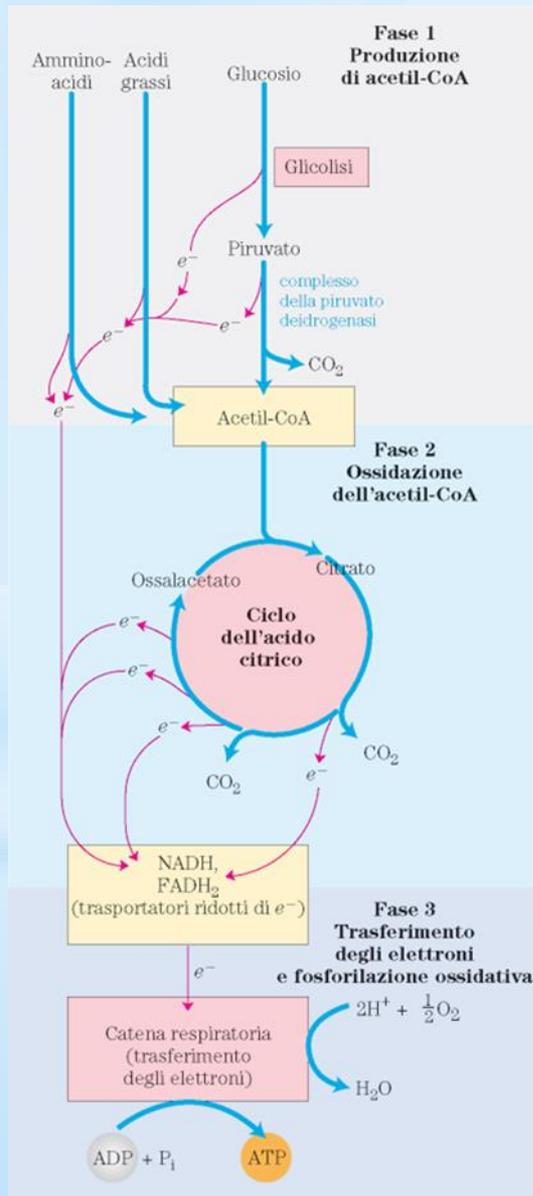


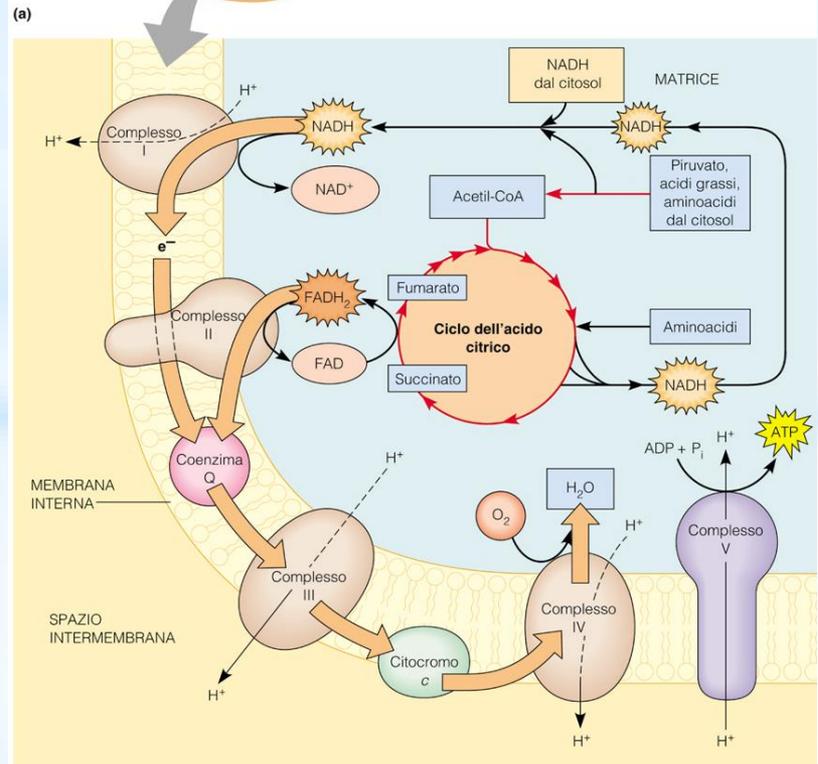
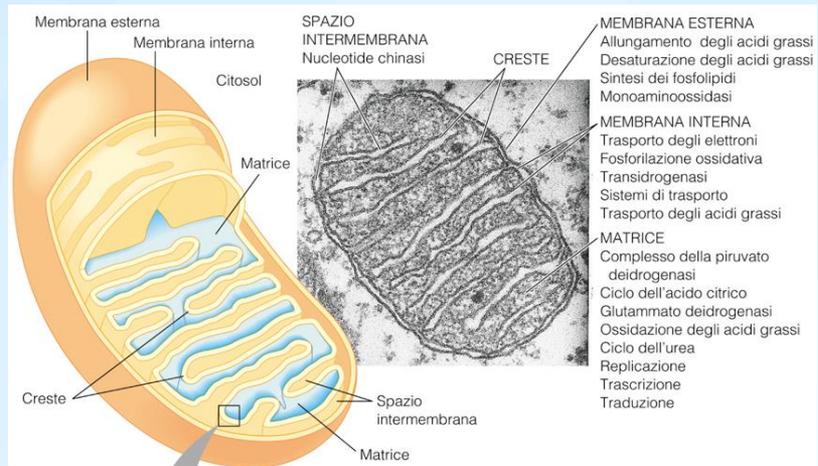
* Lezione 13

