

METABOLISMO

- Il metabolismo (dal greco cambiamento) è il complesso delle reazioni chimiche e fisiche che avvengono in un organismo vivente per mantenerlo in vita.
- Gli organismi viventi devono comunque rispettare le leggi della termodinamica che descrivono le regole del trasferimento di calore e lavoro (energia)
- La seconda legge della termodinamica dice che in ogni sistema chiuso (confinato) la quantità di entropia (disordine) tende ad aumentare (da cui il famoso enunciato l'entropia dell'universo è in costante aumento).
- Apparentemente la straordinaria complessità degli organismi viventi sembra contraddire questa legge
- La vita è possibile poichè gli organismi viventi sono dei sistemi aperti
- Perciò i sistemi viventi non sono all'equilibrio (termodinamico)

METABOLISMO

- Gli organismi viventi sono dei sistemi dissipativi. Essi mantengono il loro stato di alta complessità e organizzazione (bassa entropia) causando un grande aumento di entropia dell'ambiente
- Il metabolismo cellulare raggiunge questo obiettivo accoppiando i processi spontanei del catabolismo ai processi non spontanei dell'anabolismo
- Da un punto di vista termodinamico, il metabolismo mantiene l'ordine creando il disordine

- Processi spontanei: esoergonici
$$\Delta G \ll 0 \quad \rightarrow \quad \Delta S \text{ aumenta}$$
- Processi non spontanei: endoergonici
$$\Delta G > 0 \quad \rightarrow \quad \Delta S \text{ diminuisce}$$

Gli organismi viventi operano trasformazioni di varie forme di energia

ENERGIA RADIANTE

cloroplasti

**ENERGIA CHIMICA
(tessuti vegetali)**

=

**ENERGIA CHIMICA
(alimenti)**

↓ mitocondri

ATP

(conservazione di energia chimica)

enzimi cellulari

membrane

fibre muscolari

**ENERGIA
CHIMICA
(tessuti animali)**

**ENERGIA
OSMOTICA
(trasporto)**

**ENERGIA
MECCANICA
(contrazione)**

L'aumento di ordine (diminuzione di entropia) che si verifica nella sintesi delle biomolecole è "pagato" da energia proveniente dall'esterno, trasformata in energia di legame chimico (ATP) e utilizzata in vari modi

METABOLISMO

Funzioni del metabolismo

- Ottenere energia chimica
- Convertire le molecole
- Polimerizzare i precursori monomerici
- Sintetizzare e degradare le biomolecole

Il metabolismo è tradizionalmente diviso in due parti

Catabolismo o metabolismo degradativo

sostanze nutrienti \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} +$ Energia utilizzabile

Anabolismo o metabolismo biosintetico

piccole molecole + energia \rightarrow molecole complesse

Metabolismo energetico

comporta il recupero dell'energia producendo molecole di ATP

Strategie trofiche in base alla fonte di energia libera

Autotrofi

(in grado di sintetizzare tutti i loro costituenti a partire da molecole più semplici come H_2O , CO_2)

chemiolitotrofi (attraverso l'ossidazione di composti inorganici come NH_3 , H_2S)

fotoautotrofi (mediante fotosintesi)

Eterotrofi

(ottengono energia dall'ossidazione di composti organici come carboidrati, lipidi e proteine)

Il metabolismo ossidativo

Degradazione ossidativa dei composti a base di carbonio in CO_2 e H_2O

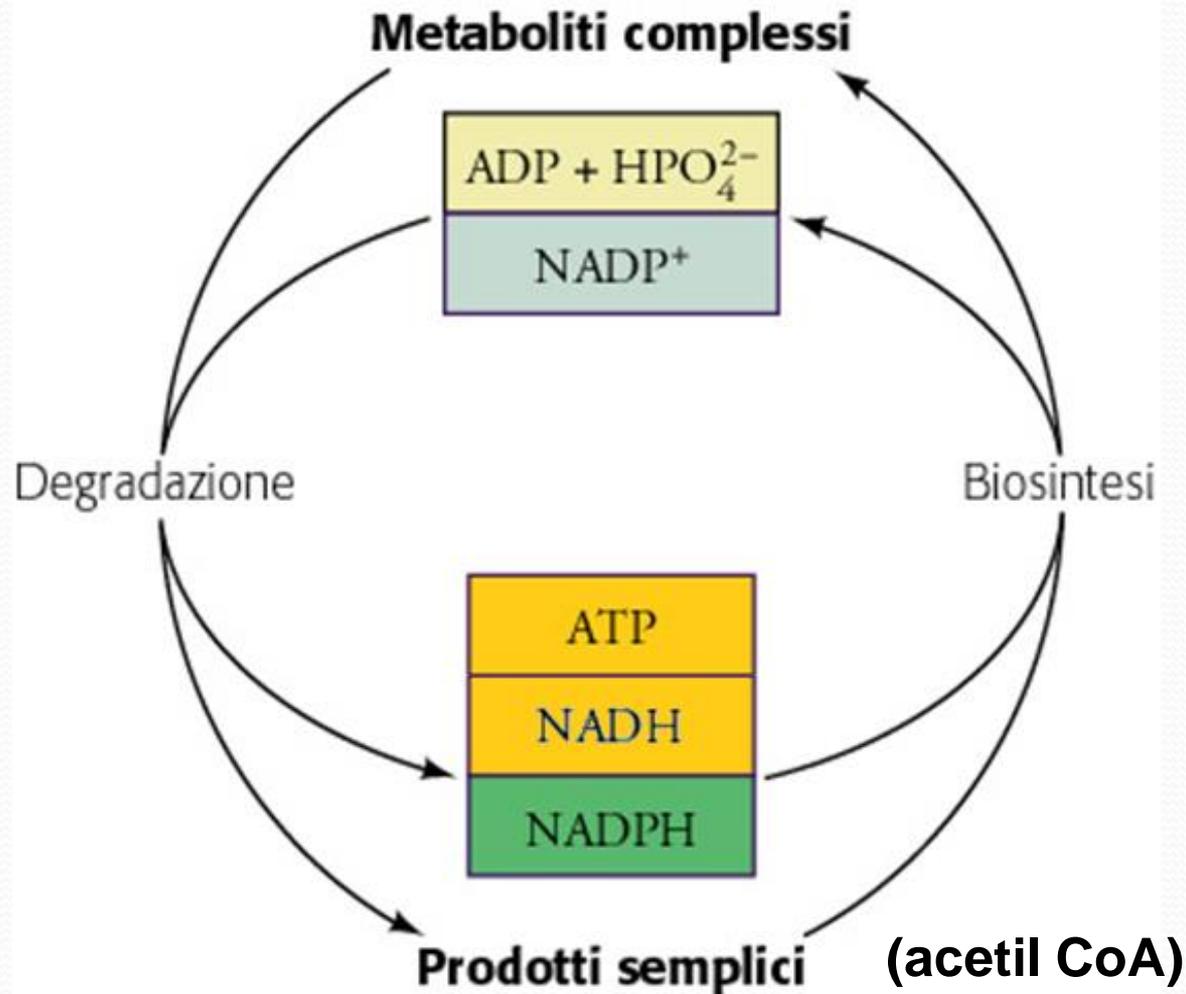
Il carbonio C è ossidato – perde elettroni
l' O_2 è ridotto ad H_2O – acquista elettroni

In queste reazioni vengono prodotte molecole di ATP e coenzimi ridotti (NADH/NADPH/FADH₂) che conservano buona parte dell'energia liberata durante le reazioni di ossidazione.

L'ossidazione dei coenzimi ridotti porterà ad una ulteriore generazione di energia chimica (ATP)

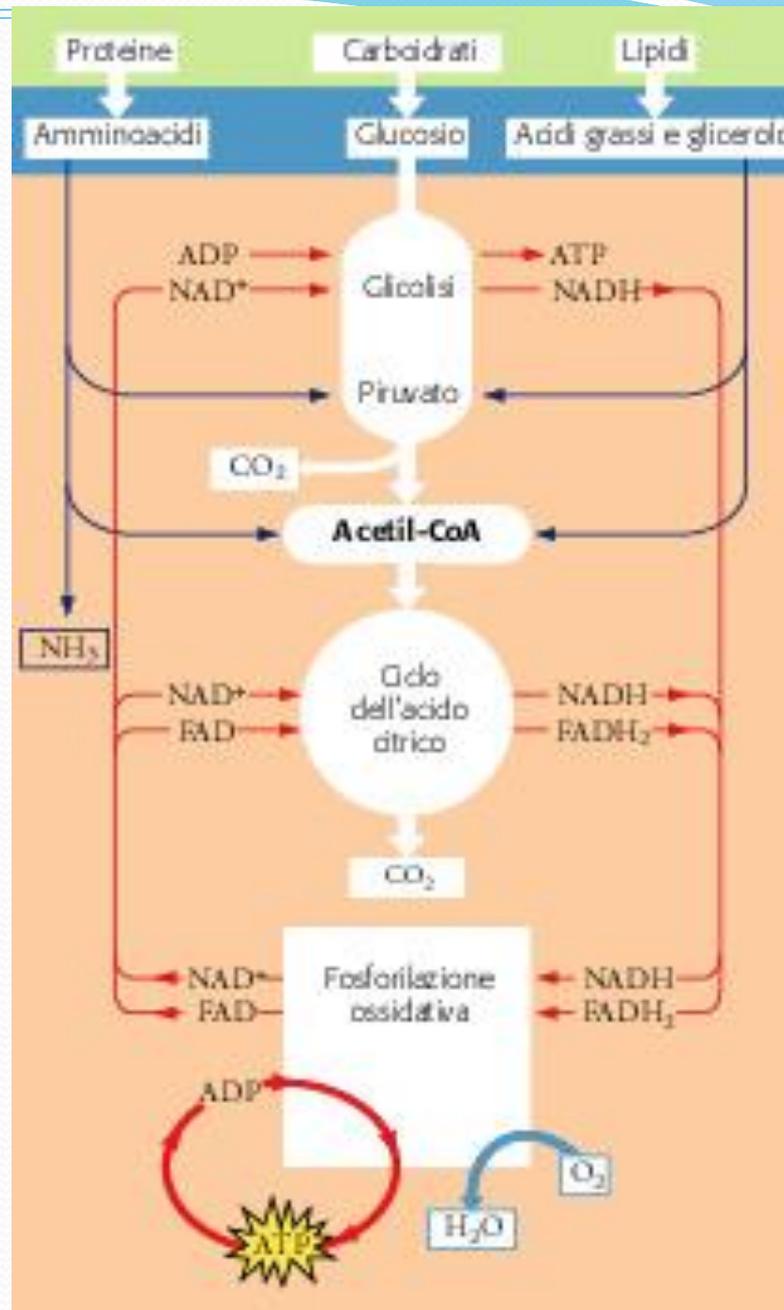


Ruoli dell'ATP e del NAD⁺/NADP⁺ nel metabolismo

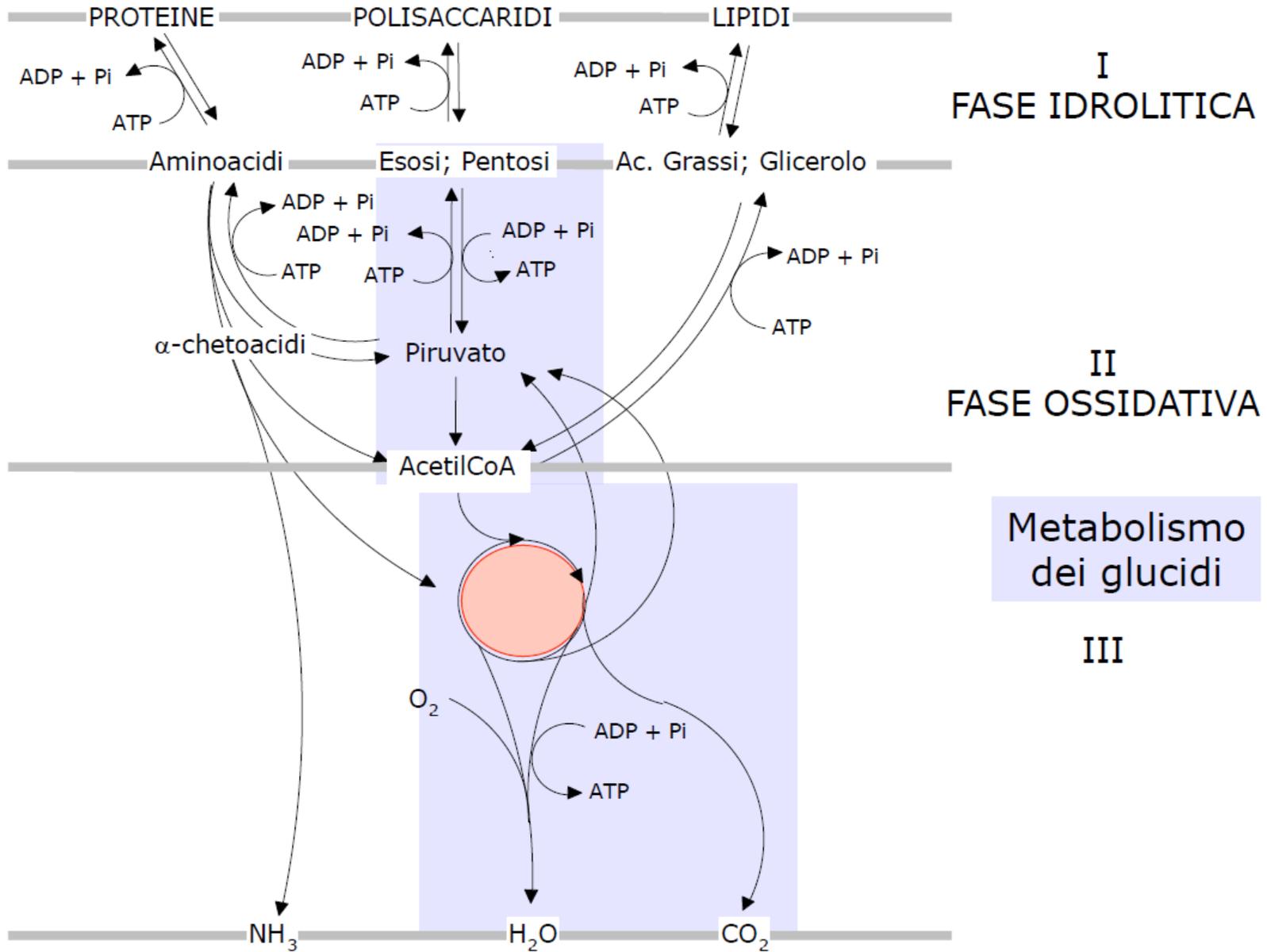


L'ATP e il NADPH sintetizzati mediante la degradazione di metaboliti complessi sono la fonte di energia libera per le reazioni di biosintesi e per altre reazioni.

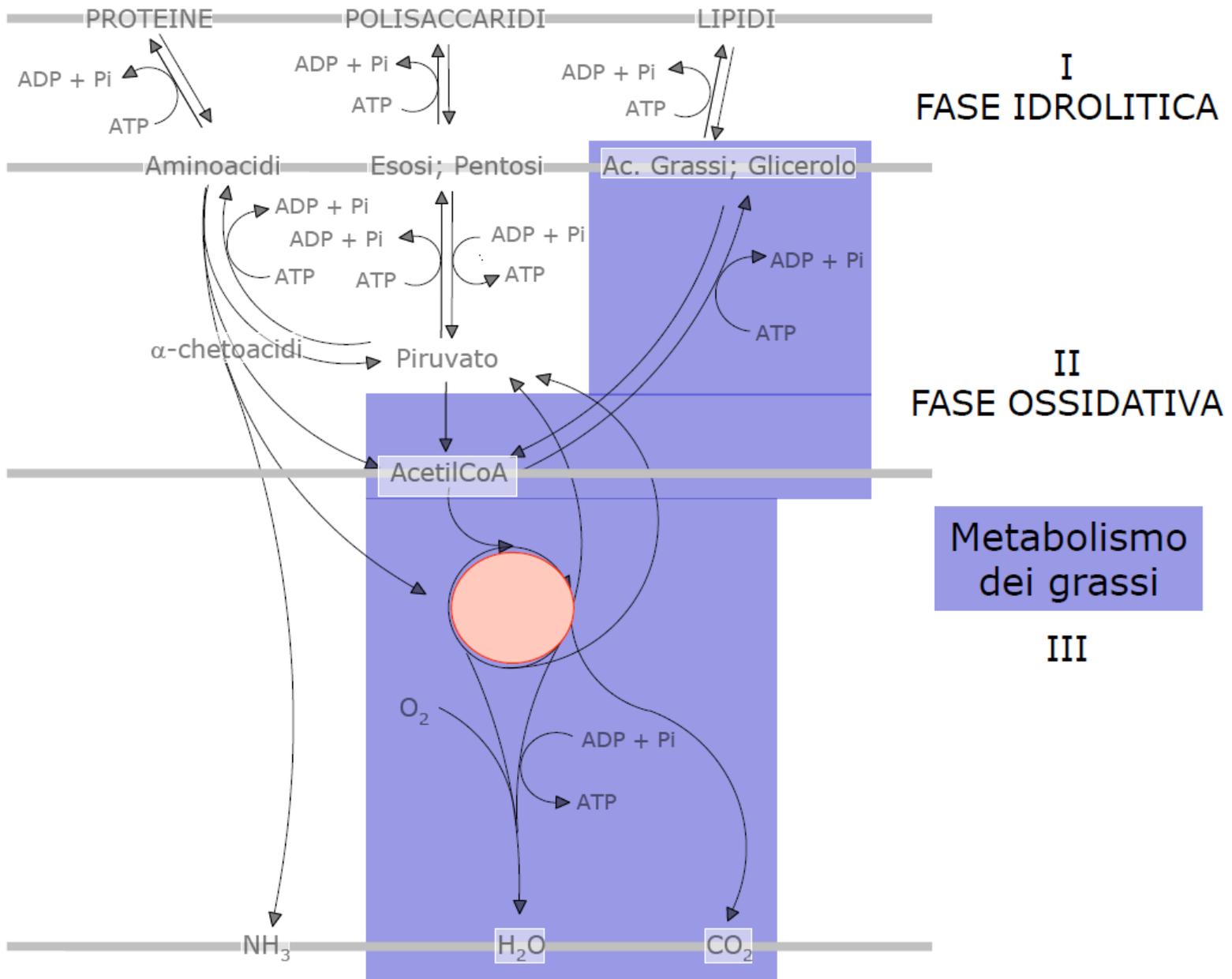
SGUARDO GENERALE AL CATABOLISMO



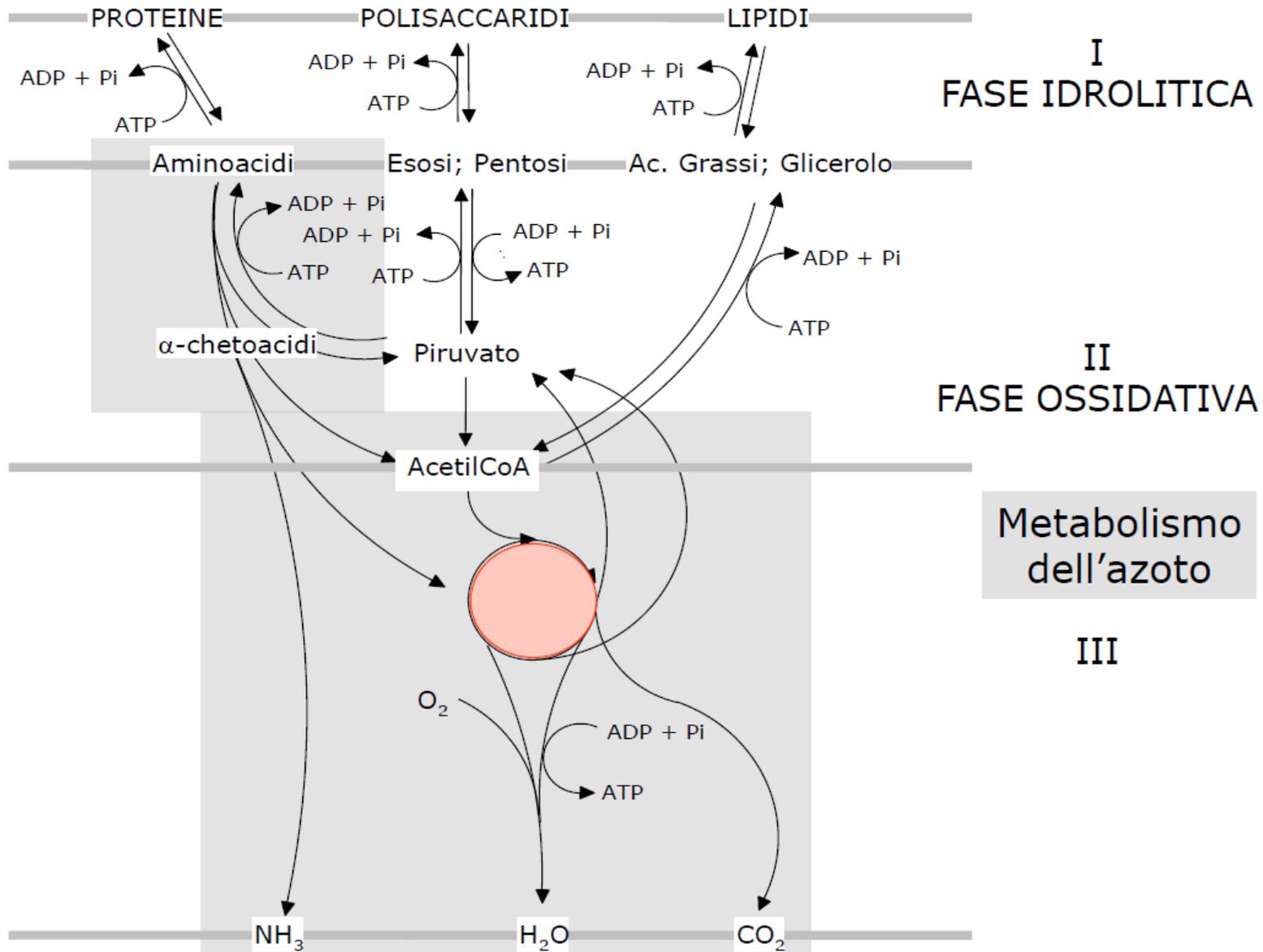
Metabolismo glucidi



Metabolismo lipidi



Metabolismo azoto



Nella cellula le vie metaboliche hanno localizzazioni specifiche

Tabella 13.1. Funzioni metaboliche degli organelli negli eucarioti

<i>Organello</i>	<i>Funzione</i>
Mitocondrio	Ciclo dell'acido citrico, fosforilazione ossidativa, ossidazione degli acidi grassi, demolizione degli amminoacidi
Citosol	Glicolisi, via del pentosio fosfato, biosintesi degli acidi grassi, molte reazioni della gluconeogenesi
Lisosomi	Digestione enzimatica dei componenti cellulari e del materiale ingerito
Nucleo	Replicazione e trascrizione del DNA, modificazioni dell'RNA
Apparato di Golgi	Modificazioni post-traduzionali delle proteine di membrana e di secrezione; formazione della membrana plasmatica e delle vescicole di secrezione
Reticolo endoplasmatico ruvido	Sintesi delle proteine legate alla membrana e delle proteine di secrezione
Reticolo endoplasmatico liscio	Biosintesi dei lipidi e degli steroidi
Perossisomi (gliossisomi nelle piante)	Reazioni ossidative catalizzate da amminoacido ossidasi e catalasi; nelle piante, reazioni del ciclo del gliossilato

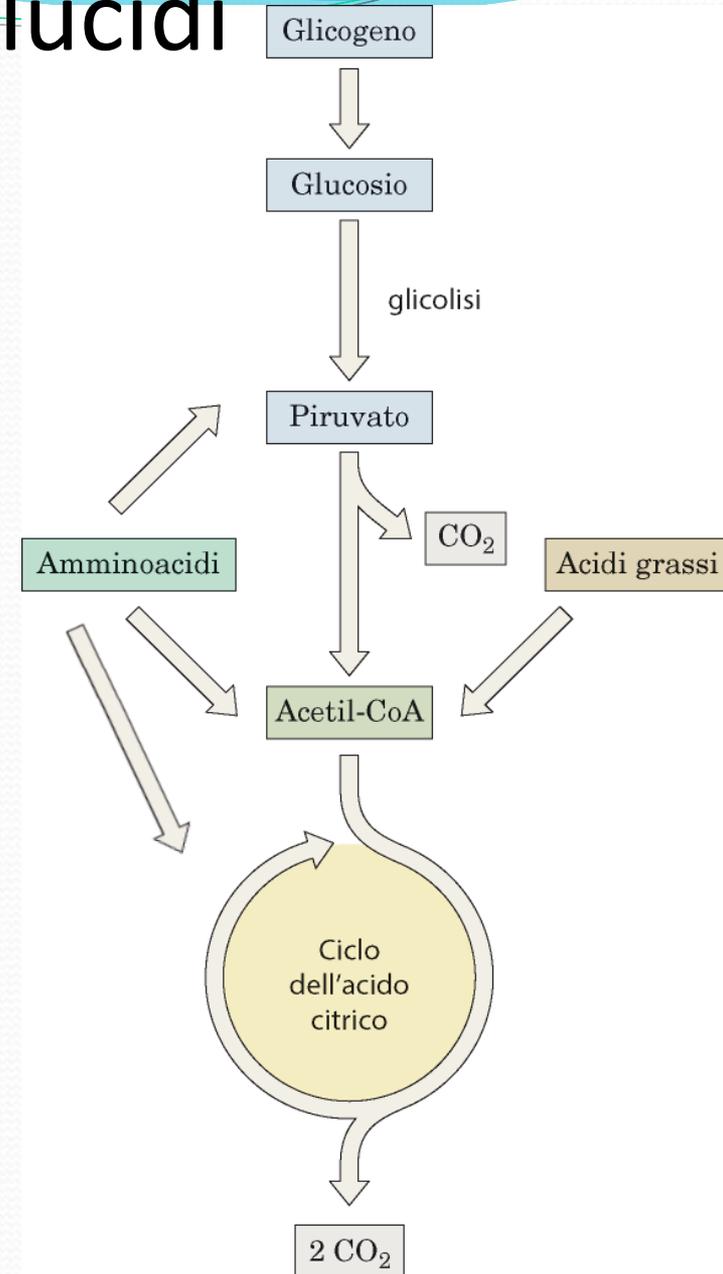
Metabolismo ossidativo glucidi

La trasformazione del glucosio in piruvato attraverso la glicolisi fornisce solo una parte dell'ATP generato dal catabolismo del glucosio stesso.

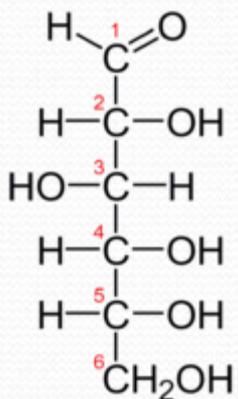
La maggior parte dell'ATP si genera durante la completa ossidazione dei derivati del glucosio a CO_2 mediante il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs.

Il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici costituisce la via finale di ossidazione delle molecole organiche presenti nelle sostanze nutrienti (acidi grassi, carboidrati e amminoacidi), la maggior parte delle quali entrano nel ciclo sotto forma di acetil coenzima A (acetil-CoA).

