dins el metabolisme.

#### TRANSFORMACIÓ GLUCOSA --> ACETIL-CoA

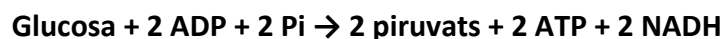
El procés que transforma la glucosa es pot dividir en dues parts: la glucòlisi, que la transforma en piruvat, i la posterior oxidació del piruvat en acetil-CoA i CO<sub>2</sub>.



Glucòlisi: és la via metabòlica encarregada d'oxidar la glucosa per d'obtenir energia per la cèl·lula. Té lloc al citoplasma cel·lular, la realitzen tots els organismes i és un procés anaeròbic.

Està formada per dues fases diferents: una d'activació, que necessita energia, i una de generació, en què es produeix energia en forma d'ATP.

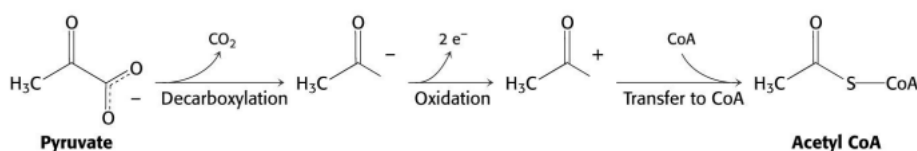
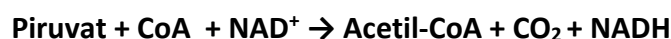
El balanç general de la glucòlisi és el següent:



El piruvat que es genera amb la glucòlisi pot transformar-se en Acetil-CoA o pot entrar a les rutes fermentatives.

Transformació de piruvat en Acetil-CoA: és una reacció d'oxidació catalitzada pel complex enzimàtic piruvat deshidrogenasa (PDH) en què obtenim Acetil-CoA i CO<sub>2</sub>. Aquest tipus de reacció es coneix com a **descarboxilació oxidativa** ja que el piruvat perd el seu grup carboxil en forma de diòxid de carboni.

L'ió piruvat des descarboxila donant CO<sub>2</sub> i es deshidrogena (s'oxida). Els dos protons que perd els accepta el NAD<sup>+</sup>, que es redueix i passa a NADH. L'acetil resultant s'uneix amb un coenzim A i forma l'acetil-CoA. La reacció global és la següent:

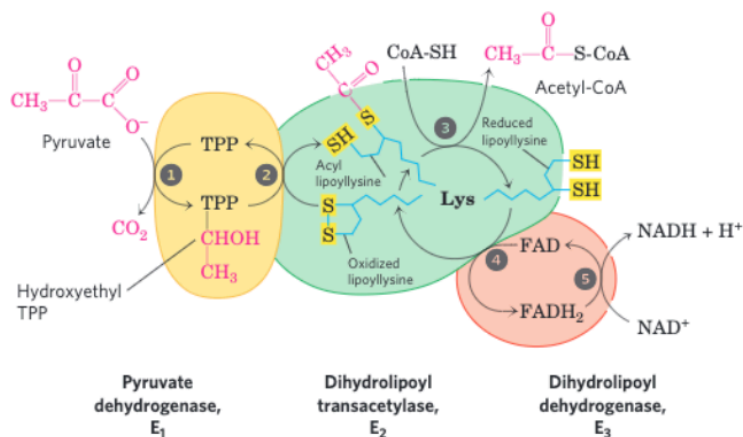


La **piruvat deshidrogenasa** és un complex multienzimàtic que conté múltiples còpies de 3 enzims diferents i es troba a la matriu de les mitocondries. Aquests tres enzims són:

Enzim	Cofactors	Reacció
Piruvat descarboxilasa	Pirofosfat de tiamina (TPP)	Descarboxilació del piruvat
Dihidrolipoli transacetilasa	Liopoamida i CoA	Transferència del grup acetil al CoA.
Dihidrolipoli deshidrogenasa	FAD i NAD <sup>+</sup>	Regeneració de la forma oxidada de la lipoamida.

El **coenzim A** té un grup funcional tiol (-SH) que pot unir-se a acetils formant tioèsters.

En aquesta reacció s'obté energia en forma de poder reductor, una molècula de NADH (que després permet obtenir 3 ATP). Els intermedis de les reaccions passen directament d'un centre actiu de la PDH a un altre, la PDH catalitza 5 reaccions de manera consecutiva. Això es coneix com a **canalització del substrat**.



