

## LEZIONE 11 BIOCHIMICA ( Sbobinatore: Borello Natalia)

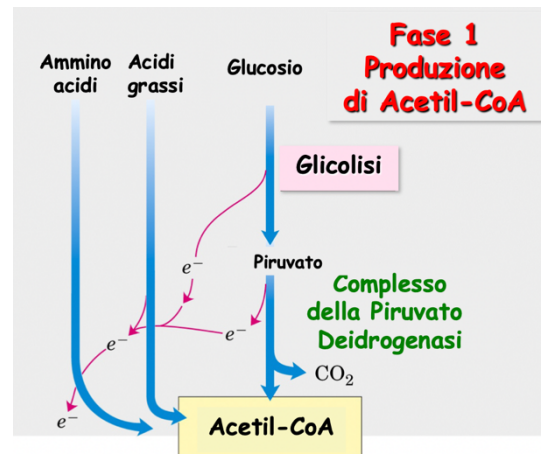
### Argomenti: Il ciclo di Krebs

In questa lezione vedremo come le sostanze convogliano verso l'ultima degradazione che avviene a livello del Ciclo di Krebs, il quale è un metabolismo la cui sede si trova all'interno della matrice mitocondriale.

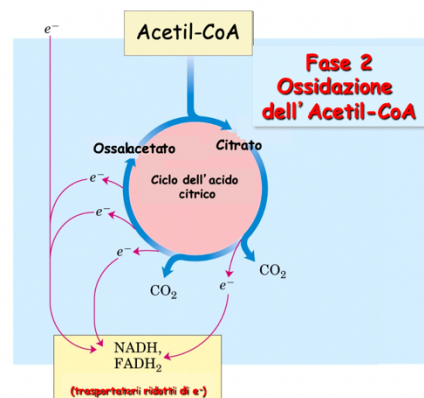
Il mitocondrio ha due sistemi di membrane: uno esterno (più permeabile ai soluti) e uno interno selettivo ai vari soluti; quindi, poiché ci dev'essere uno scambio di sostanze fra il mitocondrio e il citoplasma, esistono dei trasportatori adibiti a tale compito (come quelli che abbiamo visto trasportare fuori il malato o il PEP posizionati sulla membrana interna dei mitocondri).

Quando si studia la degradazione delle varie sostanze, per comodità, si divide questa degradazione in tre fasi:

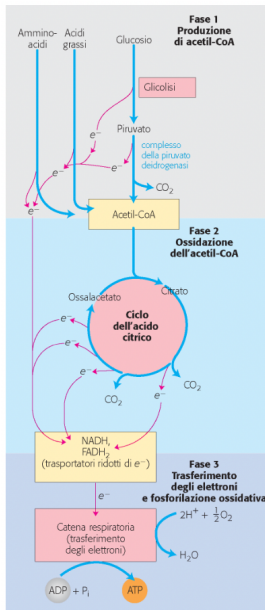
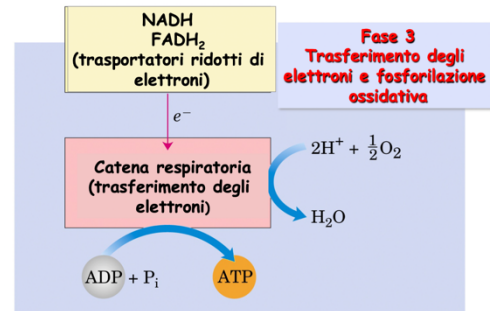
1. Produzione di AcetilCoA → viene prodotto essenzialmente a livello mitocondriale. Può essere prodotto da vari substrati, ad esempio, a partire da glucosio oppure da acidi grassi o amminoacidi (in particolare i chetogenetici). Inoltre, in questa fase, oltre alla produzione di AcetilCoA, che è fondamentale per poi far partire il ciclo di Krebs, abbiamo elettroni presenti sui trasportatori di elettroni che sono i coenzimi ridotti (es. NADH e FADH<sub>2</sub>)



2. Una volta prodotto l'AcetilCoA si entra nella cosiddetta ossidazione di quest'ultimo. Sostanzialmente non si ha produzione di energia, tranne che per un'unica molecola, ma si ha nuovamente formazione di coenzimi ridotti. Una volta che, a livello della matrice mitocondriale, sono stati prodotti tutta questa serie di coenzimi ridotti, essi entrano nella fase successiva.



