

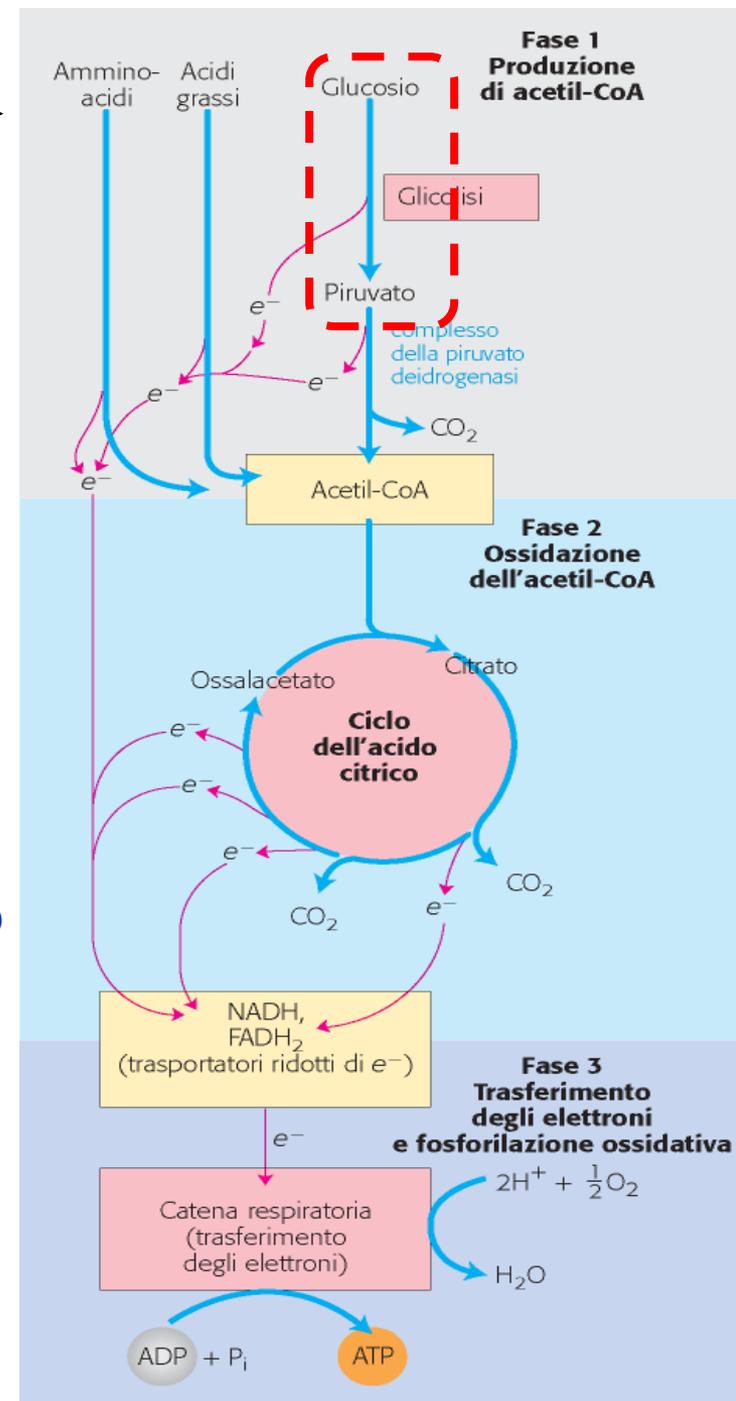
Fasi della respirazione cellulare →

Metabolismo degradativo nelle cellule aerobiche

- cellule eucariotiche
- batteri

✓ Ossidazione completa dei nutrienti a CO_2 ed H_2O

✓ Respirazione cellulare: consumo di O_2 e produzione di CO_2 da parte delle cellule



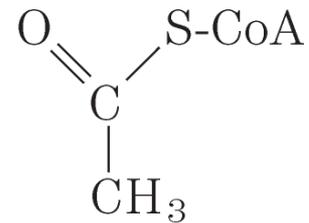
Metabolismo degradativo nelle cellule aerobiche

punti di ingresso nel Ciclo di Krebs

• zuccheri ➔ acetil-CoA

• acidi grassi ➔ acetil-CoA

• aminoacidi ➔ acetil-CoA o altri intermedi del ciclo di Krebs



Acetil-CoA

sede del Ciclo di Krebs

• Eucarioti: matrice mitocondriale

• Batteri: citosol

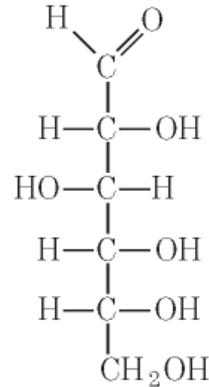
IL CICLO DELL'ACIDO CITRICO

- **Ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici**
- **Punto di convergenza di tutte le vie metaboliche degradative**
- **Punto di partenza di diverse vie anaboliche**
- **Seconda fase della respirazione cellulare: lo scheletro carbonioso di zuccheri, acidi grassi ed aminoacidi entra nel ciclo per essere completamente ossidato a CO₂**
- **Produzione di energia (ATP/GTP) e di coenzimi ridotti**

ingresso del glucosio nel ciclo di Krebs

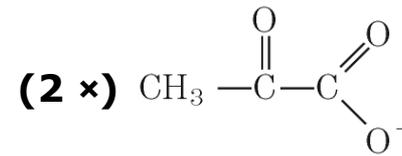
I fase
respirazione
cellulare

citosol



glucosio

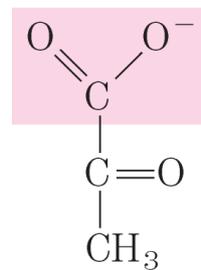
glicolisi



piruvato

Decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil-CoA

matrice
mitocondriale



Piruvato

CoA-SH

NAD⁺

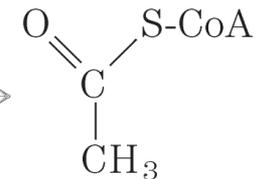
TPP,
lipoato,
FAD

NADH

complesso della piruvato
deidrogenasi (E₁ + E₂ + E₃)

CO₂

+



Acetil-CoA

- perdita del gruppo carbossilico come CO₂
- ossidazione ad estere sotto forma di acetil-CoA
- processo che avviene nella matrice mitocondriale

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

Complesso della piruvato deidrogenasi

E' situato all'interno della membrana mitocondriale interna

E' composto da

3 enzimi

- E₁ = piruvato deidrogenasi
- E₂ = diidrolipoil transacetilasi
- E₃ = diidrolipoil deidrogenasi

5 cofattori

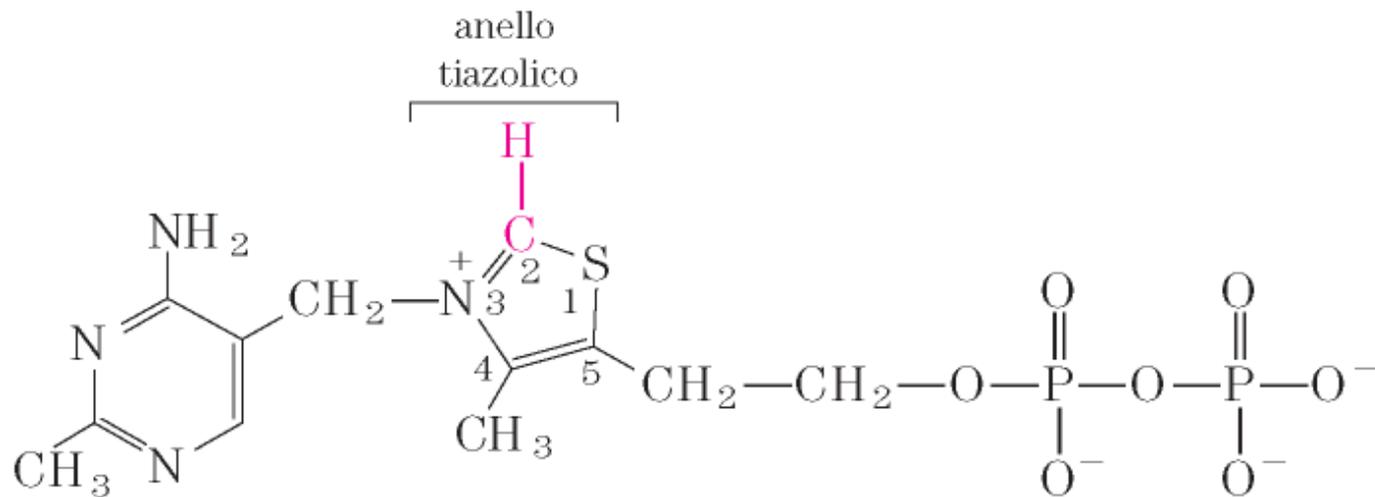
- tiamina pirofosfato (TPP)
- lipoato
- flavin adenindinucleotide (FAD)
- Coenzima A (CoA)
- nicotinamide adenindinucleotide (NAD)

Derivanti da vitamine

- tiamina pirofosfato (TPP)
- flavin adenindinucleotide (FAD)
- Coenzima A (CoA)
- nicotinamide adenindinucleotide (NAD)

- tiamina
- riboflavina
- pantotenato
- niacina

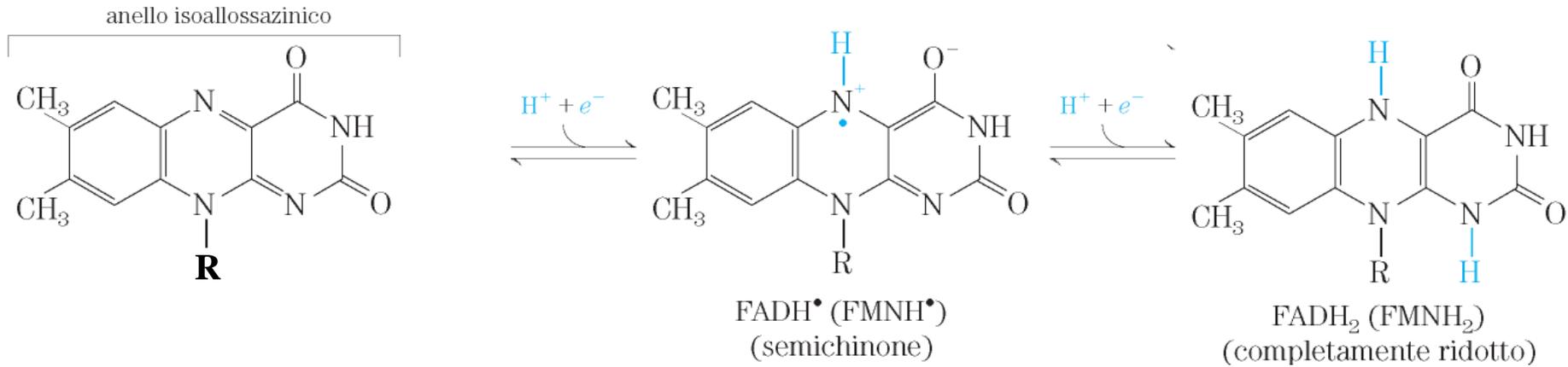
- **tiamina pirofosfato (TPP)**



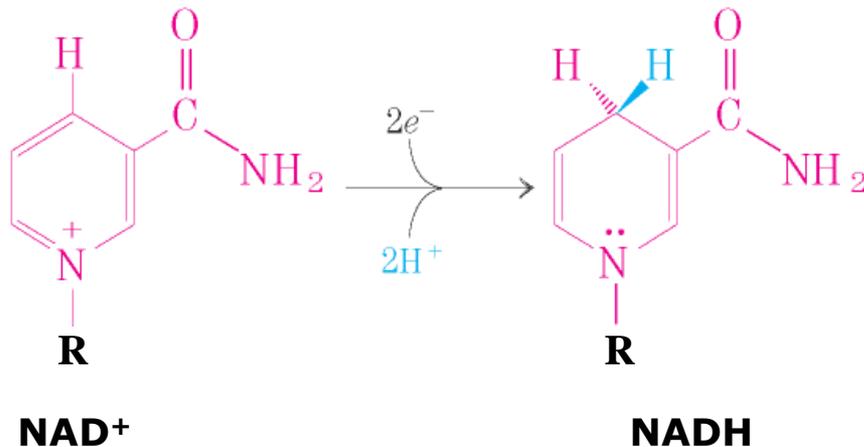
Tiamina pirofosfato (TPP)

coinvolto in reazioni di decarbossilazione: stabilizza carbanioni

• flavin adenindinucleotide (FAD)