1. La molècula de piruvat reacciona amb el TPP i es descarboxila. El C-1 del piruvat s'allibera com a CO<sub>2</sub> i el C-2 canvia d'estat d'oxidació: passa de ser un aldehyd, a un alcohol unit al TPP.
2. S'oxida l'hidroxiètil unit al TPP i es transforma en un àcid carboxílic (acetil). Els electrons que es perden serveixen per reduir el pont disulfur (S-S) de la lipoamida i transformar-lo en dos grups tiol (-SH). L'acetil que es produeix està unit a un dels grups tiol de la lipoamida.
3. Té lloc una transesterificació (procés d'intercanvi d'un grup R d'un èster orgànic amb un grup R' d'un alcohol) en què el grup tiol de l'acetil-CoA es substitueix pel de la lipoamida, que conté l'acetil. Aquest pas comporta la reducció de la lipoamida.
4. La dihidrolipoli deshidrogenasa catalitza la transferència de 2 H des de la lipoamida reduïda fins al grup prostètic FAD, que es redueix a FADH<sub>2</sub>.
5. El FADH<sub>2</sub> transfereix un H<sup>-</sup> al NAD<sup>+</sup> i forma NADH.
6. El complex enzimàtic està llest per tornar a començar un altre volta al cicle catalític.

La deficiència de vitamina B1 ocasiona una malaltia neurològica i cardiovascular anomenada **beri-beri**. Els individus que la pateixen solen tenir alts nivells de piruvat, lactat i alanina en sang, i baixa activitat de piruvat deshidrogenasa i, per tant, se'ls recomana una dieta baixa en carbohidrats.