Il ciclo dell'acido citrico è una via metabolica centrale che consente di utilizzare diversi combustibili metabolici oltre al piruvato derivante dalla glicolisi



Metabolismo glucidi



Glucosio

$$C1 = +1$$

$$C2 = 0$$

$$C2 = 0$$

$$C3 = 0$$

$$C4 = 0$$

$$C5 = 0$$

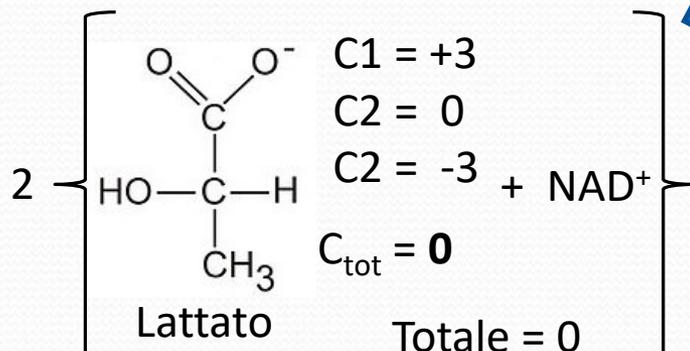
$$C6 = -1$$

$$C_{\text{tot}} = 0$$

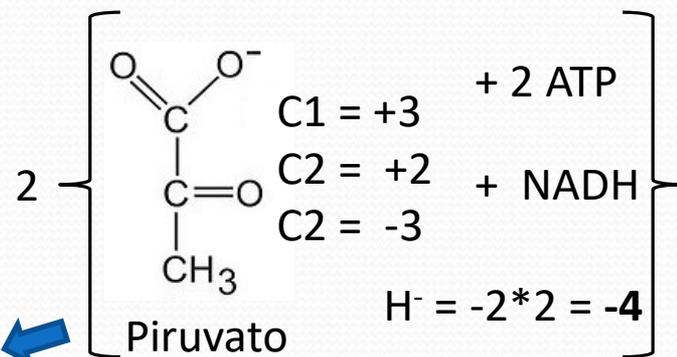
Glicolisi



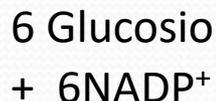
Metabolismo non ossidativo



Totale = 0

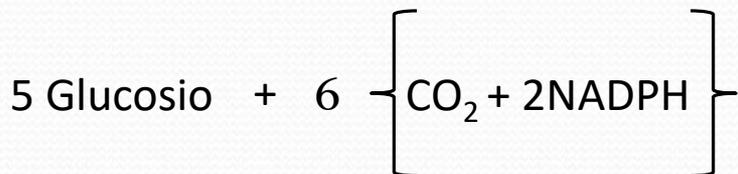


$$C_{\text{tot}} = +2*2 = +4 \quad \text{Totale} = 0$$



Via pentosi

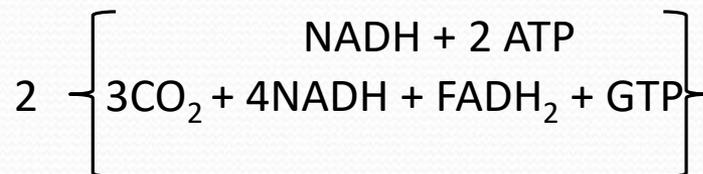
Metabolismo ossidativo



$$C_{\text{tot}} = +4*6 = +24 \quad H^- = -4*6 = -24$$

Totale = 0

Ciclo di Krebs



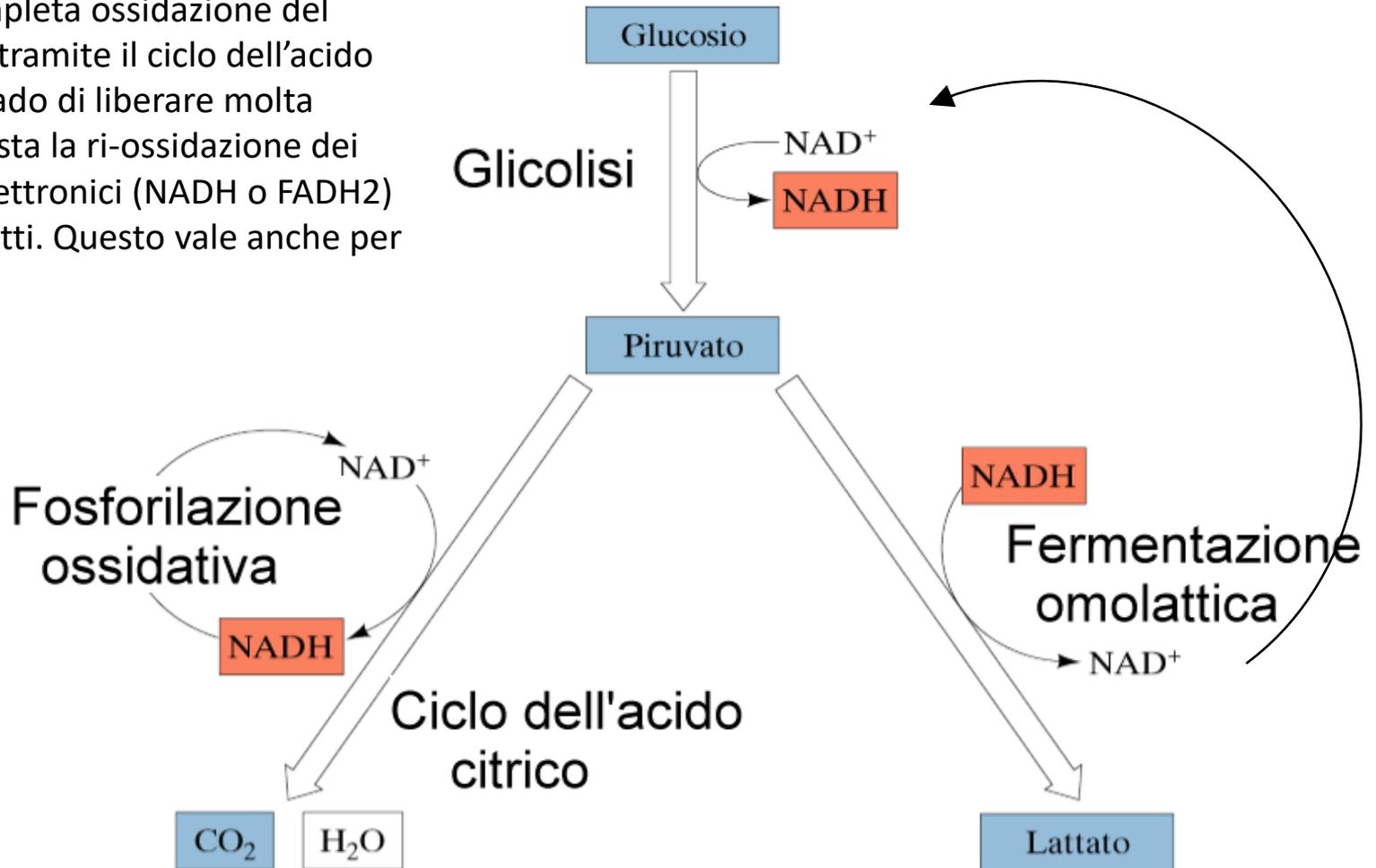
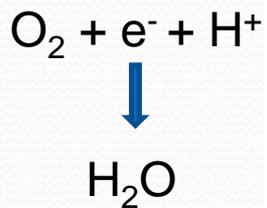
$$C_{\text{tot}} = +4*3*2 = +24 \quad H^- = -2*6*2 = -24$$

Totale = 0

Destini catabolici del piruvato

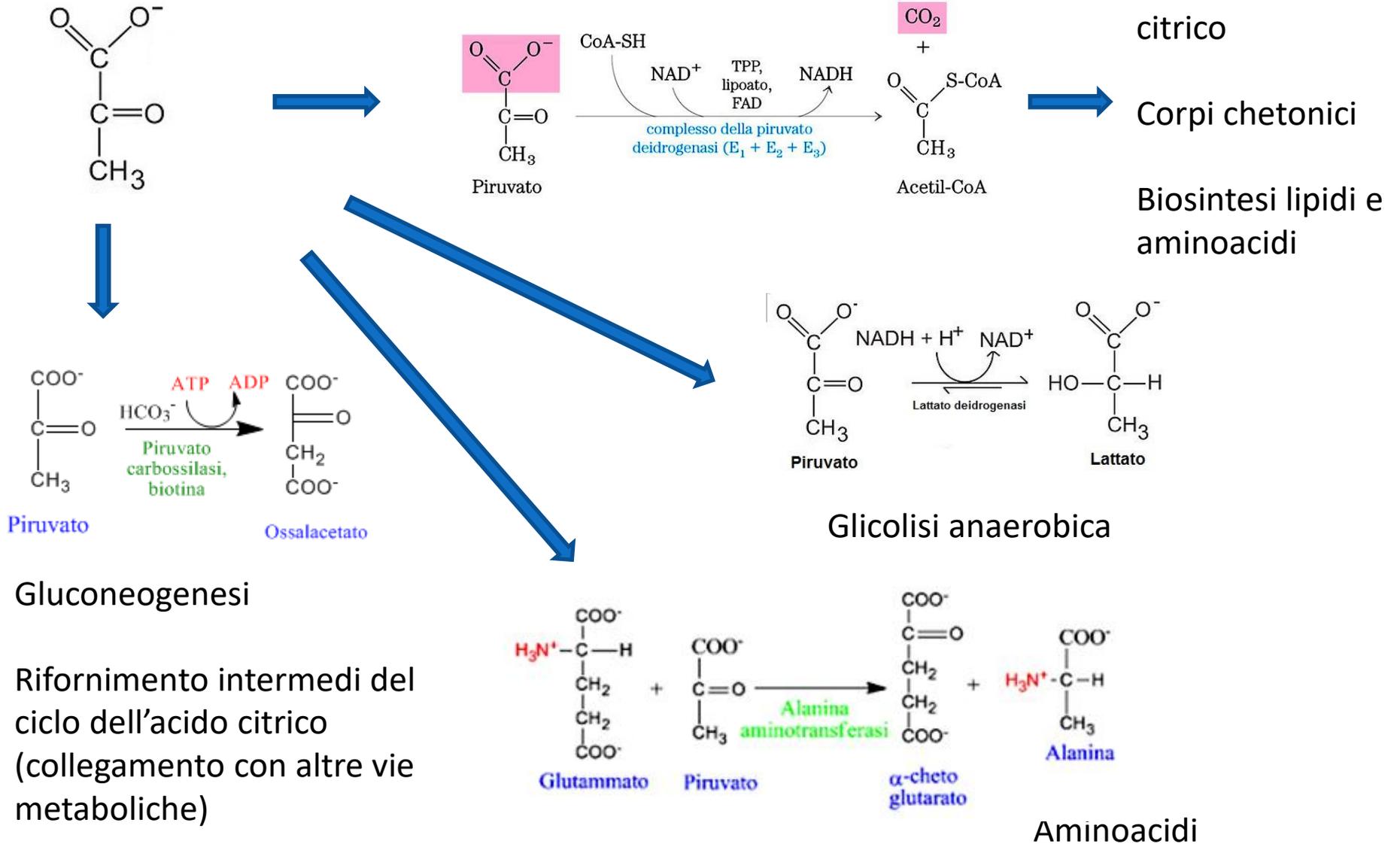
Le due molecole di piruvato prodotte dalla glicolisi sono ancora relativamente ridotte e contengono quindi ancora la maggior parte dell'energia disponibile presente in origine nella molecola di glucosio.

Sebbene la completa ossidazione del piruvato a CO_2 , tramite il ciclo dell'acido citrico, sia in grado di liberare molta energia è richiesta la ri-ossidazione dei trasportatori elettronici (NADH o FADH_2) che si sono ridotti. Questo vale anche per la glicolisi

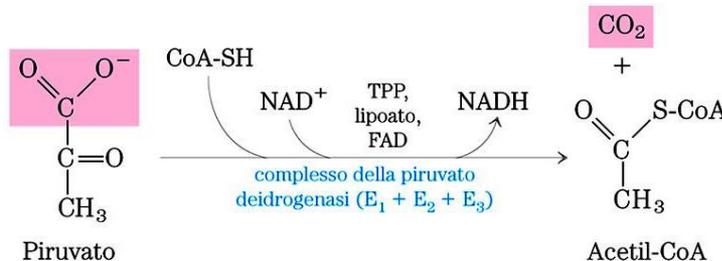
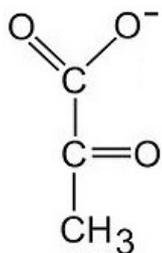


Destini alternativi del piruvato

Il piruvato riveste un ruolo centrale nel metabolismo cellulare



Destini alternativi del piruvato

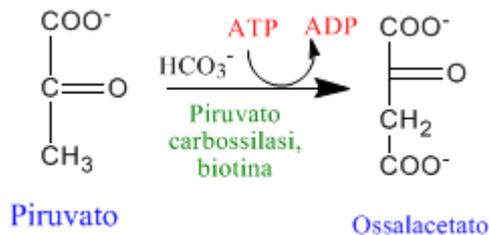
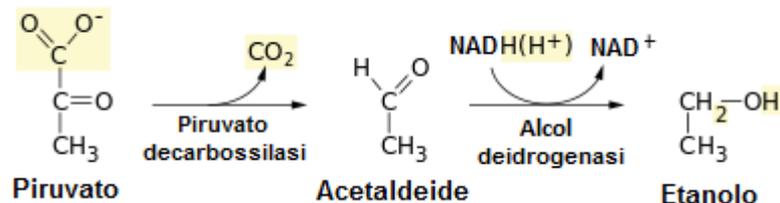
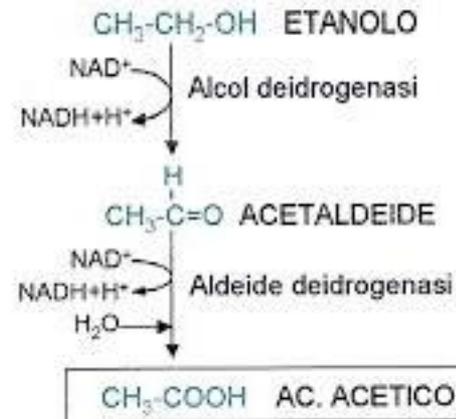
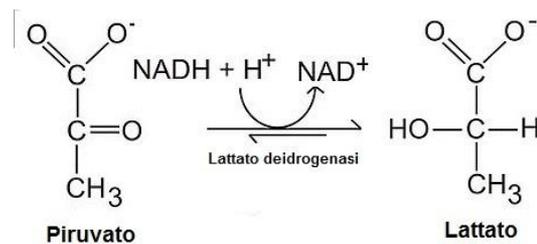


Ciclo di dell'acido citrico

Corpi chetonici

Biosintesi lipidi

Vie fermentative



Gluconeogenesi

Rifornimento intermedi del ciclo dell'acido citrico (collegamento con altre vie metaboliche)

Fermentazione lattica, etanolica, acetica

Fermentazione aceton-butilica, butan-diolica ecc

Vie fermentative

(basso livello di ossidazione - vie anaerobiche)

Principali vie fermentative

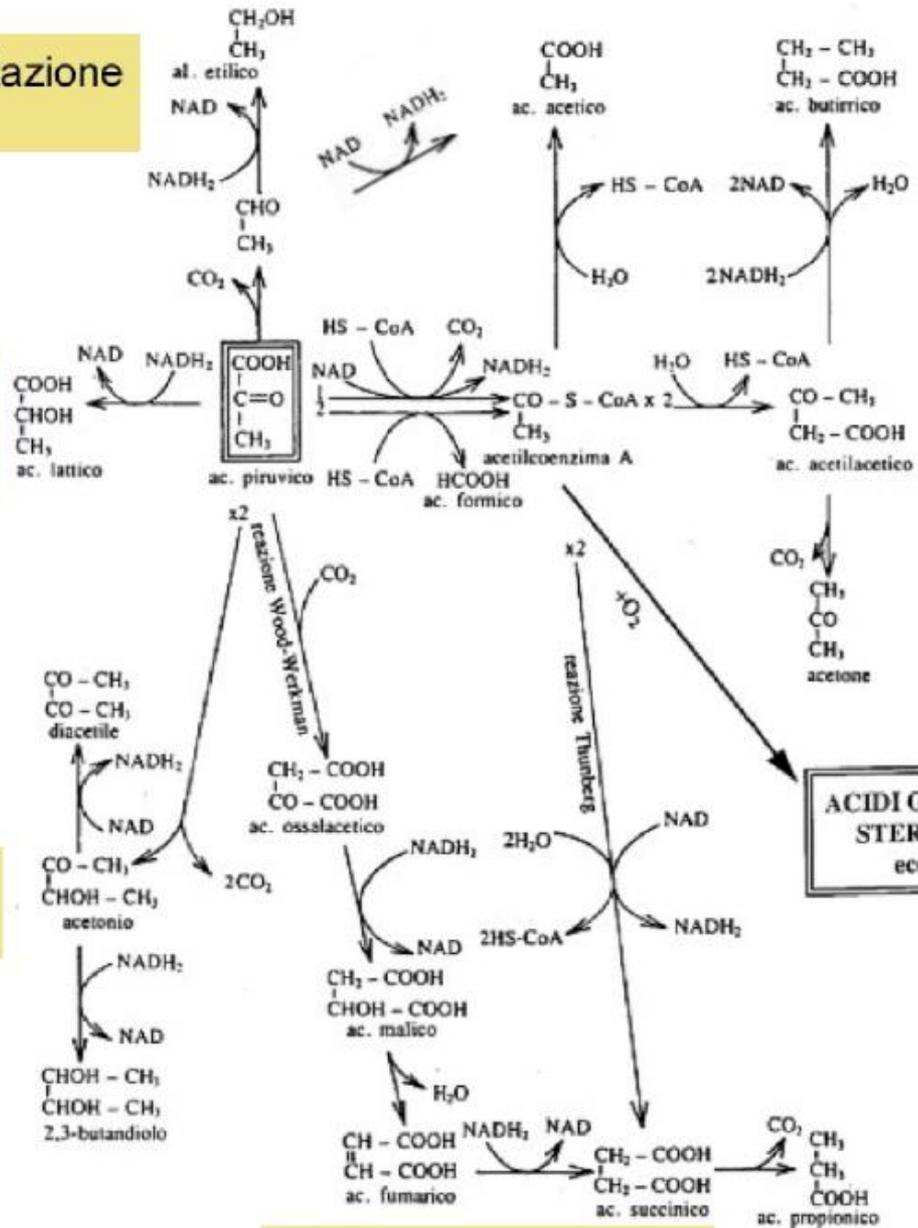
Fermentazione Alcolica

Ferm. Lattica (omo ed etero lattica)

Fermentazione Aceton-Butilica

Fermentazione Butan-diolica

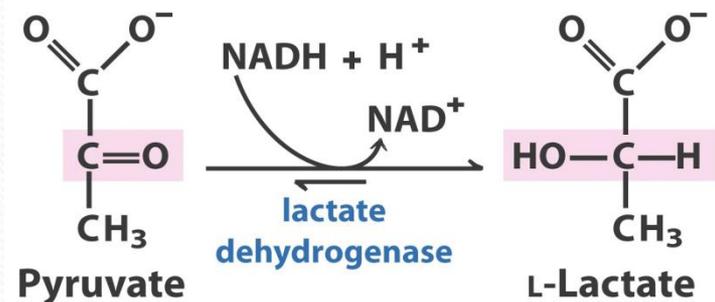
Fermentazione malo-alcolica



ACIDI GRASSI
STEROLI
ecc.

Fermentazione lattica

Quando la quantità di ossigeno disponibile è limitata (ad esempio durante una breve ma intensa attività muscolare) l'ossigeno non può essere trasportato al muscolo nella quantità necessaria per ossidare il piruvato e produrre la quantità di ATP richiesta nella contrazione muscolare. Inoltre la via glicolitica richiede la ri-ossidazione delle molecole di NADH prodotte. Per questo il piruvato viene convertito in lattato (fermentazione lattica)



$$\Delta G'^{\circ} = - 25.1 \text{ kJ/mol}$$

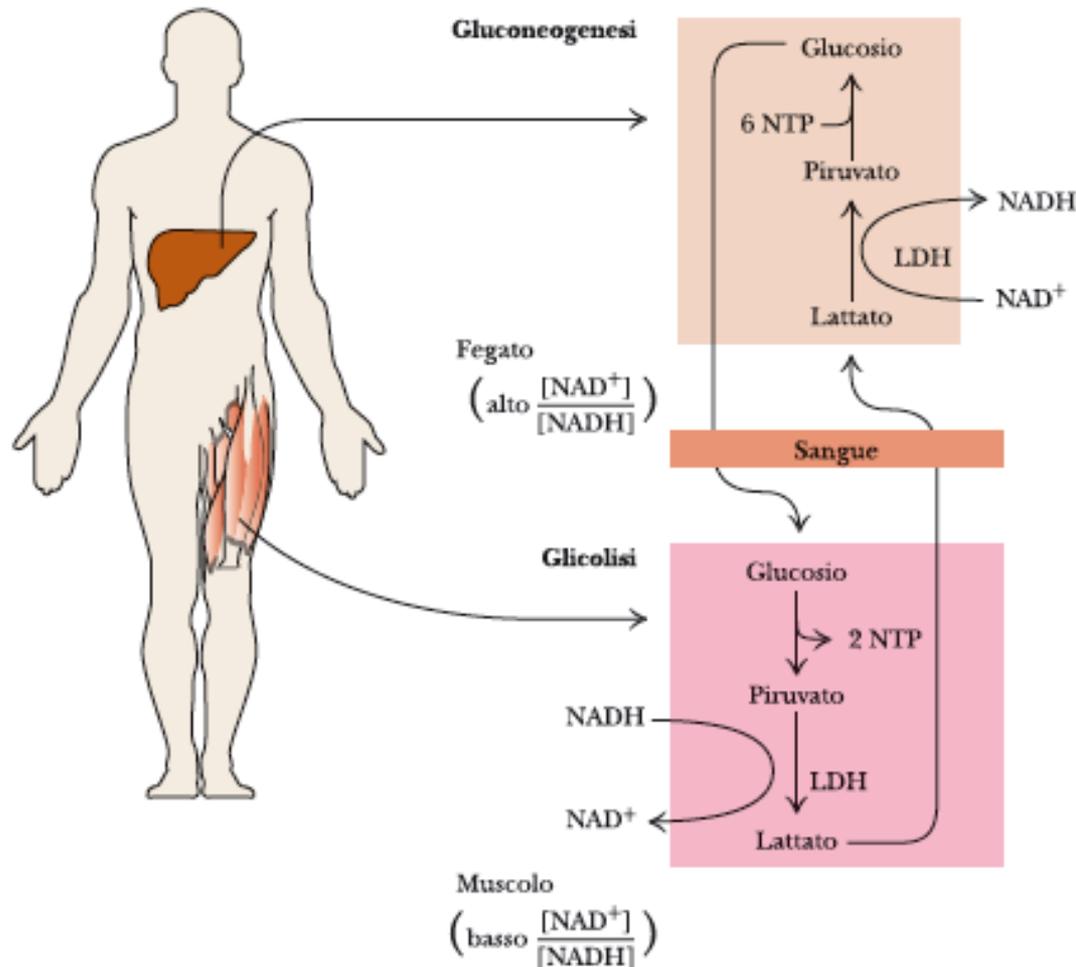
Utilità della fermentazione lattica:

- Rigenerazione del NAD^+ necessario per alimentare la glicolisi e continuare così il processo di demolizione del glucosio, anche se con rese energetiche minori
- L' ATP così prodotto può essere utilizzato direttamente dalla cellula muscolare
- La glicolisi avviene in maniera autonoma rispetto alle concentrazioni di O_2 nel sangue

Durante lo sforzo muscolare, il muscolo utilizza la sua riserva di glucosio (glicogeno) come fonte di ATP via glicolisi e fermentazione lattica.

L'acido lattico prodotto può essere smaltito molto lentamente e produce abbassamento del pH sia nel muscolo che nel sangue (dolore, affaticamento fisico, blocco muscolare)

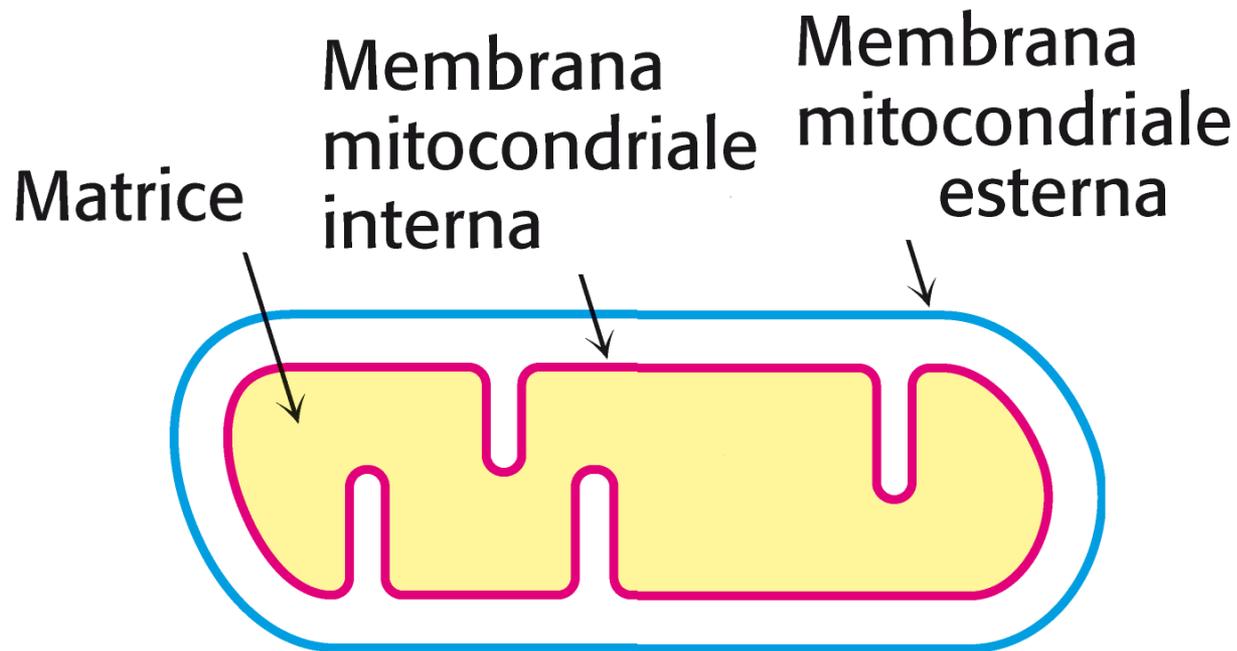
Ciclo di Cori



Il lattato prodotto nel muscolo viene trasportato al fegato dove può essere trasformato in glucosio (per poi essere di nuovo trasportato ai muscoli) o metabolizzato ossidativamente (entra nel ciclo dell'acido citrico) attraverso la sua riconversione ad acido piruvico. Lo scambi glucosio-lattato tra fegato e muscolo prende il nome di ciclo di Cori

Metabolismo ossidativo

Negli eucarioti, la maggior parte delle reazioni coinvolte nel metabolismo ossidativo e tutte le reazioni del ciclo dell'acido citrico avvengono all'interno della matrice mitocondriale al contrario di quelle della glicolisi che avvengono nel citoplasma.



Il mitocondrio è delimitato da una doppia membrana che filtra e limita il passaggio in entrata ed in uscita delle varie molecole. La relativa impermeabilità della membrana mitocondriale è essenziale per le funzioni del mitocondrio stesso.

Ciclo dell'acido citrico

Il ciclo dell'acido citrico rappresenta il processo centrale attraverso il quale vengono catabolizzati tutti i combustibili metabolici. Per entrare nel ciclo, lo scheletro carbonioso di zuccheri, acidi grassi e alcuni aminoacidi deve essere degradato a gruppo acetilico (acetilCoA)

Il ciclo di Krebs non è semplicemente la continuazione della via glicolitica, ma una serie di reazioni cicliche con un ruolo centrale nel metabolismo.

Negli eucarioti avviene interamente nei mitocondri. Quindi tutti i substrati che entrano nel ciclo devono essere prodotti nei mitocondri oppure devono venire trasportati all'interno di essi.