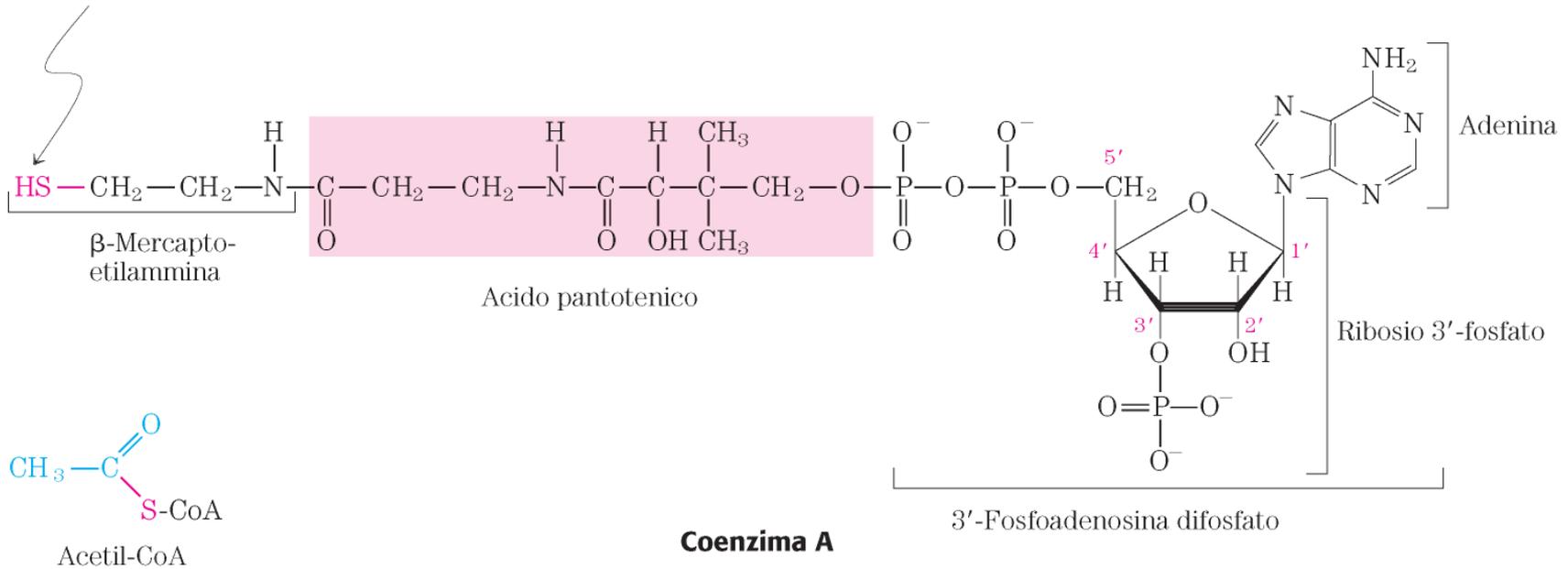
• nicotinamide adenindinucleotide (NAD)



trasportatori di elettroni

• Coenzima A (CoA)