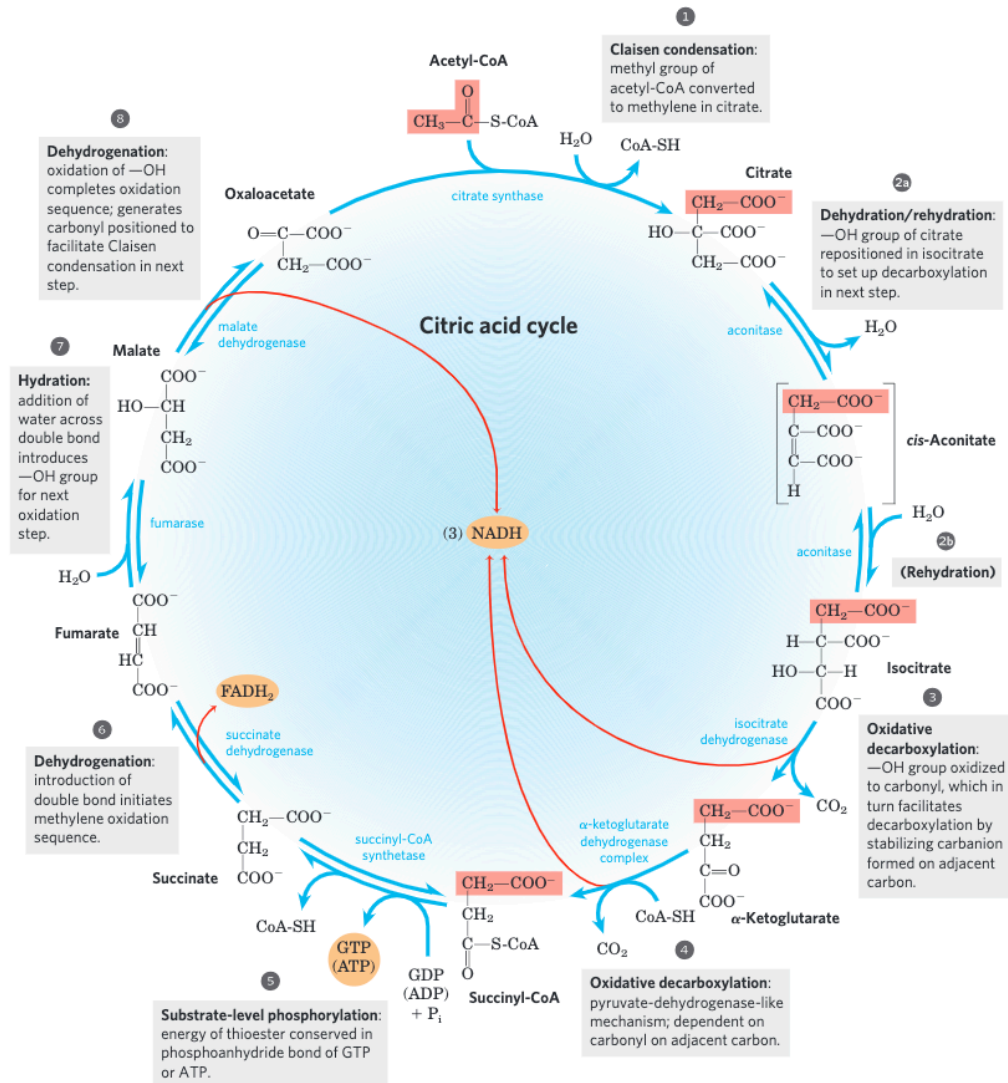
## TRANSFORMACIÓ LÍPIDS --> ACETIL-CoA

Els lípids poden transformar-se en acetil-CoA gràcies a la **β-oxidació**, un procés catabòlic cíclic que té lloc a la matriu mitocondrial i que oxida 2 àtoms de carboni de l'àcid gras per cicle. Prèviament els àcids grassos s'han d'activar amb el coenzim A ja que, sinó, en ser la membrana mitocondrial impermeable als lípids, no la poden travessar.

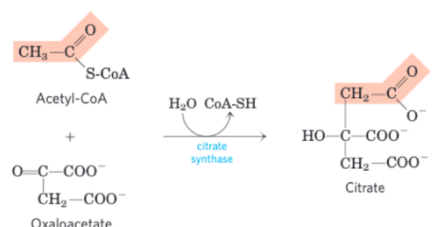
## TRANSFORMACIÓ D'AMINOÀCIDS --> ACETIL-CoA

Les proteïnes s'hidrolitzen a aminoàcids i aquests es degraden per transaminació, desaminació oxidativa i descarboxilació. Els aminoàcids glucogènics poden generar piruvat i, per tant, transformar-se en acetil-CoA de la mateixa manera que els glúcids, o poden generar intermediaris del cicle de Krebs. Els aminoàcids cetogènics (Lys i Leu) generen acetil-CoA o acetoacetil-CoA.

## 2. CICLE DE KREBS

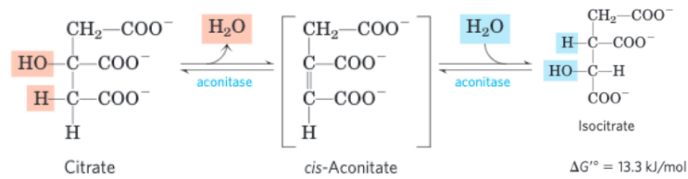


1. Condensació d'una molècula d'acetil-CoA amb àcid oxolacètic. El grup carbonil de l'oxalacetat fa d'electròfil i ataca el carboni del metil de l'acetil-CoA en el que es coneix com a **condensació de Claisen**. El metil passa d'estar unit a l'acetil-CoA a unir-se al C-2 de l'oxalacetat, formant una molècula de citrat, un compost de 6 carbonis. És una reacció irreversible ja que la hidròlisi de l'enllaç tioèster de l'acetil-CoA comporta l'alliberament d'una gran quantitat d'energia. Està catalitzada per l'enzim **citrat sintasa**. L'energia que s'obté de la hidròlisi de l'enllaç tioèster s'inverteix per formar un nou enllaç C-C.