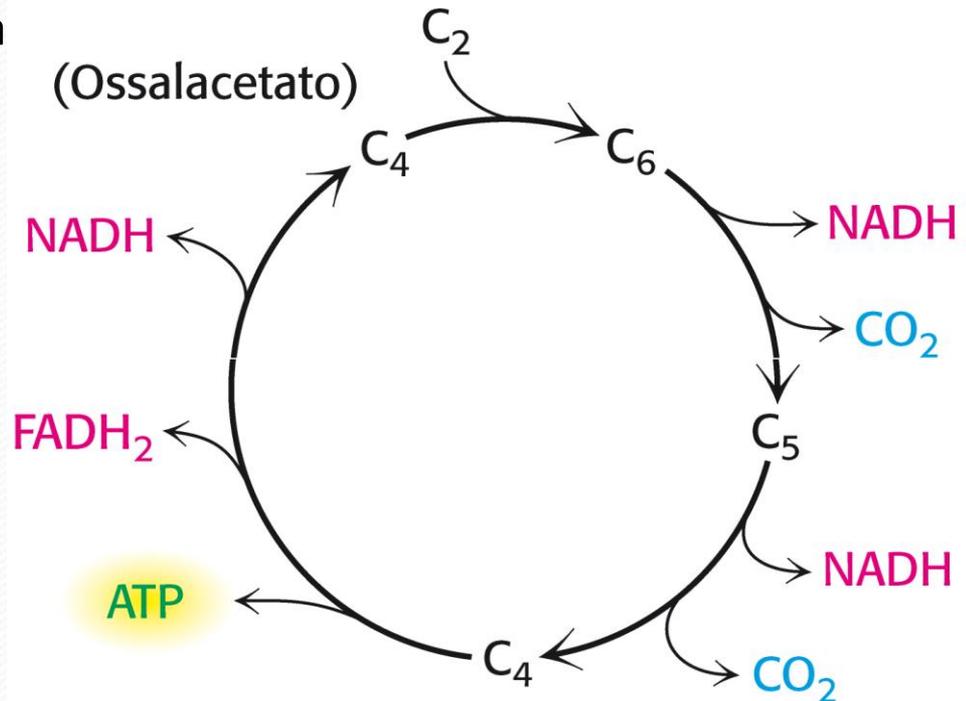
Gli intermedi del ciclo devono essere utilizzati all'interno dei mitocondri oppure possono essere trasportati nel citosol come substrati per altre vie metaboliche.

Ciclo dell'acido citrico

La funzione del ciclo dell'acido citrico è quella di raccogliere gli elettroni ad alta energia dall'ossidazione dei combustibili carboniosi che saranno poi utilizzati per la sintesi di ATP.

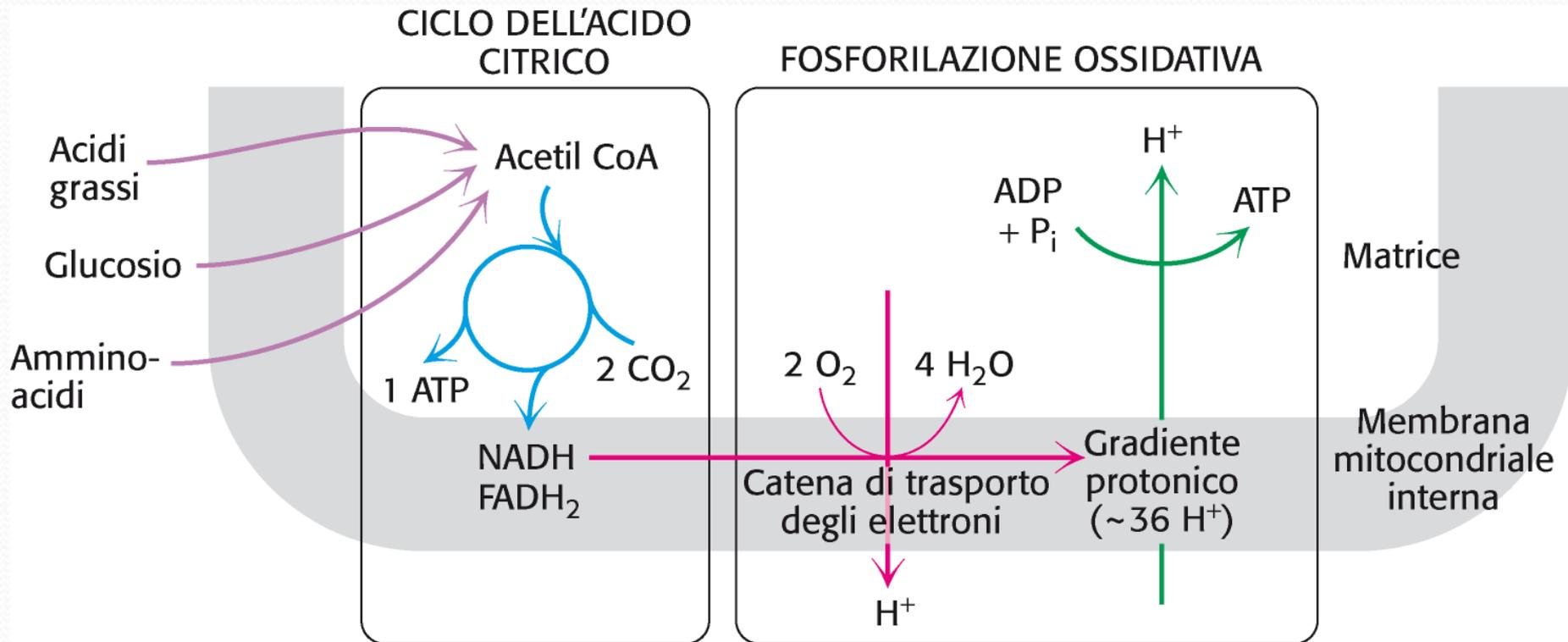
Il ciclo ossida due unità bicarboniose producendo due molecole di CO_2 , una di GTP ed elettroni ad alta energia sottoforma di NADH e FADH_2 .

- Un composto a 4 atomi di C (ossalacetato) condensa con una unità bicarboniosa dando un composto a 6 atomi di C (acido tricarbossilico)
- Vengono poi rilasciate due molecole di CO_2 mediante decarbossilazione ossidativa liberando elettroni ad alta energia e una molecola a 4 atomi di C (succinato)
- Il composto a 4 atomi di C viene poi metabolizzato rigenerando il composto a 4 atomi di C iniziale (ossalacetato)



Ciclo dell'acido citrico

Il ciclo dell'acido citrico è la prima fase della respirazione cellulare. Gli elettroni ad alto potenziale di trasferimento rimossi dalle molecole organiche carboniose sottoforma di NADH e FADH₂ riducono poi l'O₂ e generano il gradiente protonico che viene usato per la sintesi di ATP (fosforilazione ossidativa).



Ciclo dell'acido citrico

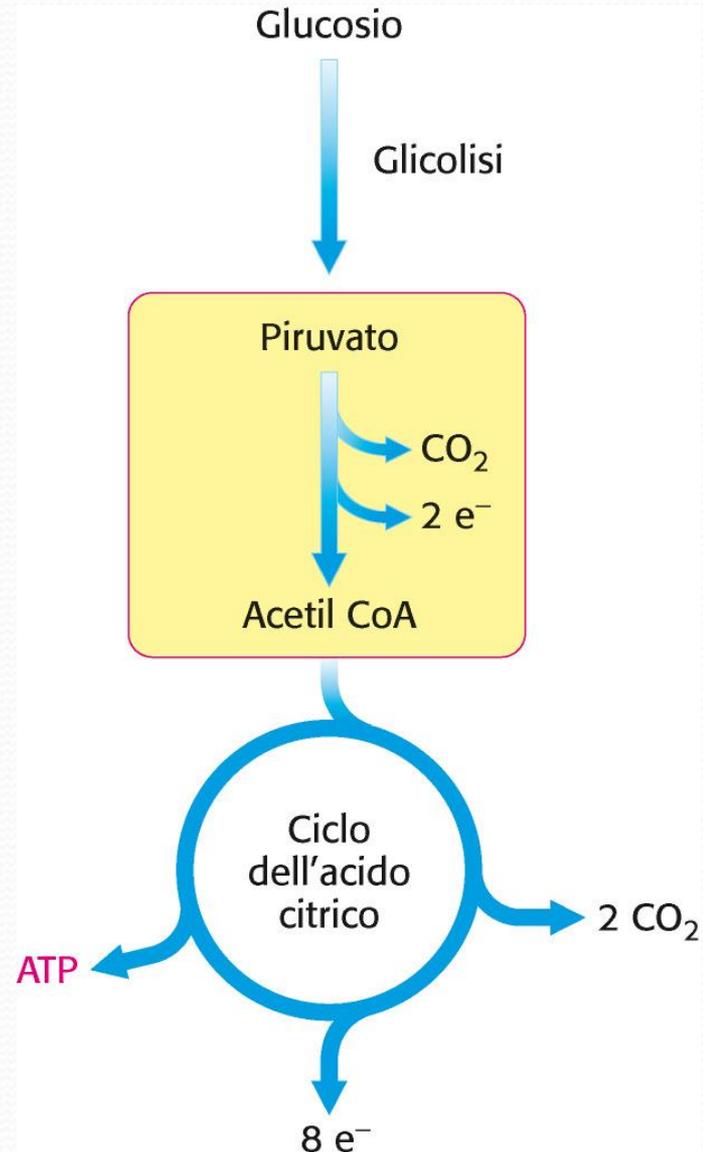
La reazione che lega la via glicolitica ed il ciclo dell'acido citrico è rappresentata dalla decarbossilazione ossidativa del piruvato per formare acetil CoA.

Anche questa reazione, come l'intero ciclo dell'acido citrico, avviene nei mitocondri delle cellule eucariotiche.

Tale reazione è irreversibile ed è catalizzata dal complesso della piruvato deidrogenasi.

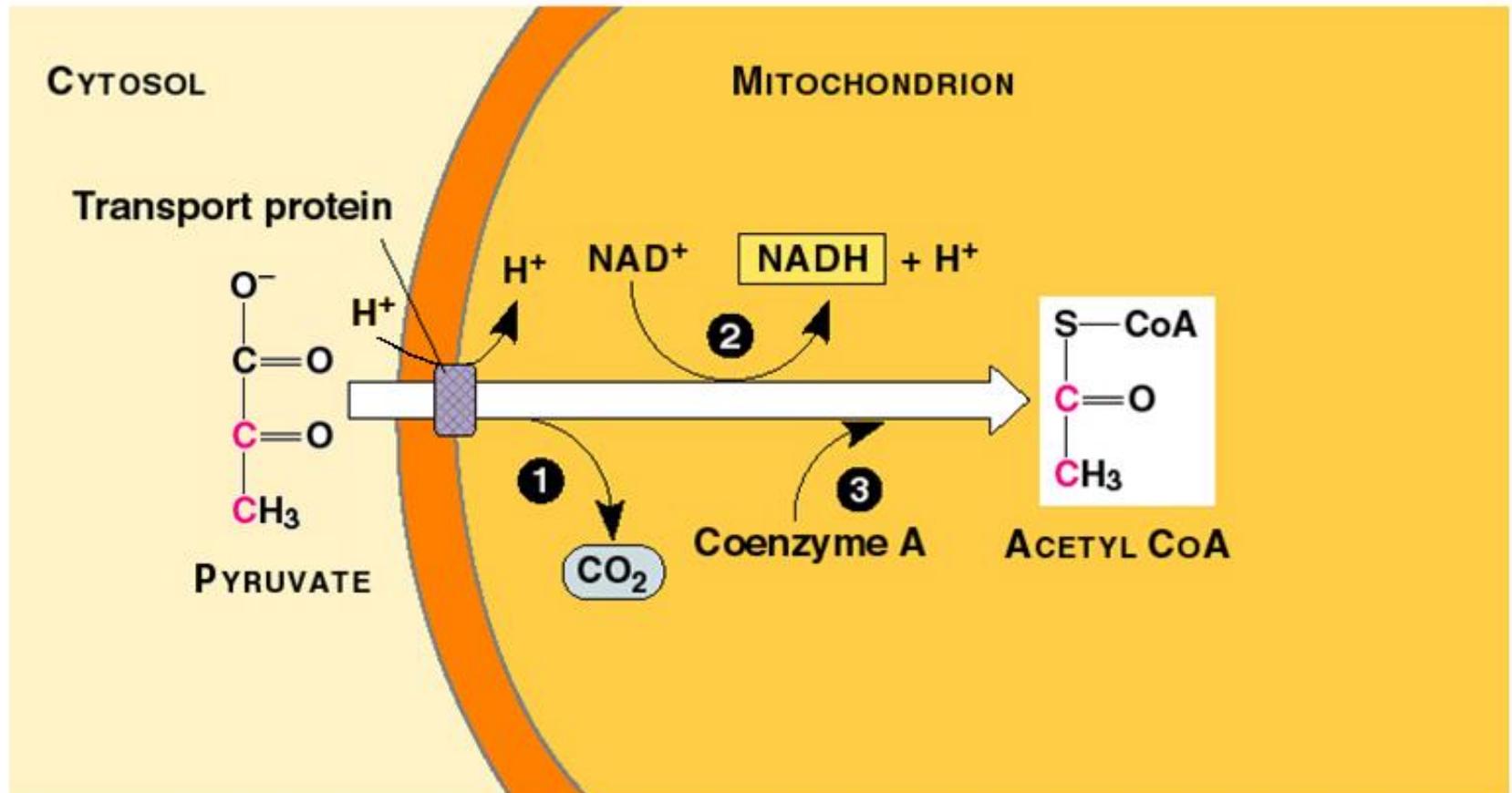
Tale complesso produce CO_2 e cattura elettroni sottoforma di NADH.

L'ingresso del piruvato nel mitocondrio avviene attraverso un trasportatore specifico



Ingresso del piruvato nel mitocondrio

In condizioni di aerobiosi, il piruvato viene trasportato all'interno del mitocondrio (attraverso un traslocatore di membrana simporto che utilizza il gradiente protonico). Nel mitocondrio il piruvato viene decarbossilato ossidativamente ad acetil-CoA tramite la piruvato deidrogenasi, complesso multi-enzimatico costituito da tre tipi di enzimi)



Complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi

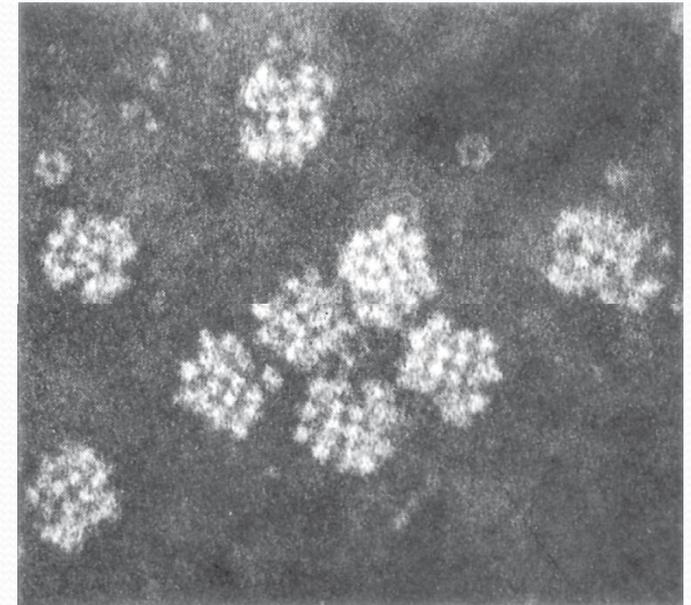
Il complesso della piruvato deidrogenasi è formato da tre distinte proteine enzimatiche. Il complesso è di grandi dimensioni con masse molecolari comprese tra 4 e 10 milioni di dalton.

La deidrogenazione e la decarbossilazione del piruvato ad acetil CoA coinvolgono l'azione sequenziale di 3 enzimi diversi, E1, E2 ed E3, ciascuno formato da più catene polipeptidiche e disposti in maniera spaziale a formare delle unità cubiche.

Importanza dei complessi multienzimatici

- La distanza percorsa dai substrati di reazioni poste in sequenza è molto minore
- La possibilità di reazioni collaterali è diminuita
- E' possibile un controllo coordinato delle reazioni

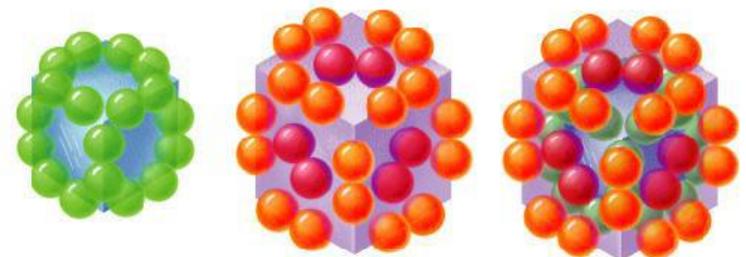
24 unità di diidrolipoil transacetilasi (E2) (verde) sono circondate da 24 unità di piruvato deidrogenasi (E1) (arancio) associate a dimeri e 12 unità di diidrolipoil deidrogenasi (E3) (rosse)



(a)

(b)

(c)



Complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi

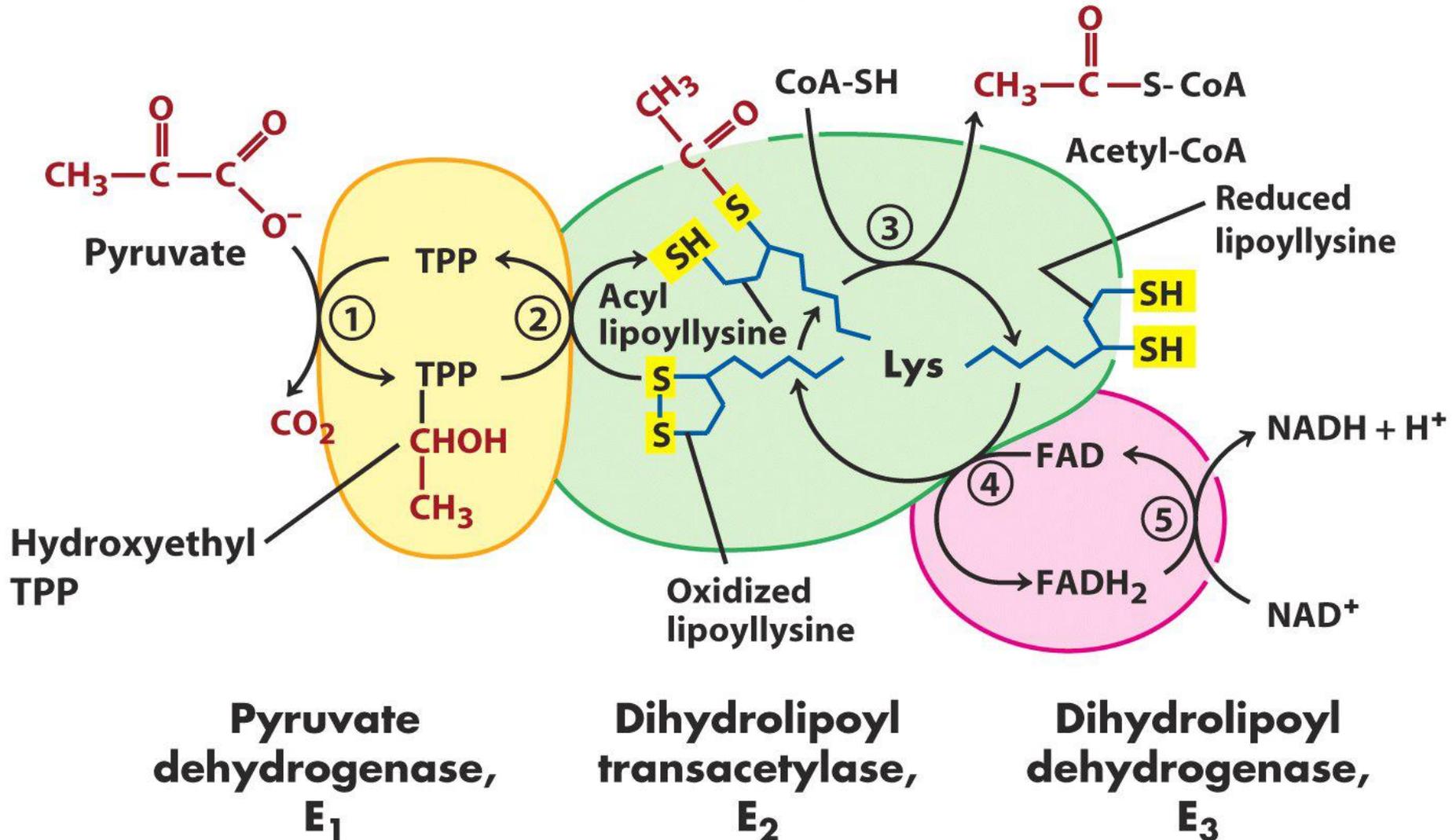
Il complesso della piruvato deidrogenasi è formato da tre distinte proteine enzimatiche che contengono 5 coenzimi:

- tiamina pirofosfato (TPP)
- flavin adenin dinucleotide (FAD)
- coenzima A (CoA)
- nicotinamide adenin dinucleotide (NAD)
- acido lipoico

TABELLA 17.1 I coenzimi e i gruppi prostetici della piruvato deidrogenasi

Cofattore	Posizione	Funzione
Tiamina pirofosfato (TPP)	Legato a E ₁	Decarbossila il piruvato, producendo un idrossietil-TPP carbanione
Acido lipoico	Legato covalentemente a un residuo di Lys di E ₂ (lipoamide)	Accetta l'idrossietil carbanione dal TPP sotto forma di gruppo acetilico
Coenzima A (CoA)	Substrato per E ₂	Accetta il gruppo acetilico dalla lipoamide
Flavina adenina dinucleotide (FAD)	Legato a E ₃	Ridotto dalla lipoamide
Nicotinamide adenina dinucleotide (NAD ⁺)	Substrato per E ₃	Ridotto dal FADH ₂

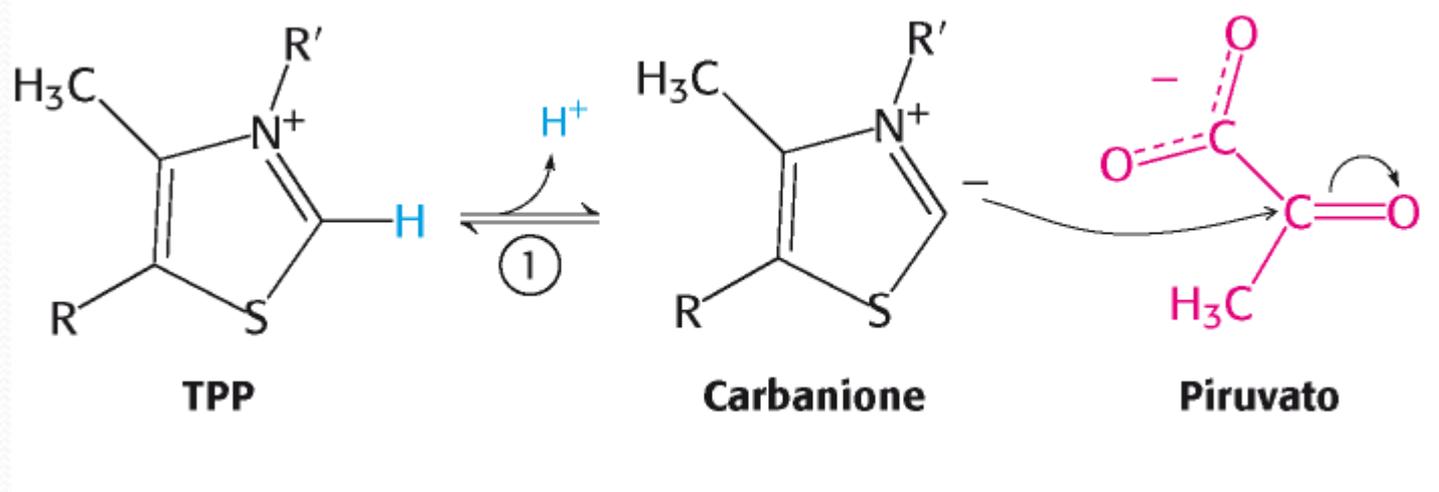
Complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi



Decarbossilazione ossidativa del piruvato

Prima reazione

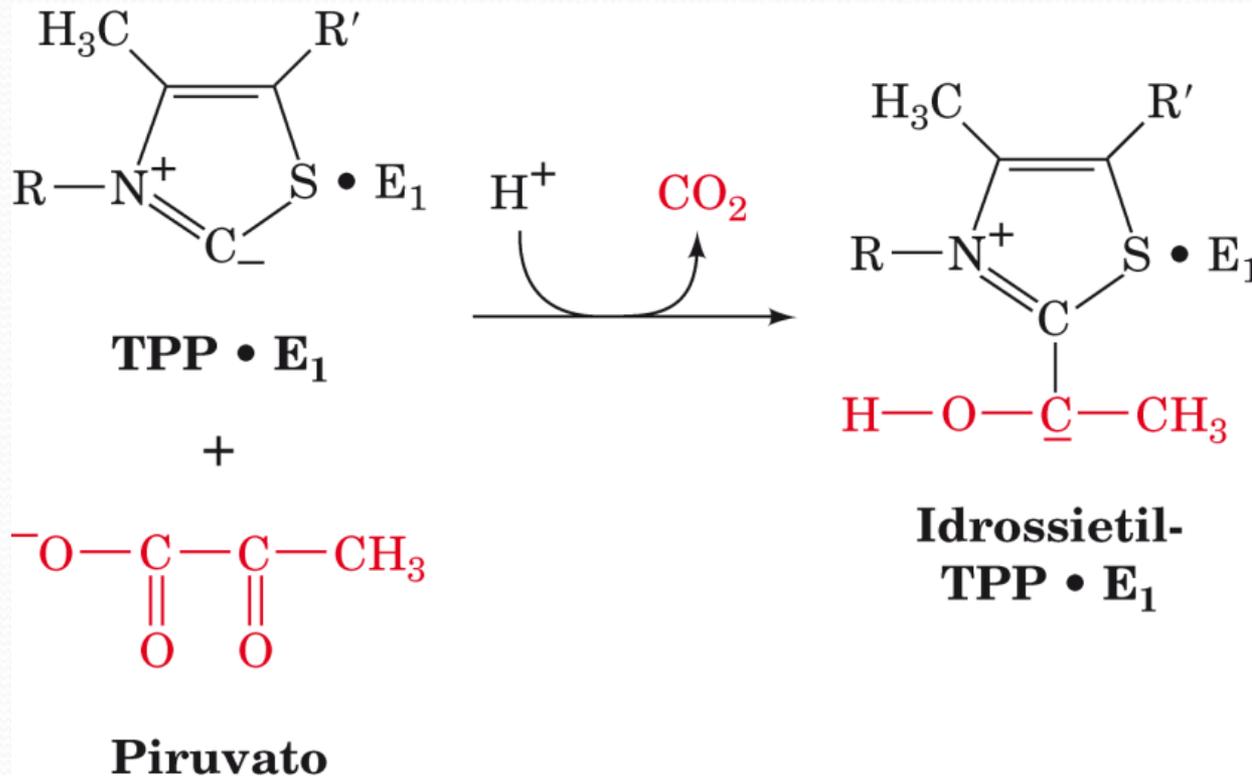
Il piruvato si combina con la TPP e poi viene decarbossilato formando idrossietil-TPP. La reazione è catalizzata dal componente piruvato deidrogenasi (E1) del complesso multienzimatico.



L'atomo di carbonio tra l'N e lo S dell'anello tiazolico della TPP è più acido della maggior parte dei gruppi $=CH-$. Questo gruppo si ionizza per formare un carbanione, che si addiziona facilmente al gruppo carbonilico del piruvato.