Ciclo dell'Acido Citrico

Catabolismo delle proteine, dei grassi e dei carboidrati nelle tre fasi della respirazione cellulare



FASE 1: l'ossidazione degli ac grassi, del glucosio e di alcuni aa produce Acetil-CoA;
FASE 2: l'ossidazione dei gruppi acetilici nel ciclo dell'ac.citrico comprende quattro reazioni, che sottraggono elettroni;
FASE 3: gli e^- trasportati dal NADH e dal FADH_2 vengono incanalati in una catena mitocondriale di trasportatori di e^- , riducendo alla fine l' O_2 ad H_2O . Il flusso di e^- consente la sintesi di ATP.

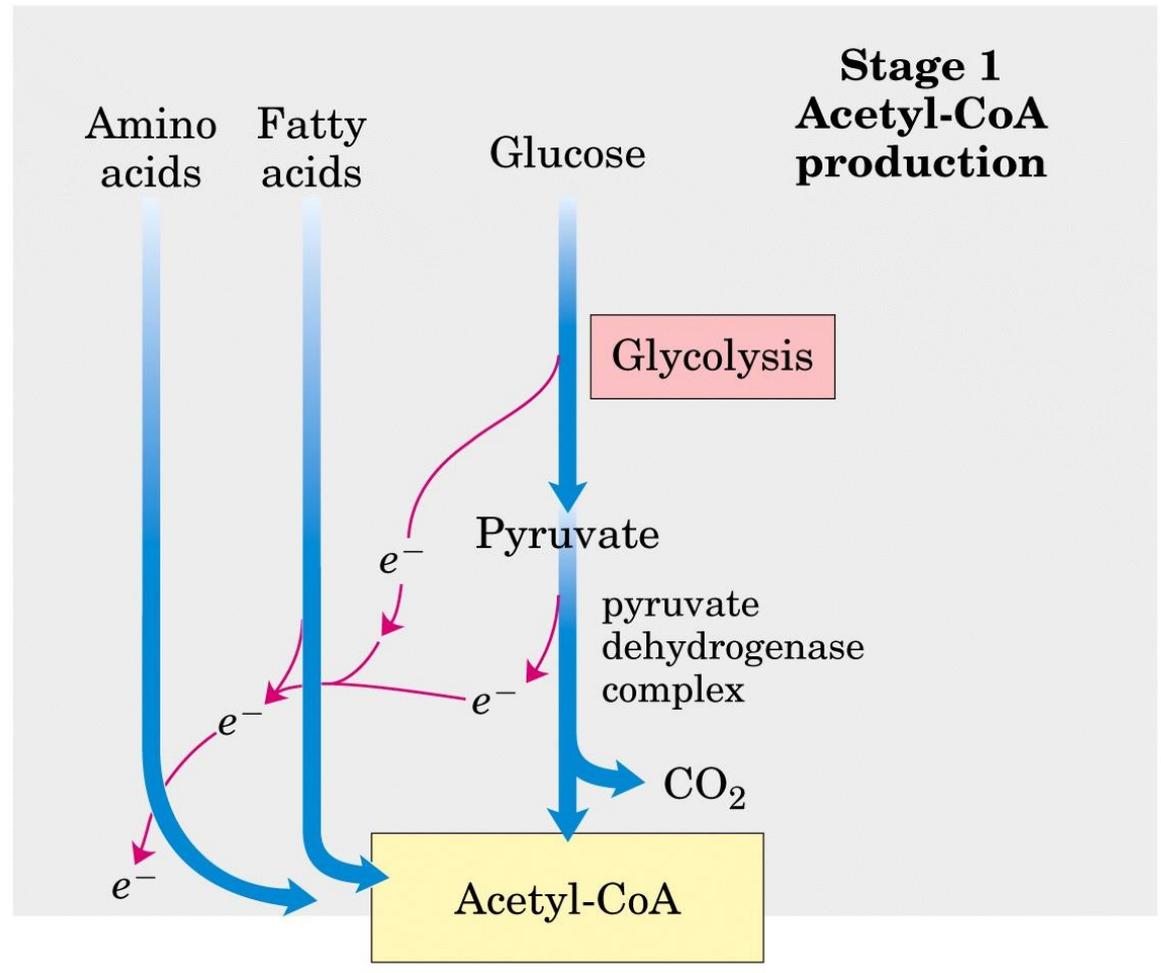


METABOLISMO OSSIDATIVO

Processi molecolari in cui è coinvolto il consumo di ossigeno e la formazione di CO_2 da parte della cellula