3. I coenzimi vengono nuovamente ossidati e ciò permetterà la sintesi di ATP (fosforilazione ossidativa)



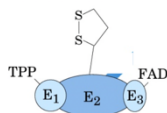
In questa immagine viene riassunto tutto ciò che abbiamo descritto sopra. Le sostanze devono seguire questo ciclo perché solo un susseguirsi di queste fasi può portare ad una formazione cospicua di ATP che, fino a prima della fase 3, era molto limitata.



$$\Delta G^{\circ'} = -33,4 \text{ kJ/mole}$$

ossidativa del piruvato ed NAD ridotto. La reazione è irreversibile ed ha un  $\Delta G$  profondamente negativo. Questo complesso enzimatico è formato da tre subunità proteiche, alcune delle quali

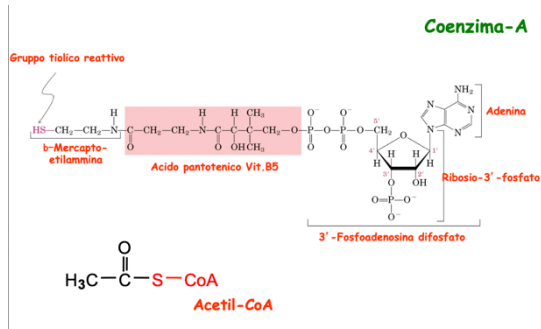
legano specificatamente alcuni degli enzimi mostrati in basso:



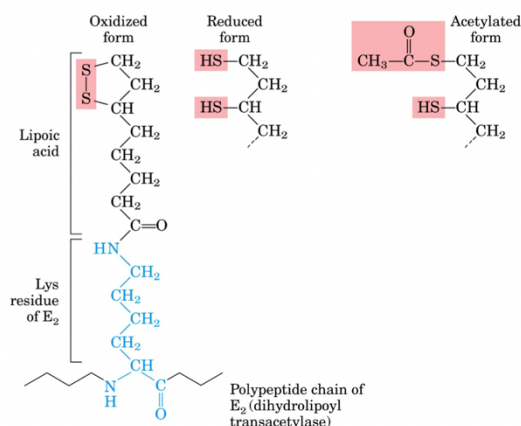
Enzima	Abbreviazione	Gruppo prostetico o Coenzimi
Piruvato deidrogenasi	E <sub>1</sub>	Tiamina Pirofosfato
Diidrolipoil Transacetilasi	E <sub>2</sub>	Lipoato
Diidrolipoil Deidrogenasi	E <sub>3</sub>	FAD
		NAD <sup>+</sup>
		Coenzima-A

la prima è la Piruvato deidrogenasi (E1) propriamente detta che lega covalentemente la tiamina pirofosfato; poi abbiamo la diidropoil transacetetilasi (E2) che lega covalentemente il lipoato; infine la diidropoil deidrogenasi (E3), che lega covalentemente il FAD.

Partecipano anche una molecola di NAD ossidato ed una di CoA, che non sono legati a nessun substrato. Questi due non solo legati covalentemente, quindi, non sono gruppi prostetici dell'enzima.