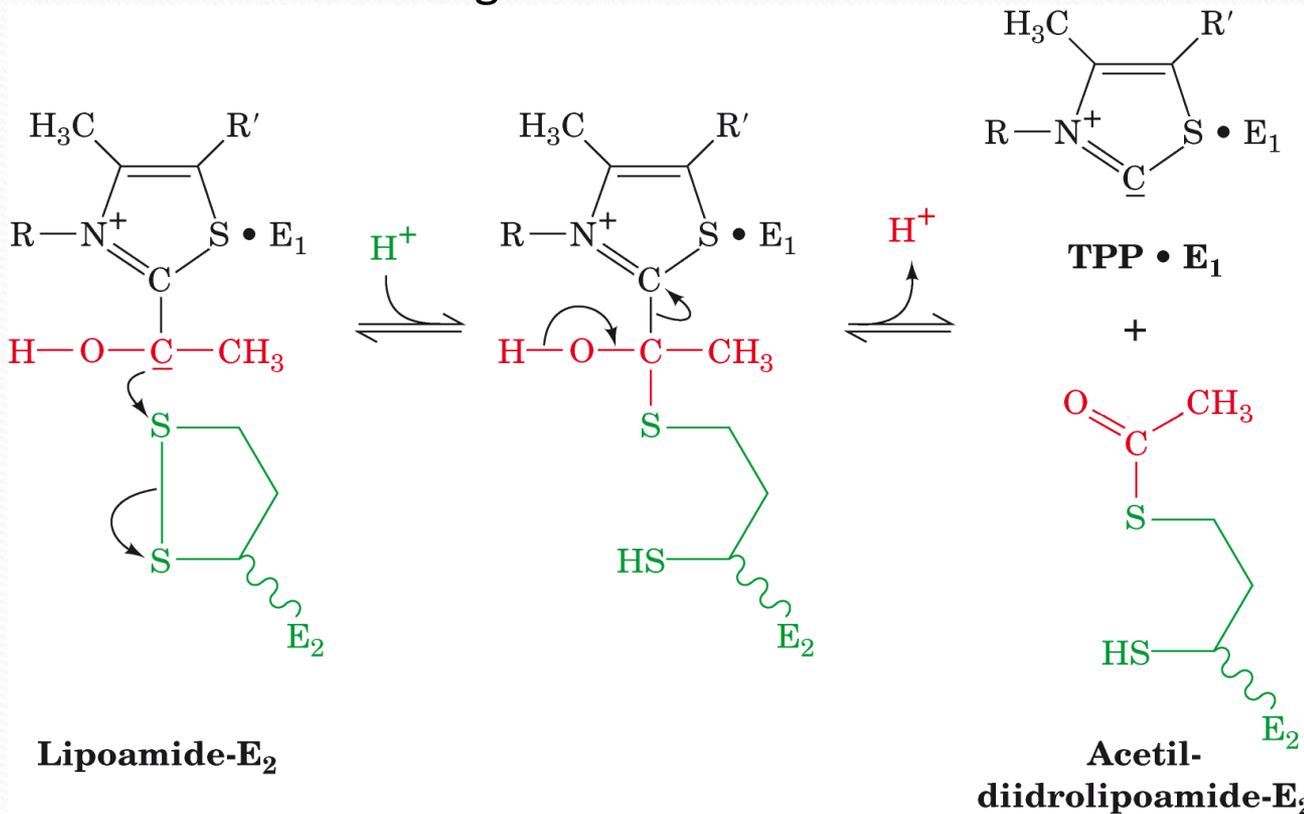
Decarbossilazione ossidativa del piruvato

Il carbanione del TPP si addiziona al gruppo carbonilico del piruvato. Questa addizione è seguita dalla decarbossilazione del piruvato. L'anello carico positivamente del TPP agisce da trappola di elettroni che stabilizza la carica negativa generata dalla decarbossilazione. Tale carica viene trasferita sull'anello tiazolico. La protonazione forma idrossietil-TPP



Decarbossilazione ossidativa del piruvato

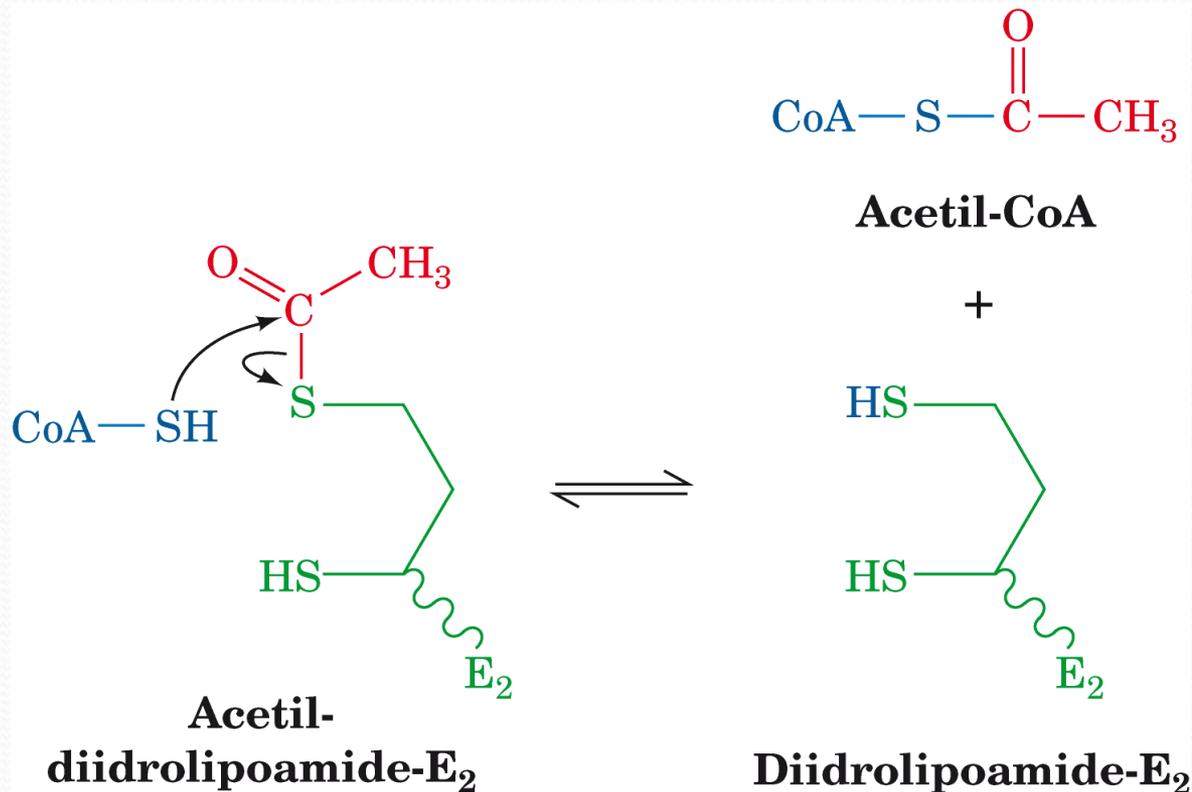
Il gruppo idrossietilico legato alla TPP viene ossidato a formare un gruppo acetilico che è trasferito alla lipoamide, un derivato dell'acido lipoico legato ad un residuo di lisina di E2 tramite un legame amidico.



L'ossidante è il gruppo disolfuro della lipoamide. Questa reazione, catalizzata ancora dalla componente piruvato deidrogenasi E1, produce acetil-lipoamide

Decarbossilazione ossidativa del piruvato

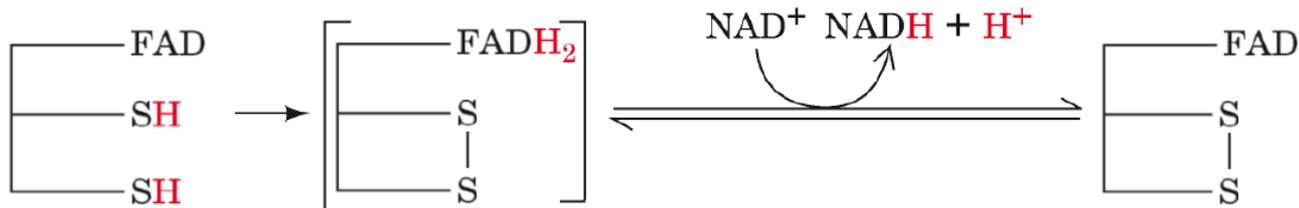
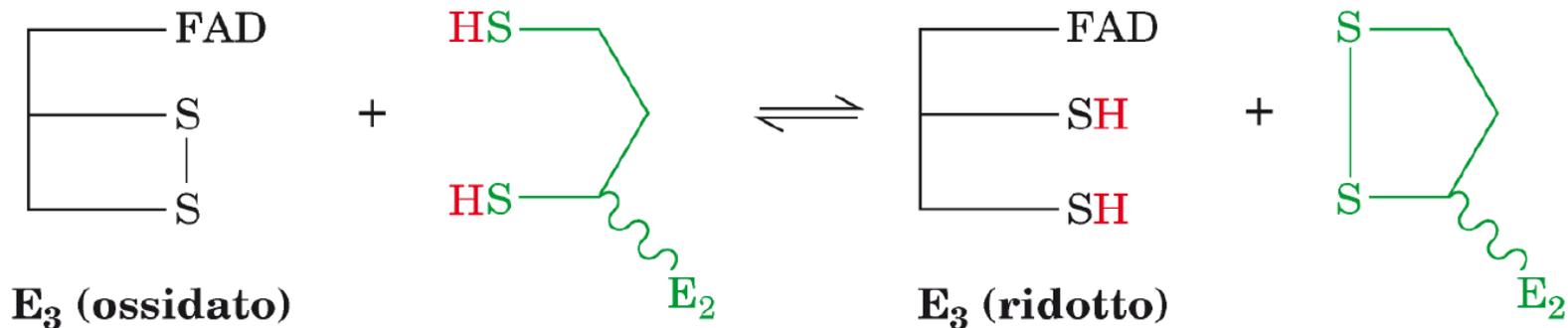
Il gruppo acetile viene trasferito dalla acetillipoamide al CoA per formare acetil CoA. Questa reazione è catalizzata dalla diidrolipoil transacetilasi E2. Il legame tioestere ricco di energia viene conservato.



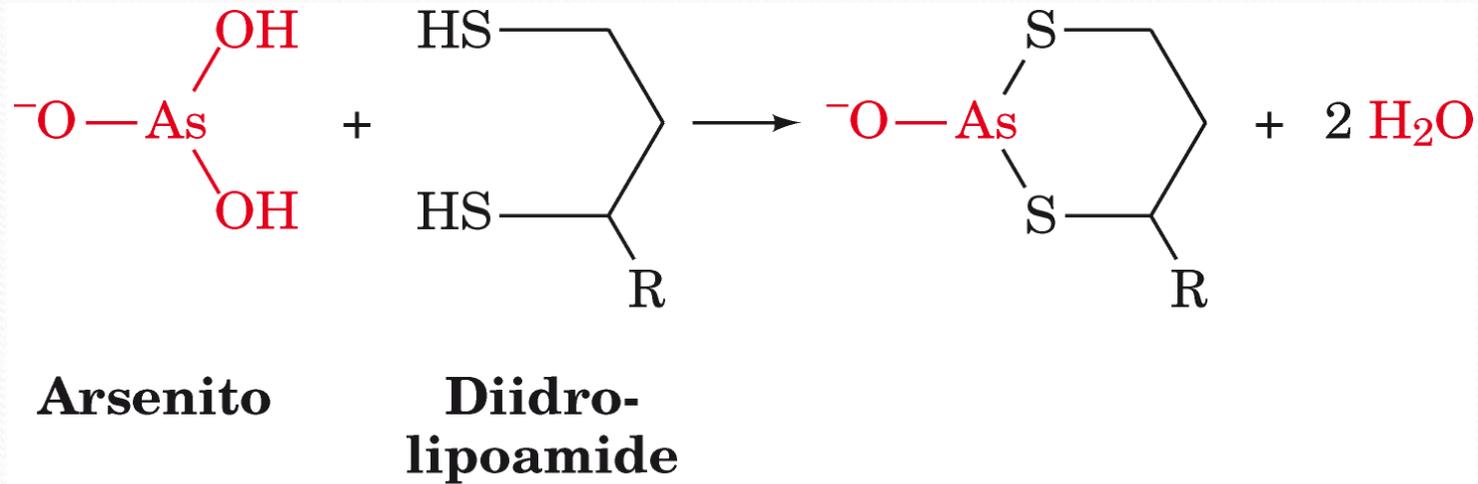
Decarbossilazione ossidativa del piruvato

Il complesso della piruvato deidrogenasi non è in grado di portare a termine un altro ciclo catalitico finchè la diidrolipoamide non è riossidata a lipoamide.

La forma ossidata della lipoamide viene rigenerata dalla diidrolipoil deidrogenasi (E3). Due elettroni vengono trasferiti a un gruppo prostetico FAD dell'enzima e poi al NAD⁺



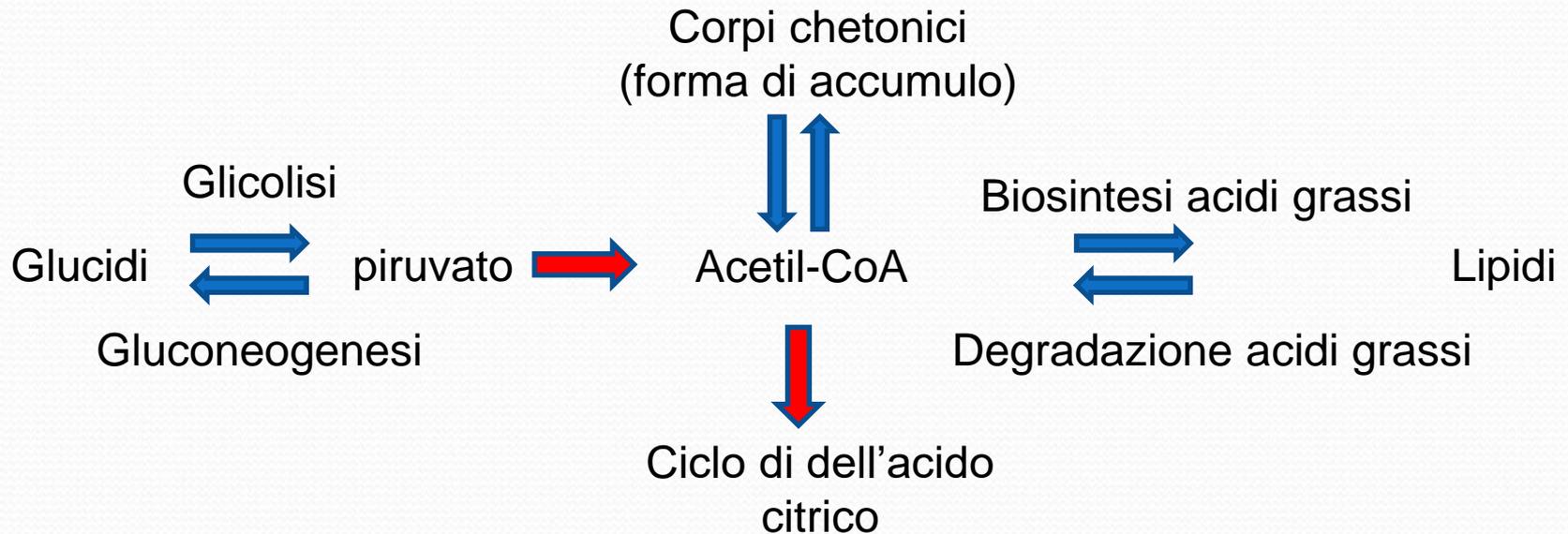
Avvelenamento da arsenico



Inattivazione della piruvato deidrogenasi

Ruolo dell'acetil-CoA

L'acetil-CoA, come il piruvato da cui può derivare, è un intermedio chiave nel metabolismo cellulare. Tuttavia la formazione di Acetil-CoA dal piruvato è una reazione irreversibile negli animali. Quindi il glucosio si può formare dal piruvato ma non dall'acetil-CoA al contrario dei lipidi, che generano acetil-CoA durante la degradazione e possono essere riformati a partire da acetil-CoA

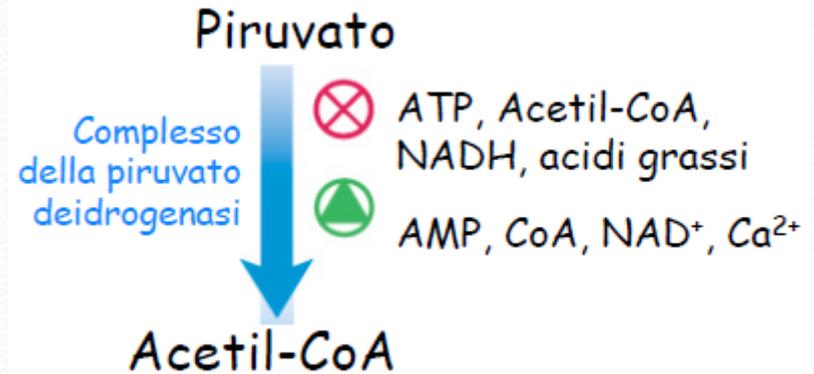


La decarbossilazione ossidativa del piruvato in Acetil CoA indirizza gli atomi di carbonio verso l'ossidazione a CO_2 attraverso il ciclo dell'acido citrico oppure verso l'incorporazione nei lipidi (o accumulati come corpi chetonici). Per questo motivo l'attività del complesso della piruvato deidrogenasi è strettamente regolata.

Regolazione della piruvato deidrogenasi (PDH)

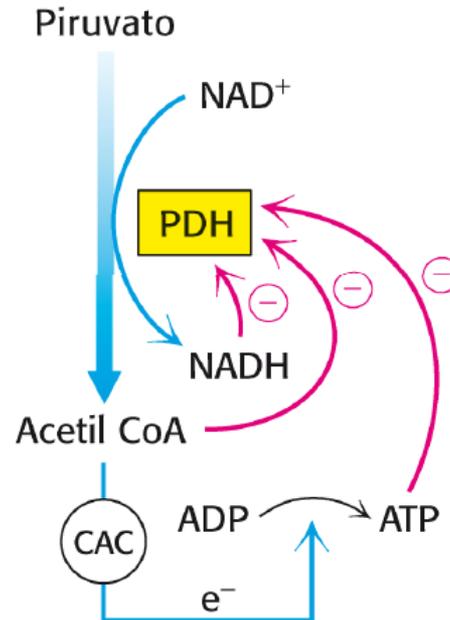
La PDH è soggetta diversi meccanismi di controllo:

La PDH è soggetta ad inibizione feedback dai suoi prodotti di reazione (acetil-CoA e NADH) che consente di variare l'attività del complesso in funzione dell'effettivo utilizzo di acetil-CoA e NADH nel mitocondrio.

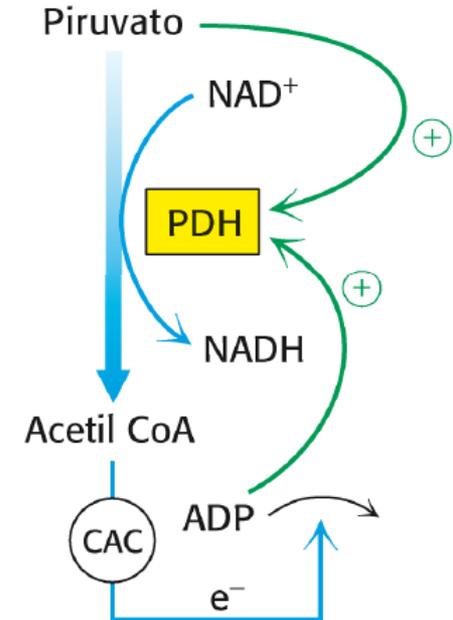


L'attività della PDH è poi regolata dalla carica energetica. La PDH è inattiva quando la carica energetica è elevata e gli intermedi biosintetici sono abbondanti.

(A) ALTA CARICA ENERGETICA



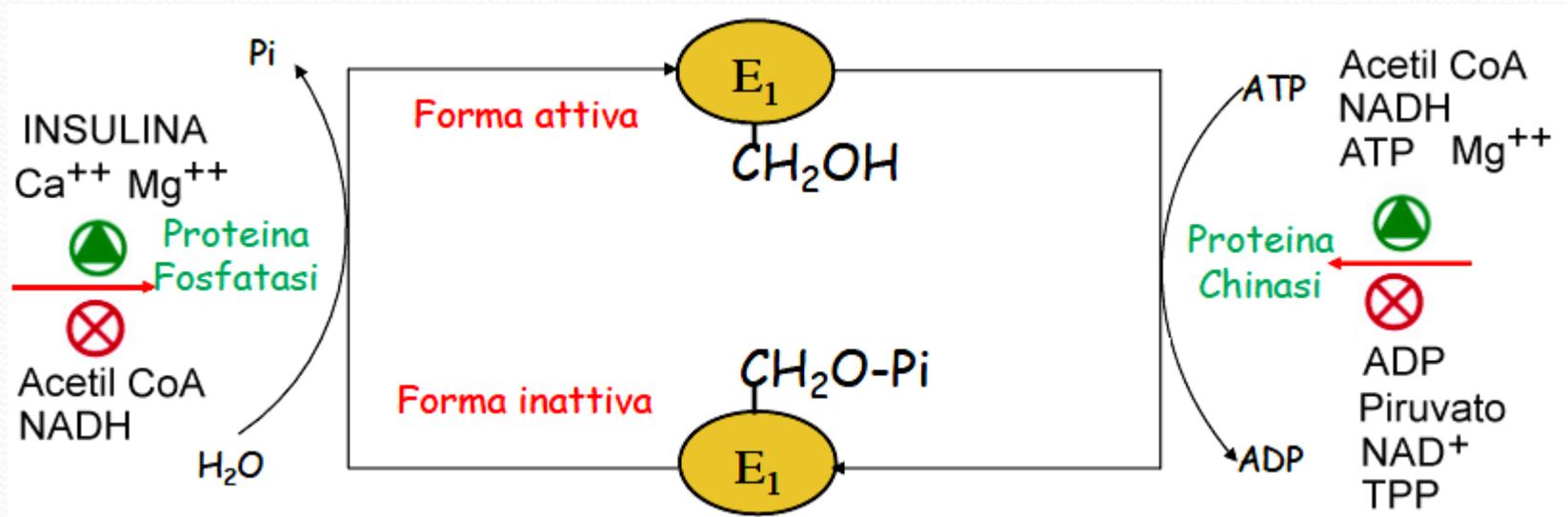
(B) BASSA CARICA ENERGETICA



Regolazione della piruvato deidrogenasi (PDH)

La PDH è anche soggetta a regolazione mediante modifica covalente

L'aumento del rapporto NADH/NAD^+ , acetil CoA/CoA o ATP/ADP promuove la fosforilazione dell'enzima E_1 e questo porta alla inattivazione del complesso.

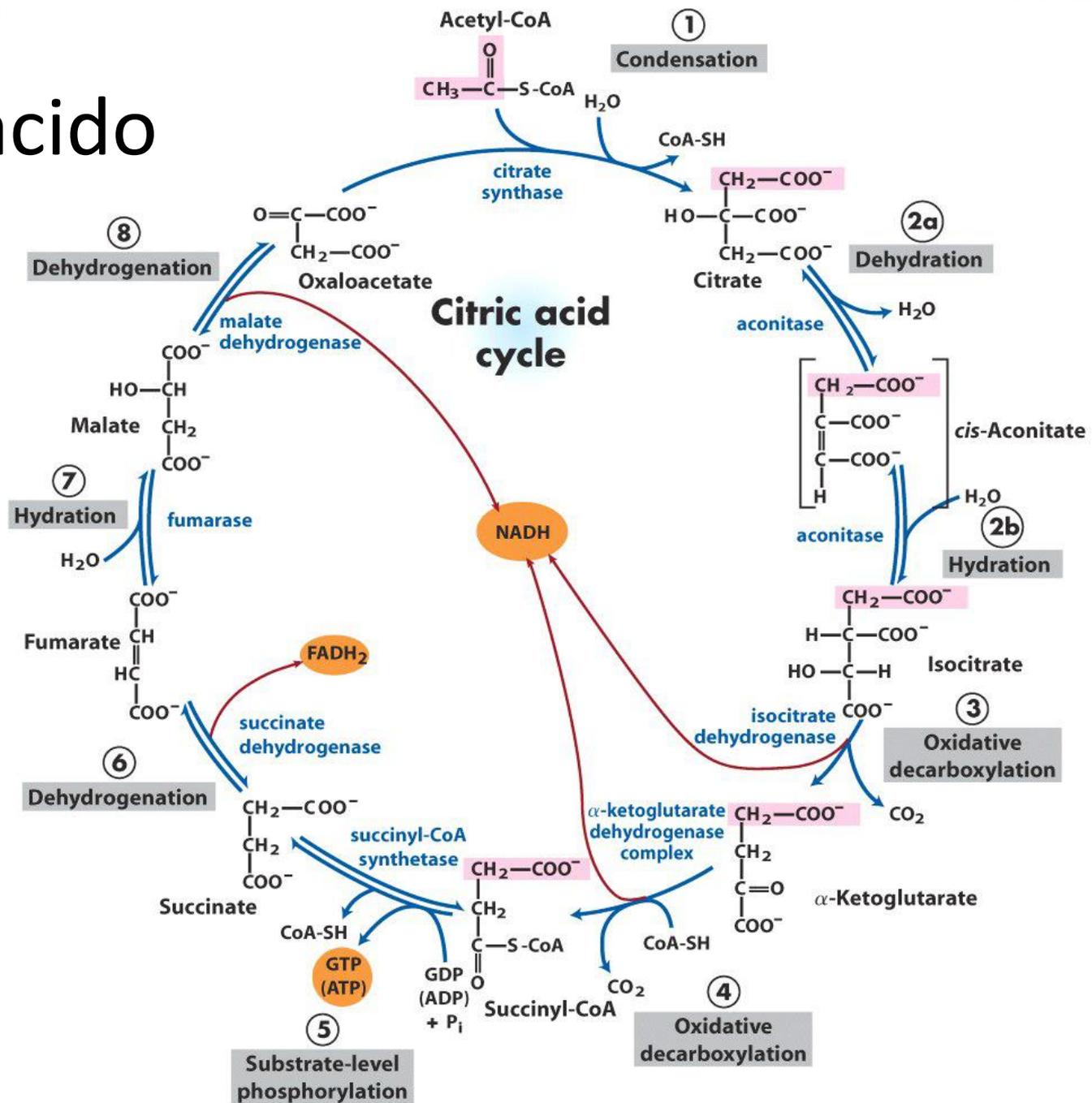


La PDH è quindi inibita da ATP , Acetil-CoA NADH mentre è stimolata da AMP , CoA e NAD^+ .



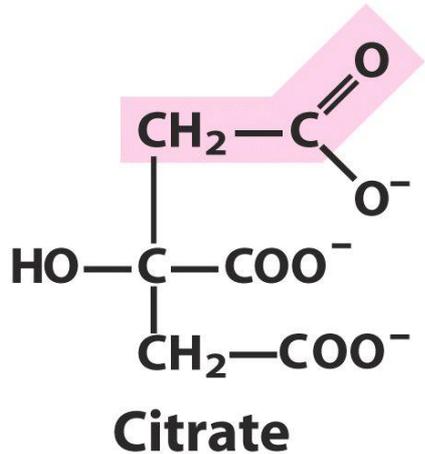
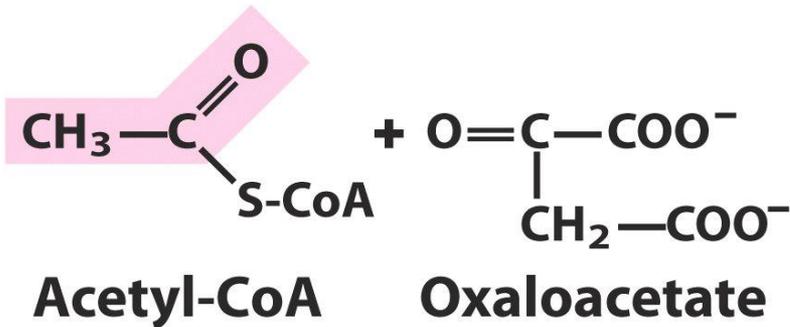
Ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs

Il ciclo dell'acido citrico



Il ciclo dell'acido citrico: 1- citrato sintasi

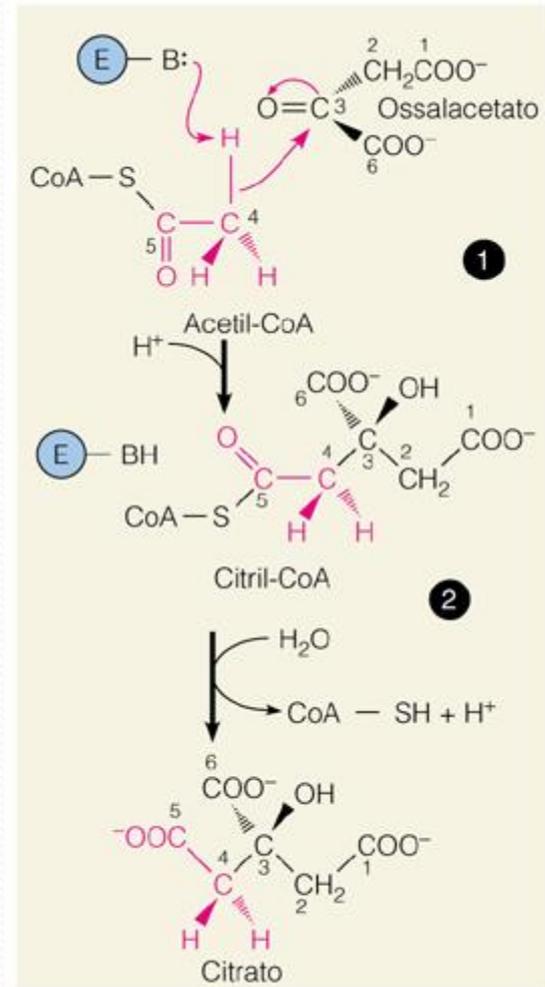
La reazione catalizzata dalla citrato sintasi è una condensazione aldolica tra acetil-CoA e ossalacetato seguita da idrolisi. Il citril CoA è una molecola ad alto contenuto energetico poiché contiene il legame tioestere originariamente presente nell'acetil CoA. L'idrolisi del citril CoA fa procedere la reazione verso la sintesi del citrato.