1^a parte

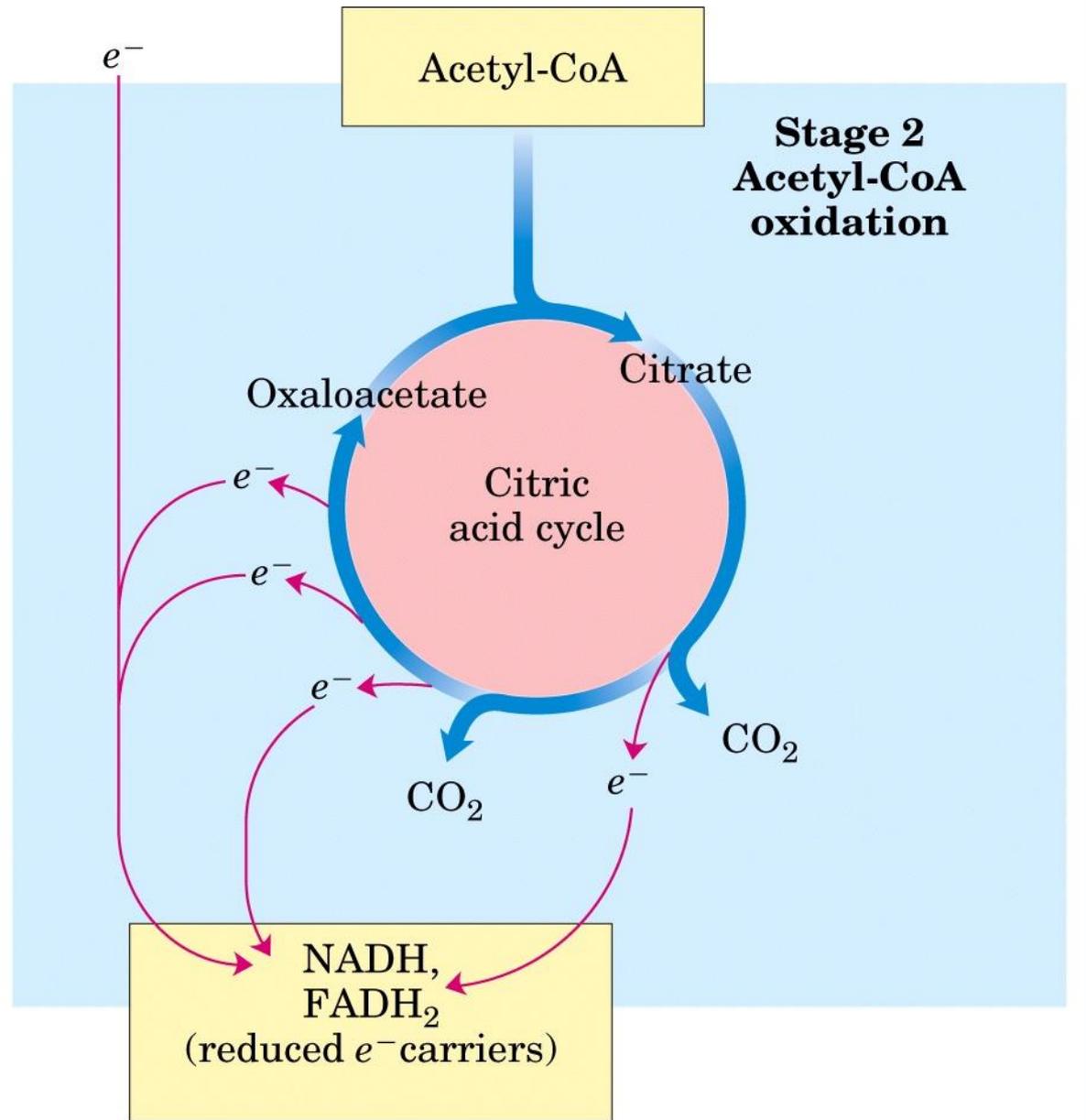
Le sostanze nutrienti: a. grassi, glucosio e qualche amminoacido, sono ossidate fino a formare frammenti a due atomi di carbonio: gruppo acetilico



2^a parte

I gruppi acetilici sono immessi nel ciclo dell'acido citrico, dove vengono ossidati fino a formare CO₂ ed energia sotto forma di molecole ridotte:

NADH e FADH₂



3^a fase

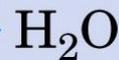
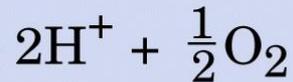
I cofattori ridotti prodotti nella seconda fase sono a loro volta ossidati liberando protoni (H^+) ed elettroni che attraverso una catena respiratoria saranno trasferiti all' O_2 che si riduce ad H_2O .