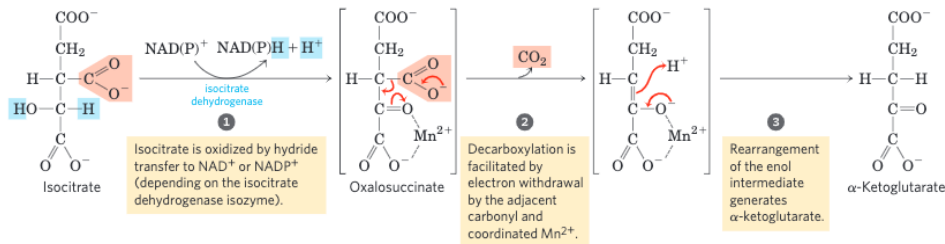


$$\Delta G^\circ = -32.2 \text{ kJ/mol}$$

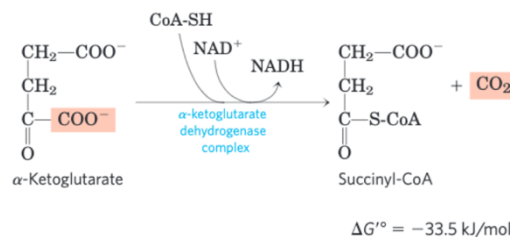
2. Transformació del citrat en isocitrat, catalitzada per l'enzim **aconitasa**. Aquesta reacció té lloc en dues etapes diferents i comporta la formació d'un producte intermedi, el *cis*-Aconitat.



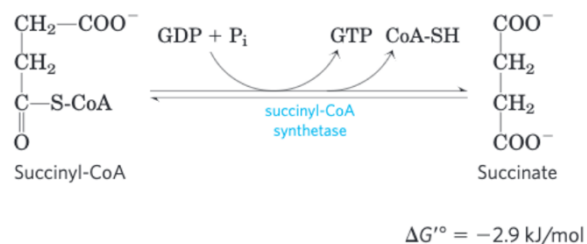
3. Oxidació de l'isocitrat a  $\alpha$ -cetoglutarat i  $\text{CO}_2$ , catalitzada per l'enzim **isocitrat deshidrogenasa** (l'oxidació equival a la descarboxilació de l'isocitrat), que també redueix el  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ .



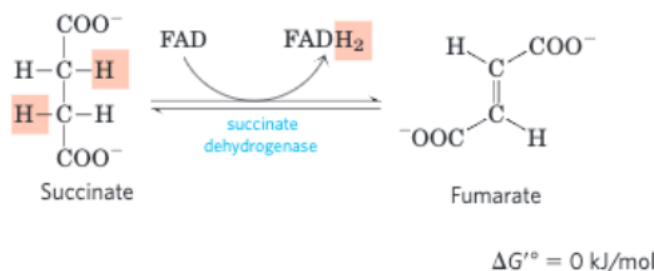
4. Oxidació de l' $\alpha$ -cetoglutarat a succinil-CoA i  $\text{CO}_2$ . En aquest cas l'oxidació també correspon a una descarboxilació (= -  $\text{CO}_2$ ) catalitzada pel complex multienzimàtic  **$\alpha$ -cetoglutarat deshidrogenasa**.  $\text{NAD}^+$  actua com a acceptor d'electrons i el CoA com a transportador del succinil. L'energia que obtenim oxidant l' $\alpha$ -cetoglutarat es conserva a l'enllaç tioèster del succinil-CoA.



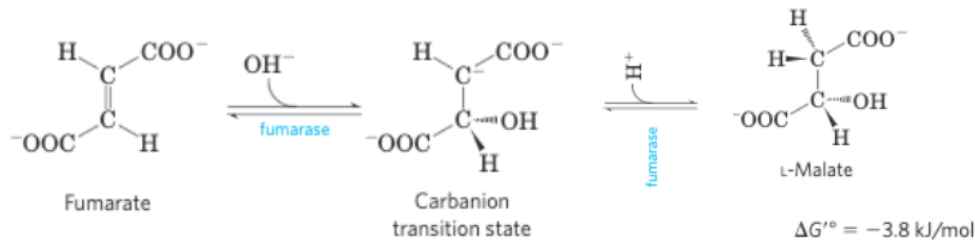
5. Conversió del succinil-CoA en succinat. L'enllaç tioèster del succinil s'hidrolitza i l'energia que emmagatzemava es transfereix a una molècula de GTP o ATP i, en el procés, es forma el succinat. Aquesta reacció reversible està catalitzada per la **succinil-CoA sintetasa**.