Reazione fortemente esoergonica, punto di regolazione

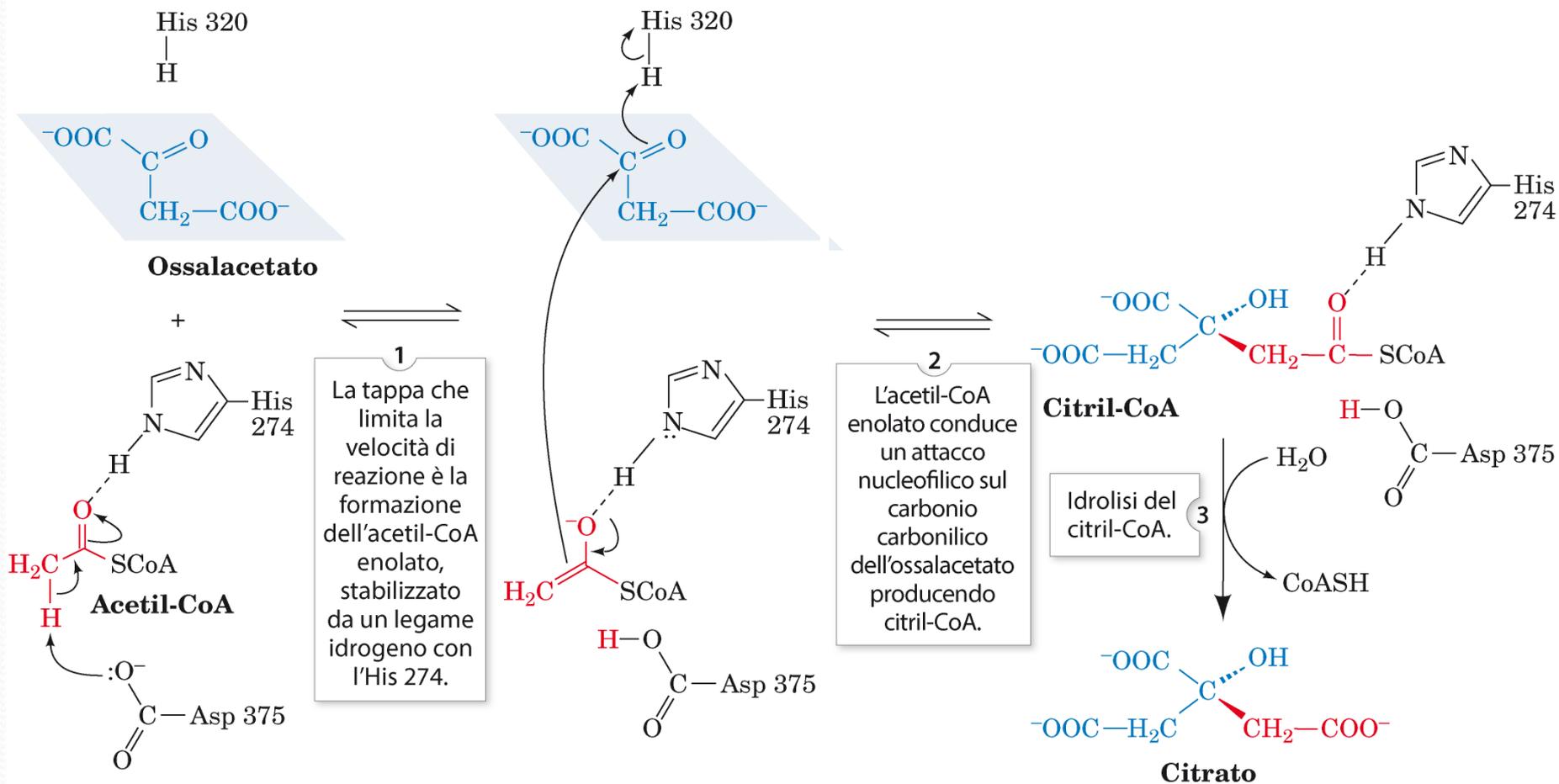
$$\Delta G'^{\circ} = -32,2 \text{ kJ/mol}$$

La condensazione impedisce l'idrolisi di acetil CoA, che porterebbe uno spreco di energia.



Il ciclo dell'acido citrico: 1 - citrato sintasi

Condensazione di acetil-CoA e ossalacetato



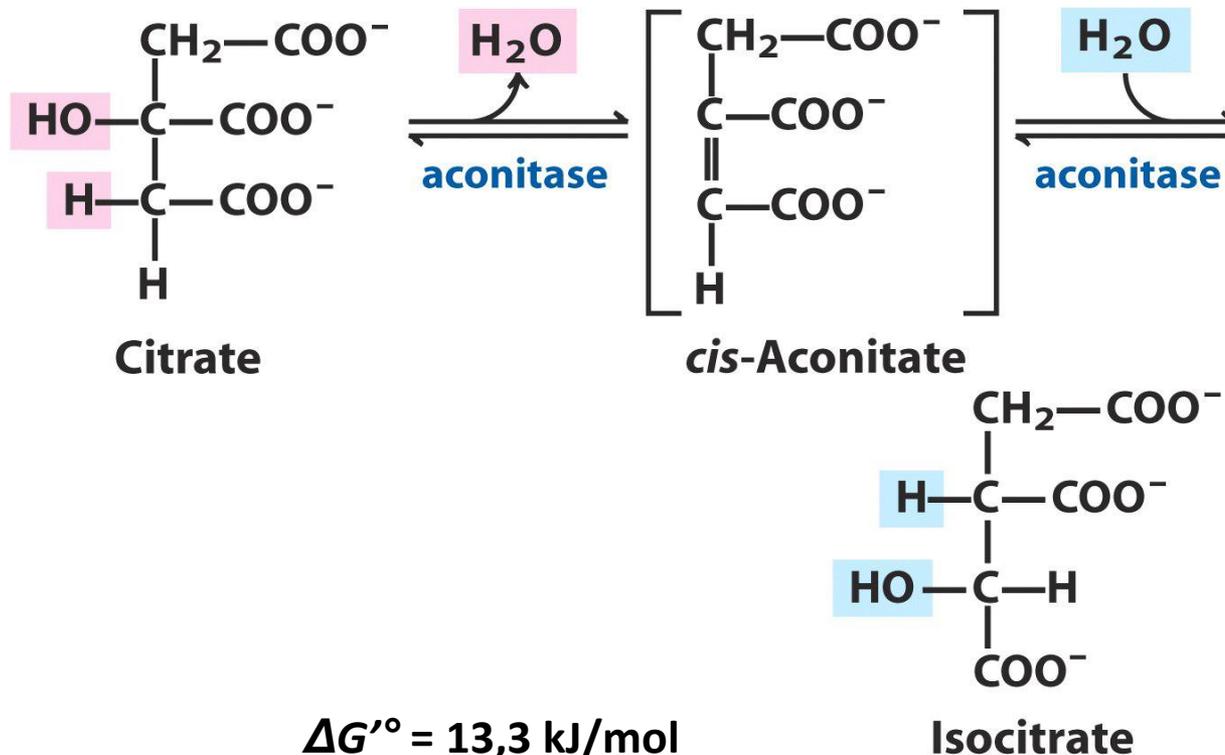
Catalisi acido-base / His-mediata

Il ciclo dell'acido citrico: 2 - aconitasi

Isomerizzazione di citrato a isocitrato

Il gruppo ossidrilico del citrato non è localizzato in modo appropriato per le reazioni ossidative successive per cui viene isomerizzato a isocitrato dalla aconitasi.

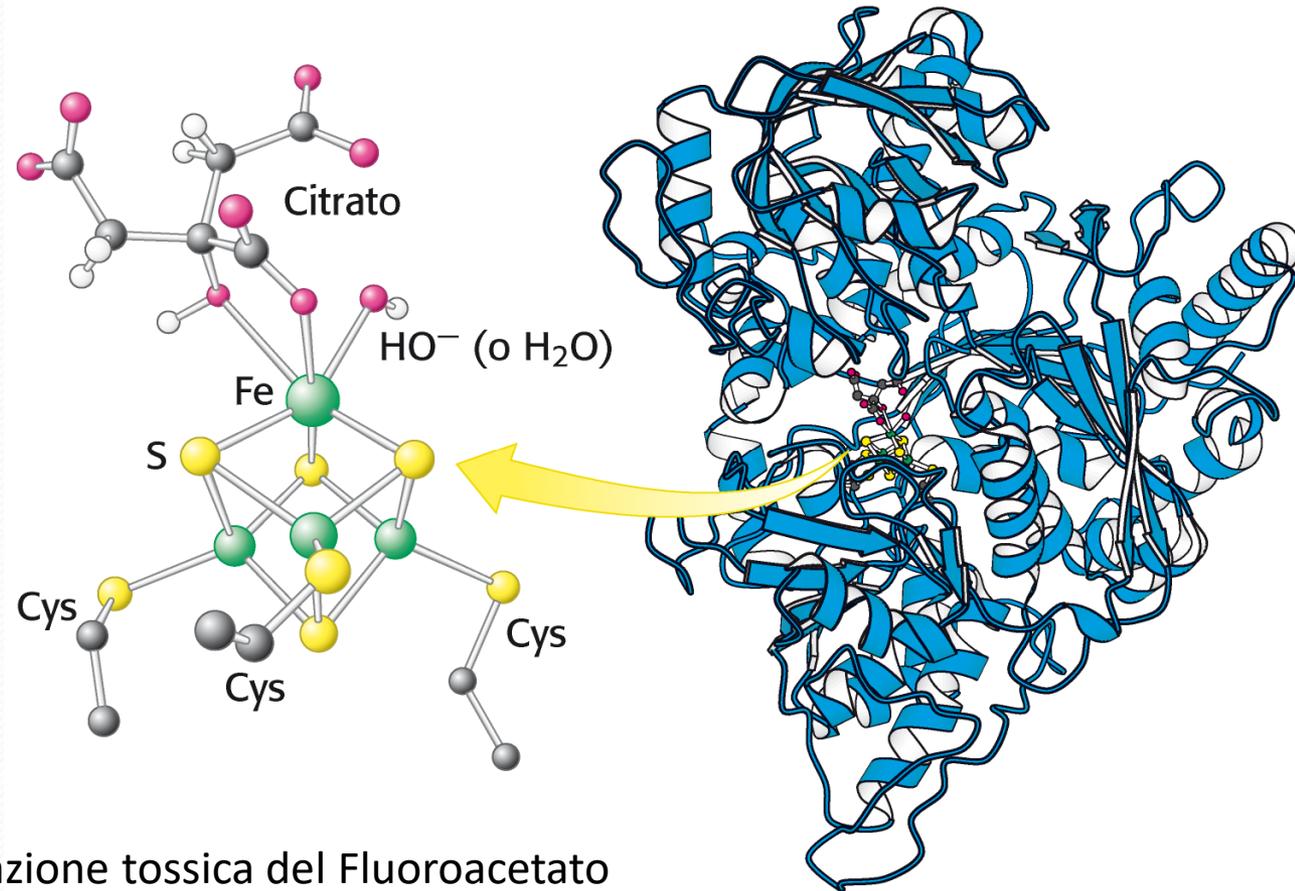
Il passaggio da un gruppo alcolico da terziario a secondario lo rende più facilmente ossidabile



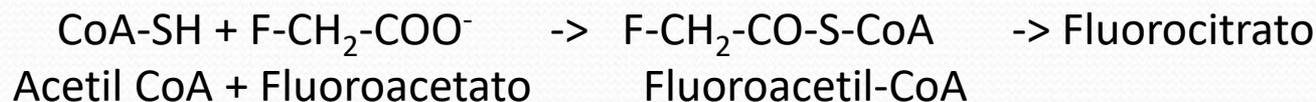
L'isomerizzazione avviene attraverso una reazione di deidratazione seguita da una di idratazione.

Il ciclo dell'acido citrico: 2 - aconitasi

L'aconitasi è una proteina ferro-zolfo. Il centro Fe-S è importante sia nel legame col substrato sia nel processo catalitico. Uno degli atomi di ferro del centro si lega ai gruppi carbossilico e ossidrilico del citrato.



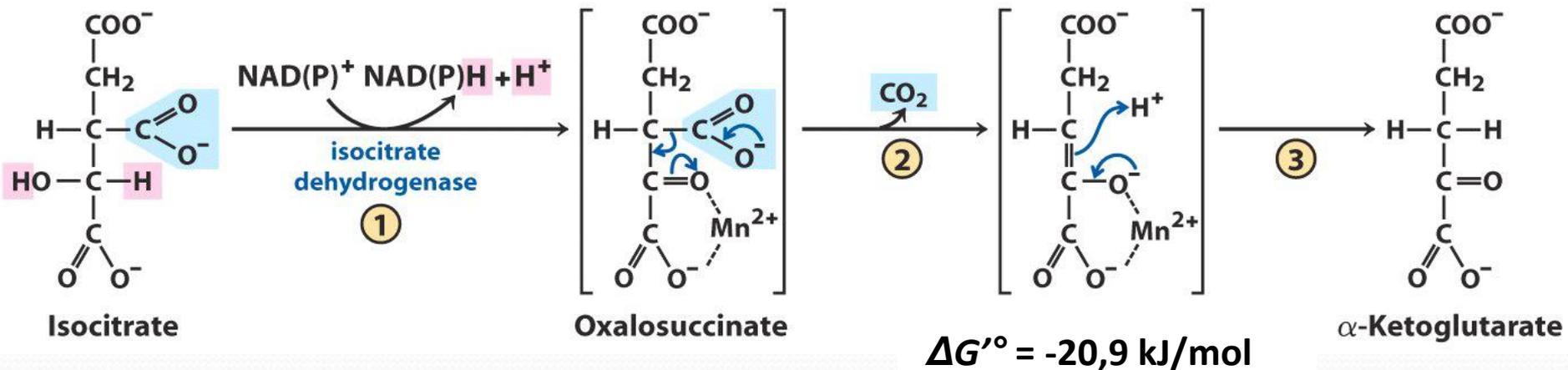
L'aconitasi è il bersaglio dell'azione tossica del Fluoroacetato composto di origine vegetale che è stato usato come veleno per topi.



Il fluoroacetato è un esempio di substrato suicida. Infatti funge da substrato per la citrato sintasi e viene trasformato in fluoroacetil-CoA e poi fluorocitrato. Il fluorocitrato però non può essere trasformato dall'aconitasi e come risultato si ha il blocco del ciclo dell'acido citrico

Il ciclo dell'acido citrico: 3 – isocitrato deidrogenasi

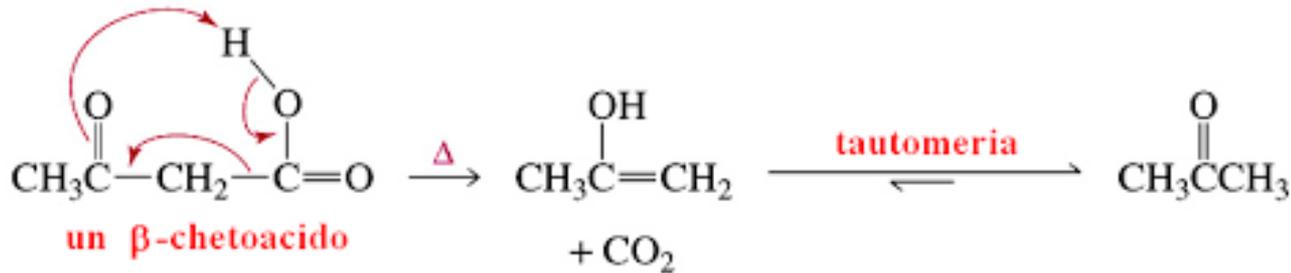
Prima decarbossilazione ossidativa del ciclo



L'enzima Isocitrato deidrogenasi catalizza la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato ad α-chetoglutarato. Nella prima parte della reazione avviene la deidrogenazione (ossidazione) dell'isocitrato ad ossalosuccinato, un intermedio β-chetoacido instabile che subisce una decarbossilazione spontanea (favorita dallo ione Mn²⁺) mentre è ancora legato all'enzima. In questo modo si libera la prima molecola di CO₂. Durante questa reazione si genera anche il trasportatore di elettroni ad alto potenziale di trasferimento, il NADH a partire da NAD⁺. Esistono due forme isoenzimatiche sia NAD⁺ che NADP⁺ dipendenti

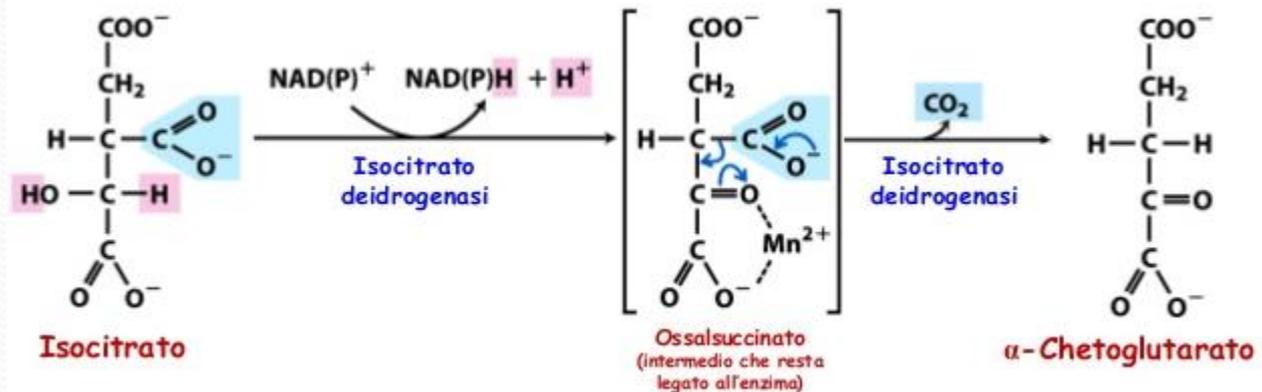
Decarbossilazione beta-chetoacidi

Le reazioni di decarbossilazione dei beta-chetoacidi sono catalizzate da enzimi che contengono un ione Mn^{+2} o un altro gruppo elettro-attrattore



In presenza di un gruppo elettro-attrattore sul carbonio in β al gruppo carbossilico aumenta in modo marcato l'acidità dell'idrogeno in α e il gruppo carbossilico può essere allontanato come CO_2

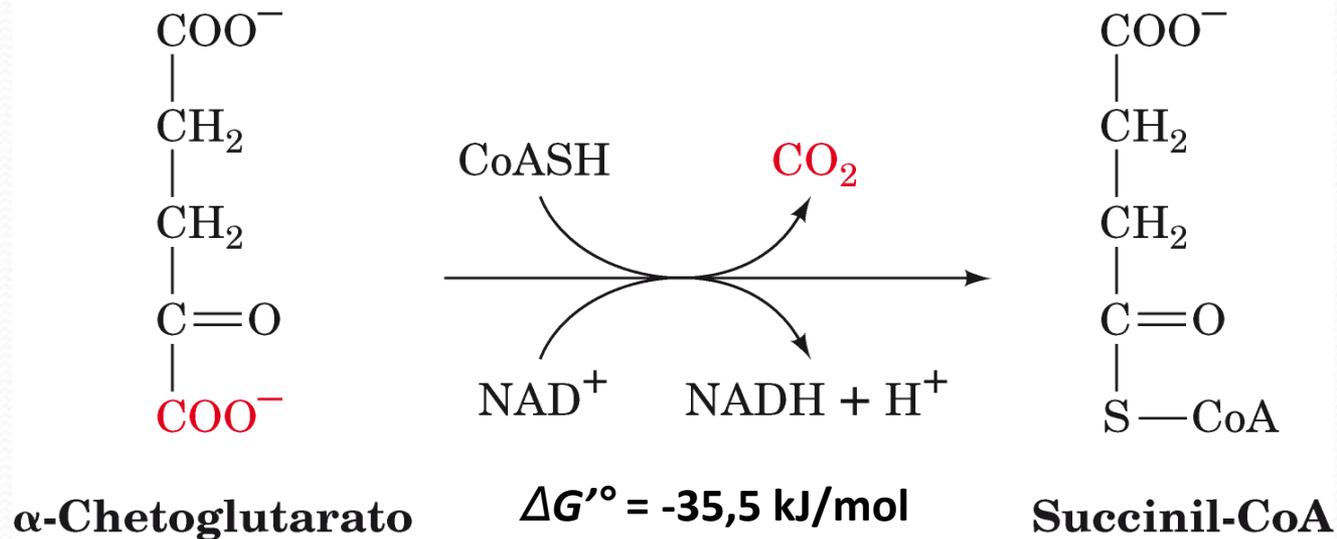
Durante il metabolismo, la decarbossilazione è favorita dalla ossidazione in gruppo carbonilico del carbonio alcolico che si trova in posizione β rispetto al gruppo carbossilico da eliminare



Il ciclo dell'acido citrico:

4 – α -chetoglutarato deidrogenasi

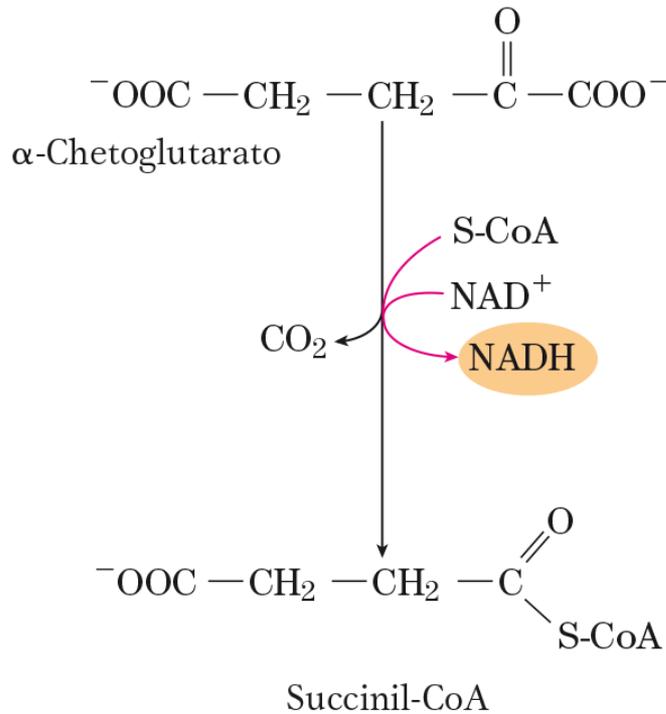
Seconda decarbossilazione ossidativa del ciclo. L'energia dell'ossidazione dell' α -chetoglutarato viene conservata mediante la formazione del legame tioestere del succinil-CoA. Durante la reazione si genera anche il secondo trasportatore di elettroni ad alto potenziale di trasferimento, il NADH a partire da NAD⁺.



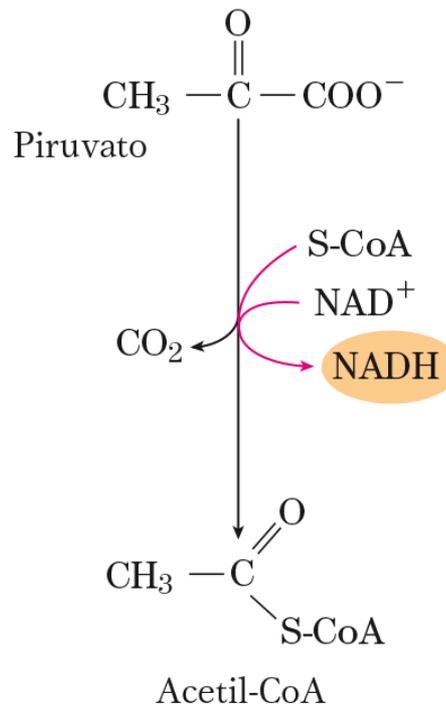
La reazione è catalizzata dal complesso della α -chetoglutarato deidrogenasi, molto simile alla piruvato deidrogenasi sia nella struttura che nel meccanismo d'azione. Il complesso è formato da tre enzimi, E1, E2 e E3, e 5 coenzimi che consentono la decarbossilazione di un α -chetoacido e la successiva formazione di un legame tioestere tra il CoA e il gruppo acilico derivato dalla decarbossilazione. In questo complesso l'enzima E1 è diverso ed è specifico per l' α -chetoglutarato.

Ossidazione di α -chetoacidi

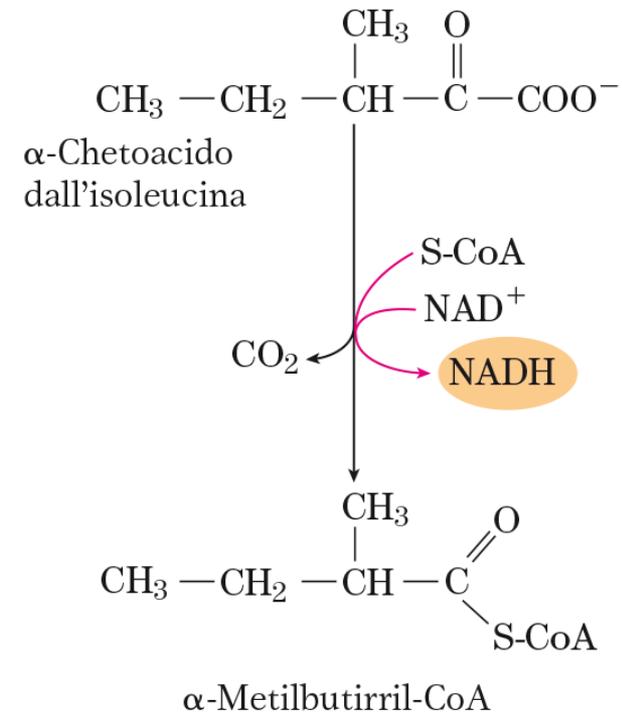
Ciclo dell'acido citrico



Complesso della piruvato deidrogenasi



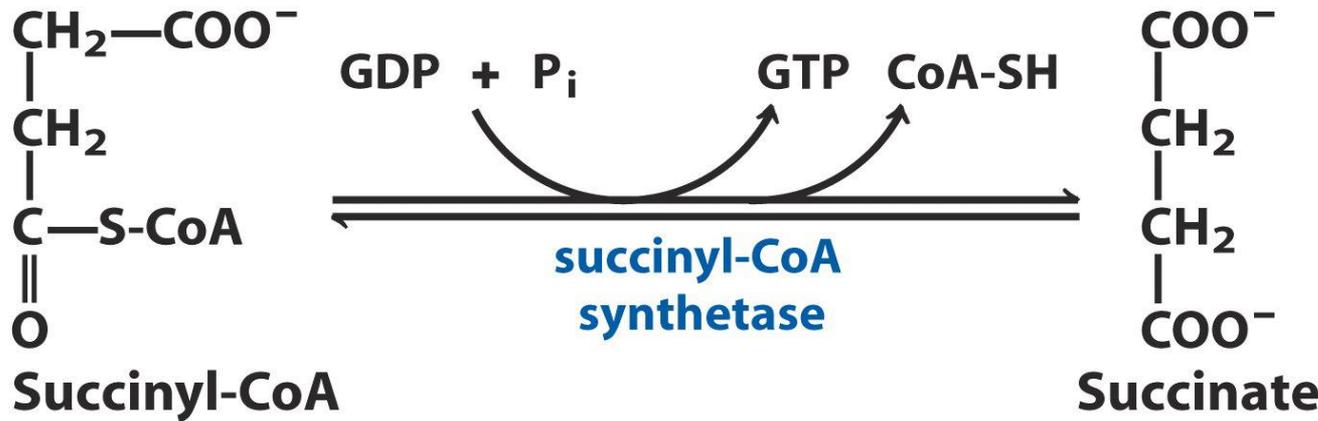
Ossidazione dell'isoleucina (leucina, valina)



Esempi di ossidazioni di α -chetoacidi catalizzate da complessi enzimatici che utilizzando 5 reazioni e 5 coenzimi (TPP, NAD^{+} , FAD, CoA e acido lipoico) ossidano il carbonio carbonilico, liberano CO_2 e trasferiscono il gruppo acilico sul CoA

Il ciclo dell'acido citrico: 5 – succinil-CoA sintetasi

Fosforilazione a livello del substrato



$$\Delta G'^{\circ} = -2,9 \text{ kJ/mol}$$

La scissione del legame tioestere del succinil-CoA è accoppiata alla fosforilazione di un nucleoside difosfato purinico costituendo la sola tappa del ciclo nella quale è prodotto un composto contenente un gruppo fosforico ad elevato potenziale energetico.