NADH,
FADH₂
(reduced e^- carriers)

e^-

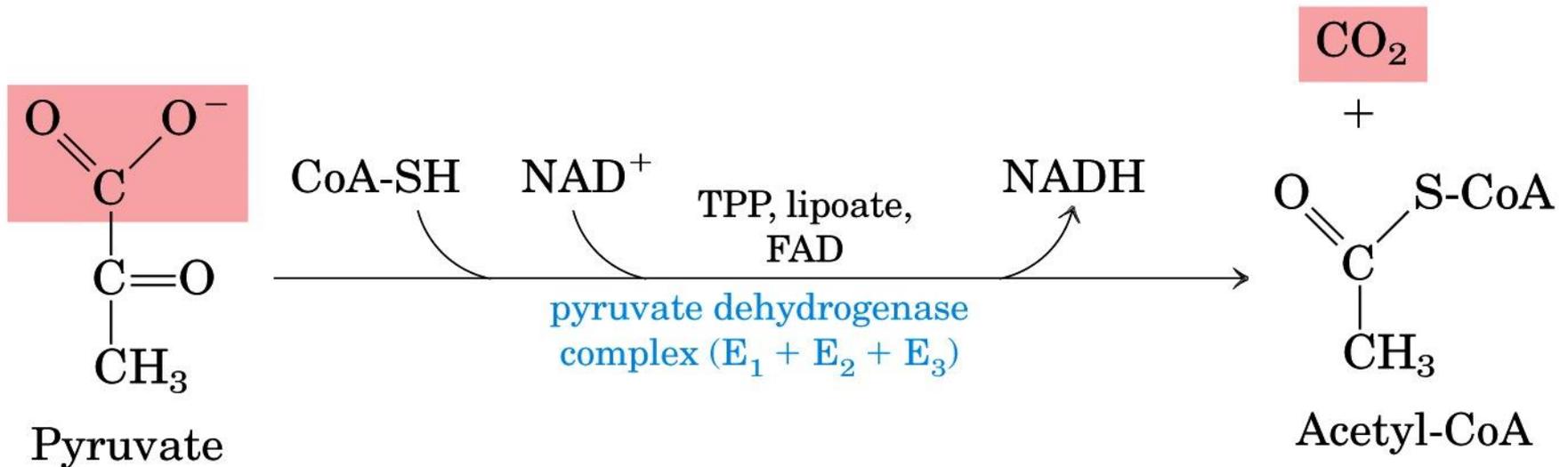
Respiratory
(electron transfer)
chain

Stage 3
Electron transfer
and oxidative
phosphorylation



L'energia rilasciata in questo trasferimento sarà convertita ad **ATP**

COMPLESSO DELLA PIRUVATO DEIDROGENASI



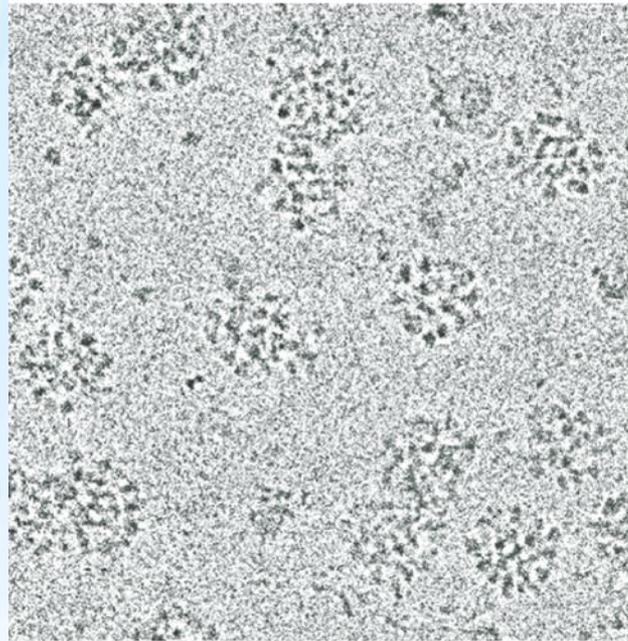
$$\Delta G'^{\circ} = -33.4 \text{ kJ/mol}$$

COMPLESSO MULTIENZIMATICO

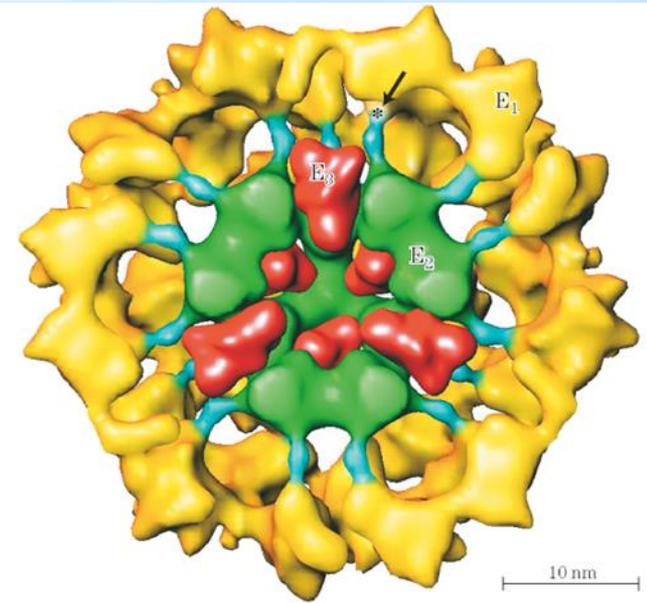
Costituito da 3 enzimi e 5 gruppi prostetici: tiamina pirofosfato (TPP), flavin adenin dinucleotide (FAD), coenzima A (CoA-SH), nicotinamide adenin dinucleotide (NAD) e l'ACIDO LIPOICO (lipoammide).