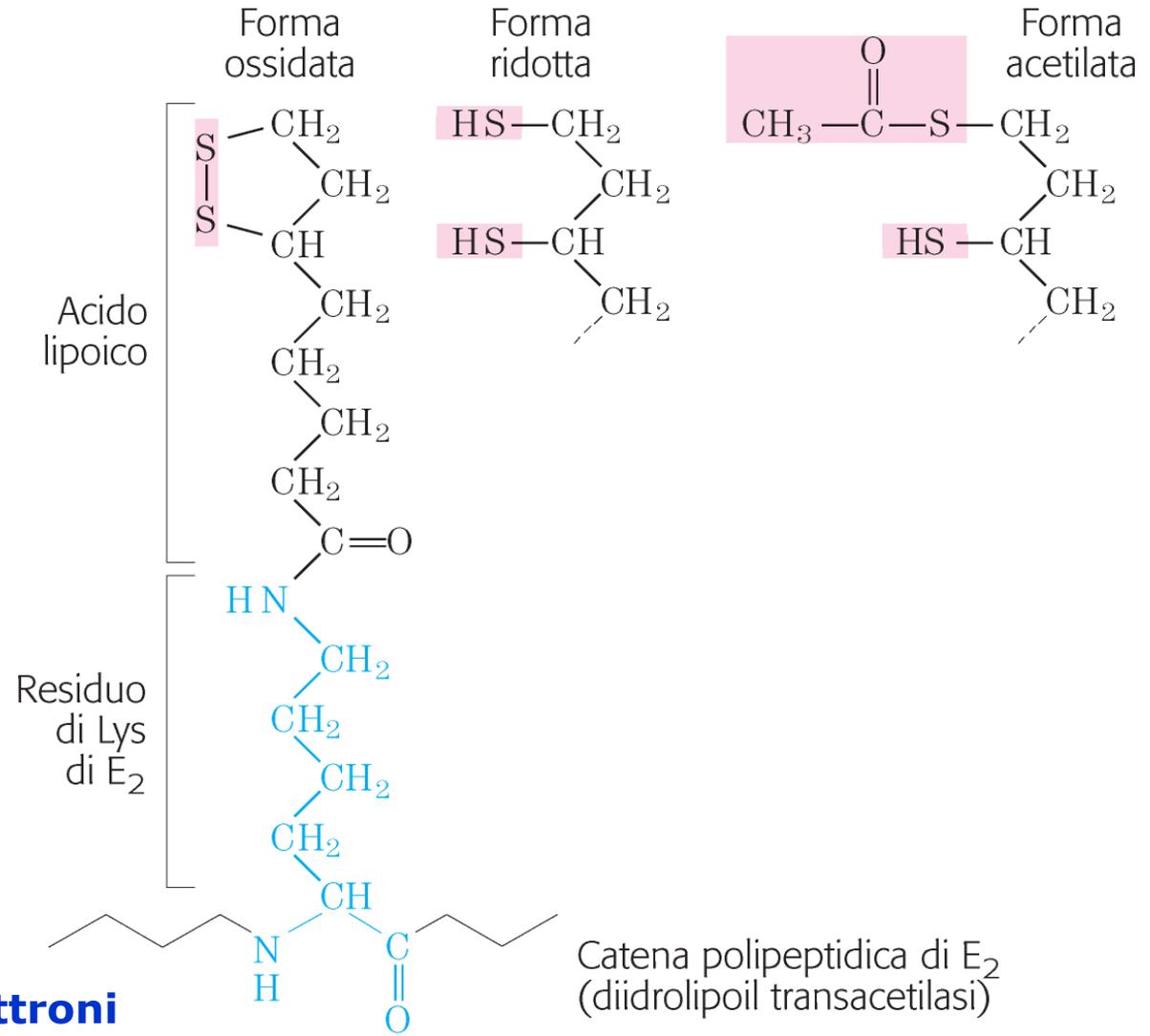
Gruppo tiolico reattivo



trasportatore di gruppi acilici sotto forma di TIOESTERE



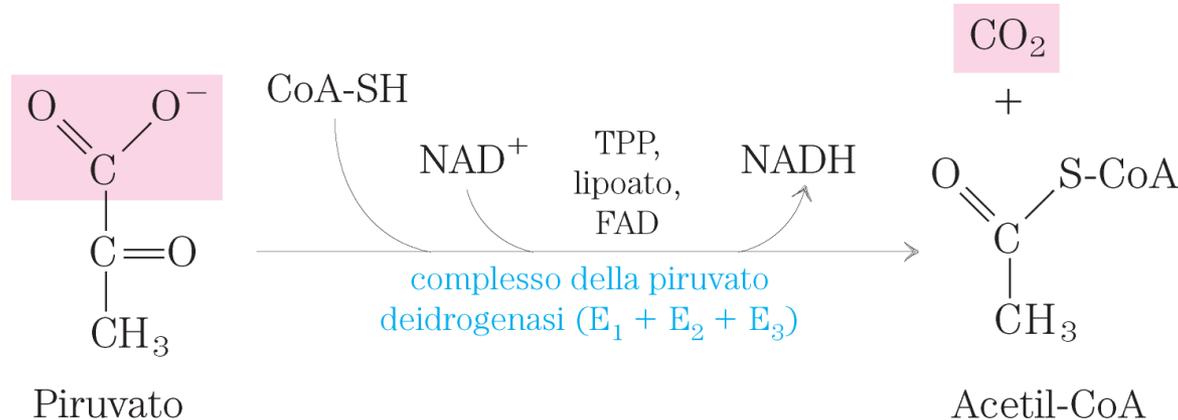
• lipoato



trasportatore di elettroni

trasportatore di gruppi acilici

Decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil-CoA

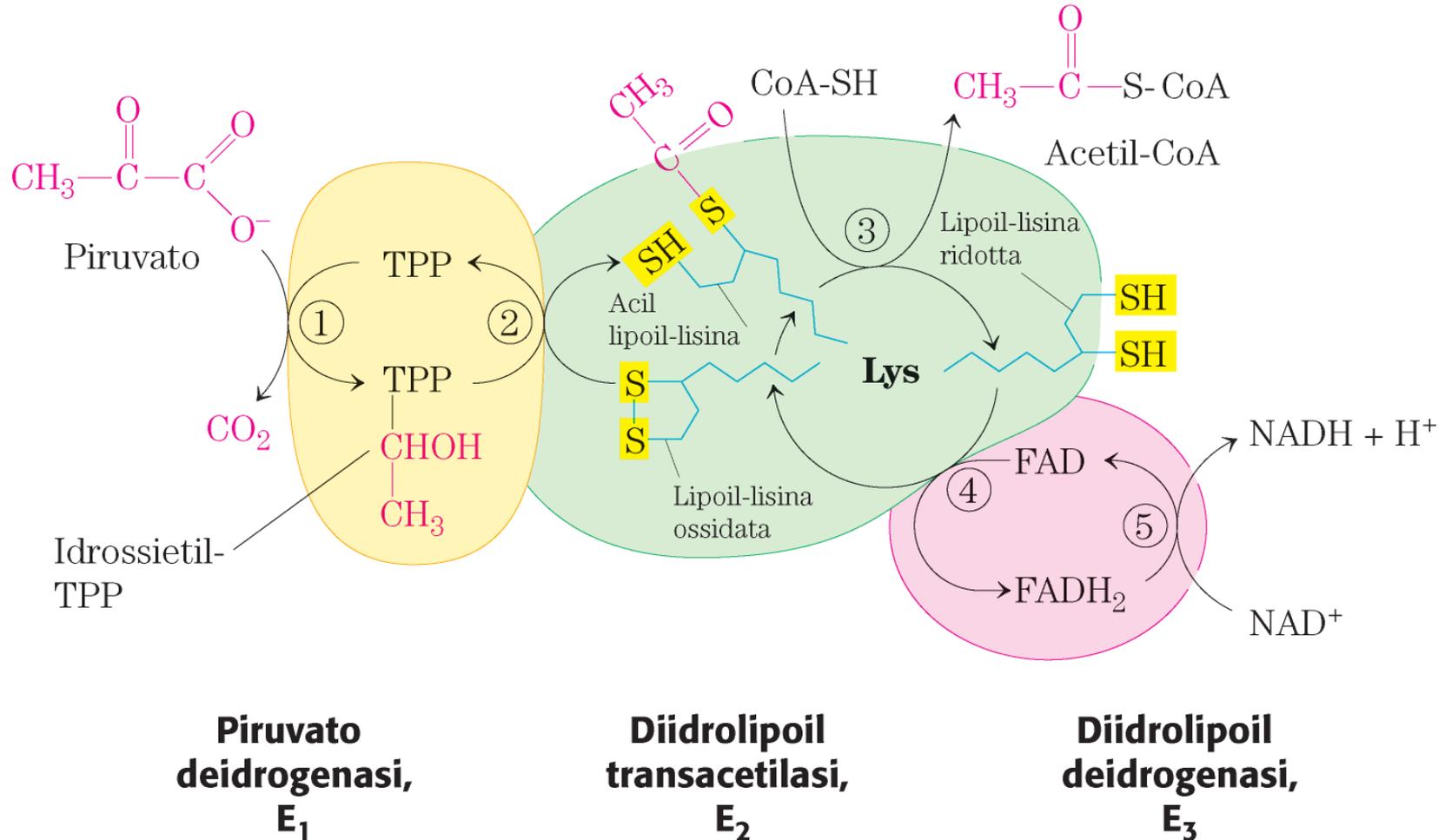


$$\Delta G'^{\circ} = -33,4 \text{ kJ/mole}$$

Procede in 5 fasi catalizzate in sequenza dagli enzimi E_1 , E_2 ed E_3

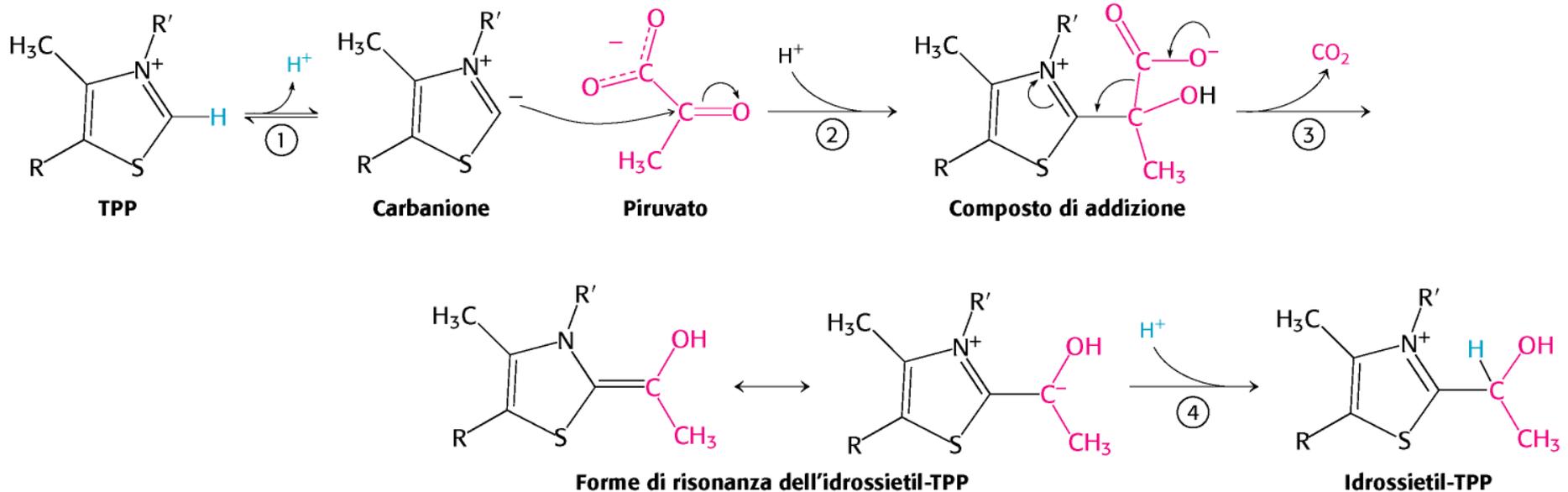
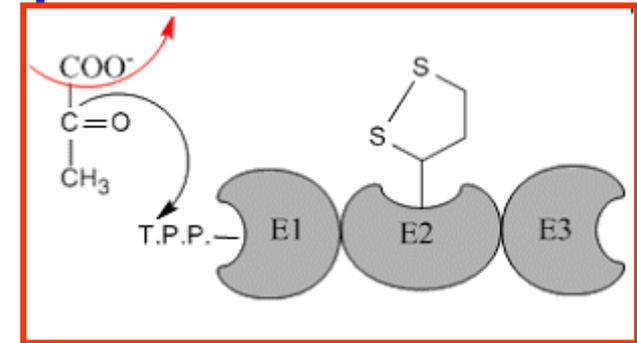
1. Decarbossilazione del piruvato
2. Ossidazione dell'idrossietilTPP
3. Formazione dell'acetil-CoA
4. Ossidazione del lipoato ridotto
5. Ossidazione del FADH_2

Decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil-CoA



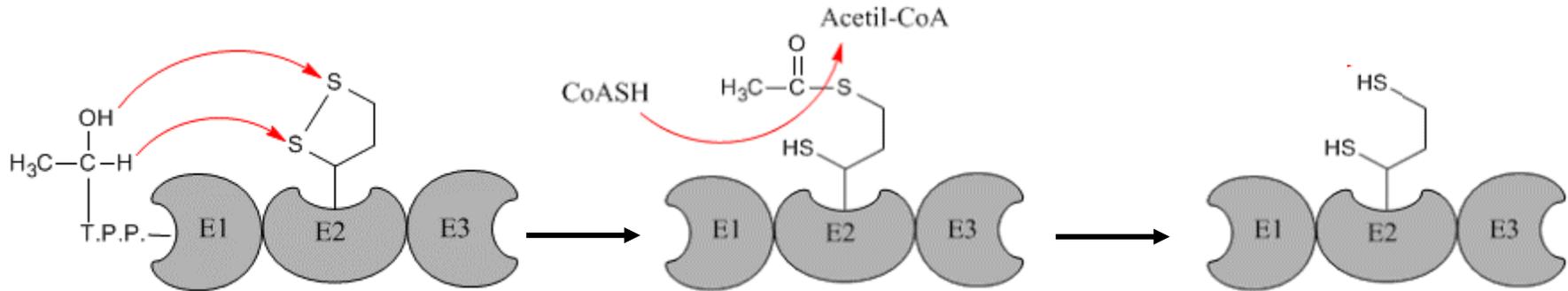
Incanalamento dei substrati: gli intermedi non si allontanano mai dal complesso enzimatico e tengono così alta la propria concentrazione locale e sottraggono il gruppo acetile all'azione di altri enzimi (complesso PDH nei mitocondri; nel citosol dei procarioti)

Primo enzima (E1): Decarbossilazione del piruvato mediata da TPP



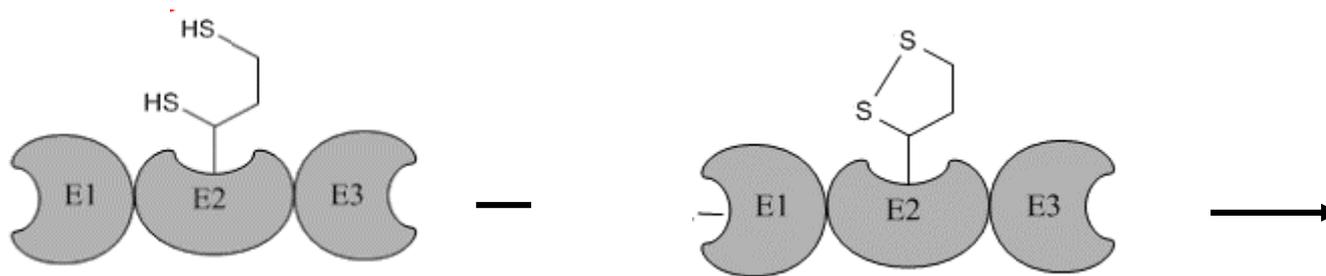
- **Procede con lo stesso meccanismo visto nella fermentazione alcolica in cui la decarbossilazione del piruvato è catalizzata dalla piruvato decarbossilasi che usa anch'essa TPP come coenzima**
- **L'idrossietil-TPP una volta formato viene portato al secondo enzima per ossidare l'idrossietile a tioestere**

Secondo enzima (E2): ossidazione dell'idrossietile a tioestere

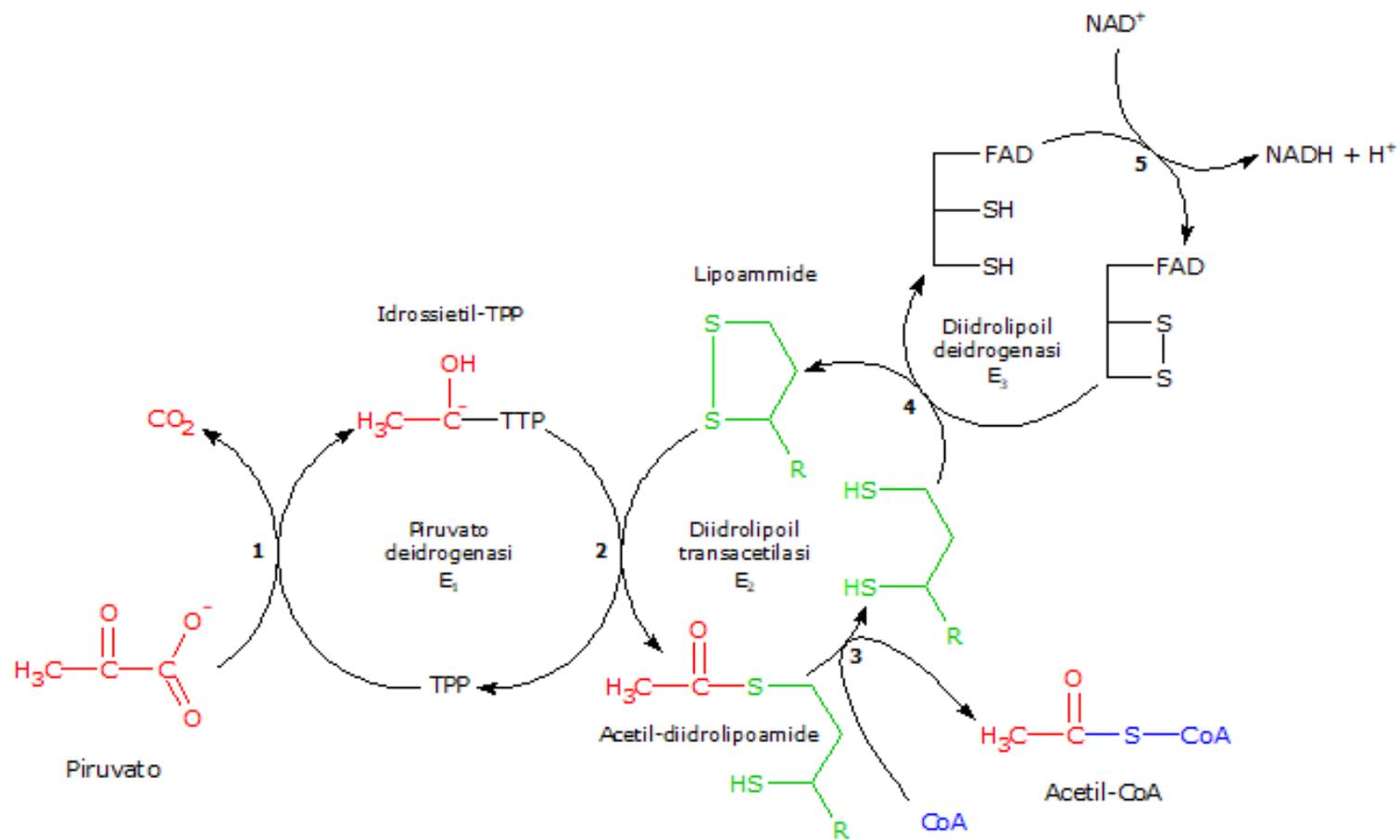


- **L'idrossietile viene ossidato a tioestere dal lipoato e poi da questo viene portato al coenzima A che lo lega per portarlo a sua volta fuori dall'enzima sotto forma di AcetilCoA**
- **Il lipoato ridotto si sposterà verso il terzo enzima per essere ri-ossidato a spese del FAD**

**Terzo enzima (E3): ossidazione del diidrolipoile a spese di FAD;
riossidazione di FADH₂ a spese di NAD⁺**



- L'idrossietile viene ossidato a tioestere dal lipoato e poi da questo viene portato al coenzima A che lo lega per portarlo a sua volta fuori dall'enzima sotto forma di AcetilCoA
- Il lipoato ridotto si sposterà verso il terzo enzima per essere ri-ossidato a spese del FAD