Nelle cellule animali sono presenti due forme isoenzimatiche, una specifica per l'ADP (muscolo scheletrico e cardiaco) e l'altra per il GDP (fegato).

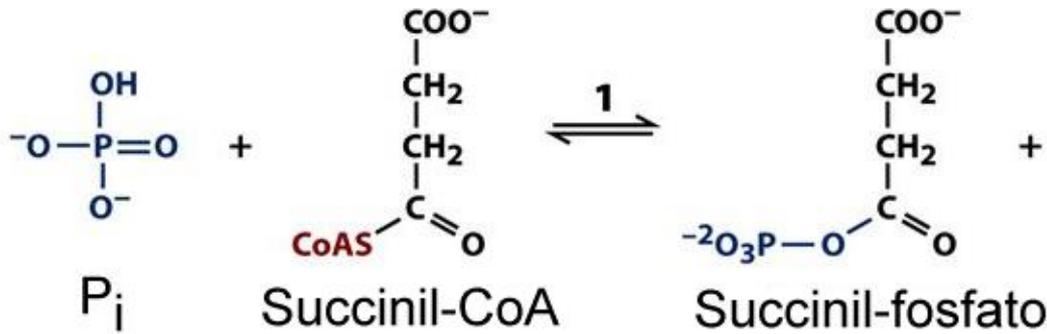
Il GTP formato può donare il gruppo γPi ad ADP mediante una reazione reversibile catalizzata dalla nucleoside difosfato chinasi



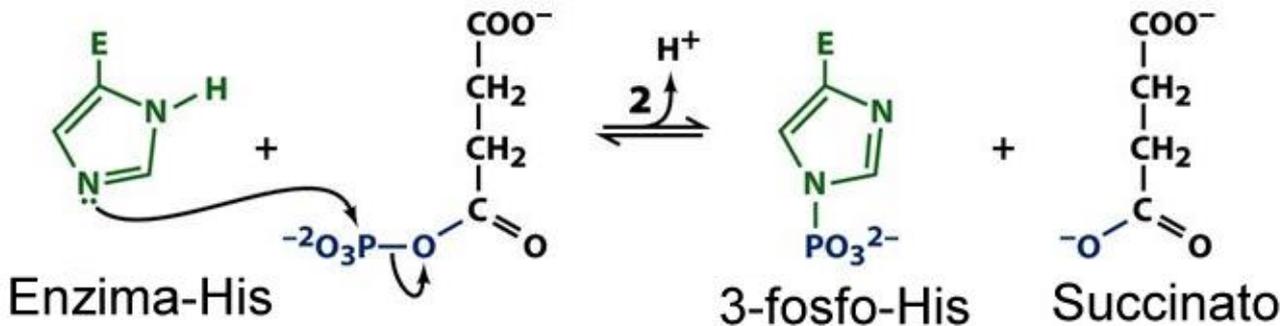
Il risultato netto dell'attività di entrambi gli isozimi della succinil-CoA sintetasi è la conservazione di energia sotto forma di ATP

Il ciclo dell'acido citrico: 5 – succinil-CoA sintetasi

La succinil CoA sintetasi interconverte due tipi di energia biochimica passando attraverso la formazione di un intermedio fosforilato

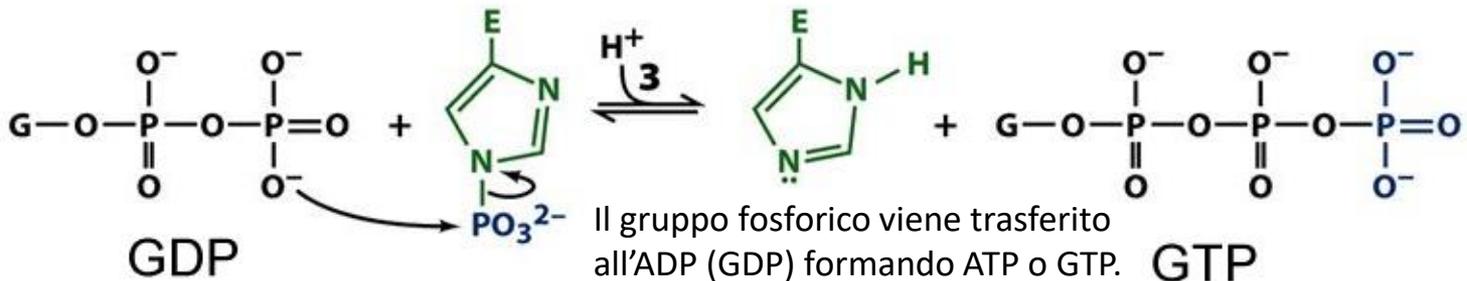


L'ortofosfato sostituisce il CoA formando il succinil -fosfato ad alta energia



Un residuo di His riceve il gruppo fosforico liberando il succinato

La fosfoistidina si sposta verso l'ADP (GDP)

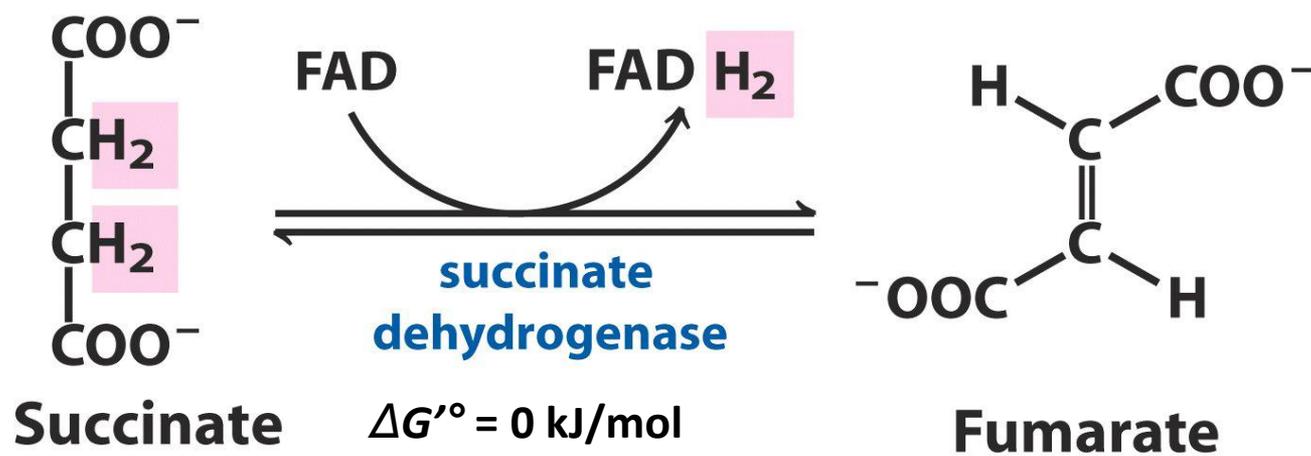


Il gruppo fosforico viene trasferito all'ADP (GDP) formando ATP o GTP. **GTP**

Il gruppo fosfato attivato viene temporaneamente legato ad un residuo di istidina nel sito catalitico. Questo è comune nelle reazioni di trasferimento di gruppi fosfato

Il ciclo dell'acido citrico: 6 – succinato deidrogenasi

Deidrogenazione stereospecifica del succinato (si forma l'acido fumarico, isomero trans, e non l'acido maleico, isomero cis) Durante la reazione si genera anche il terzo trasportatore di elettroni (FADH₂ a partire da FAD).



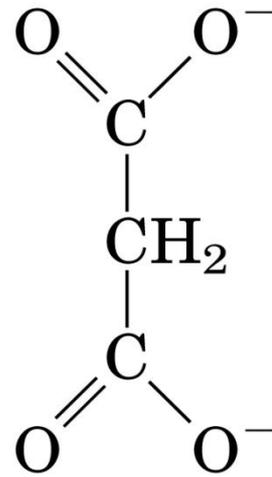
Nelle reazioni di ossidazione in cui vengono rimossi due atomi di H dal substrato formando un doppio legame è quasi sempre il FAD l'accettore di elettroni.

L'enzima è legato alla membrana interna dei mitocondri (nei procarioti è associato alla membrana plasmatica). Contiene tre centri ferro-zolfo e una molecola di FAD legata covalentemente

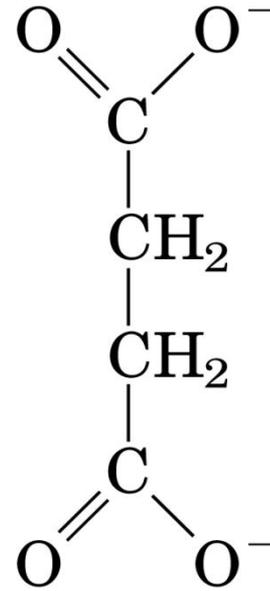
Gli elettroni estratti dal succinato passano attraverso il FAD ed i centri ferro-zolfo prima di entrare nella catena di trasporto degli elettroni

Il FAD è l'accettore di atomi di idrogeno in questa reazione in quanto la variazione di energia libera è troppo piccola per ridurre il NAD⁺. Il FAD è strettamente legato alla succinato deidrogenasi.

Il ciclo dell'acido citrico: 6 – succinato deidrogenasi



Malonate

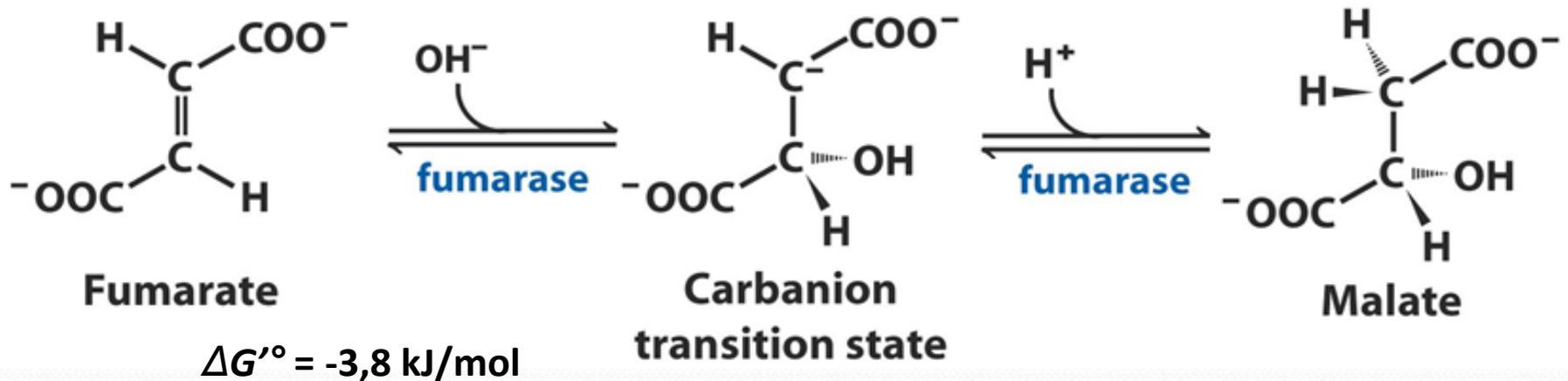


Succinate

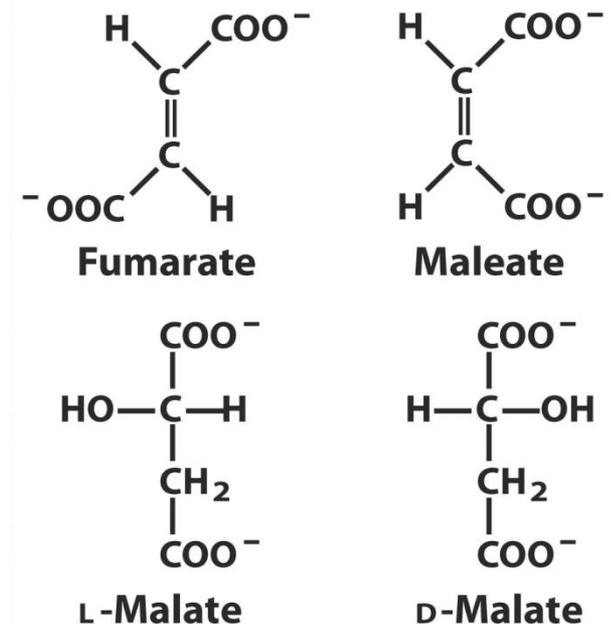
Il malonato è un inibitore della succinato deidrogenasi. La sua struttura, con due gruppi carbossilici è molto simile al succinato, che però non può essere ossidato. L'inibizione può essere ridotta aumentando la concentrazione del succinato (inibizione competitiva)

Il ciclo dell'acido citrico: 7 – fumarasi

idratazione del doppio legame del fumarato

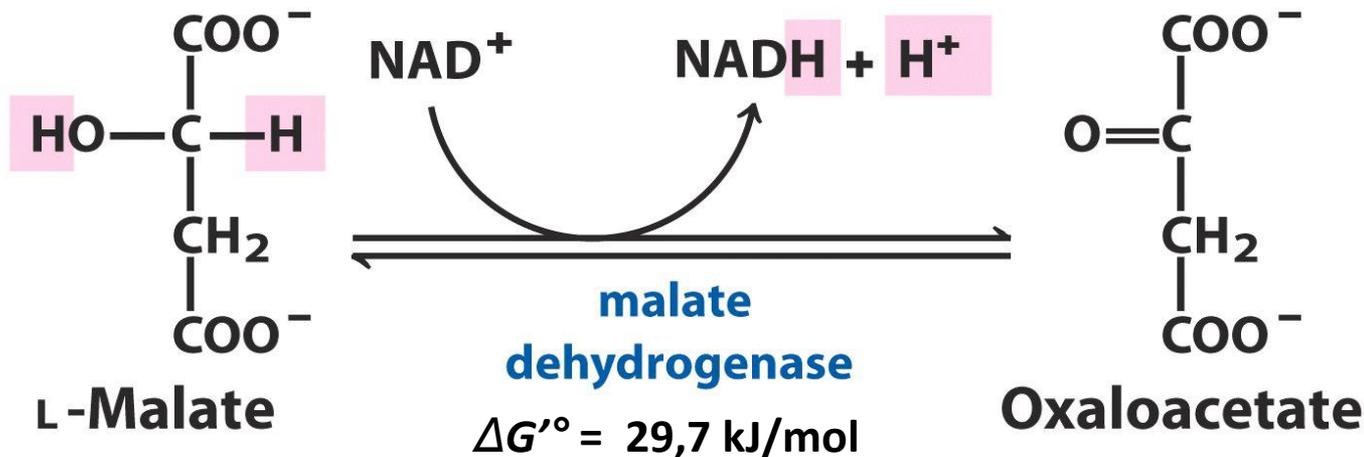


La fumarasi (o fumarato idratasi) catalizza l'idratazione stereospecifica del doppio legame trans del fumarato. Anche in questo caso si produce un isomero specifico (L-malato e non D-malato) dato che il gruppo ossidrilico viene addizionato solu su di un lato del doppio legame. La fumarasi è altamente stereospecifica in quanto catalizza l'idratazione del fumarato, isomero trans, e non quella del maleato, isomero cis. Anche nella reazione inversa l'enzima conserva la sua stereospecificità in quanto il D-malato non è substrato dell'enzima.



Il ciclo dell'acido citrico: 8 – malato deidrogenasi

Ossidazione di malato a ossalacetato

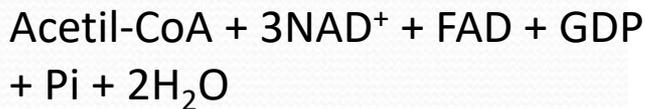


Durante la reazione si genera anche il quarto trasportatore di elettroni ad alto potenziale di trasferimento (NADH a partire da NAD⁺).

Il ΔG° di questa reazione è + 29.7 kJ/mol e quindi l'equilibrio sarebbe spostato a sinistra (la concentrazione di ossalacetato è molto bassa). Nelle cellule tuttavia, l'ossalacetato viene rimosso continuamente dalla successiva reazione altamente esoergonica catalizzata dalla citrato sintasi (Ossalacetato + acetil-CoA → citrato ΔG° -31.5 kJ/mol). In questo modo la reazione della malato deidrogenasi viene spinta verso la formazione di ossalacetato permettendo così il mantenimento del processo ciclico

Bilancio del ciclo dell'acido citrico

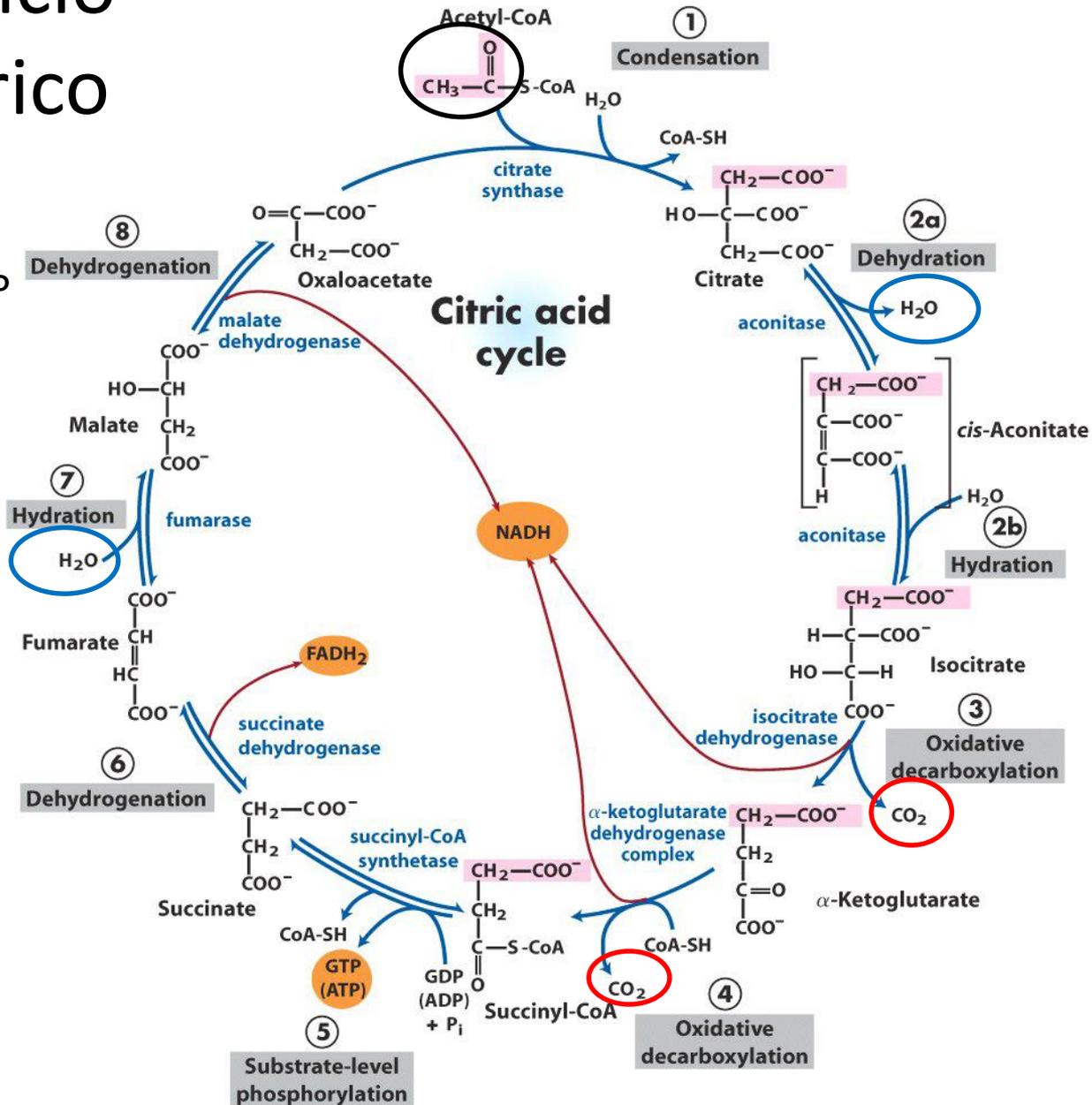
Il bilancio complessivo del ciclo dell'acido citrico è:



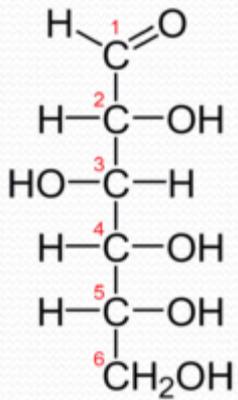
→



- **Due** atomi di C entrano nel ciclo come Acetil-CoA e **due** atomi di C escono dal ciclo come CO_2
- **Quattro** coppie di elettroni escono dal ciclo in 4 reazioni di ossidazione che portano alla riduzione di 3 molecole di NAD^+ e una di FAD
- La scissione del legame tioestere del succinil CoA genera una molecola di GTP (o ATP)
- Vengono consumate **due** molecole di H_2O nelle due reazioni di idratazione



Metabolismo glucidi



Glucosio

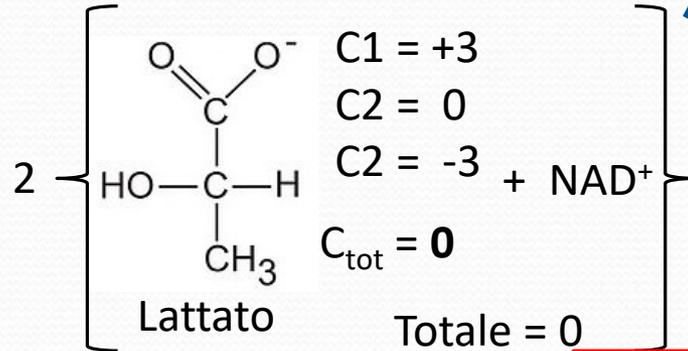
$C_1 = +1$
 $C_2 = 0$
 $C_2 = 0$
 $C_3 = 0$
 $C_4 = 0$
 $C_5 = 0$
 $C_6 = -1$

$C_{\text{tot}} = 0$

Glicolisi

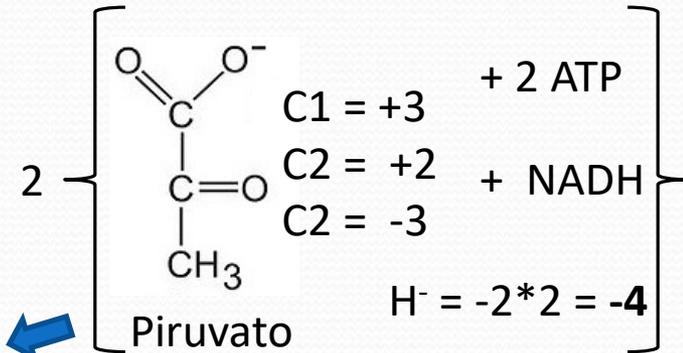
+ 2NAD⁺

Metabolismo non ossidativo



$C_1 = +3$
 $C_2 = 0$
 $C_2 = -3$
 $C_{\text{tot}} = 0$

Totale = 0



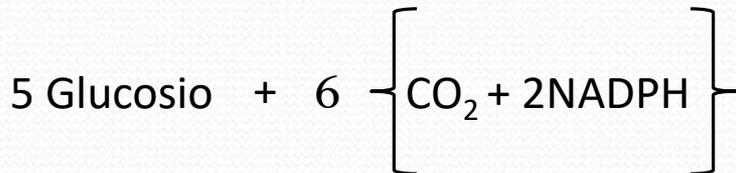
$C_1 = +3$ + 2 ATP
 $C_2 = +2$ + NADH
 $C_2 = -3$
 $\text{H}^- = -2 \cdot 2 = -4$

$C_{\text{tot}} = +2 \cdot 2 = +4$ Totale = 0

6 Glucosio + 6NADP⁺

Via pentosi

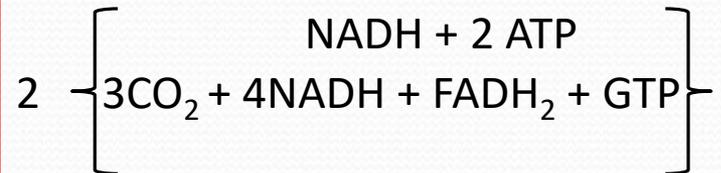
Metabolismo ossidativo



$C_{\text{tot}} = +4 \cdot 6 = +24$ $\text{H}^- = -4 \cdot 6 = -24$

Totale = 0

Ciclo di Krebs



$C_{\text{tot}} = +4 \cdot 3 \cdot 2 = +24$ $\text{H}^- = -2 \cdot 6 \cdot 2 = -24$

Totale = 0

Bilancio del ciclo dell'acido citrico

Glicolisi

Glucosio \rightarrow 2 Piruvato 2 ATP
2 NADH (5 ATP)

Piruvato deidrogenasi

2 Piruvato \rightarrow 2 AcetilCoA 2 NADH (5 ATP)

Ciclo dell'acido citrico

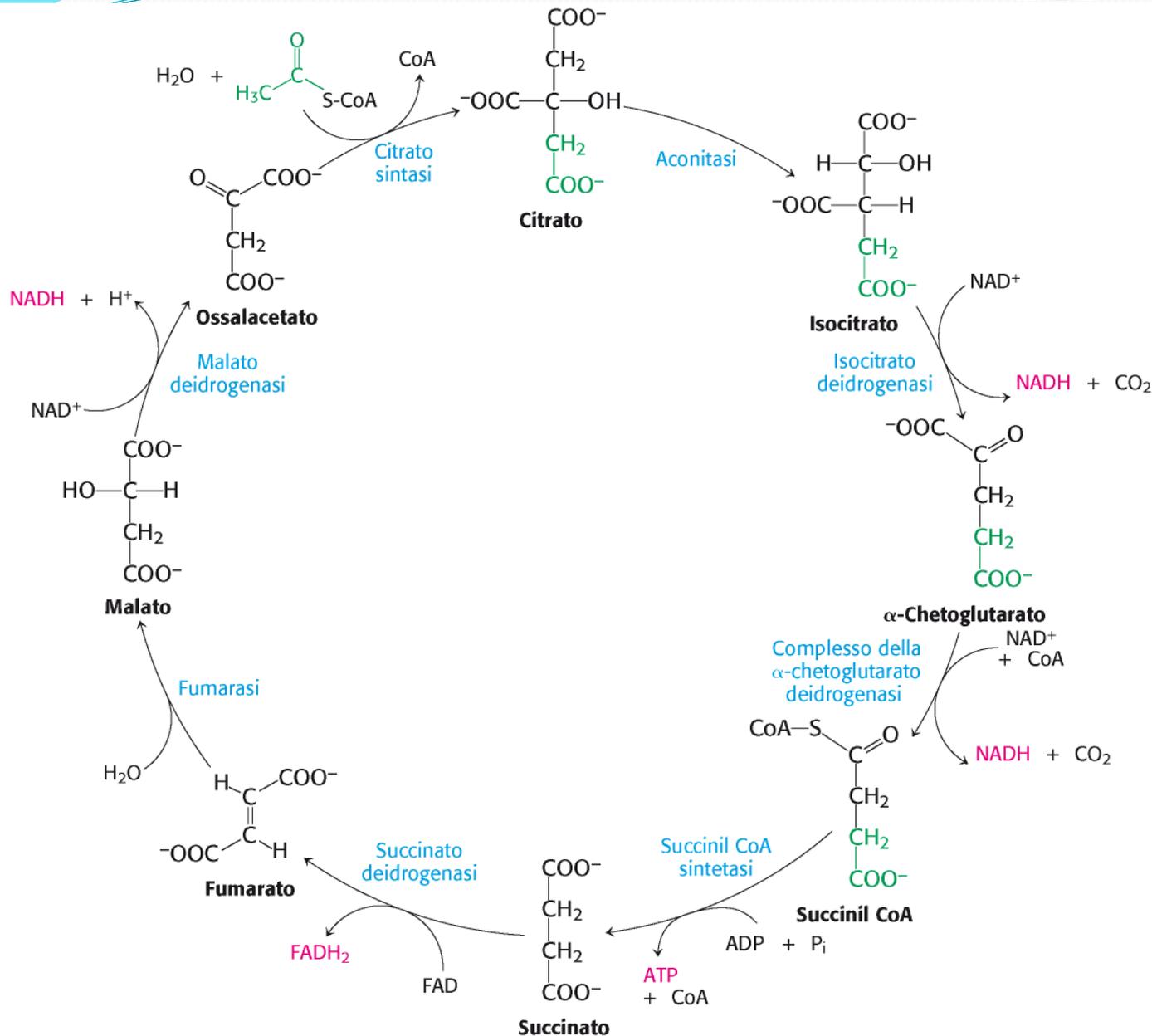
2 AcetilCoA \rightarrow 4 CO₂ 6 NADH (15 ATP)
2 FADH₂ (3 ATP)
2 GTP/ATP
totale 32 ATP

$32 \times 30.5 \text{ kJ/mole} = 976 \text{ kJ/mole}$

Ossidazione chimica glucosio = 2840 kJ/mole

Resa $976/2840 \times 100 = 34 \%$

Bilancio del ciclo dell'acido citrico



Studi con traccianti radioattivi hanno rivelato che i due atomi di carbonio che entrano nel ciclo non sono gli stessi che lo abbandonano. I due atomi di carbonio che entrano nel ciclo come Acetil CoA verranno rilasciati come CO_2 nel ciclo successivo.