LOCALIZZATO NELLA MATRICE MITOCONDRIALE DELLE CELLULE EUCARIOTICHE E NEL CITOSOL DELLE CELLULE PROCARIOTICHE

Il num di copie di ciascuna subunità varia da un organismo all'altro: nell'enzima bovino 60 copie di E2 sono disposte a formare un dodecaedro pentagonale (b)

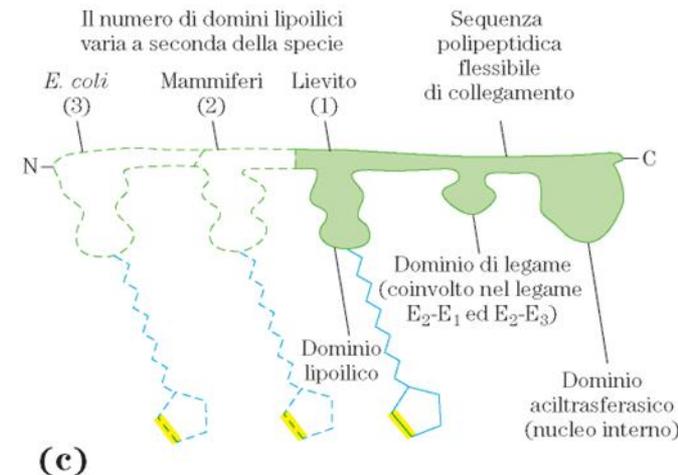


(a)



(b)

PIRUVATO DEIDROGENASI (E1)
DIIDROLIPOIL TRANSACETILASI (E2)
DIIDROLIPOIL DEIDROGENASI (E3)



(c)

✓ E2 presenta 3 domini funzionali distinti:

1. Dominio lipoilico amminotermiale che contiene uno o più residui di lipoil-lisina;

1. Dominio centrale di legame ad E1 ed E3

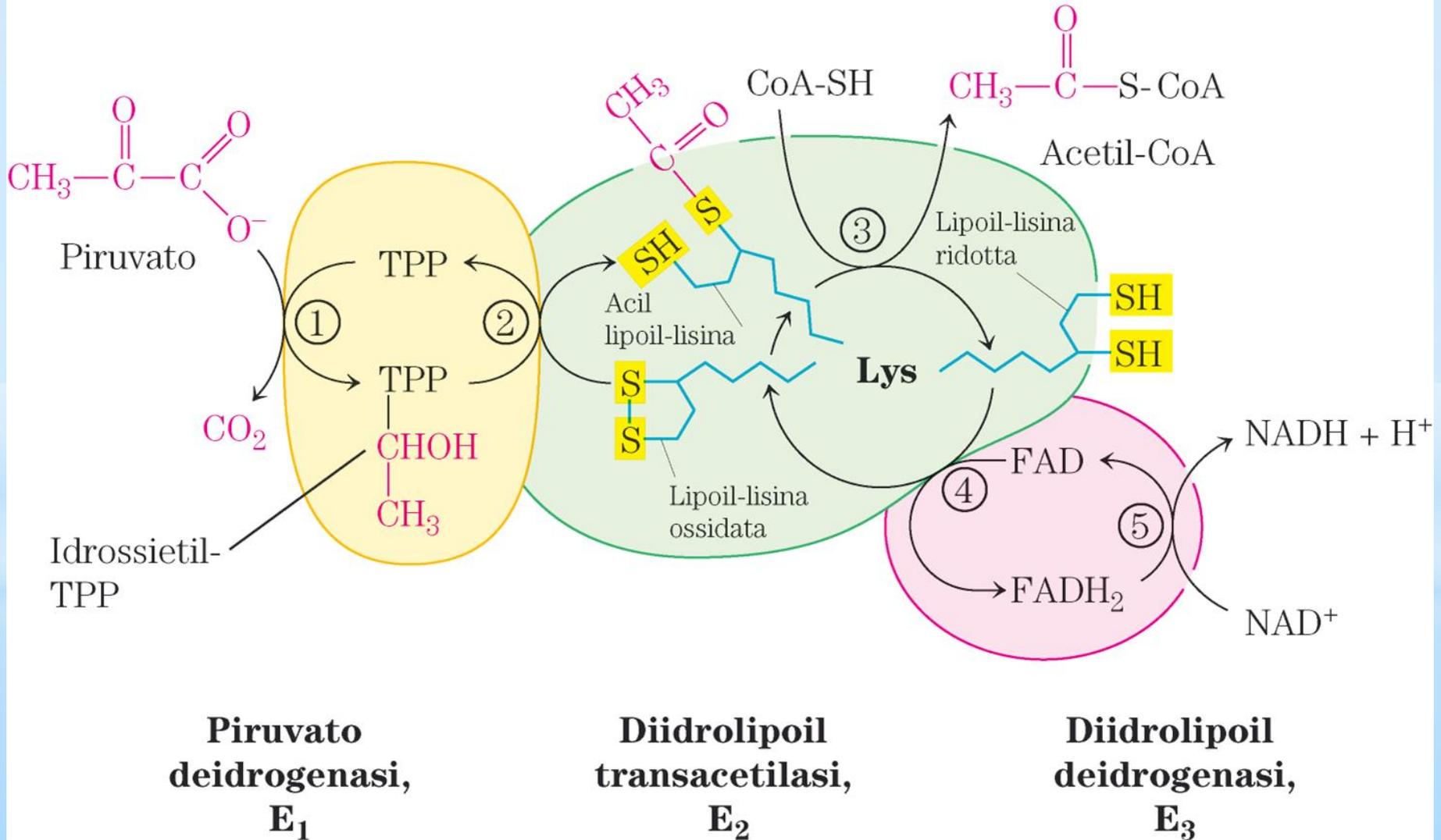
1. Dominio interno aciltrasferasico che contiene il sito attivo