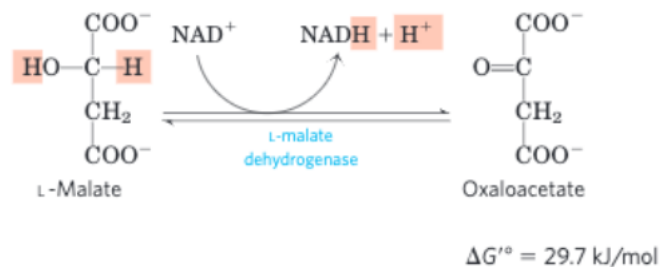
6. Oxidació del succinat a fumarat gràcies a la **succinat deshidrogenasa**.



7. Hidratació reversible del fumarat a malat catalitzada per la **fumarasa**. S'obté com a producte intermedi un carbanió.



8. Oxidació del malat a oxalacetat catalitzada per l'enzim **L-malat deshidrogenasa**, que està enllaçat amb una molècula de  $\text{NAD}^+$  que accepta un electró i es redueix a  $\text{NADH}$ . Per aquest motiu aquest pas del cicle de Krebs, igual que el 6, està connectat amb la cadena respiratòria i, si aquesta s'inhibeix, el cicle també. És una reacció endergònica i, per tant, en condicions estàndard està desplaçada cap a l'esquerra. Com que l'oxalacetat contínuament s'elimina per reaccionar amb l'acetil-CoA per formar citrat en una reacció exergònica, la reacció està, en realitat, desplaçada cap a la dreta.



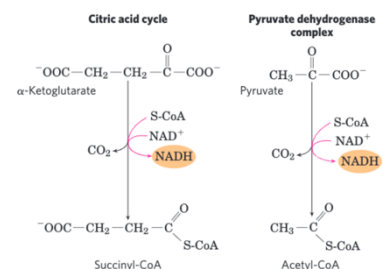
## ENZIMS QUE INTERVENEN AL CICLE DE KREBS

**Citrat Sintasa:** és l'enzim que catalitza la primera etapa del Cicle de Krebs, la formació de citrat, en una reacció molt exergònica, irreversible i allunyada de l'equilibri. La va descobrir Severo Ochoa.

**Aconitasa:** catalitza la transformació reversible i no espontània (però que té lloc ja que la concentració d'isocitrat és molt petita perquè es consumeix ràpidament durant la següent etapa) del citrat en isocitrat. La reacció que catalitza és estereoespecífica perquè dels 4 estereoisòmers que podríem obtenir només se'n produeix 1. El seu centre actiu és proquiral.

**Isocitrat deshidrogenasa:** catalitza la descarboxilació oxidativa de l'isocitrat a  $\alpha$ -cetoglutarat. Conté un àtom de  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  al centre actiu que interactua amb el carbonil d'un dels intermediaris de la reacció (oxalosuccinat) i queden coordinats. Utilitza  $\text{NAD}^+$  com a acceptor d'electrons i, per tant, el redueix a  $\text{NADH}$ .

**Complex multienzimàtic  $\alpha$ -cetoglutarat-deshidrogenasa:** catalitza la descarboxilació oxidativa de l' $\alpha$ -cetoglutarat a succinil-CoA i  $\text{CO}_2$ . Catalitza una reacció idèntica a la del piruvat deshidrogenasa i els dos complexos són molt similars tant en estructura com en funció. Els tres estan formats per tres enzims: E1, E2 i E3 i contenen els mateixos cofactors. Probablement derivin d'un ancestre comú.



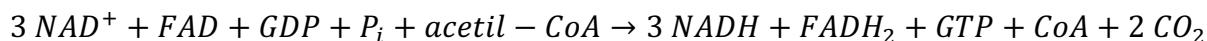
**Succinil-CoA sintetasa:** catalitza la conversió del succinil-CoA en succinat en què es produeix GTP i s'allibera CoA.

**Succinat deshidrogenasa** (també complex mitocondrial II de la cadena respiratòria): catalitza l'oxidació del succinat a fumarat. A les cèl·lules eucariotes la trobem a la membrana mitocondrial interna. Està covalentment unit amb una molècula de FAD que es redueix a  $\text{FADH}_2$  i va a parar a la cadena respiratòria.

Fumarasa: catalitza la hidratació del fumarat a malat. És una reacció altament esteroespecífica, catalitza només la hidratació de l'enllaç doble trans del fumarat però no el cis. En la direcció contrària passa el mateix, el D-Malat, que s'obté a partir de l'isòmer cis, no és un substrat vàlid.