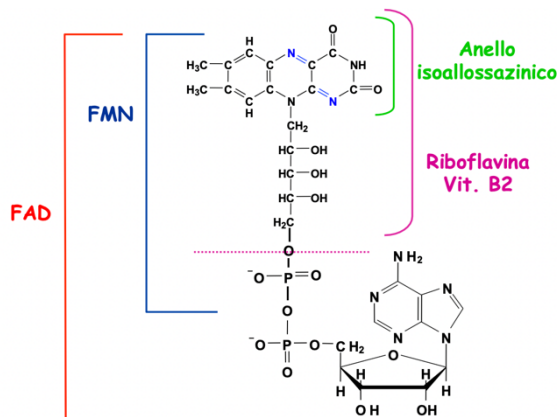


La molecola del CoA è formata dall'unione dell'acido pantotenico con il Fosfoadenosina difosfato (nucleotide) e la b-Mercapto-etilammina. La parte reattiva della molecola è il gruppo tiolico SH. Grazie a questo gruppo, il CoA può essere legato all'acetaldeide per formare l'AcetilCoA. Spesso, infatti, nelle reazioni in cui è utilizzato il CoA (che è un attivatore della molecola) si indica lo zolfo proprio per indicare il legame tioestere.

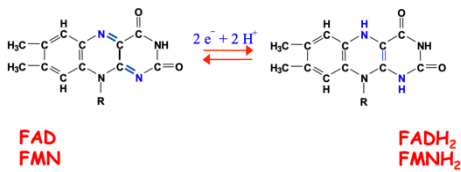


L'altro coenzima che è legato covalentemente alla proteina è l'acido lipoico, tramite un residuo di lisina. La sua caratteristica è quella di avere un anello che forma un ponte disolfuro. Questo ponte può essere ossidato o ridotto. Nel meccanismo della reazione catalizzata dalla piruvato deidrogenasi, si avrà prima la formazione di un intermedio, quindi trasferimento dell'acetile sul ponte disolfuro sul lipoato, con rottura del ponte e, successivamente, la completa riduzione del ponte. Abbiamo già parlato del coenzima tiamina pirofosfato quando abbiamo visto la decarbossilazione del piruvato ad acido acetico

nella fermentazione alcolica.



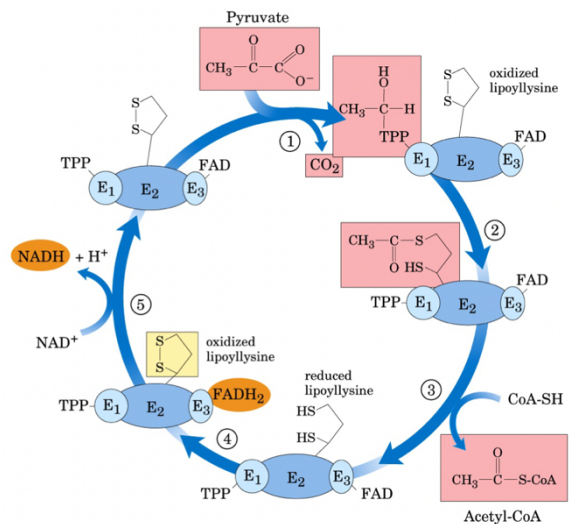
Il FAD è costituito dalla riboflavina (vitamina B2) e, la parte reattiva della molecola, sono i due azoti in blu, ovvero quelli dell'anello isoallossazinicco. Quando a questa struttura viene legato un gruppo fosfato, otteniamo un enzima che prende il nome di FMN. Questo coenzima è presente all'interno delle nostre cellule nella catena di trasporto degli elettroni. Per ottenere, invece, il FAD è necessario legare una molecola di AMP all'FMN. A differenza del NAD che, di fatto, acquisisce uno ione idruro (quindi due elettroni ed un protone), il FAD e l'FMN vengono completamente ridotti acquisendo due protoni e due elettroni.



In figura si può notare la riduzione dei due azoti di cui si è parlato prima.