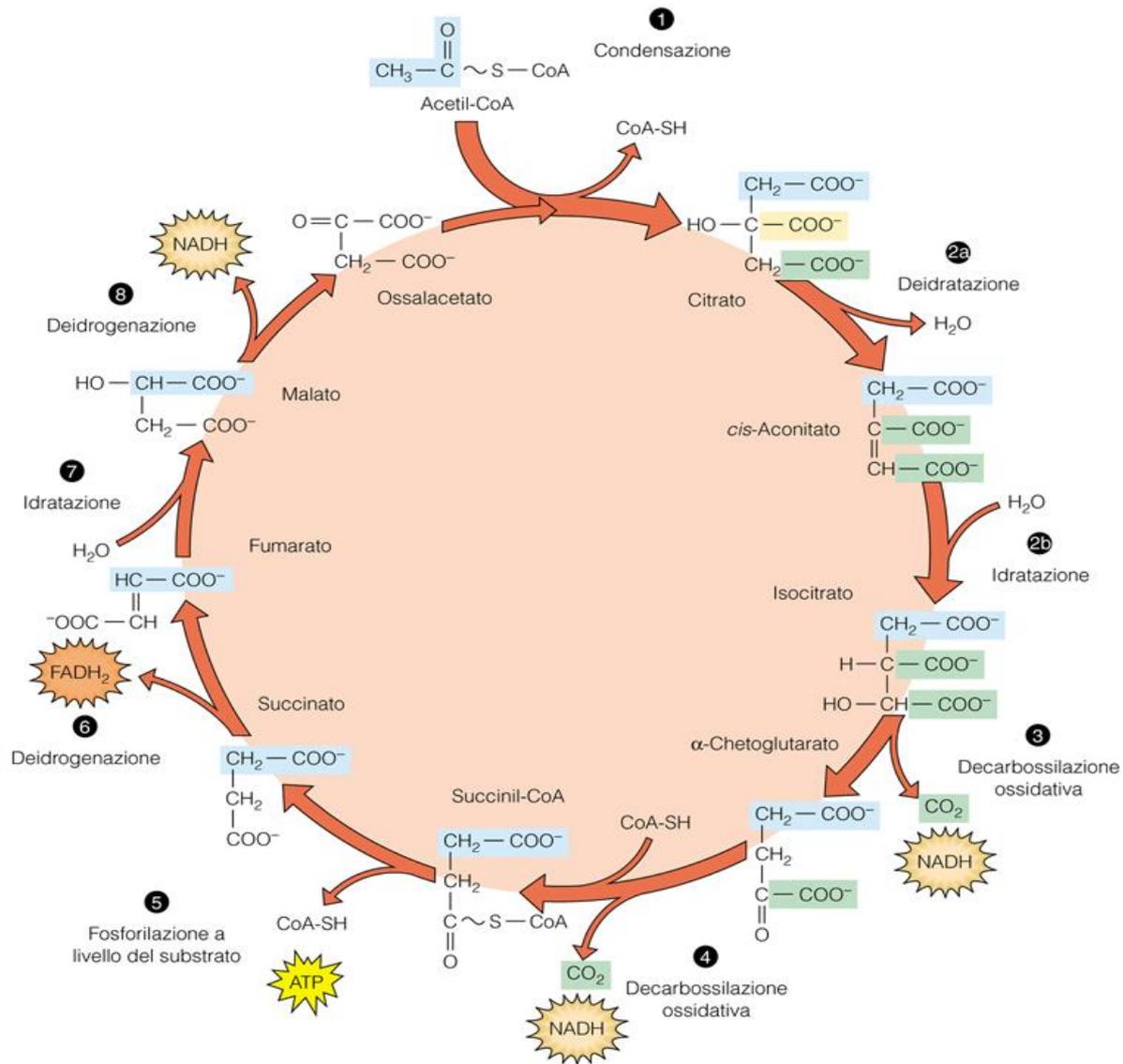
Il complesso PDH del lievito ha un solo dominio lipoilico con attaccato un lipoato, mentre nel complesso dei mammiferi ve ne sono due e in E. Coli tre (c).