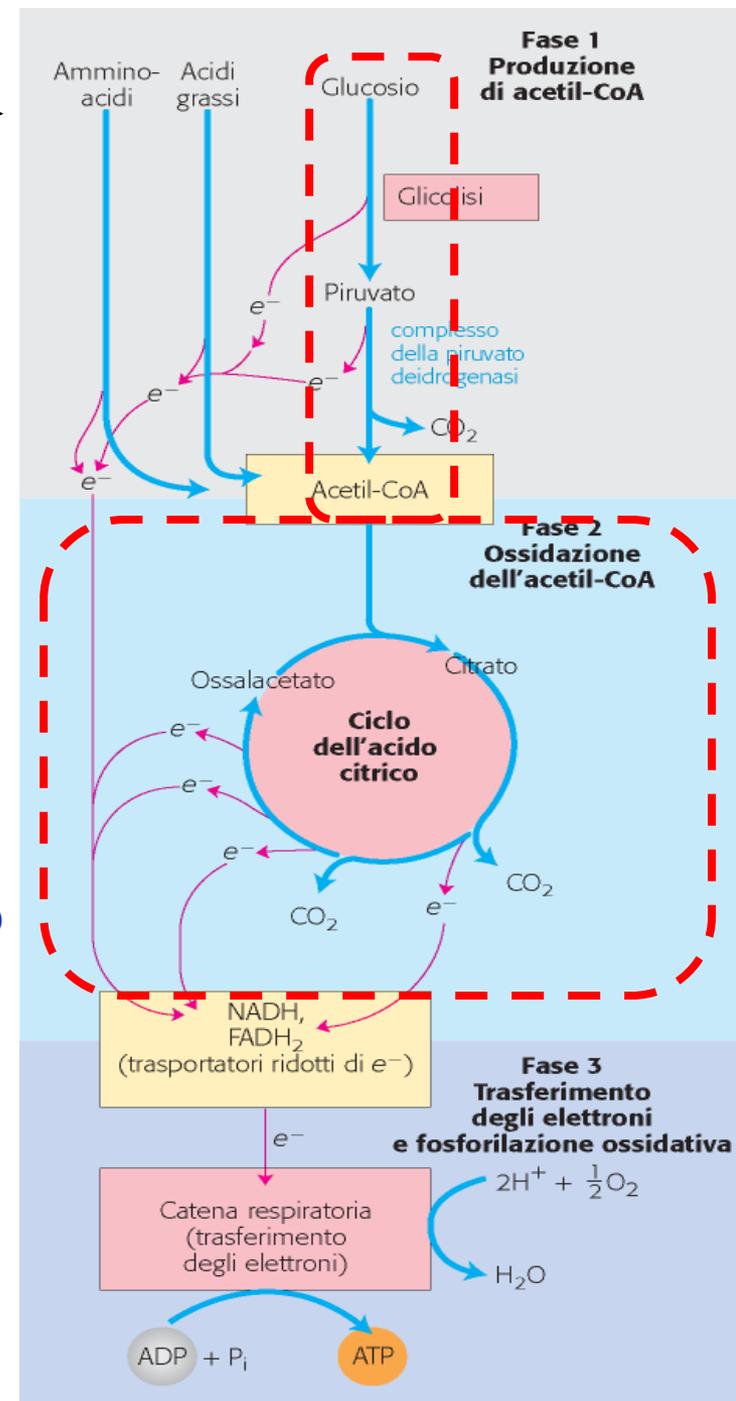
Fasi della respirazione cellulare →

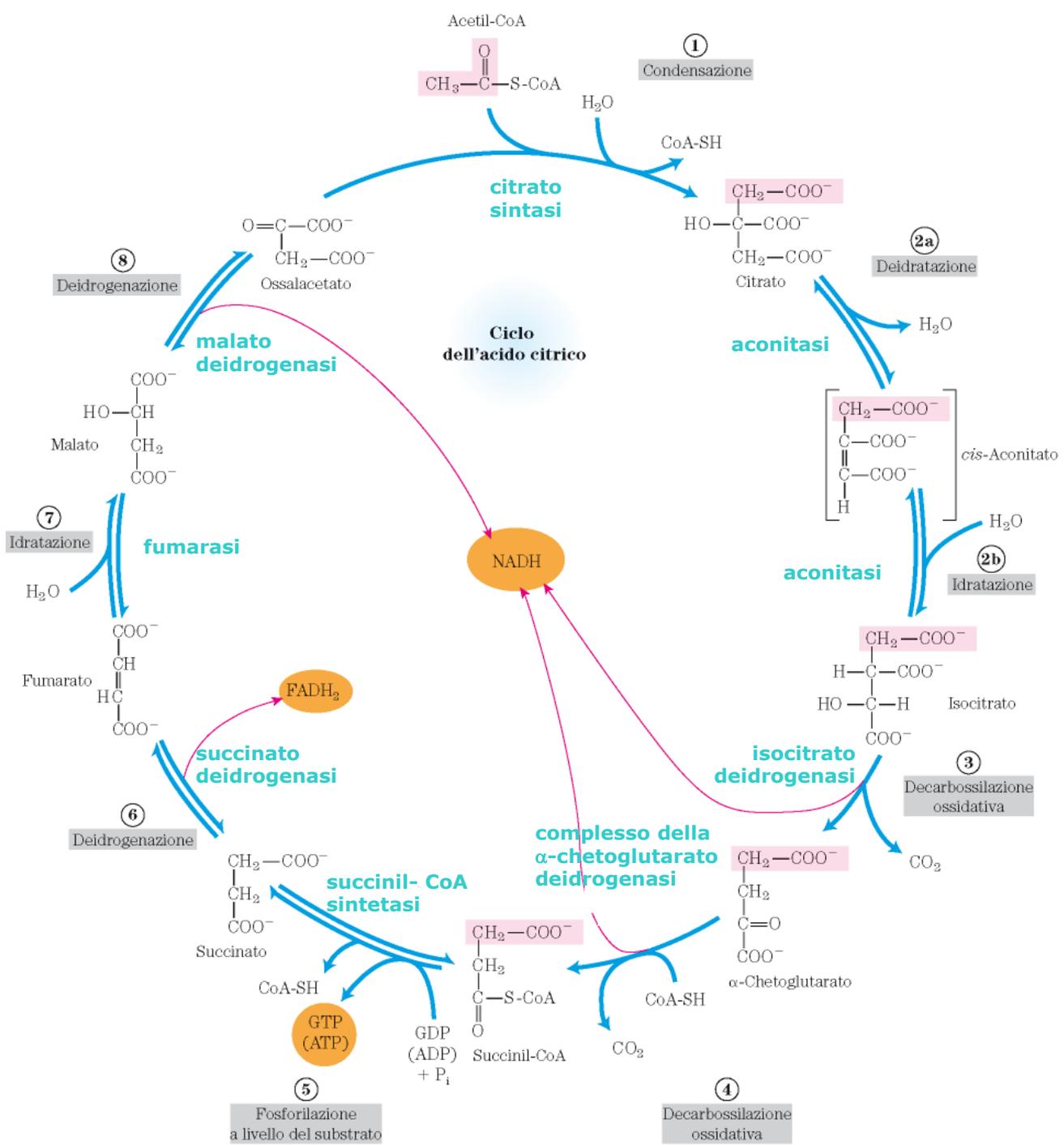
Metabolismo degradativo nelle cellule aerobiche

- cellule eucariotiche
- batteri

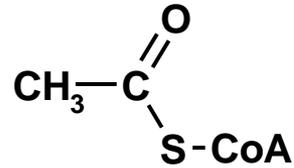
✓ Ossidazione completa dei nutrienti a CO_2 ed H_2O

✓ Respirazione cellulare: consumo di O_2 e produzione di CO_2 da parte delle cellule



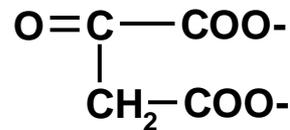


1) FORMAZIONE DEL CITRATO

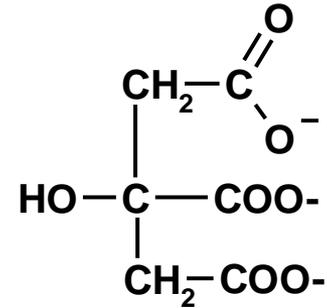
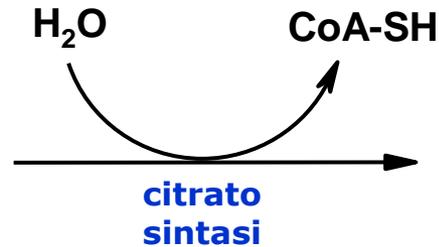


Acetil-CoA

+



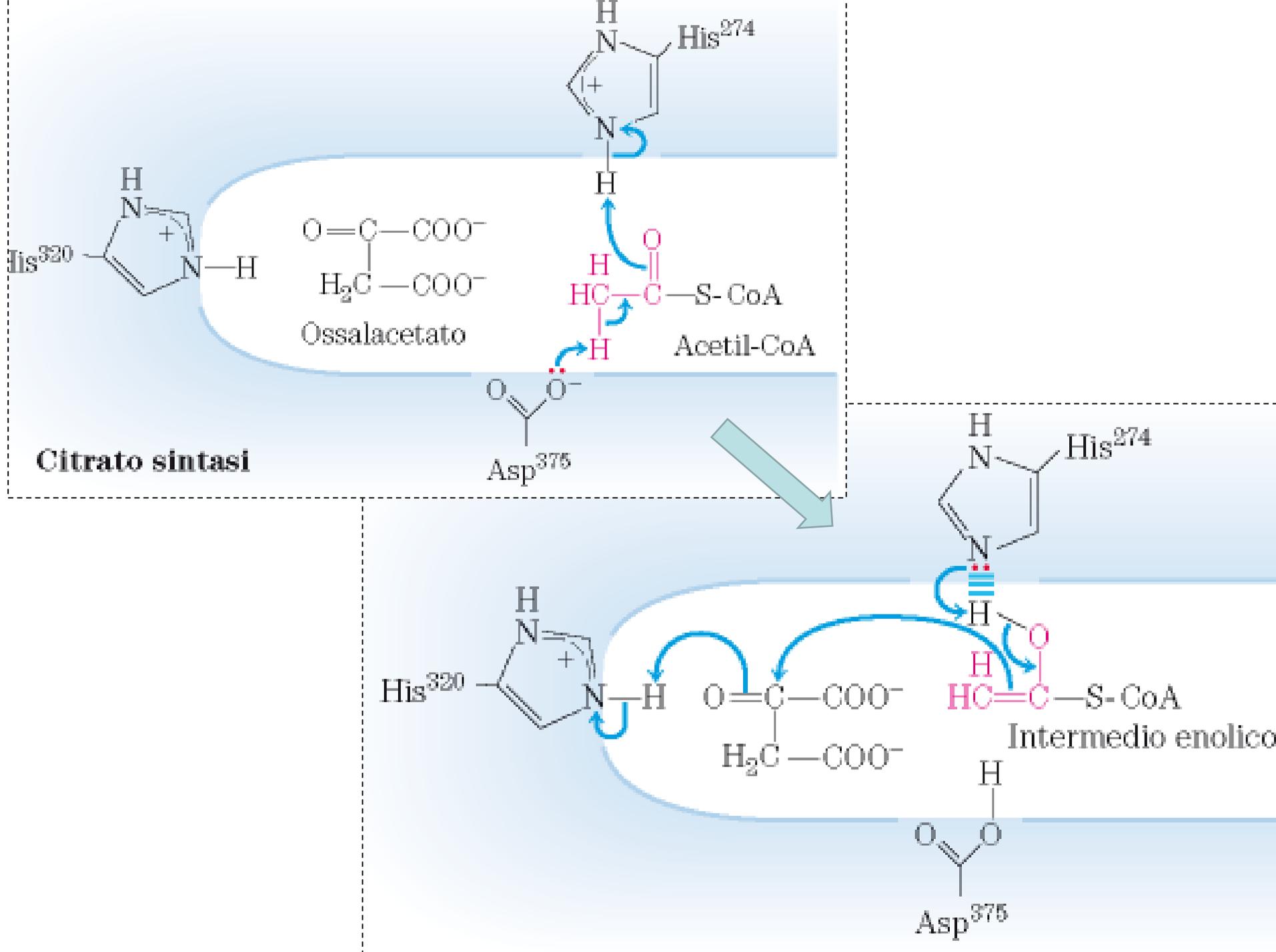
ossalacetato

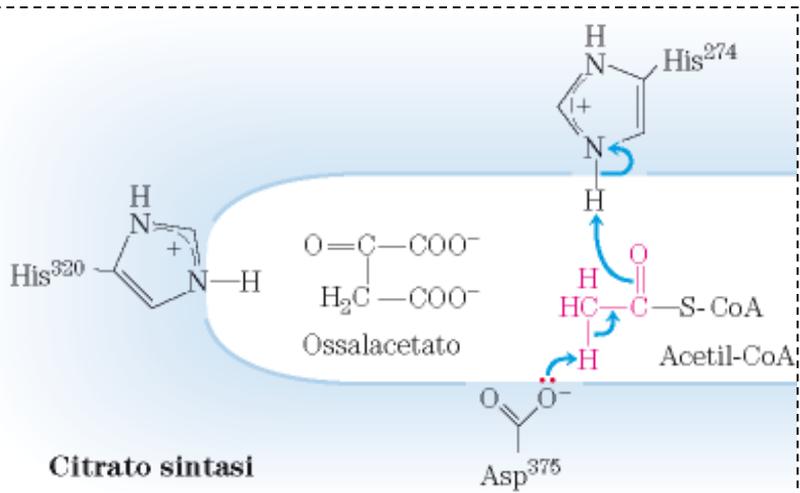


citrato

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

- reazione di condensazione
- sito di **regolazione** del ciclo di Krebs
- citril-CoA intermedio transitorio che si idrolizza nel sito attivo
- reazione **irreversibile** nelle condizioni intracellulari