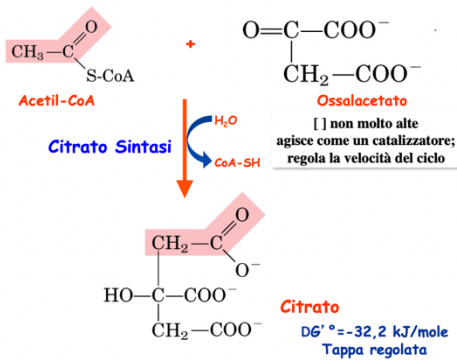
Il meccanismo di decarbossilazione del piruvato per ottenere l'AcetilCoA inizia con le stesse modalità che abbiamo visto essere utilizzate per decarbossilare il piruvato ad acetaldeide: il piruvato si lega sulla TPP e viene decarbossilato. È lo stesso processo che abbiamo già visto nella fermentazione alcolica. La differenza fra quello che avviene nella fermentazione alcolica e questo è che nella fermentazione alcolica l'acetaldeide viene rilasciato nel mezzo, invece, in questo caso, l'acetaldeide viene trasferito sul ponte disolfuro del lipoato.

In un passaggio successivo, l'Acetaldeide viene legata al gruppo reattivo del CoA formando l'AcetilCoA e, quindi, inizia la concreta riduzione dell'anello presente sull'acetilcolina. A questo punto, dopo la formazione di AcetilCoA, il resto del meccanismo serve per ripristinare lo stato iniziale dell'enzima. Quindi, il gruppo presente sul lipoato va riossidato a spese del FAD presente sulla terza subunità dell'enzima che, chiaramente, viene ridotto a FADH<sub>2</sub>. Il FADH<sub>2</sub> deve essere, a sua volta, riossidato a spese di una molecola di NAD che, questa volta, è libero nella matrice mitocondriale. Riducendo il NAD a NADH + H<sup>+</sup>, l'enzima è ripristinato e la decarbossilazione ossidativa del piruvato può ripartire.



L'AcetilCoA è stato prodotto e può entrare nel ciclo di Krebs. Il suo nome deriva dalla presenza di una molecola che non viene né prodotta, né consumata: l'ossalacetato. Quindi il ciclo partirà grazie alla presenza, nella matrice mitocondriale di AcetilCoA e ossalacetato e permetterà l'ulteriore ossidazione della molecola di AcetilCoA con formazione di tutta una serie di equivalenti di riduzione ed un'unica molecola di ATP.

## Prima reazione:



È la condensazione tra AcetilCoA e Ossalacetato.

L'ossalacetato è un acido tricarbossilico che abbiamo già incontrato quando abbiamo visto la gluconeogenesi ma, in questo caso, condensa con l'AcetilCoA grazie alla presenza di un enzima chiamato citrato sintasi, che permette la formazione del citrato e la fuoriuscita del CoA. Il citrato, che è il substrato dal quale, spesso, prende il nome il ciclo, è un acido tricarbossilico a 6C (atomi di carbonio).

La reazione è irreversibile e questa è una delle tappe

regolate del ciclo di Krebs. Il ciclo di Krebs, è regolato anche e soprattutto dalla concentrazione dell'ossalacetato nella matrice mitocondriale.

## Seconda reazione:



La seconda reazione è regolata da un enzima chiamato

Aconitasi. E' una reazione reversibile che porta alla

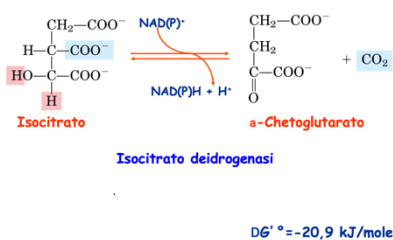
formazione dell'isocitrato e che funziona in due passaggi

metabolici. Il primo consiste nella perdita di una molecola

d'acqua con formazione di un intermedio chiamato cis-

aconitato che presenta un doppio legame al quale, successivamente, viene addizionata una molecola di acqua, portando alla formazione dell'isocitrato (spostamento del gruppo -OH in posizione 2)