✓ Il sito attivo di E1 contiene la TPP

✓ Il sito attivo di E3 ha legato a sé il FAD

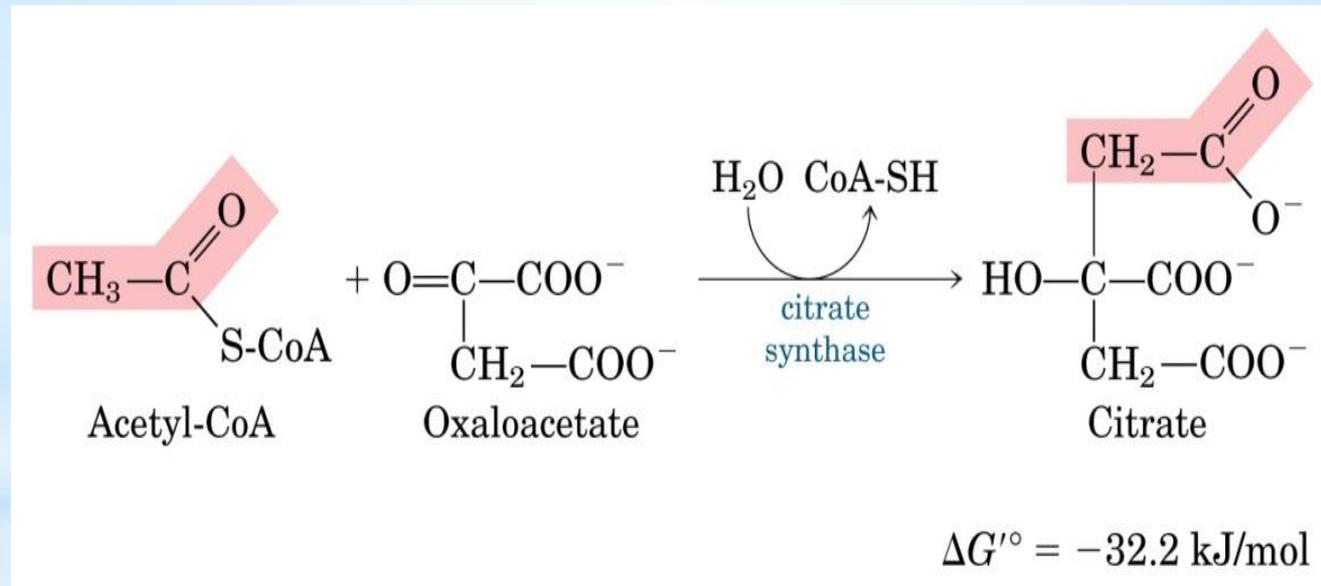
Decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil-CoA da parte del complesso della piruvato deidrogenasi





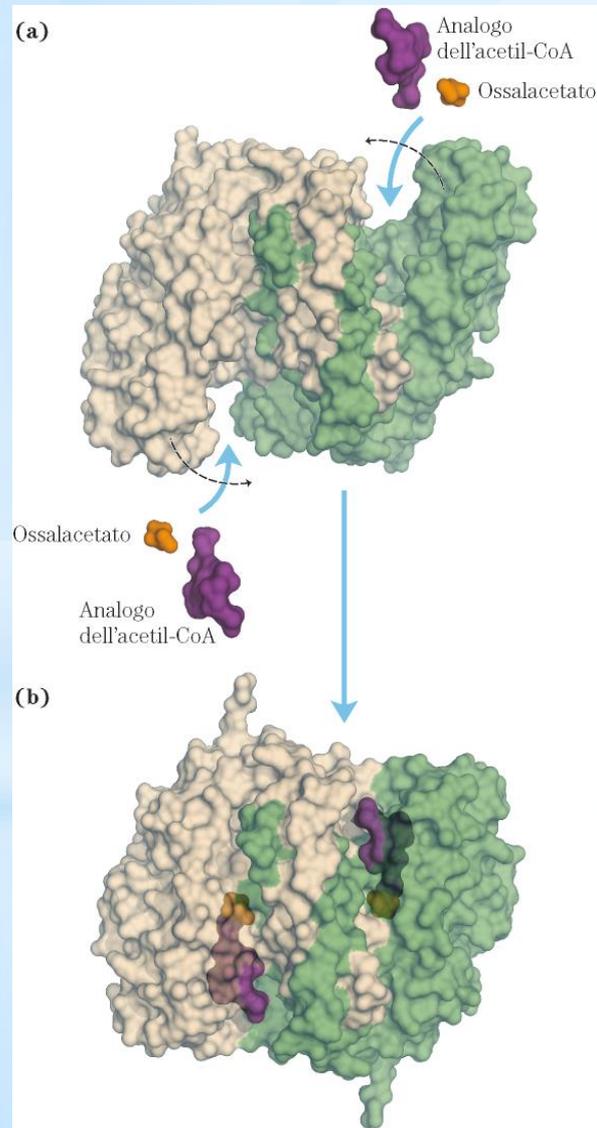
FASE 1: entrata e fuoriuscita di 2 atomi di C