Controllo del ciclo dell'acido citrico

Valori di $\Delta G' ^\circ$ delle reazioni del ciclo dell'acido citrico		
Reazione	Enzima	$\Delta G' ^\circ$ (kJmol ⁻¹)
1	Citrato Sintasi	-31.5
2	Aconitasi	+5
3	Isocitrato deidrogenasi	-21
4	Complesso α -chetoglutarato deidrogenasi	-33
5	Succinil-CoA Sintetasi	-2.1
6	Succinato deidrogenasi	+6
7	Fumarasi	-3.4
8	Malato deidrogenasi	+29.7
BILANCIO NETTO		-50.3

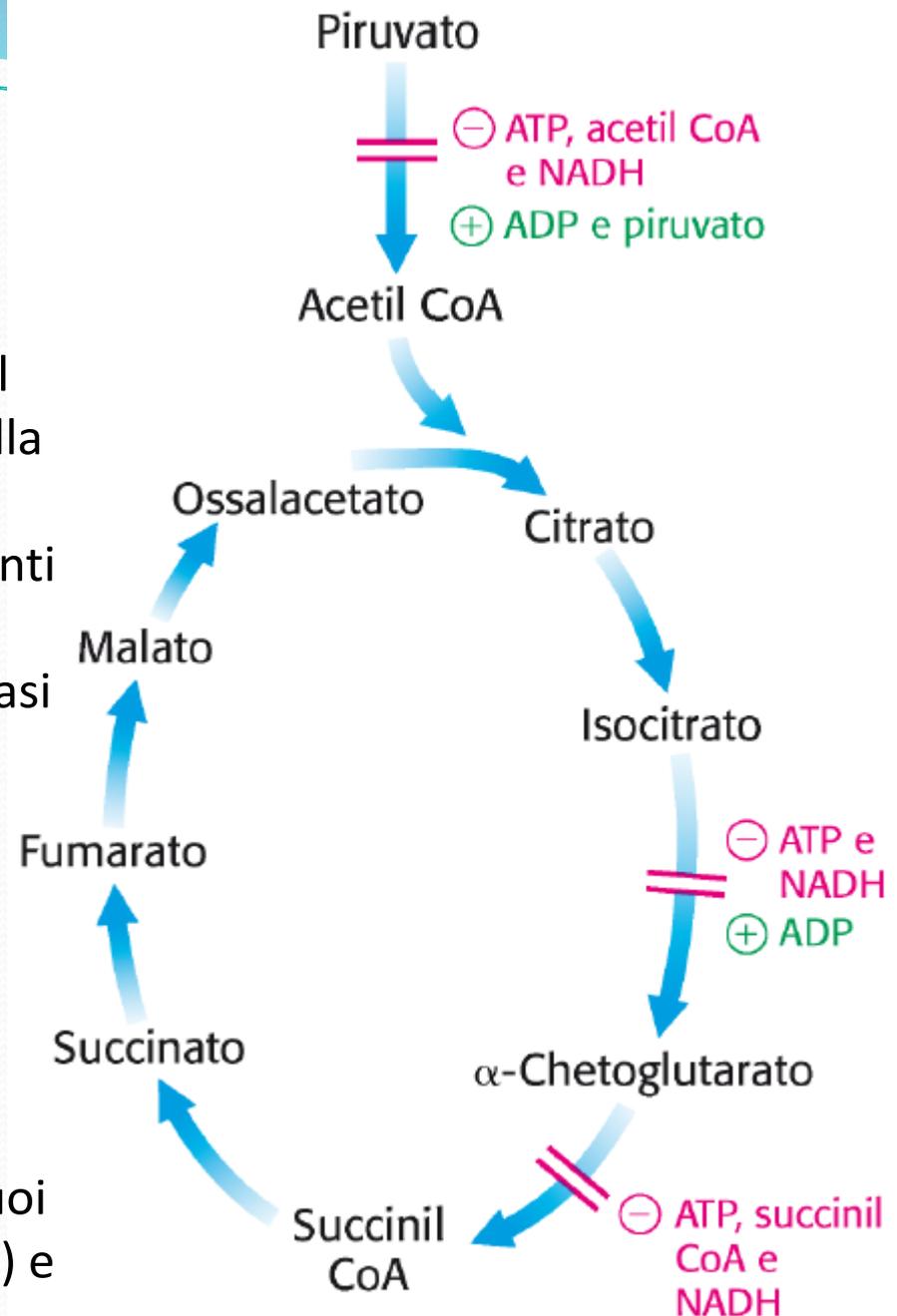
Le reazioni con valori di ΔG molto negativi (reazioni irreversibili) sono i principali punti di controllo dell'intera via

Controllo del ciclo dell'acido citrico

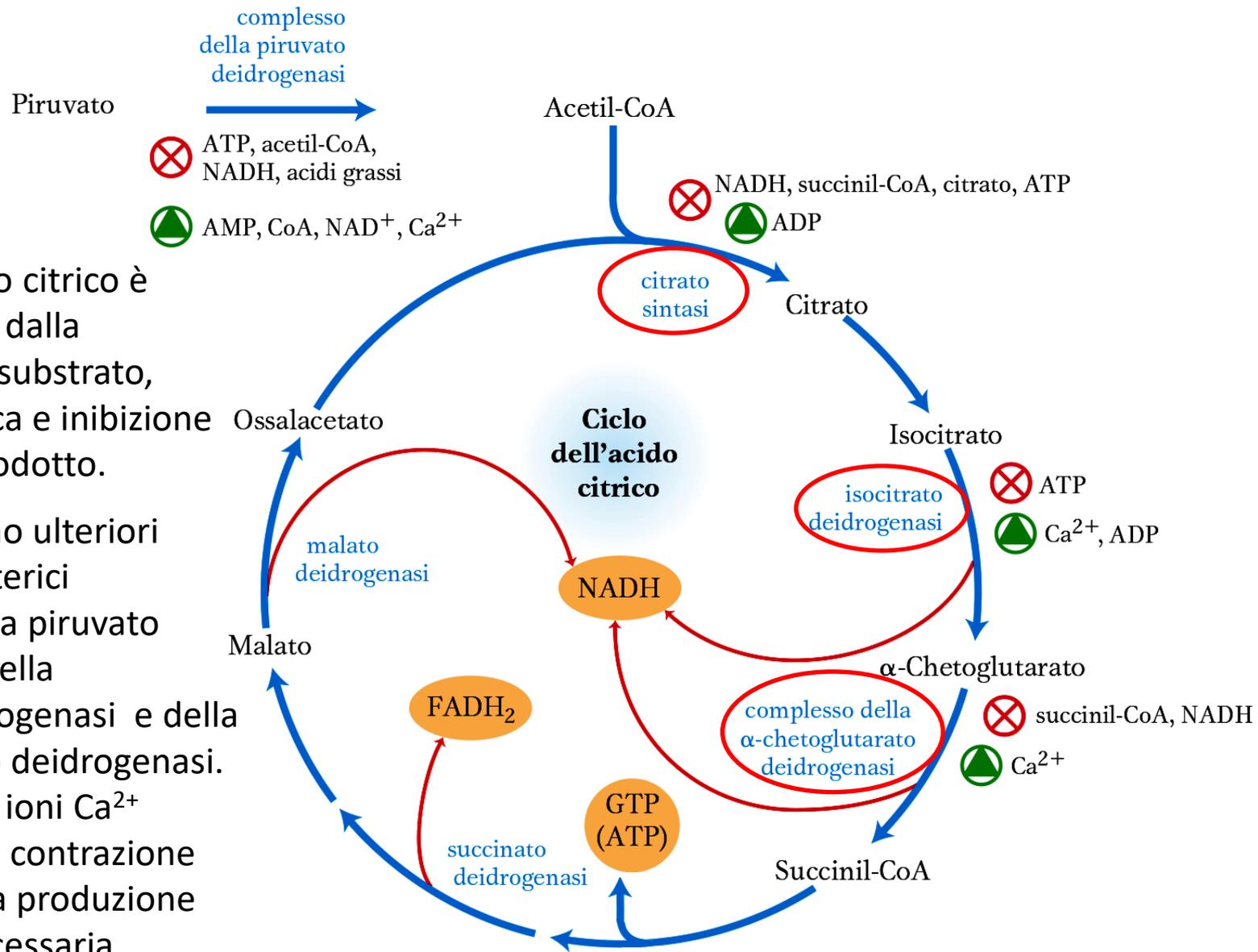
La velocità del ciclo dell'acido citrico è finemente regolata in modo da soddisfare il principalmente il fabbisogno energetico della cellula.

Il ciclo dell'acido citrico è regolato in più punti che corrispondono alle reazioni catalizzate dagli enzimi allosterici isocitrato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi.

- L'isocitrato deidrogenasi è stimolata allostericamente dall'ADP ed è inibita da ATP e NADH.
- La regolazione dell' α -chetoglutarato deidrogenasi è simile a quella della PDH (forte omologia strutturale tra i due complessi). Infatti l'enzima è inibito dai suoi prodotti di reazione (succinil CoA e NADH) e dall'ATP (carica energetica)



Controllo del ciclo dell'acido citrico



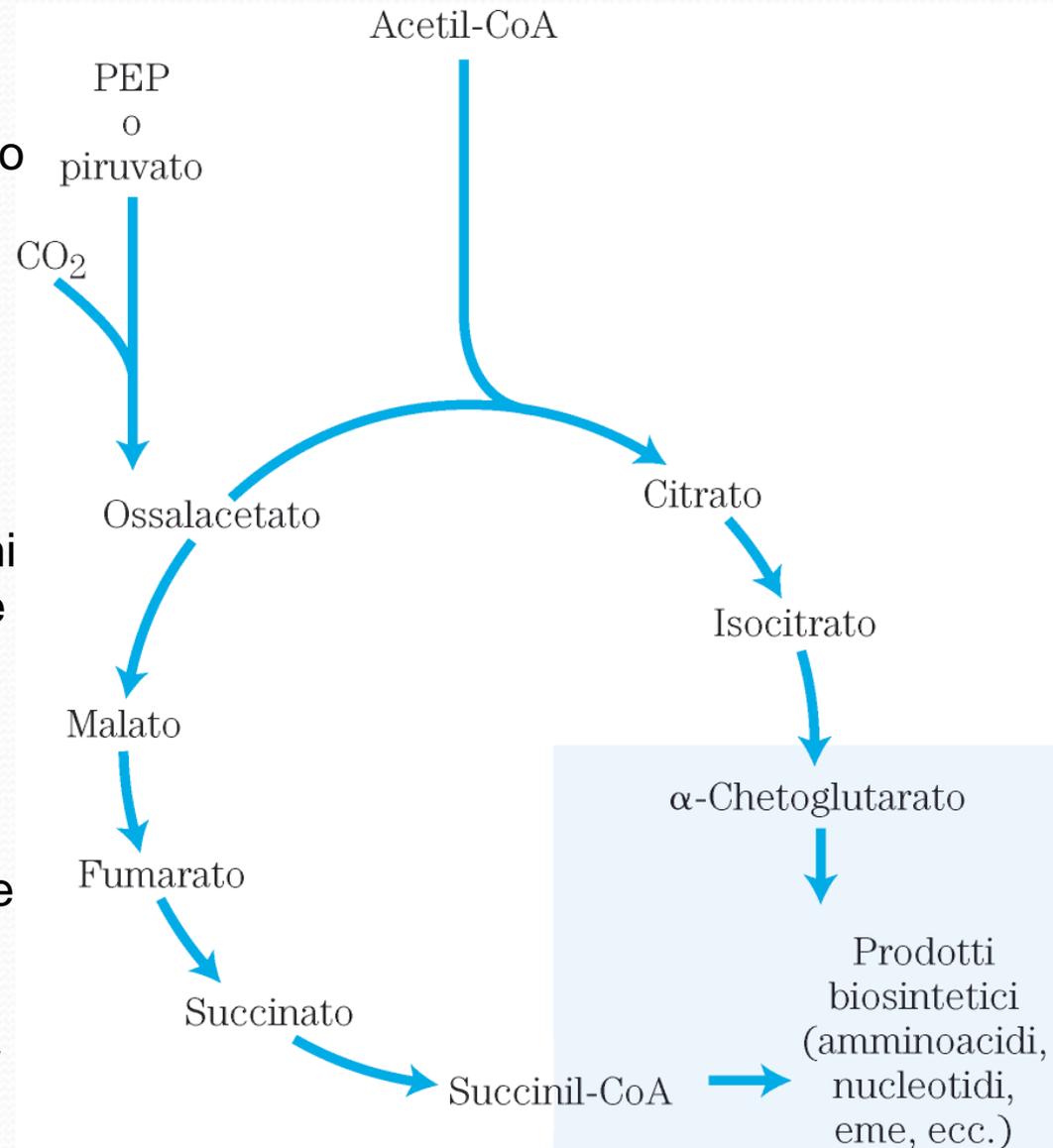
Il ciclo dell'acido citrico è quindi regolato dalla disponibilità di substrato, carica energetica e inibizione feedback da prodotto.

Gli ioni Ca²⁺ sono ulteriori regolatori allosterici (attivatore) della piruvato deidrogenasi, della Isocitrato deidrogenasi e della α-ketoglutarato deidrogenasi. Nel muscolo gli ioni Ca²⁺ stimolano sia la contrazione muscolare sia la produzione dell'energia necessaria

Evoluzione del ciclo di Krebs

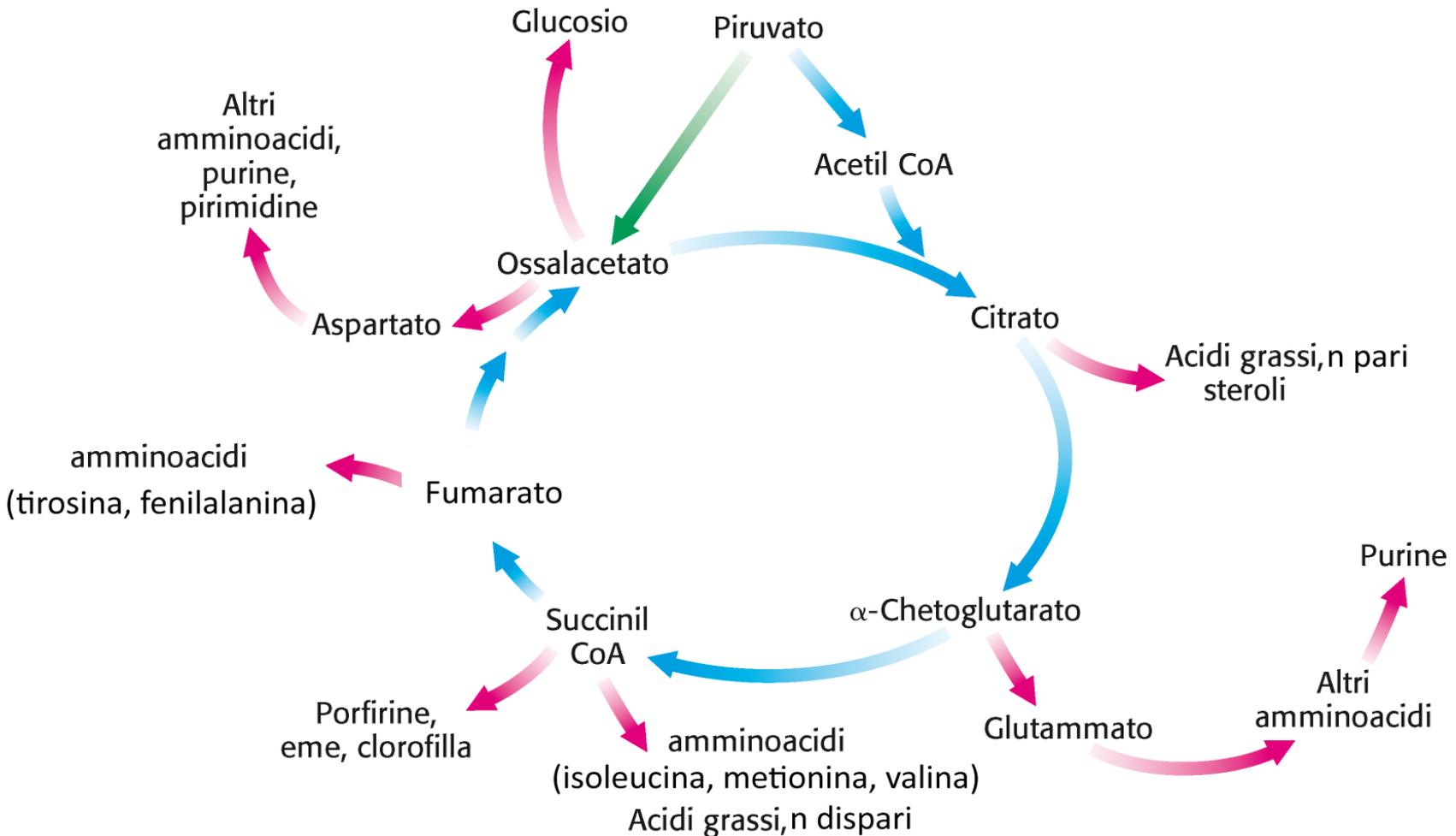
Il ciclo dell'acido citrico attuale è il prodotto dell'evoluzione e la maggior parte delle reazioni che lo costituiscono si sono consolidate prima della comparsa degli organismi aerobici. Molto probabilmente i primi organismi anaerobici usavano le reazioni del ciclo dell'acido citrico in processi biosintetici lineari.

Attualmente ancora esistono organismi anaerobici con caratteristiche arcaiche che mancano dell' α -chetoglutarato deidrogenasi. In questi organismi le reazioni non avvengono in maniera ciclica ma sono organizzate in due percorsi lineari, uno di tipo ossidativo e l'altro riduttivo, che portano alla formazione di α -chetoglutarato e il succinil-CoA, precursori importanti per diverse vie biosintetiche

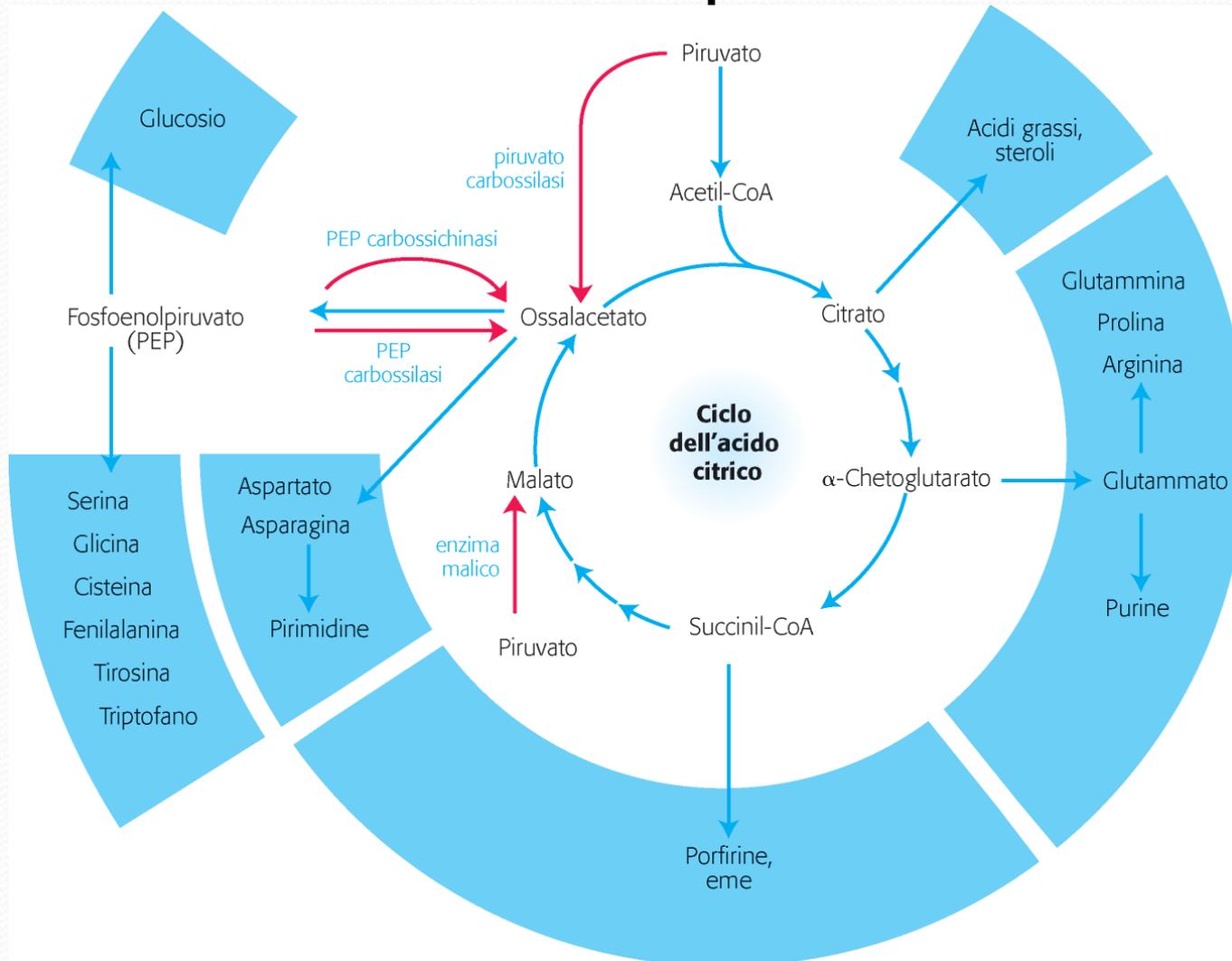


Gli intermedii del ciclo

Il ciclo dell'acido citrico fornisce gli intermedi per numerosi processi biosintetici cellulari. Negli organismi aerobici, il ciclo dell'acido citrico è una via anfibolica ovvero appartiene sia ai processi anabolici che a quelli catabolici.

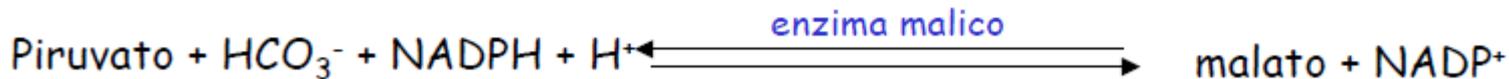
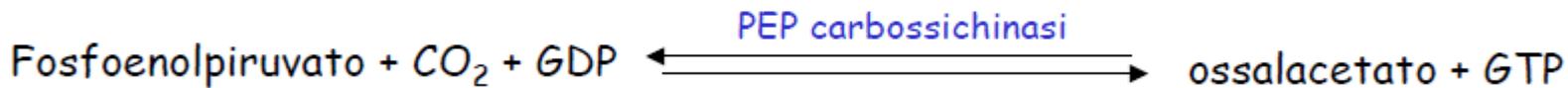
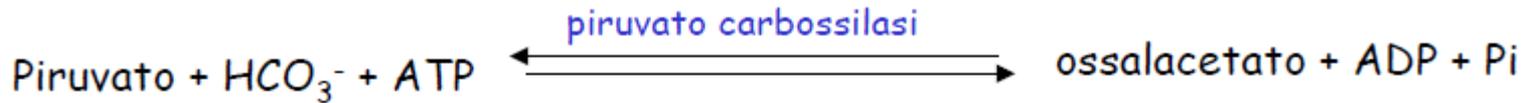


Reazioni anaplerotiche



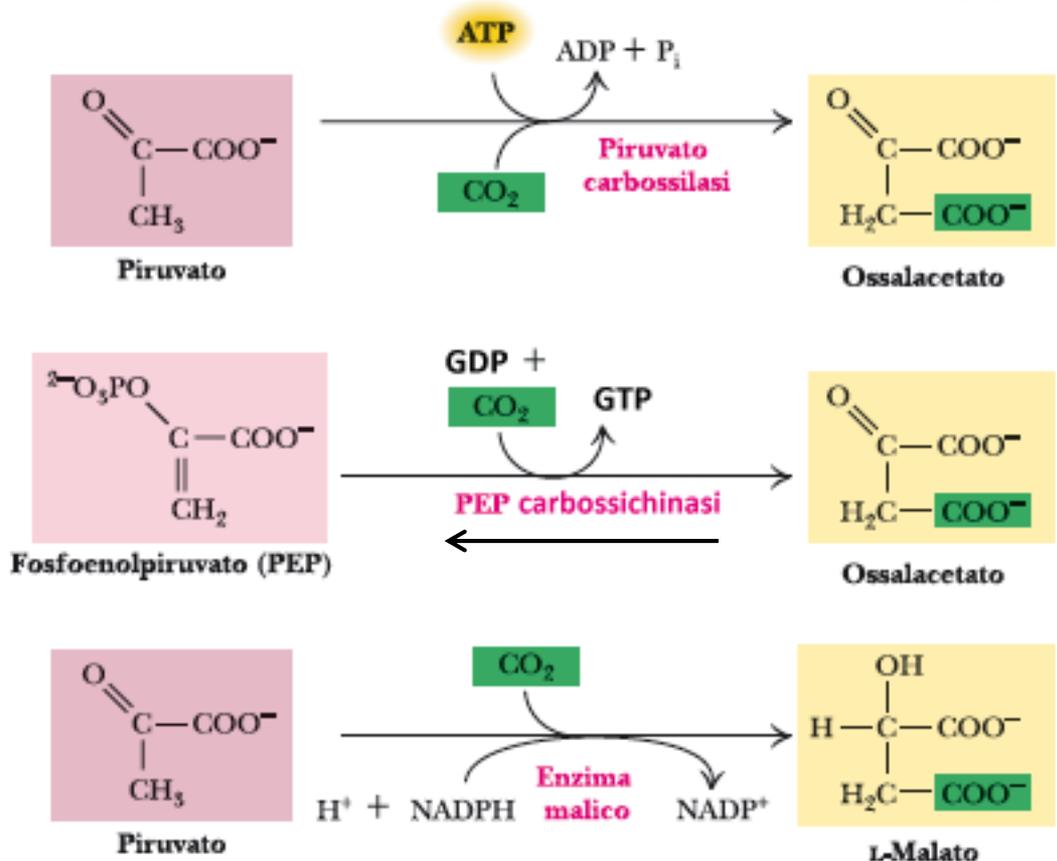
Gli intermedi del ciclo di Krebs possono essere prelevati per le biosintesi e per questo motivo devono essere rimpiazzati. Le reazioni anaplerotiche (*anaplèrosis, riempimento*) forniscono il ciclo dell'acido citrico di intermedi.