## Terza reazione:



L'isocitrato va incontro, quindi, a decarbossilazione ossidativa in

una reazione catalizzata dall'isocitrato deidrogenasi. Abbiamo la

perdita di una molecola di CO<sub>2</sub> e quindi viene ridotta una

molecola di NAD<sup>+</sup> a NADH + H<sup>+</sup> andando a formare l'α-

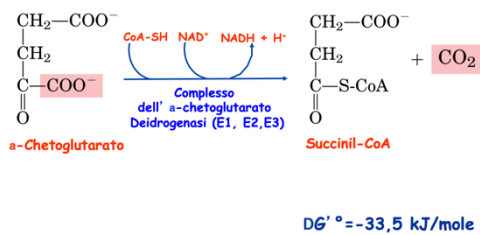
chetoglutarato più la molecola di CO<sub>2</sub>. L'isocitrato deidrogenasi è

presente in più isoforme. A seconda dell'isoforma che abbiamo, il

coenzima che può essere utilizzato è il NAD o il NADP. Il Ciclo di

Krebs utilizza il coenzima NAD.

#### Quarta reazione:



L' $\alpha$ -chetoglutarato subisce una reazione simile a quella che abbiamo visto per il piruvato, ovvero viene decarbossilato, e a questa molecola ne viene legata una di CoA. Anche in questo caso, si utilizza un complesso enzimatico che prende il nome di complesso dell' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi e che ha la stessa struttura della piruvato deidrogenasi. Anche in questo complesso vengono

utilizzati i cinque coenzimi che abbiamo visto prima. Questa reazione dà la sintesi di SuccinilCoA +  $\text{CO}_2$ .

#### Quinta reazione:



Il SuccinilCoA, grazie alla presenza del CoA, rende queste molecole altamente energetiche e, quindi, a partire dal SuccinilCoA, attraverso la SuccinilCoA sintetasi e l'utilizzo di una molecola di GDP + P, si ha l'allontanamento del CoA, quindi la rottura di questo legame ad alto contenuto energetico per formare il Succinato e,

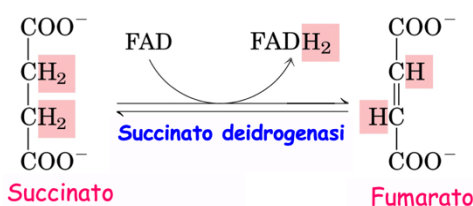
contemporaneamente, la sintesi di una molecola di GTP. Questa è l'unica molecola ad alto contenuto energetico che il ciclo di Krebs riesce a sintetizzare e, di fatto, questa reazione è una fosforilazione a livello del substrato che noi abbiamo già incontrato nella sintesi dell'ATP in fase 10 e 6 della glicolisi.



Questa molecola di GTP può essere trasformata facilmente in una molecola di ATP perché nella cellula esistono una serie di enzimi che catalizzano reazioni reversibili e senza

dispendio di energia in cui si ha scambio di gruppi fosfato fra i diversi nucleotidi: il GTP può reagire con una molecola di ADP per dare GDP + ATP.

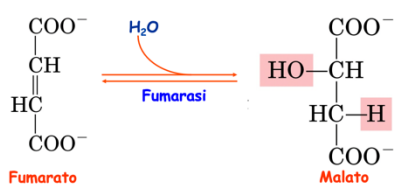
#### Sesta reazione:



Il Succinato che è stato ottenuto va incontro ad una reazione di ossidazione catalizzata da un enzima chiamato succinato deidrogenasi che utilizza come coenzima il FAD che viene ridotto a FADH2 con formazione di Fumarato che un doppio legame fra carbonio 2 e carbonio 3. La succinato deidrogenasi è particolare perché è l'unico enzima del ciclo di Krebs che è legato alla membrana mitocondriale interna e che costituisce anche il secondo complesso della catena di trasporto degli elettroni.