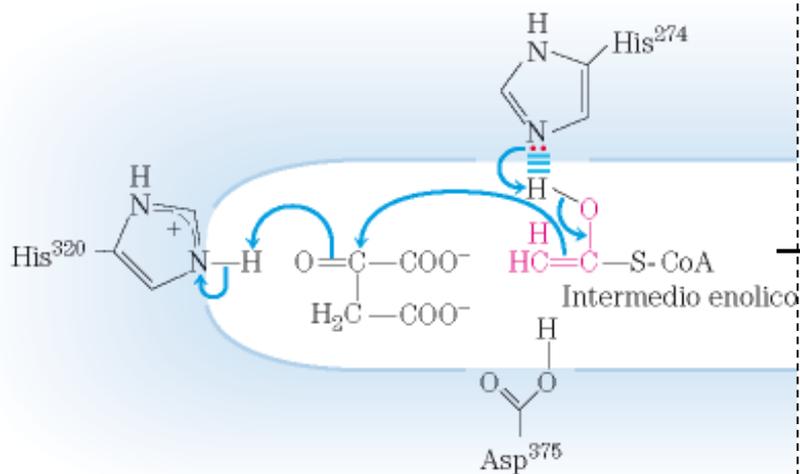




Citrato sintasi

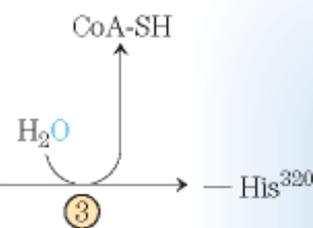
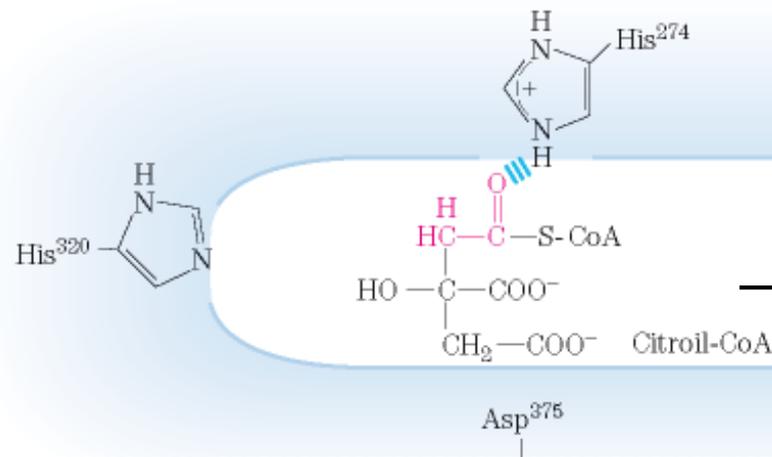
Il legame tioestere dell'acetil-CoA attiva gli idrogeni metilici e l'Asp³⁷⁵ estrae un protone dal gruppo metilico formando un intermedio enolato. L'intermedio è stabilizzato da un legame idrogeno e/o dalla protonazione dall'His²⁷⁴ (viene mostrata la protonazione completa)

①

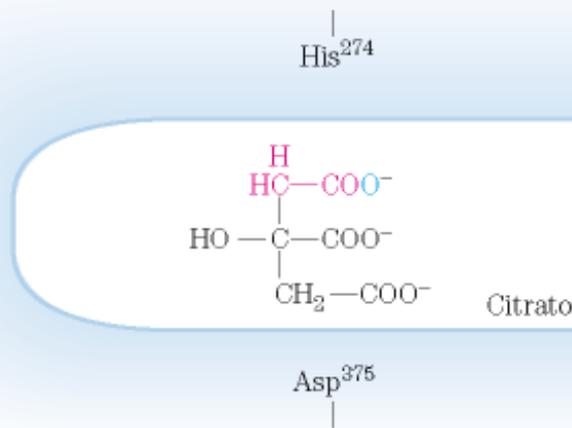


L'enol(at)o si riarrangia per attaccare l'atomo di carbonio del gruppo carbonilico dell'ossalacetato, con l'His²⁷⁴ posizionata in modo tale da estrarre il protone che aveva precedentemente ceduto. L'His³²⁰ si comporta come un acido semplice. La condensazione genera citroil-CoA

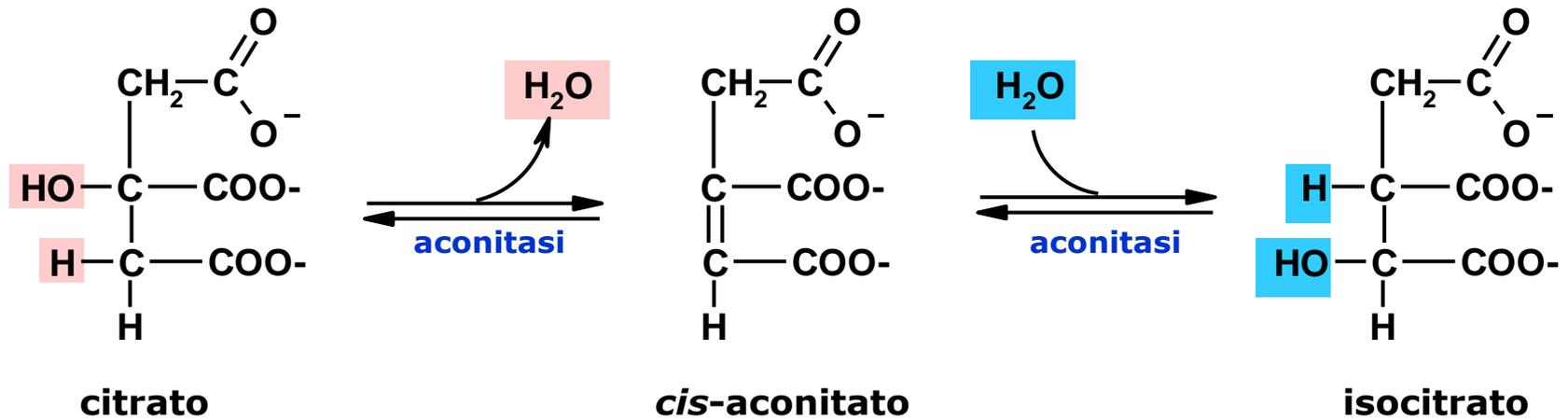
②



Il tioestere viene successivamente idrolizzato, rigenerando CoA-SH e liberando citrato



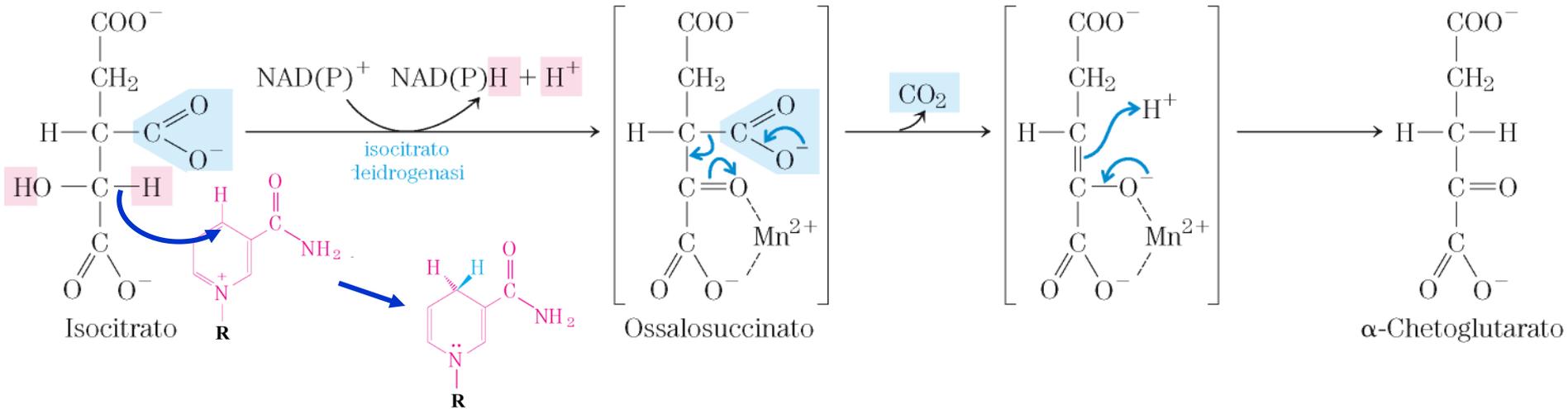
2) FORMAZIONE DELL'ISOCITRATO ATTRAVERSO IL *cis*-ACONITATO



$$\Delta G'^{\circ} = -13,3 \text{ kJ/mol}$$

- reazione di isomerizzazione
- *cis*-aconitato intermedio legato all'enzima nel sito attivo
- reazione reversibile nelle condizioni intracellulari

3) OSSIDAZIONE DELL'ISOCITRATO AD α -CHETOGLUTARATO E CO_2



$$\Delta G'^{\circ} = -20,9 \text{ kJ/mol}$$

①

L'isocitrato viene ossidato dal trasferimento di uno ione idruro al NAD^+ o al NADP^+ (a seconda della forma isozimatica)

②

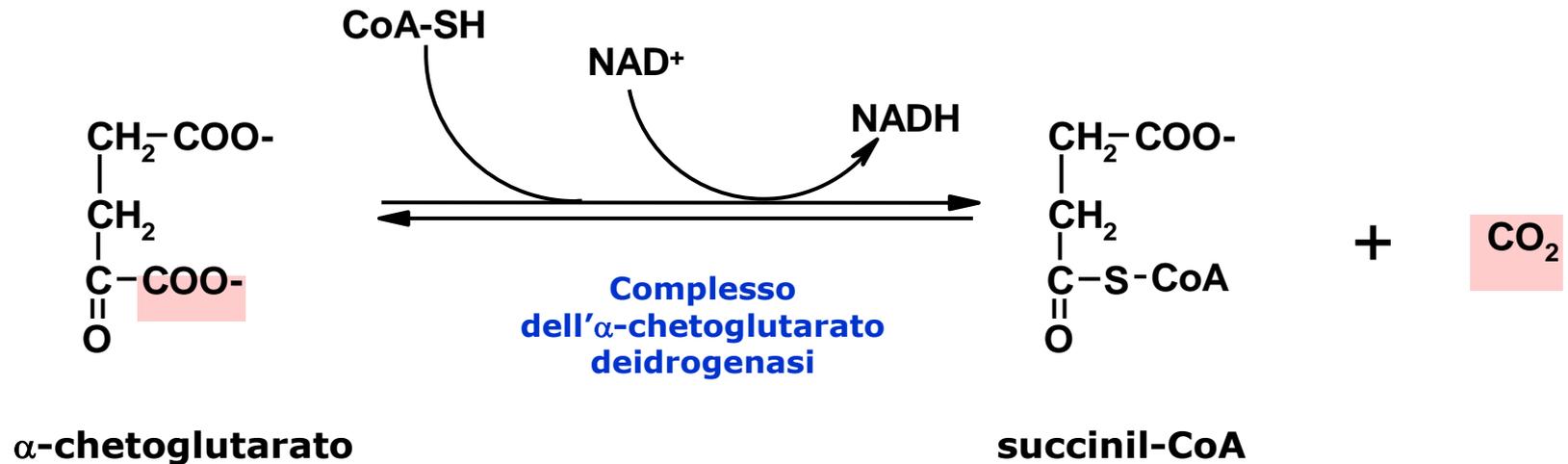
La decarbossilazione viene favorita dalla sottrazione di un elettrone da parte dello ione Mn^{2+} legato

③

Il riarrangiamento dell'intermedio enolico genera l' α -chetoglutarato

- reazione di decarbossilazione ossidativa
- sito di **regolazione** del ciclo
- immagazzinamento di energia sotto forma di **NADH**
- reazione **irreversibile** nelle condizioni intracellulari