Malat deshidrogenasa: catalitza l'oxidació del malat a oxalacetat. Està enllaçat amb una molècula de  $NAD^+$  que redueix a NADH i que va a parar a la cadena respiratòria.

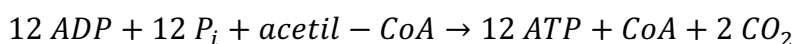
### BALANÇ GLOBAL DEL CICLE DE KREBS



Les molècules de NADH i  $FADH_2$  que obtenim s'oxiden a la cadena de transport electrònic en presència d'oxigen i generen un total d'11 molècules ATP (3 per cada NADH i 2 per cada  $FADH_2$ ):

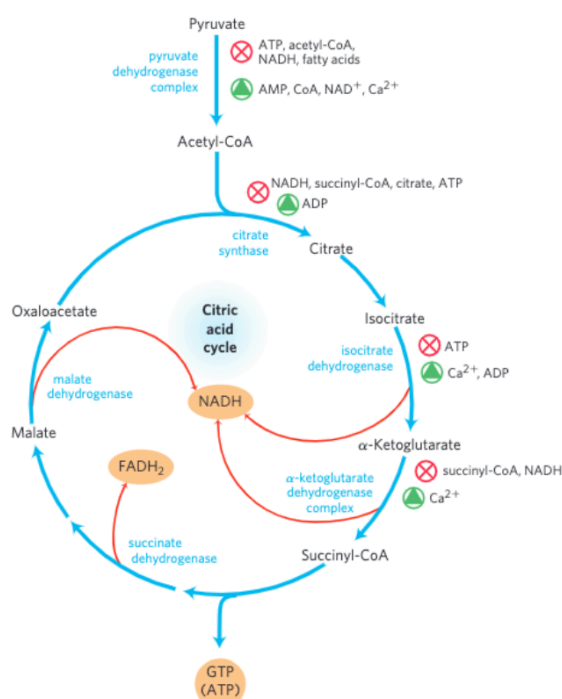


Tenint en compte aquestes conversions podem escriure el balanç de la següent manera:



### 3. REGULACIÓ DEL CICLE DE KREBS

La regulació del cicle de Krebs assegura que els productes que es generen ho fan a una velocitat adequada per mantenir la cèl·lula en un estat estable: evita que es sobreproduixin intermediaris per la cadena respiratòria que no es podran utilitzar i controla que se'n generin els que fan falta.



La regulació es produeix en etapes allunyades de l'equilibri ( $\Delta G^\circ$  molt negativa) catalitzades pels següents enzims: citrat sintasa, isocitrat deshidrogenasa i  $\alpha$ -cetoglutarat deshidrogenasa.

Citrat sintasa: quan augmenten els nivells de NADH i/o ATP per sobre dels nivells normals, disminueix la seva activitat i, per tant, també ho fa la formació de citrat.

Isocitrat deshidrogenasa: també s'inhibeix per les molècules de NADH i ATP i s'estimula amb  $NAD^+$ , ADP i  $Mg^{2+}$ .

$\alpha$ -cetoglutarat deshidrogenasa: de la mateixa manera que la PHD s'inhibeix amb els productes finals de la reacció que catalitza (succinil-CoA i NADH).

La velocitat general del cicle està regulada de forma general pel producte final de les reaccions d'obtenció d'energia de la cadena respiratòria, l'ATP, i el producte final de les etapes de deshidrogenació del cicle, el NADH. La disponibilitat de  $NAD^+$  determina que la velocitat del cicle sigui proporcional al consum d' $O_2$ .

INHIBIDORS	ACTIVADORS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- NADH i ATP (càrrega energètica alta)</li> <li>- Disponibilitat de compostos d'alta energia (acetil-CoA i succinil-CoA).</li> <li>- Necessitats cel·lulars satisfetes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADP i <math>NAD^+</math> (càrrega energètica baixa)</li> <li>- <math>Ca^{2+}</math> que serveix per adaptar el cicle a la contracció muscular.</li> </ul>