## Settima reazione:



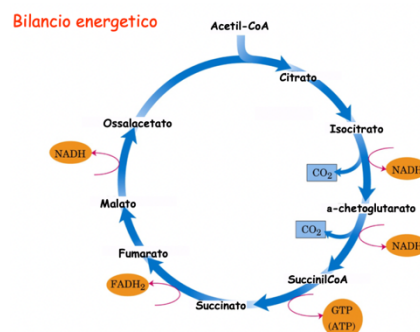
Sul doppio legame del Fumarato viene addizionata una molecola d'acqua ottenendo, grazie alla fumarasi, il Malato.

## Ottava reazione:



Il Malato diventa Ossalacetato grazie alla presenza, nei mitocondri, della malato deidrogenasi. Ricordiamo che l'Ossalacetato è il substrato che, nel ciclo di Krebs, non viene prodotto né consumato. Il ciclo di Krebs termina.

Di fatto, quindi, l'unica molecola di ATP prodotta nel ciclo di Krebs è quella che fa parte della reazione catalizzata dalla Succinato sintasi.



Facendo il bilancio energetico della produzione totale di molecole di ATP che si ottengono degradando completamente una molecola di Glucosio, il risultato sarà di 30/32 molecole. Questo perché si attribuisce per la sintesi di ogni molecola di  $NADH$  ottenute durante la glicolisi, formazione di AcetilCoA e ciclo di Krebs, la capacità di sintetizzare 2,5 molecole di ATP, mentre si attribuisce ad ogni molecola di  $FADH_2$  la capacità di sintetizzare 1,5 molecole di ATP.

table 16-1

Stoichiometry of Coenzyme Reduction and ATP Formation in the Aerobic Oxidation of Glucose via Glycolysis, the Pyruvate Dehydrogenase Reaction, the Citric Acid Cycle, and Oxidative Phosphorylation

Reaction	Number of ATP or reduced coenzymes directly formed	Number of ATP ultimately formed*
Glucose $\rightarrow$ glucose 6-phosphate	-1 ATP	-1
Fructose 6-phosphate $\rightarrow$ fructose 1,6-bisphosphate	-1 ATP	-1
2 Glyceraldehyde 3-phosphate $\rightarrow$ 2 1,3-bisphosphoglycerate	2 $NADH$	3-5
2 1,3-Bisphosphoglycerate $\rightarrow$ 2 3-phosphoglycerate	2 ATP	2
2 Phosphoenolpyruvate $\rightarrow$ 2 pyruvate	2 ATP	2
2 Pyruvate $\rightarrow$ 2 acetyl-CoA	2 $NADH$	5
2 Isocitrate $\rightarrow$ 2 $\alpha$ -ketoglutarate	2 $NADH$	5
2 $\alpha$ -Ketoglutarate $\rightarrow$ 2 succinyl-CoA	2 $NADH$	5
2 Succinyl-CoA $\rightarrow$ 2 succinate	2 ATP (or 2 GTP)	2
2 Succinate $\rightarrow$ 2 fumarate	2 $FADH_2$	3
2 Malate $\rightarrow$ 2 oxaloacetate	2 $NADH$	5
Total		30-32

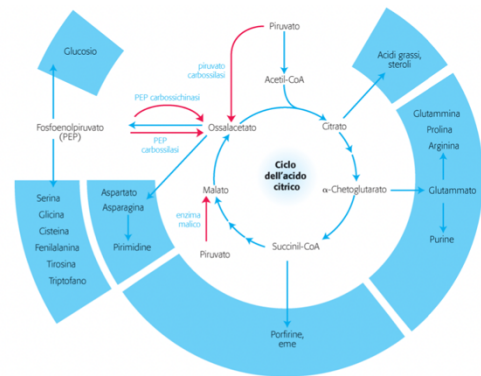
\*This is calculated as 2.5 ATP per  $NADH$  and 1.5 ATP per  $FADH_2$ . A negative value indicates consumption.

Il numero varia fra 30 e 32 perché bisogna fare attenzione alla tappa della glicolisi catalizzata dall'enzima gliceraldeide3P deidrogenasi. Questa, se ricordiamo, produce una molecola di  $NADH$

che deve essere riossidata. La riossidazione può avvenire in due diverse modalità. A seconda del tipo di riossidazione verranno prodotte 3 o 5 molecole di ATP.