Reazioni anaplerotiche



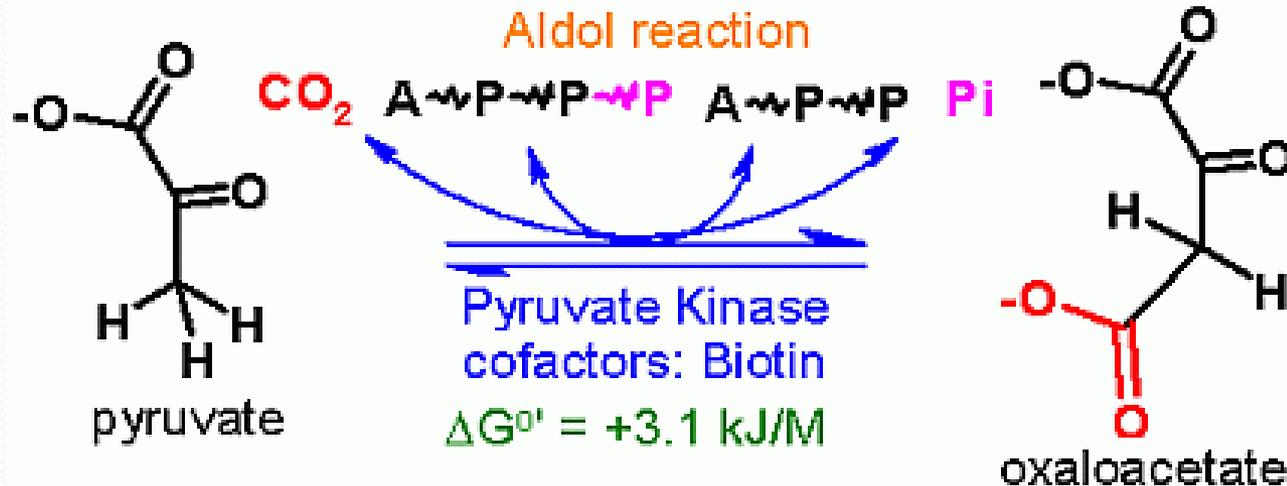
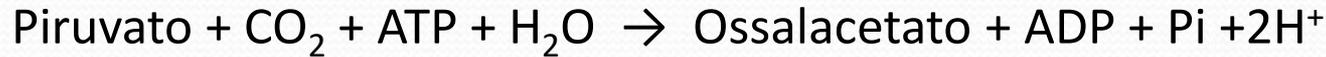
Nei tessuti animali, in particolare fegato e rene, la reazione catalizzata dalla piruvato carbossilasi biotina-dipendente è la più importante reazione anaplerotica. L'enzima è attivato allostericamente da acetil-CoA

La reazione catalizzata dalla PEP carbossichinasi non è una vera reazione anaplerotica poiché nella cellula è favorita la formazione di PEP a partire da ossalacetato a causa della notevole affinità dell'enzima per l'ossalacetato rispetto alla CO_2 .



Piruvato carbossilasi

L'ossalacetato viene prodotto a partire dal piruvato:



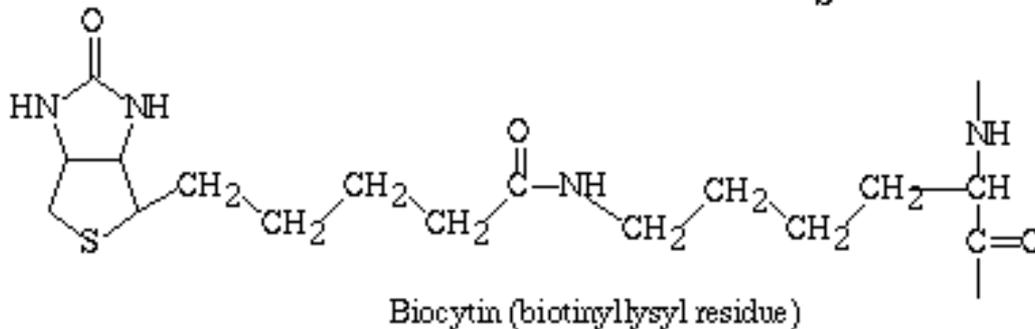
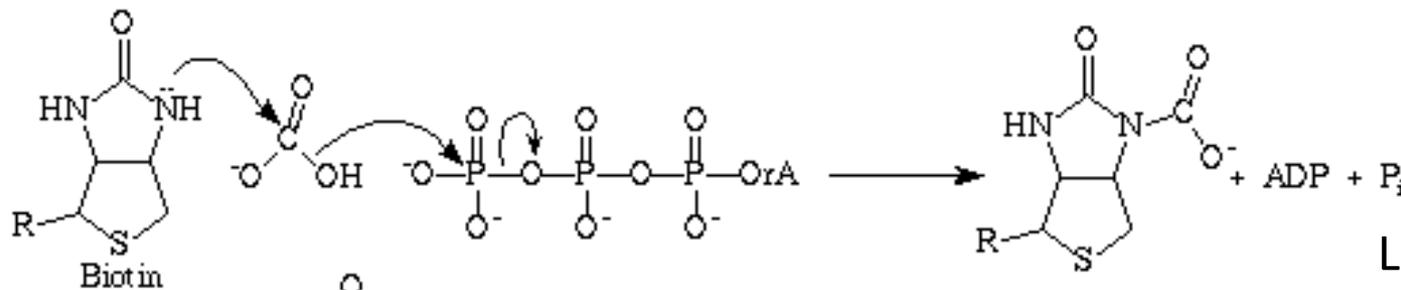
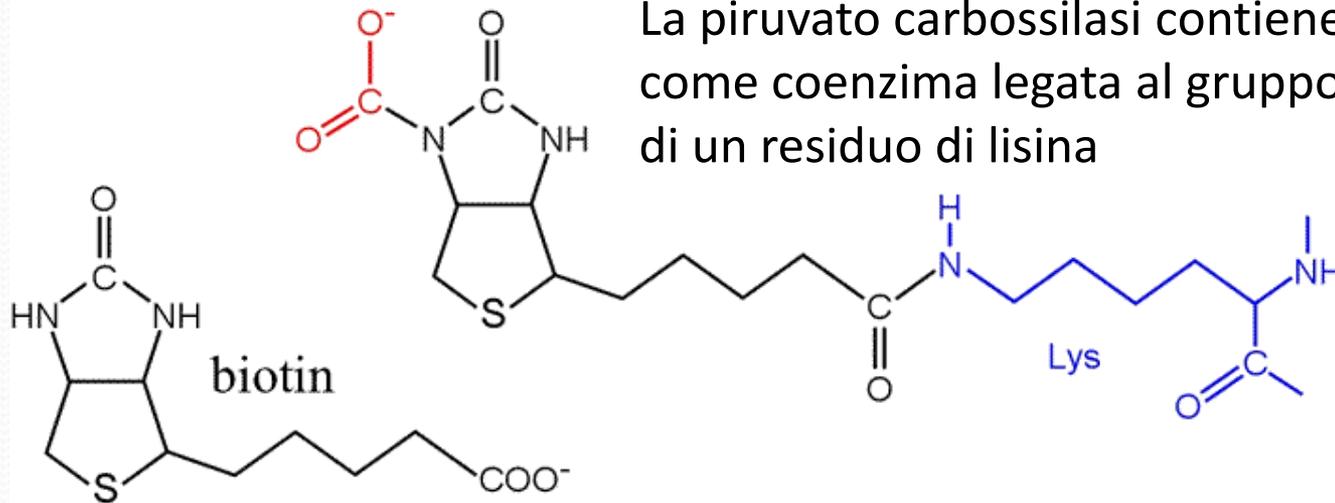
L'enzima è attivo solo in presenza di Acetil CoA che segnala il fabbisogno di ossalacetato.

Se la carica energetica è bassa, l'ossalacetato entra nel ciclo dell'acido citrico. Se la carica energetica è elevata, l'ossalacetato viene convertito in glucosio.

La piruvato carbossilasi è un enzima biotina dipendente. La carbossilazione della biotina richiede la presenza di acetil-CoA come attivatore allosterico

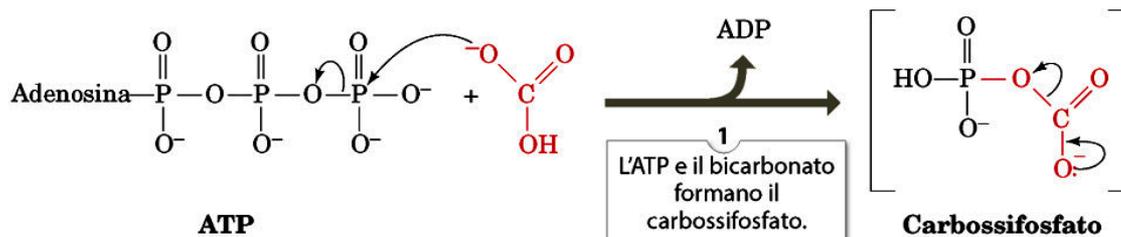
Piruvato carbossilasi

La piruvato carbossilasi contiene biotina come coenzima legata al gruppo ϵ -amminico di un residuo di lisina

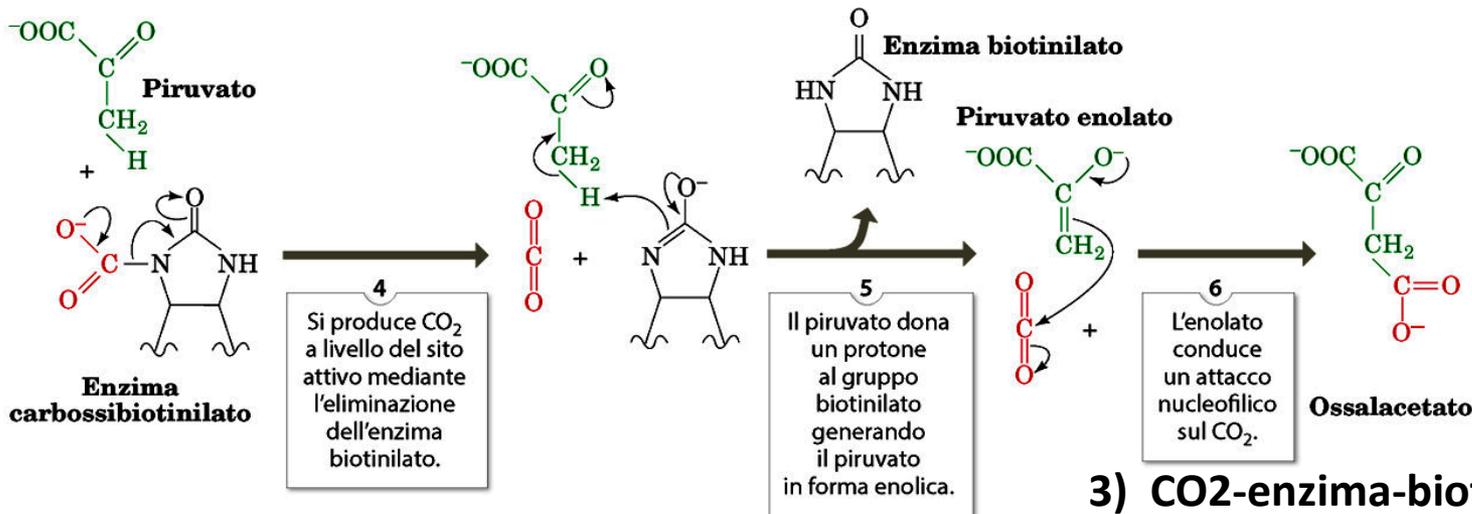
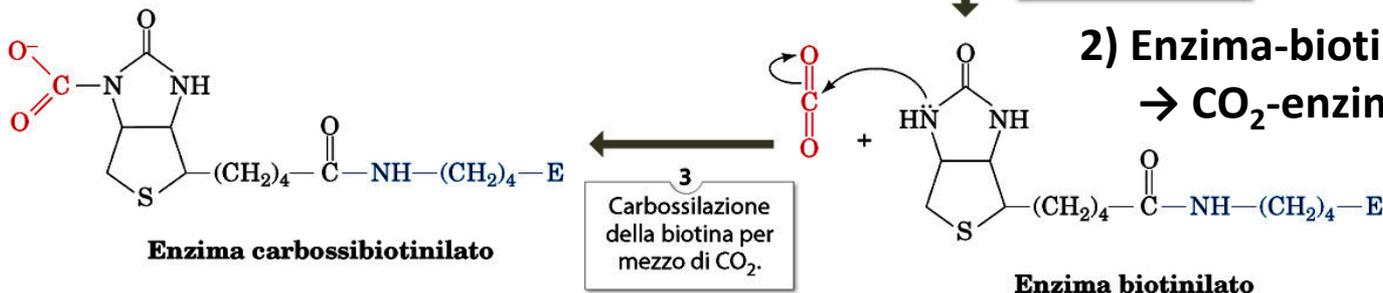
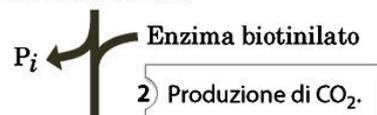


La biotina viene carbossilata a spese dell'ATP attraverso la formazione di un intermedio carbossifosfato

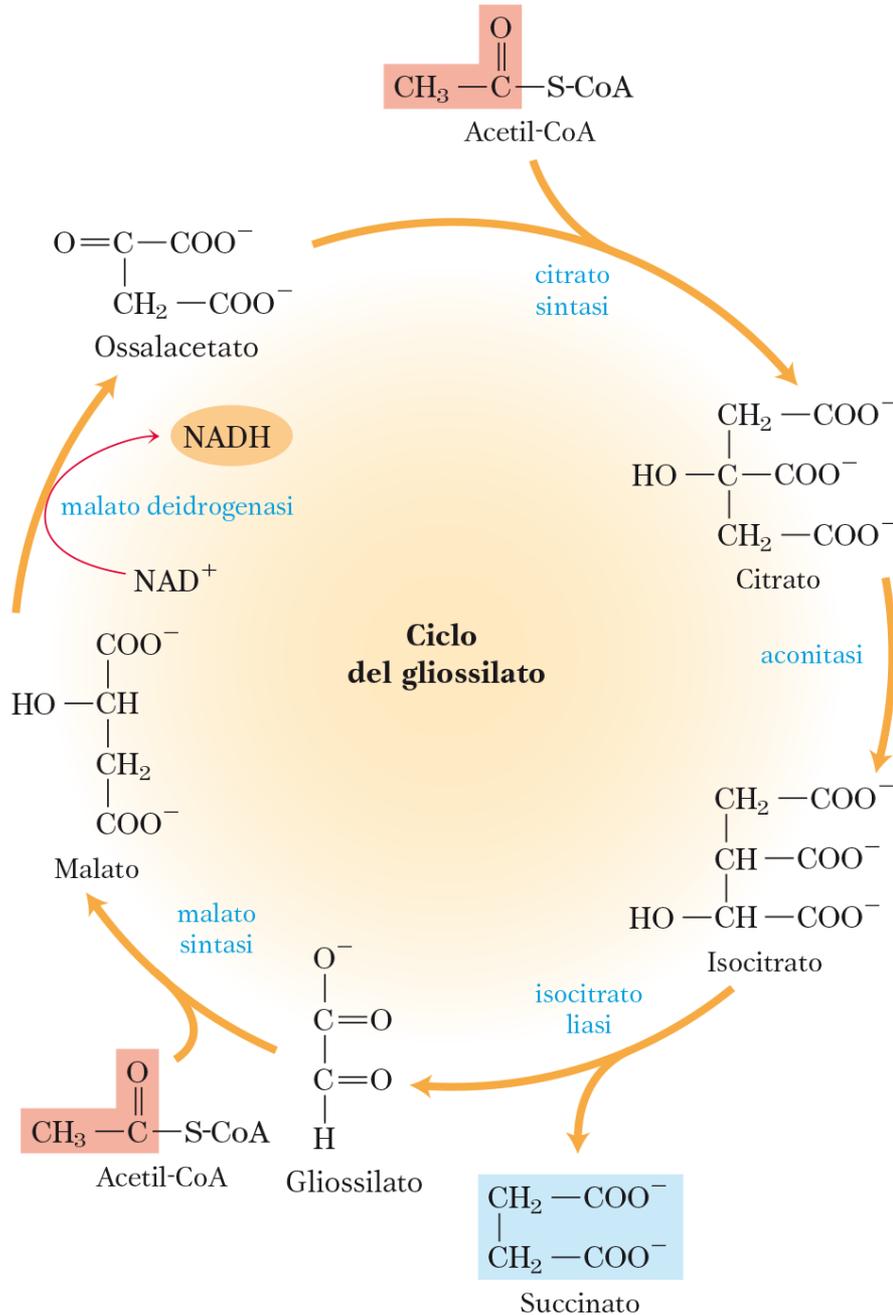
Piruvato carbossilasi



La carbossilazione del piruvato si svolge in tre stadi:



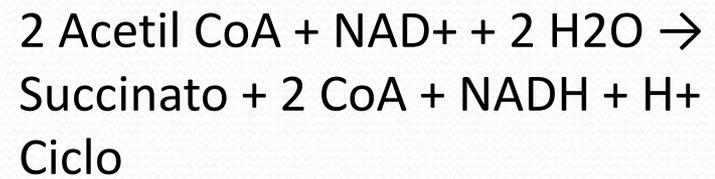
Il ciclo del glicosilato



Nel ciclo del glicosilato non sono presenti le tappe di decarbossilazione tipiche del ciclo di Krebs. Le reazioni sono infatti le stesse ad eccezione di quelle catalizzate dall'isocitrato liasi e dalla malato sintasi:

L'isocitrato viene scisso in succinato e glicosilato. Le reazioni successive rigenerano ossalacetato dal glicosilato.

La reazione complessiva del ciclo del glicosilato è:



Decarbossilazioni biologiche

Le reazioni di decarbossilazione sono essenziali durante il metabolismo ossidativo perché permettono di liberare gli atomi di carbonio quando hanno raggiunto il massimo grado di ossidazione (+4) come CO_2

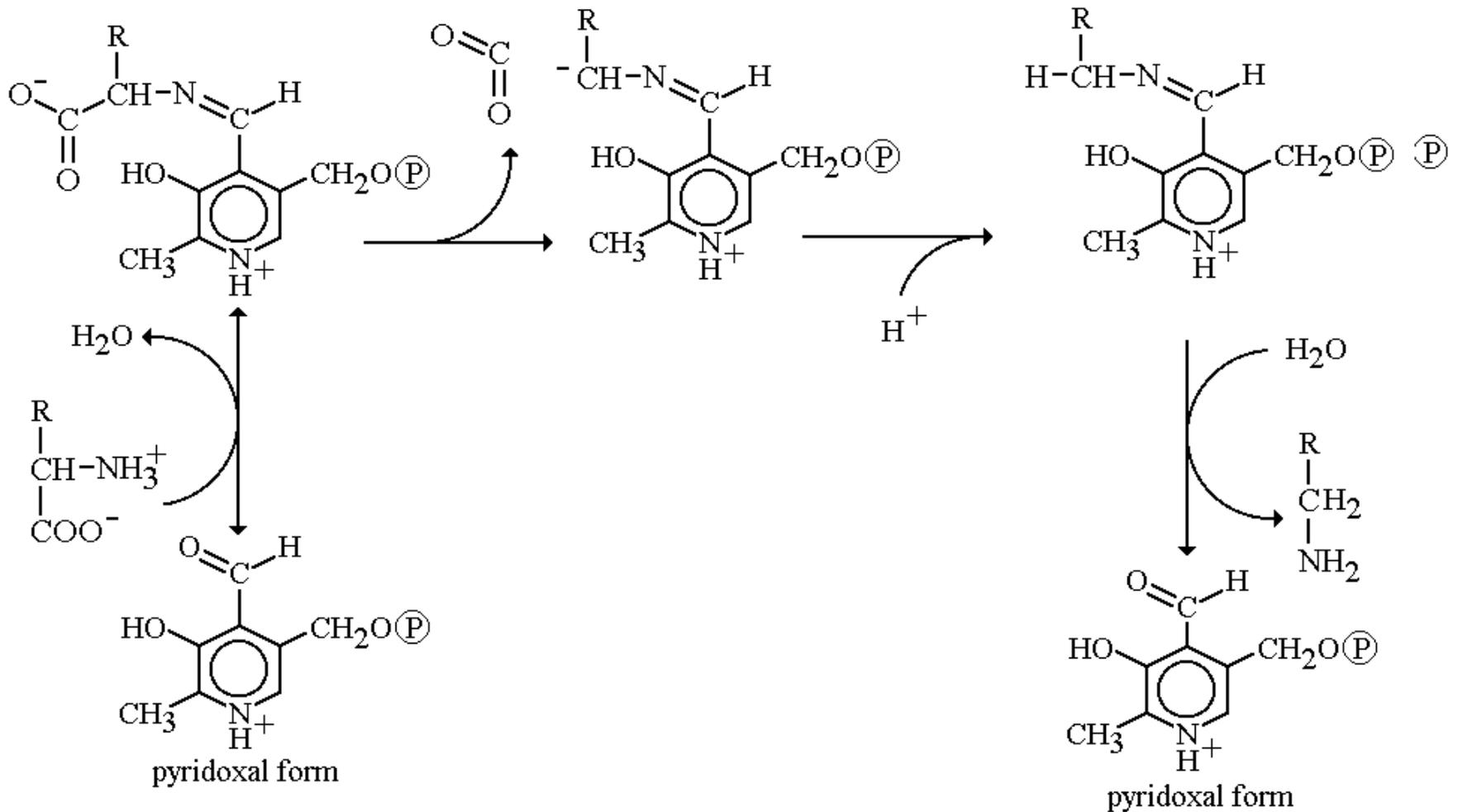
Decarbossilazione beta-chetoacidi

Decarbossilazione alfa-chetoacidi
ossidative e non ossidative

Decarbossilazione aminoacidi

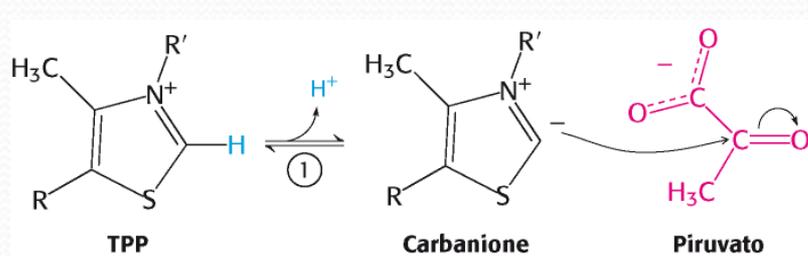
Decarbossilazione aminoacidi

Le reazioni degli aminoacidi sono catalizzate da enzimi che contengono una molecola di piridossalfosfato (PLP) come gruppo prostetico



Decarbossilazione alfa-chetoacidi

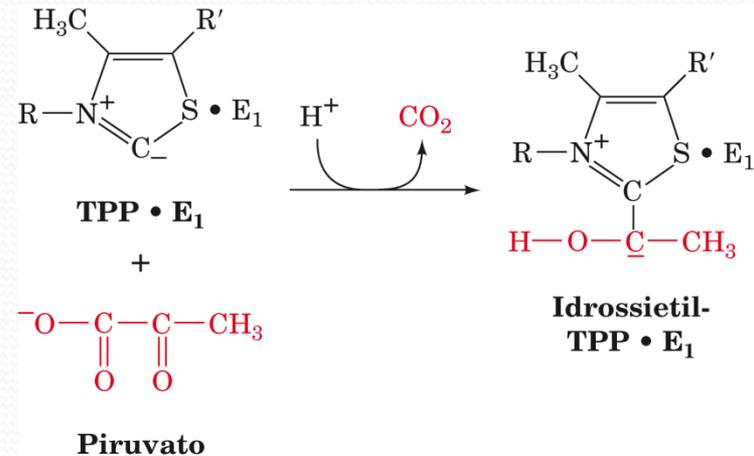
Le reazioni di decarbossilazione degli alfa-chetoacidi sono catalizzate da enzimi che contengono una molecola di tiamina pirofosfato (TPP) come gruppo prostetico



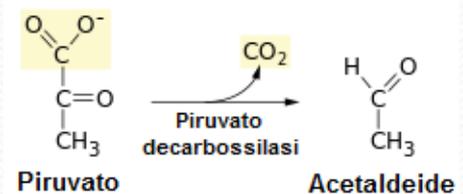
Il carbanione sulla molecola di tiamina pirofosfato (TPP) è stabilizzato per risonanza grazie all'atomo di azoto adiacente

La seconda parte della reazione dipende dal tipo di decarbossilazione:

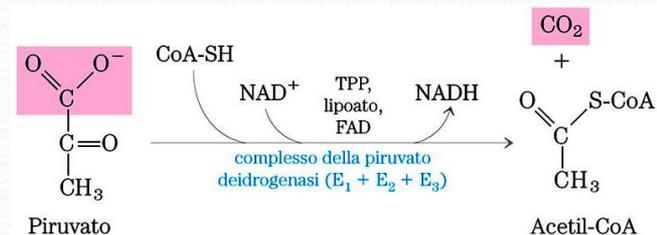
- non ossidativa
- ossidativa



Non ossidativa

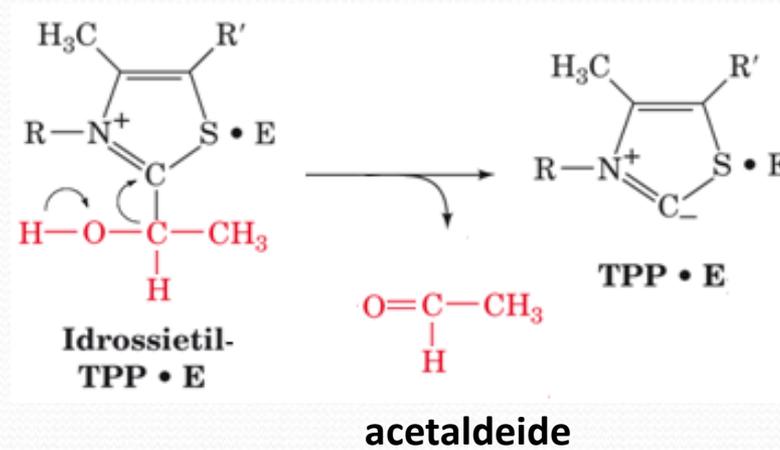
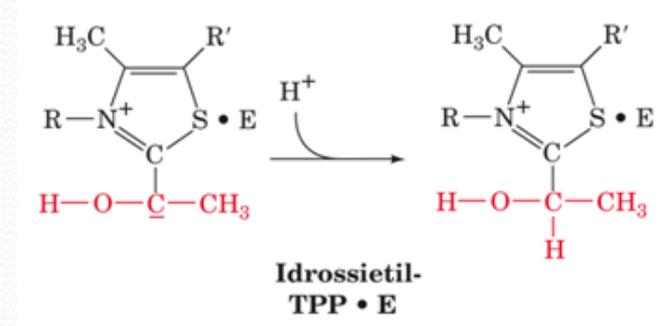
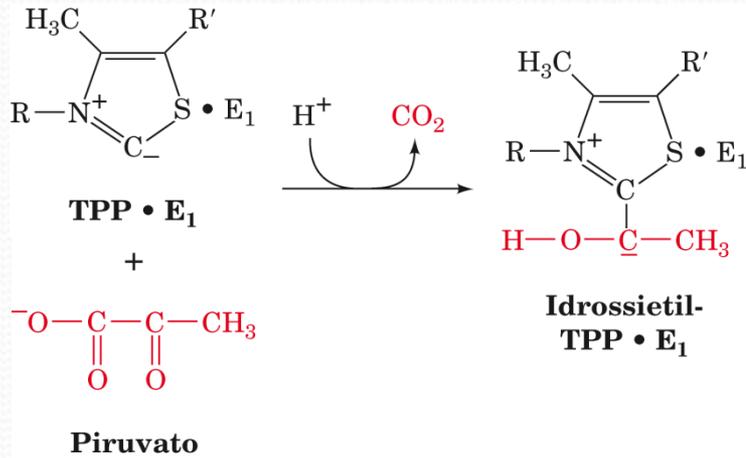


ossidativa



Decarbossilazione alfa-chetoacidi

Decarbossilazione non ossidativa



Decarbossilazione alfa-chetoacidi

Decarbossilazione ossidativa