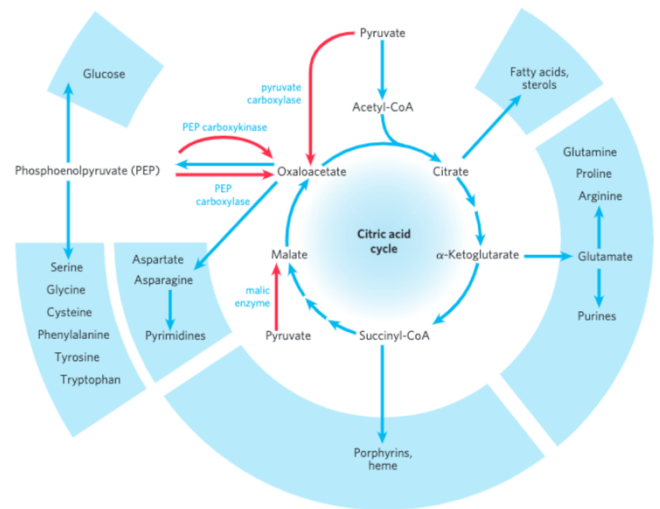


La velocitat del cicle de Krebs també es regula durant la conversió del piruvat a acetil-CoA, catalitzada per la piruvat deshidrogenasa. Aquest complex enzimàtic, en mamífers, conté dues proteïnes l'única funció de les quals és regular la seva activitat. Es pot inhibir per mitjà de dos mecanismes:

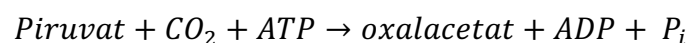
- Inhibició al·lostèrica dels enzims  $E_3$  i  $E_2$  del complex: l'enzim s'inhibeix quan les concentracions d'acetil-CoA i NADH són elevades i s'activa quan aquestes són baixes o quan la demanda energètica de la cèl·lula requereix un major flux d'acetil-CoA dins el cicle.
- Inhibició per modificació covalent de l'enzim  $E_1$  del complex: s'inhibeix per fosforilació reversible del residu de l'aminoàcid Ser de dues subunitats d' $E_1$ , que l'inactiva. Si per hidròlisi eliminem el  $P_i$  tornarem a activar  $E_1$ .

#### 4. AMFIBOLISME

El cicle de Krebs és una ruta **amfibòlica**, és a dir, està present tant als processos catabòlics (obtenició d'energia, degradació) com anabòlics (consum d'energia, síntesi). El cicle de Krebs és la via degradativa més important per generar ATP i, alhora, és també essencial per la biosíntesi de compostos cel·lulars. Per exemple, genera precursors per diferents vies anabòliques: alguns dels intermediaris del cicle de Krebs, com l'oxalacetat i l' $\alpha$ -cetoglutarat intervien a la síntesi d'aminoàcids com l'àcid aspàrtic i glutàmic.

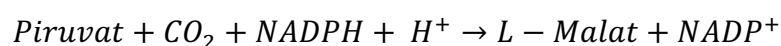


Els intermediaris del cicle de Krebs que participen en reaccions anabòliques s'han de reposar, ja que sinó el cicle es detindria (els productes d'una etapa del cicle acostumen a ser els reactius de la següent i, si ens manquen, no podem tirar endavant). Les **reaccions anapleròtiques** són les encarregades de reposar els intermediaris que s'eliminen per fer de precursors biosintètics, és a dir, de restablir els nivells d'intermediaris. La reacció anapleròtica més important és la carboxilació reversible de l'àcid pirúvic per formar àcid oxalacètic, que està catalitzada per la piruvat carboxilasa i té lloc als ronyós i al fetge:



Quan el cicle de Krebs és deficient en oxalacetat, el piruvat es carboxila per produir-ne més. Aquesta reacció, com bé indica l'equació, requereix energia aportada per l'ATP. La **piruvat carboxilasa** és un enzim al·lostèric que s'activa en presència del seu modulador, l'acetil-CoA. Quan aquest es troba en excés l'enzim s'activa per convertir piruvat en oxalacetat i, d'aquesta manera, no obtenim tant acetil-CoA i en podem consumir més ja que l'oxalacetat hi reacciona. L'activitat de la piruvat carboxilasa augmenta amb l'exercici, el dejuni i la diabetis.

L'enzim **màlic**, també conegut com a **malat deshidrogenasa dependent de NADP<sup>+</sup>**, es troba al cor i teixit muscular i catalitza la reacció:



La seva activitat disminueix en pacients amb diabetis i augmenta després de l'administració d'insulina.