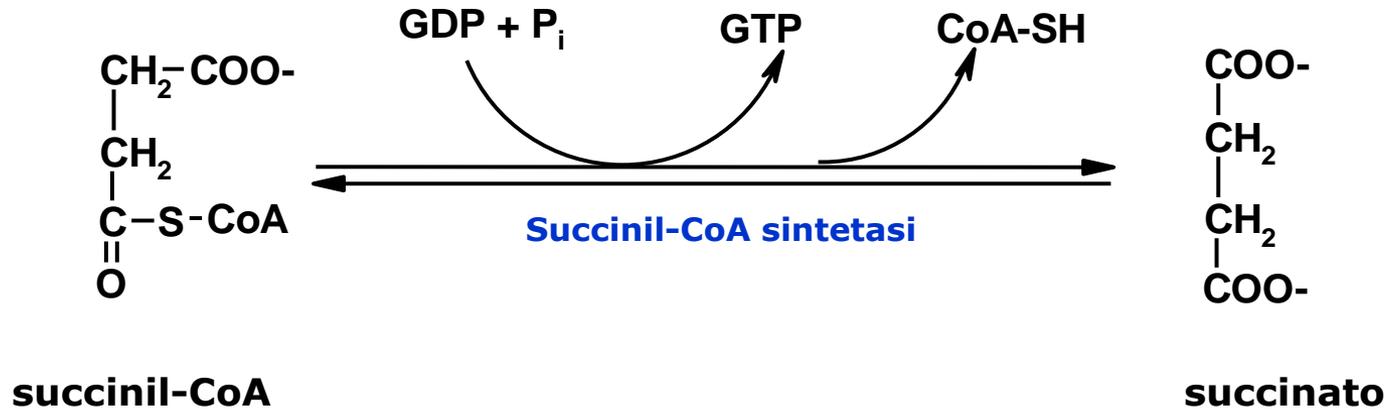
4) OSSIDAZIONE DELL' α -CHETOGLUTARATO A SUCCINIL-CoA E CO₂



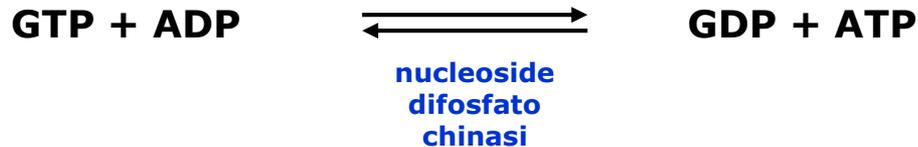
$$\Delta G'^{\circ} = -33,5 \text{ kJ/mol}$$

- reazione di decarbossilazione ossidativa
- immagazzinamento di energia sotto forma di composto tioestereo e NADH
- sito di **regolazione** del ciclo
- complesso α -chetoglutarato deidrogenasi analogo a quello della piruvato deidrogenasi
- reazione **irreversibile** nelle condizioni cellulari

5) CONVERSIONE DEL SUCCINIL-CoA A SUCCINATO



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



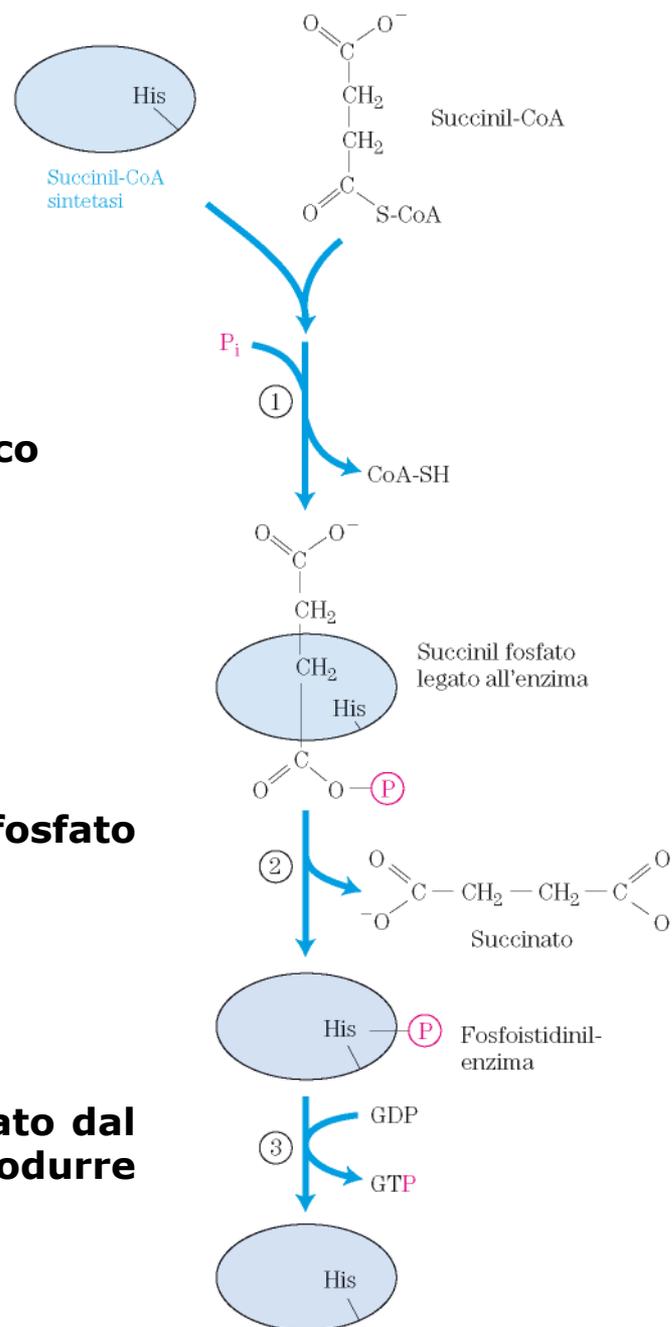
- fosforilazione a livello del substrato
- produzione di energia sotto forma di GTP
- reazione reversibile nelle condizioni intracellulari

5) CONVERSIONE DEL SUCCINIL-CoA A SUCCINATO

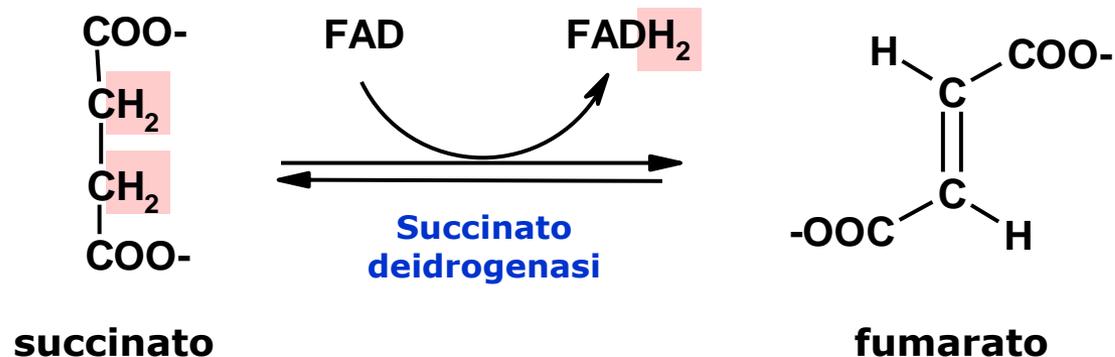
1. Sostituzione del CoA da parte del gruppo fosforico e formazione del succinilfosfato

2. Formazione del fosfoistidil-enzima: il succinil fosfato dona il gruppo fosforico ad un residuo di His

3. Si libera il succinato ed il gruppo fosforico attivato dal legame con His può essere trasferito al GDP per produrre GTP



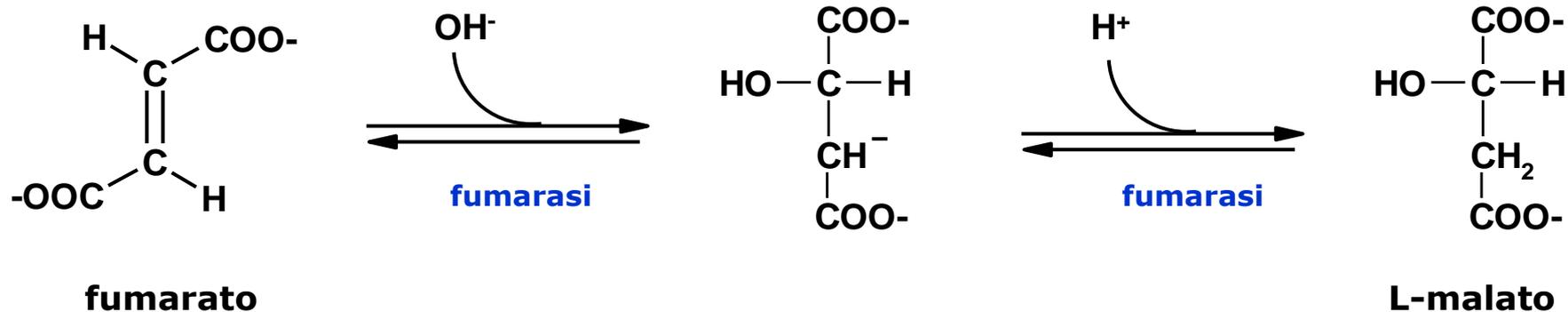
6) OSSIDAZIONE DEL SUCCINATO A FUMARATO



$$\Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

- ossidazione da parte della succinato deidrogenasi, unico enzima del ciclo **legato alla membrana mitocondriale interna**
- immagazzinamento di energia sotto forma di FADH₂
- reazione reversibile nelle condizioni intracellulari

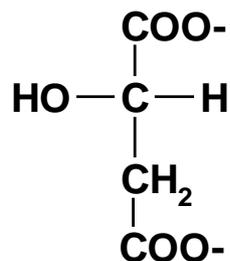
7) IDRATAZIONE DEL FUMARATO A MALATO



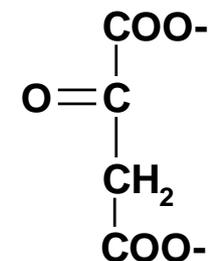
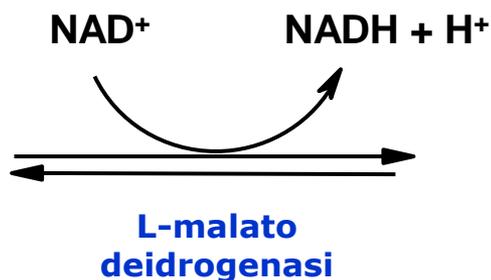
$$\Delta G'^{\circ} = - 3,8 \text{ kJ/mol}$$

- idratazione stereospecifica
- reazione reversibile nelle condizioni intracellulari

8) OSSIDAZIONE DEL MALATO A OSSALACETATO



L-malato

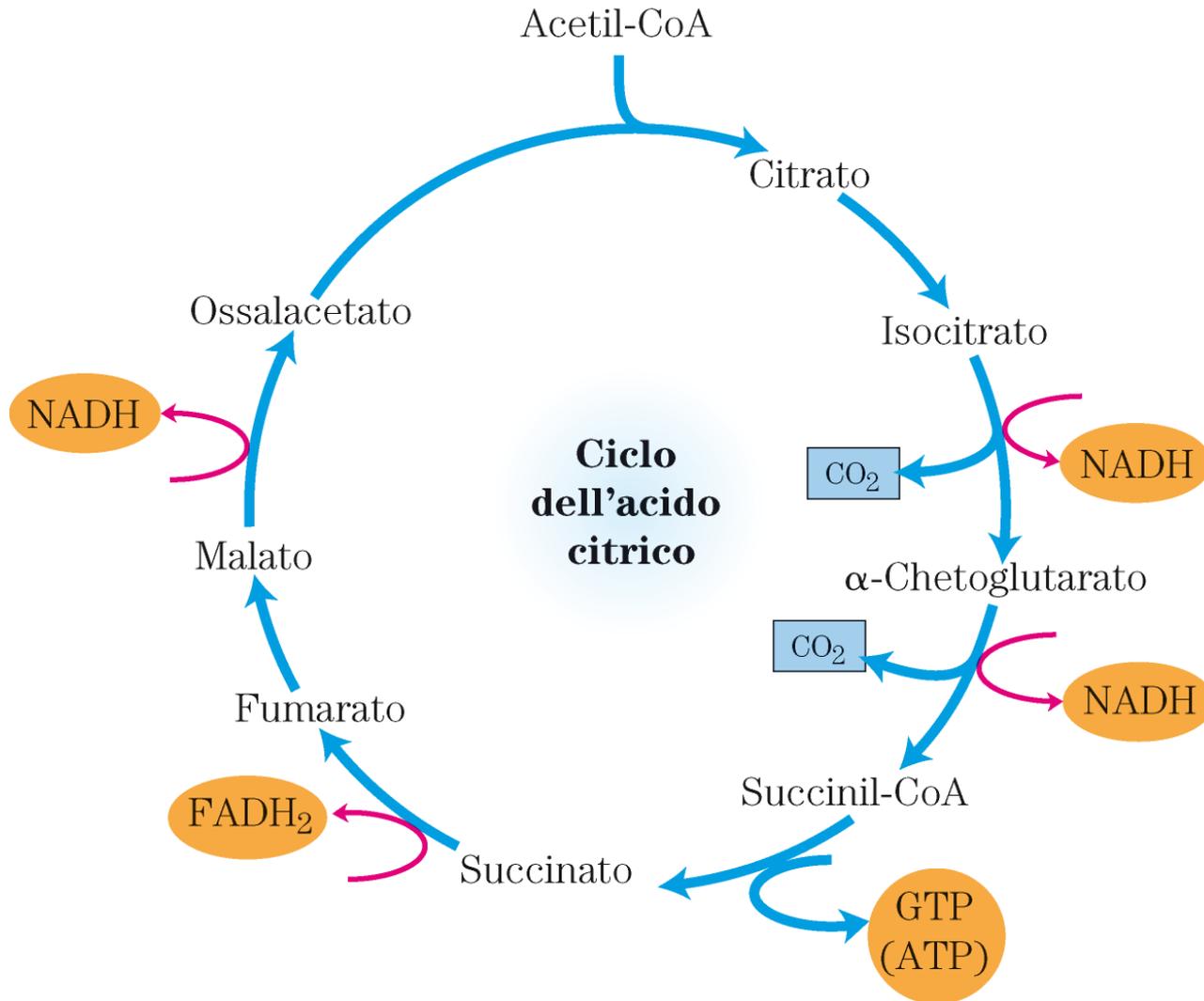


ossalacetato

$$\Delta G'^{\circ} = - 29,7 \text{ kJ/mol}$$

- reazione di ossidazione che rigenera il primo intermedio del ciclo
- immagazzinamento di energia sotto forma di NADH
- reazione reversibile nelle condizioni intracellulari