Il ciclo di Krebs è particolare in quanto smista tanti metabolismi. Come sappiamo, è presente nella matrice mitocondriale ed ha il problema che molti dei suoi substrati appartengano anche ad altri composti. Quindi, in qualche modo, il ciclo di viene “saccheggiato” da tanti metabolismi che necessitano dei suoi intermedi per ottenere altri substrati. Abbiamo:

1. Citrato: che serve per la sintesi degli acidi grassi.
2.  $\alpha$ -chetoglutarato che serve per formare glutammato che, a sua volta, formerà anche una serie di altri intermedi.
3. SuccinilCoA è alla base della sintesi dell'eme
4. Ossalacetato (dal quale dipende la velocità del ciclo di Krebs) che può essere utilizzato per sintetizzare l'aspartato, tutta una serie di altri aminoacidi e glucosio.



### Reazioni anaplerotiche

<b>FEGATO RENE</b>	
$\text{Piruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons[\text{mitocondriale}]{\text{piruvato carbossilasi}} \text{Ossalacetato} + \text{ADP} + \text{Pi}$	
<b>CUORE, MUSCOLO SCHELETRICO</b>	
$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{GDP} \xrightleftharpoons[\text{mitocondriale}]{\text{PEP carbossichinasi}} \text{Ossalacetato} + \text{GTP}$	
<b>UBIQUITARIO</b>	
$\text{Piruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightleftharpoons[\text{citoplasmatico}]{\text{enzima malico}} \text{Malato} + \text{NAD(P)}^+$	
<b>PIANTE; LIEVITO; BATTERI</b>	
$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{HCO}_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP carbossilasi}} \text{Ossalacetato} + \text{Pi}$	

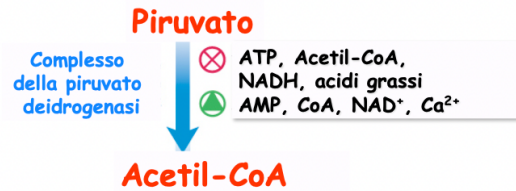
Queste sottrazioni rallentano il ciclo, quindi in cellula esistono delle reazioni chiamate anaplerotiche che, invece, sintetizzano substrati per il ciclo di Krebs e, quindi, lo riempiono nuovamente di substrati. Vengono considerate reazioni anaplerotiche quelle reazioni che possono sintetizzare Ossalacetato o Malato. Alcune di queste le abbiamo già incontrate:

1. la prima tappa della gluconeogenesi nella quale si ha sintesi di Ossalacetato e che è caratterizzata dalla piruvato carbossilasi (enzima mitocondriale).
2. Reazione che produce Ossalacetato (mitocondriale) partendo dalla PEP carbossichinasi perché questa è una reazione reversibile.
3. Reazione catalizzata dall'enzima malico (localizzato nel citoplasma) che incontreremo nella sintesi degli acidi grassi e che permette la carbossilazione del piruvato con ossidazione di una molecola di NADH per dare Malato e NAD. Il Malato può, quindi, rientrare nei mitocondri. Questo enzima può utilizzare sia NAD che NADP. Abbiamo quindi più isoforme. È una reazione reversibile.
4. L'ultima reazione anaplerotica (NON AVVIENE NEL NOSTRO ORGANISMO) è catalizzata sempre dalla PEP carbossilasi e permette la sintesi di Ossalacetato partendo da Fosfoenolpiruvato.



Abbiamo già visto questa immagine quando abbiamo parlato della sintesi del glucosio. Sappiamo che il piruvato può andare incontro a vari destini a seconda dello stato metabolico della cellula. Se il piruvato è in eccesso può essere utilizzato per sintesi di glucosio, altrimenti può essere mandato verso il ciclo di Krebs per dare energia. Il destino del piruvato deve essere chiaramente regolato. Se abbiamo un eccesso di AcetilCoA non ha senso continuare a mandare avanti il ciclo di Krebs e quindi l'AcetilCoA diventa inibitore del suo stesso enzima e attivatore della piruvato carbossilasi per mandare il Piruvato verso la sintesi del glucosio.