Prodotti di un giro del ciclo di Krebs



BILANCIO ENERGETICO DEL CICLO DI KREBS

Per ogni molecola di acetil-CoA vengono prodotti:

- 3 molecole di NADH • $\times 2,5 = 7,5$ molecole di ATP
 - 1 molecola di FADH₂ • $\times 1,5 = 1,5$ molecole di ATP
 - 1 molecola di ATP • 1 molecola di ATP
-

10 ATP

I coenzimi ridotti sono utilizzati nella catena respiratoria per la produzione di ATP mediante il processo di fosforilazione ossidativa

nella catena respiratoria:

Per 1 molecola di NADH sono prodotte 2,5 ATP

Per 1 molecola di FADH₂ sono prodotte 1,5 ATP

BILANCIO ENERGETICO DELLA DEGRADAZIONE DI UNA MOLECOLA DI **GLUCOSIO** ATTRAVERSO LA **GLICOLISI**, IL CICLO DI **KREBS** E LA **CATENA RESPIRATORIA**

Per ogni molecola di **GLUCOSIO**

- glicolisi: 2 ATP + 2 NADH 2 + 5
- piruvato → acetil-CoA: 1 NADH × 2 2,5 × 2
- ciclo di Krebs: (1 ATP + 1 FADH₂ + 3 NADH) × 2 (1 + 1,5 + 7,5) × 2

TOTALE MOLECOLE ATP = 32

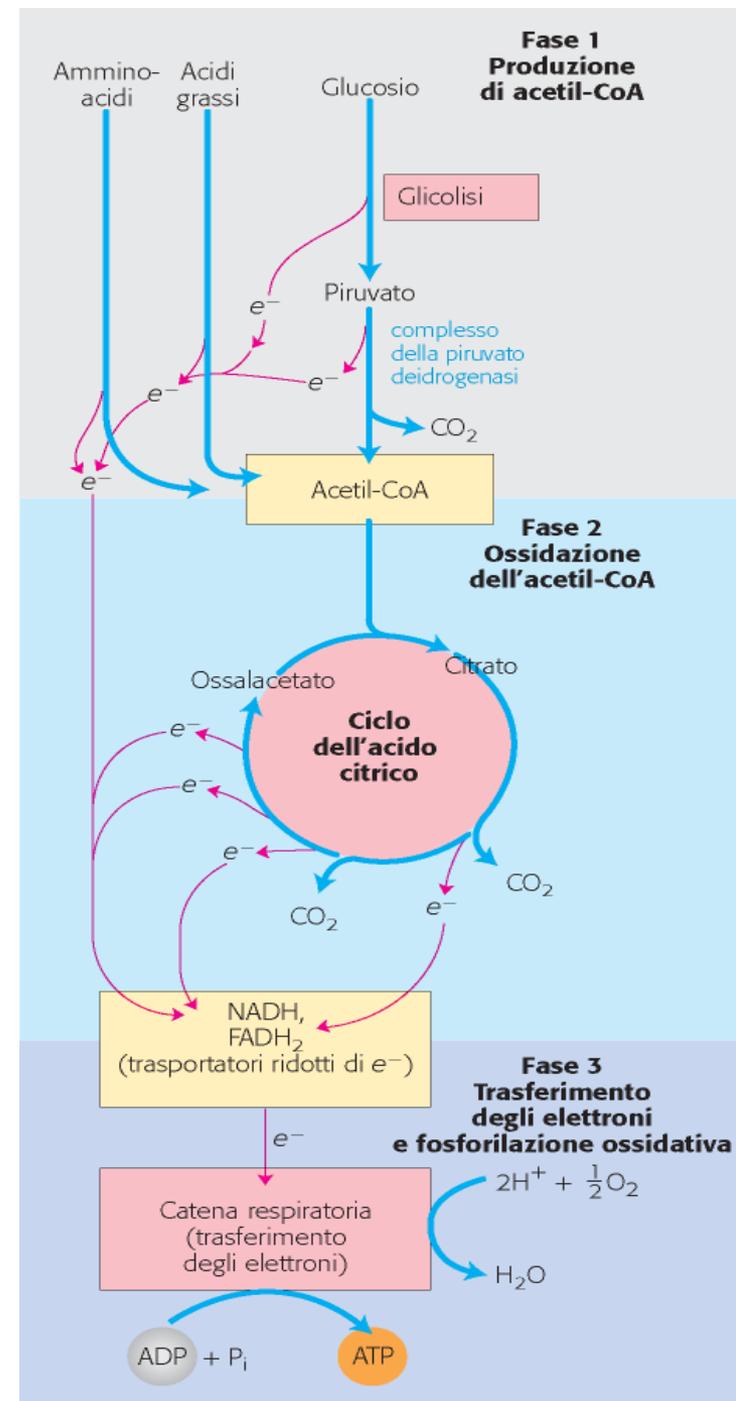
nella catena respiratoria:

Per 1 molecola di NADH sono prodotte 2,5 ATP

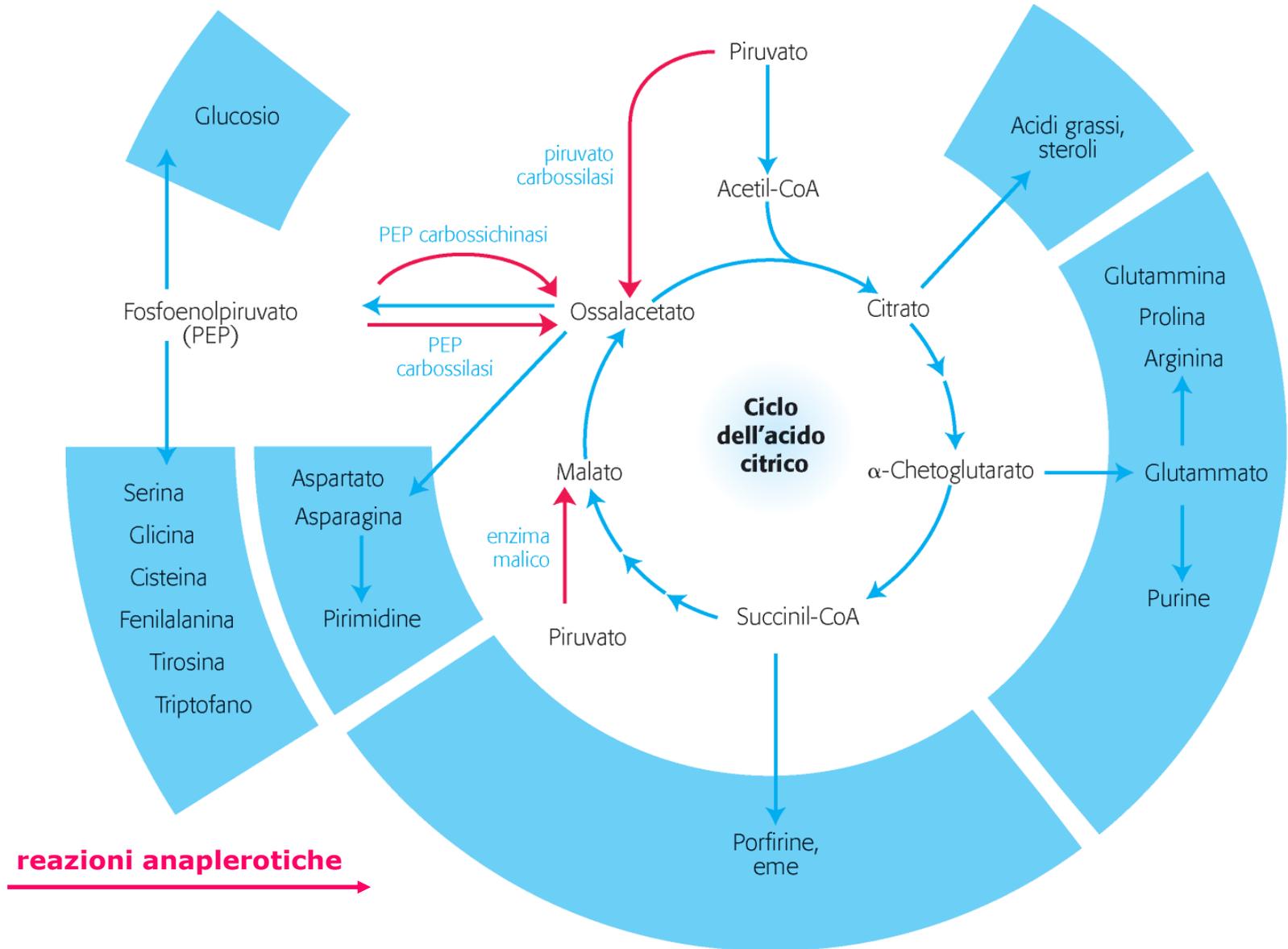
Per 1 molecola di FADH₂ sono prodotte 1,5 ATP

CICLO DI KREBS

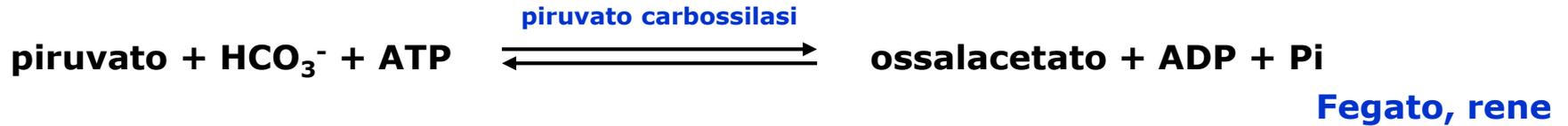
via **ANFIBOLICA**: ha un ruolo sia in processi **catabolici** (degradazione di zuccheri, acidi grassi ed aminoacidi) che **anabolici** (biosintesi di aminoacidi, nucleotidi purinici e pirimidinici, gluconeogenesi, biosintesi del gruppo eme)



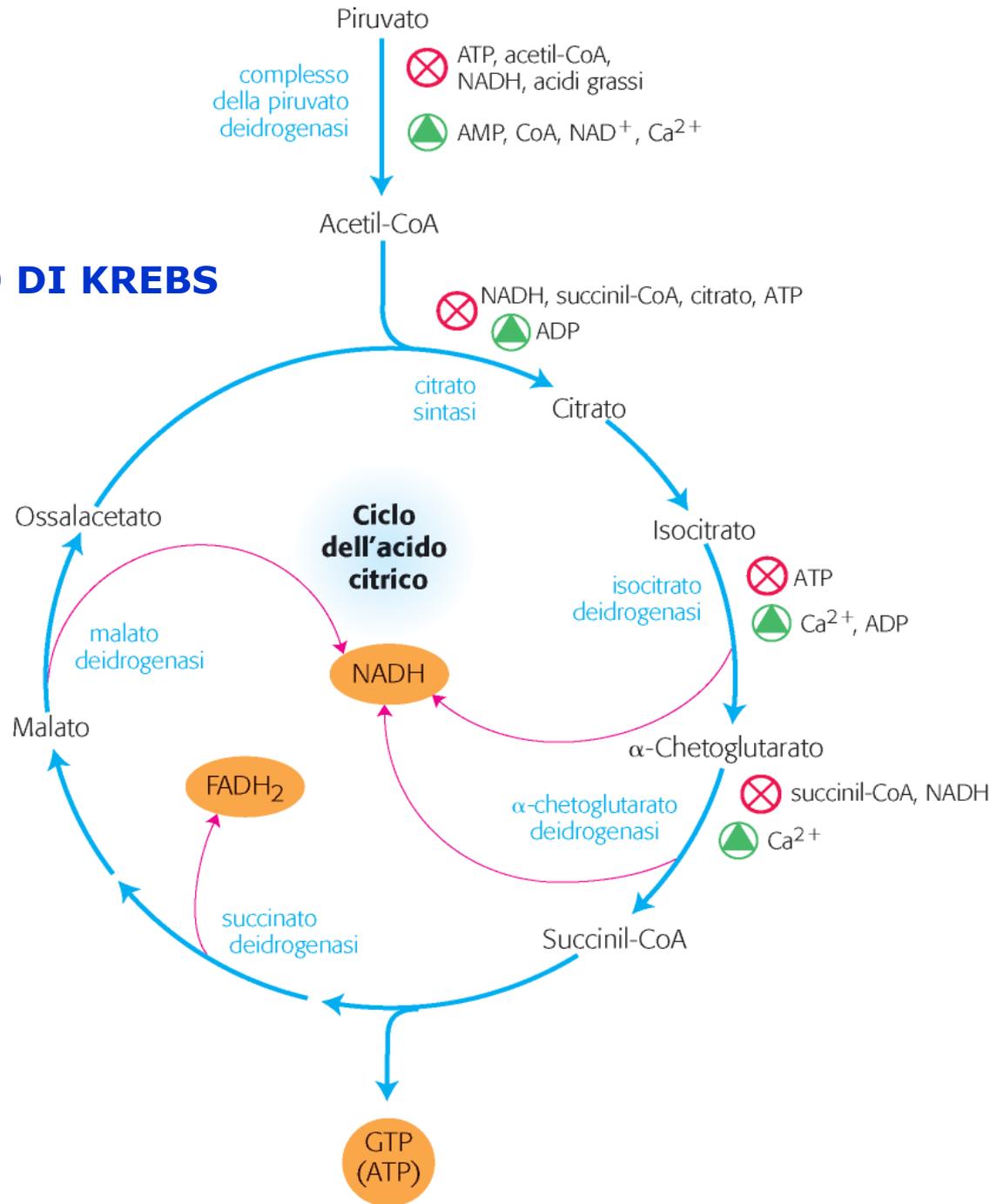
RUOLO DEL CICLO DI KREBS NELL'ANABOLISMO



REAZIONI ANAPLEROTICHE



REGOLAZIONE DEL CICLO DI KREBS



REGOLAZIONE DEL CICLO DI KREBS

Regolazione del flusso di carbonio in **entrata** nel ciclo a due livelli:

- Conversione del piruvato in acetil-CoA (Piruvato deidrogenasi, regolazione allosterica)
- Ingresso dell'acetil-CoA nel ciclo (Citrato sintasi)

Regolazione della **velocità** del ciclo a livello di:

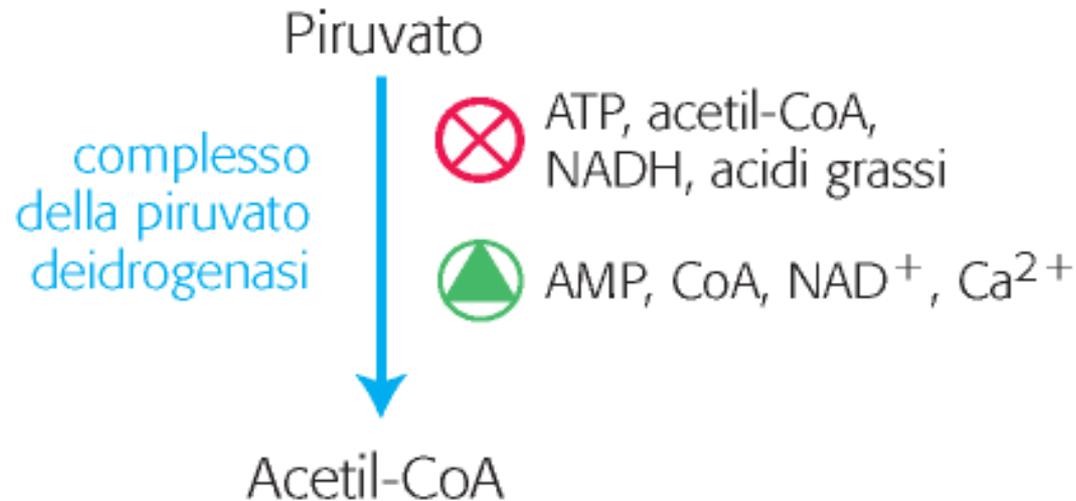
- isocitrato deidrogenasi
- α -chetoglutarato deidrogenasi

Dipende dalle necessità energetiche della cellula

Dal rapporto $[ATP]/[ADP]$

Dal rapporto $[NADH]/[NAD]$

piruvato deidrogenasi: produzione di acetil-CoA



Regolazione allosterica **Inibitori:** ATP , Acetil-CoA, NADH e acidi grassi

Attivatori: AMP, CoA, NAD⁺ e Ca²⁺

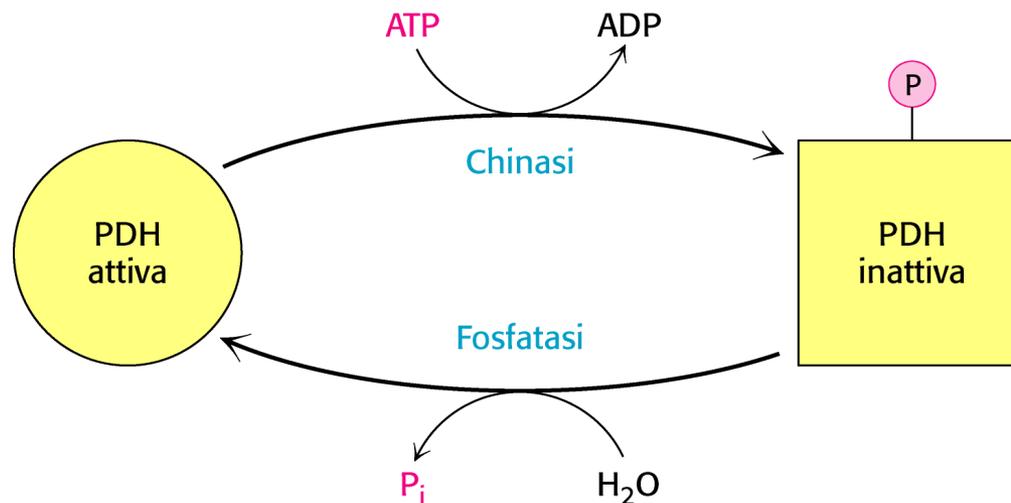
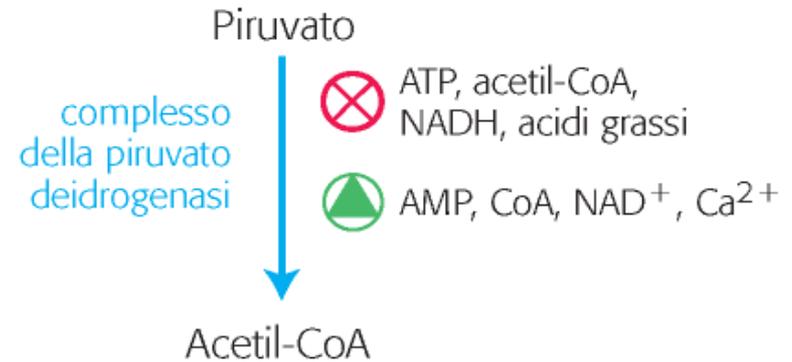
Enzima inibito: quando $[ATP]/[ADP]$ e $[NADH]/[NAD]$ sono elevati

Enzima attivato: quando aumenta la domanda energetica della cellula

piruvato deidrogenasi: produzione di acetil-CoA

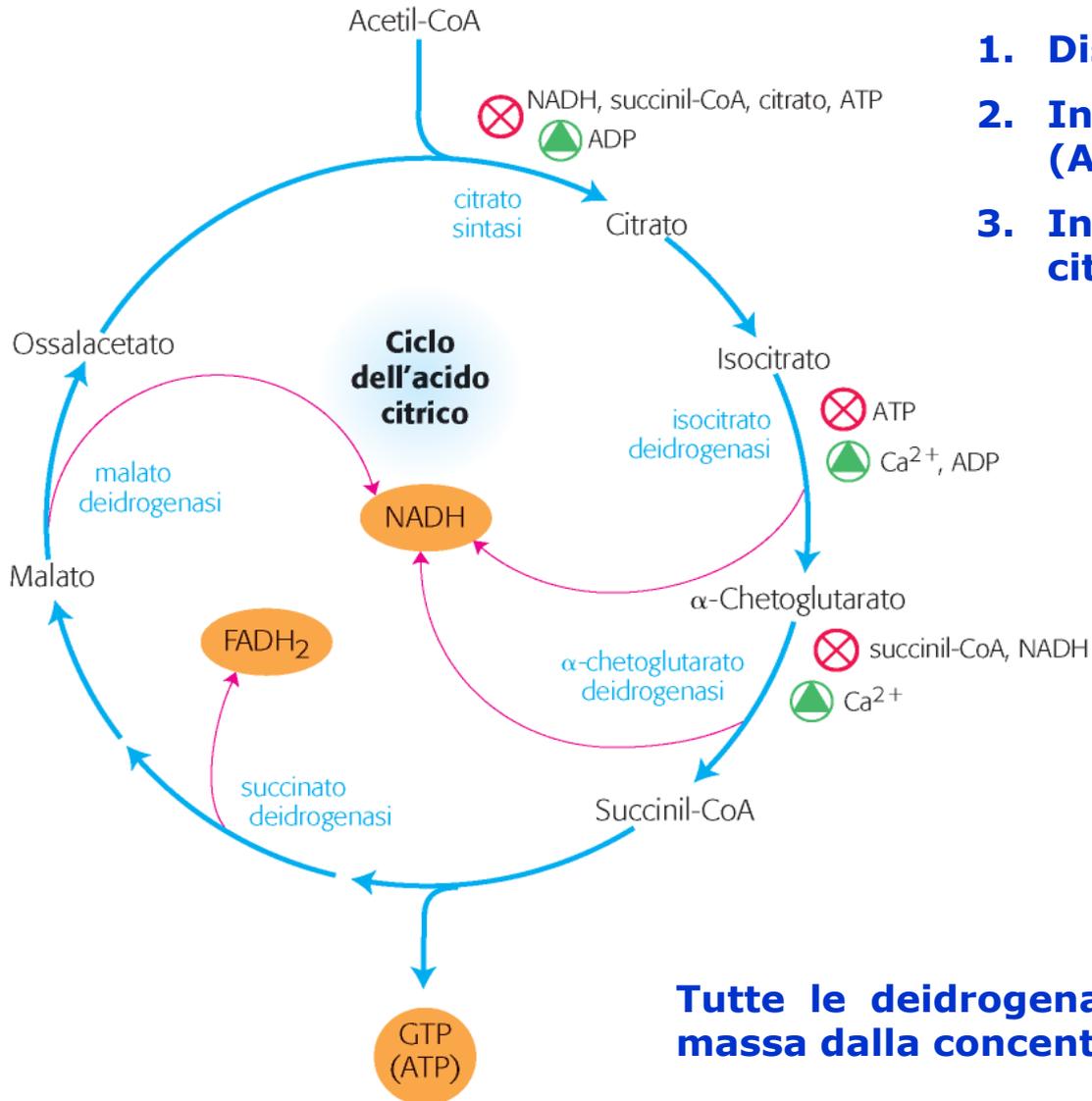
Regolazione covalente: mammiferi

Fosforilazione a livello di E₁



Chinasi: attivata allostericamente da ATP; quando i livelli di quest'ultimo si abbassano la chinasi è inattiva e la **fosfatasi** rimuove il P_i riattivando PDH

Regolazione della velocità del ciclo



1. Disponibilità di substrato

2. Inibizione da accumulo di prodotti (ATP, NADH)

3. Inibizione a feedback (succinil-CoA, citrato)

Tutte le deidrogenasi sono regolate per effetto di massa dalla concentrazione di NADH

BRACCI BIOLOGICI