La produzione di Acetil-CoA da parte del complesso della piruvato deidrogenasi è sotto controllo allosterico e covalente



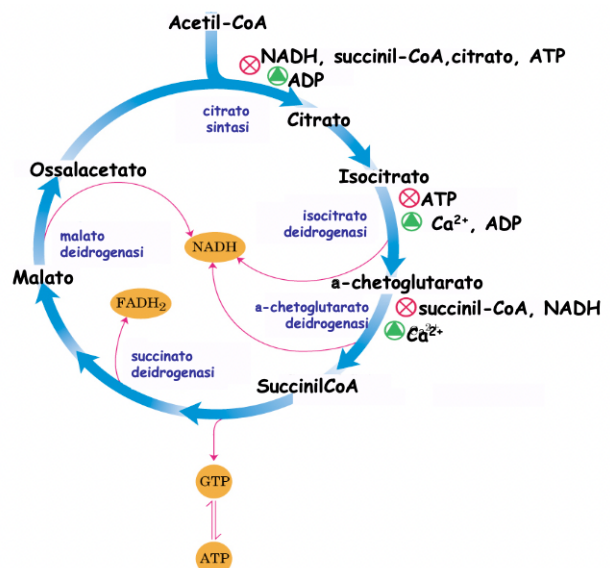
Quindi il primo enzima che, in realtà, viene regolato prima ancora di regolare il Ciclo di Krebs, è il complesso della piruvato deidrogenasi che viene regolato allostericamente e inibito da AcetilCoA (che è il suo stesso prodotto), ATP, NADH e presenza di acidi grassi perché l'eccesso di queste sostanze indicano alla cellula che c'è un alto contenuto energetico. Viceversa, viene attivato da AMP, CoA libero, NAD<sup>+</sup> e calcio.

Perché il calcio è un indicatore di scarso contenuto energetico?

Il calcio viene rilasciato nel nostro organismo in maniera massiva durante la contrazione muscolare. Difatti viene riversato dal sarcoplasma nel citoplasma e quindi indica alla cellula muscolare che deve sintetizzare ATP mandando l'AcetilCoA verso il ciclo di Krebs. Il complesso della piruvato deidrogenasi subisce anche una regolazione da parte delle cascate enzimatiche di insulina e glucagone: viene inattivato dall'insulina in modo da mandare l'AcetilCoA verso la sintesi e viene attivato dal glucagone.

Di fatto, la regolazione del ciclo di Krebs è piuttosto semplice ed è dovuta a regolazioni di tipo allosterico che avvengono sui primi enzimi del ciclo stesso. È regolato dalla disponibilità di substrato perché, avendo molte reazioni reversibili, abbiamo quella che viene chiamata "inibizione di retroazione", ovvero, inibizione per accumulo di prodotto. Dopodiché abbiamo questa inibizione di tipo allosterico prevalentemente retroattiva sulle prime reazioni del ciclo che viene regolato anche dalla presenza in cellula del rapporto fra NADH e NAD<sup>+</sup> e ATP e ADP. Più è alta la quantità di NADH e di ATP e più lento sarà il ciclo di Krebs perché entrambi sono substrati che indicano che non è necessario mandarlo. Più è alto invece il NAD ossidato e la presenza di ADP e più viene agevolato il ciclo.

Le regolazioni sono di tipo allosterico. Gli enzimi che vengono regolati sono:



1. Citrato sintasi: regolato dal suo stesso substrato, dall'ATP e dal SuccinilCoA. Sono tutti inibitori.
2. l'isocitrato deidrogenasi: inibito da ATP e attivato da calcio o ADP.
3. Il complesso dell' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi: inibito dal suo substrato e NADH mentre è attivato da Calcio.