1. TAPPA FORMAZIONE DEL CITRATO



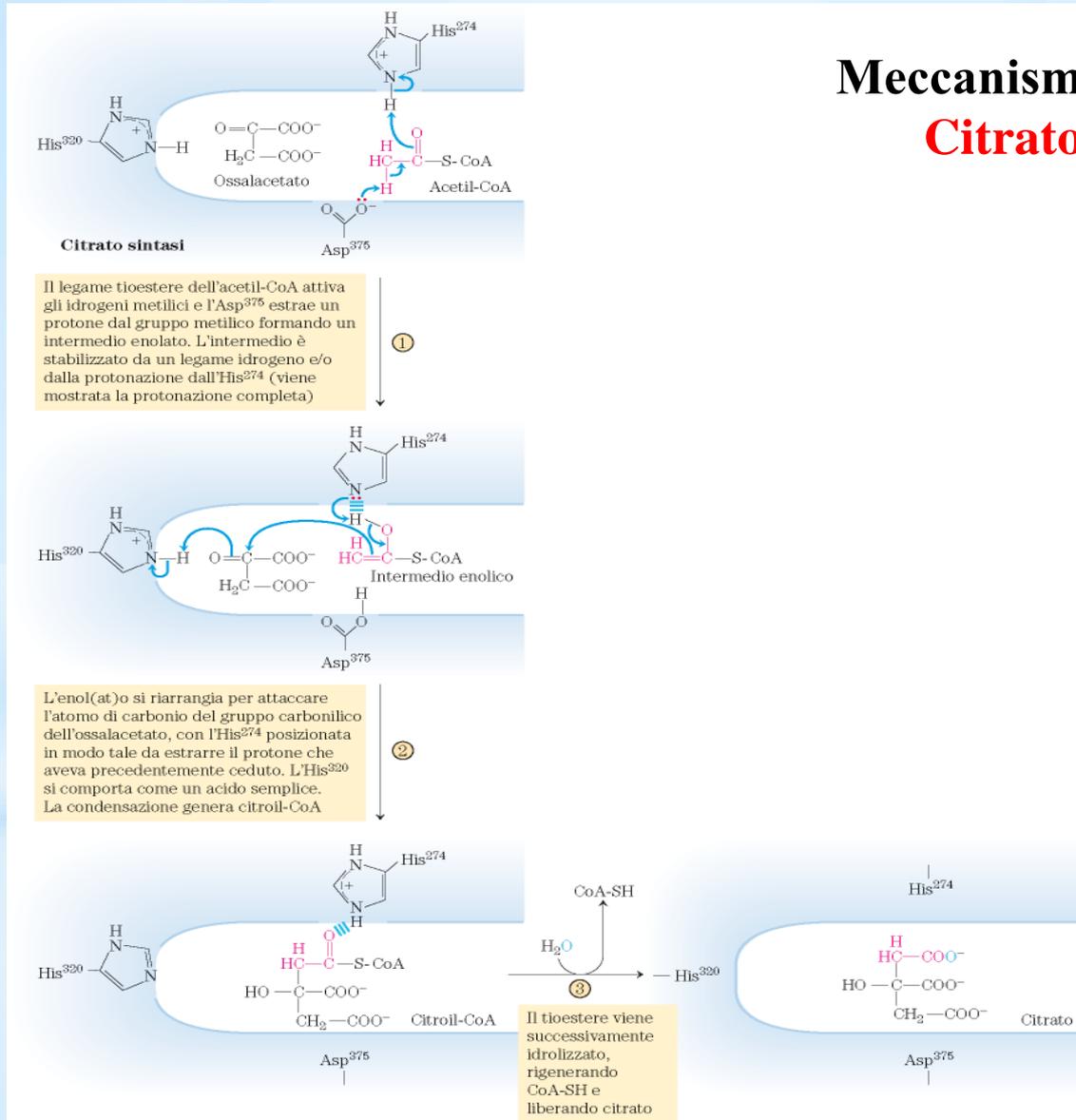
Equivalente di una condensazione aldolica seguita da idrolisi

Struttura della citrato sintasi



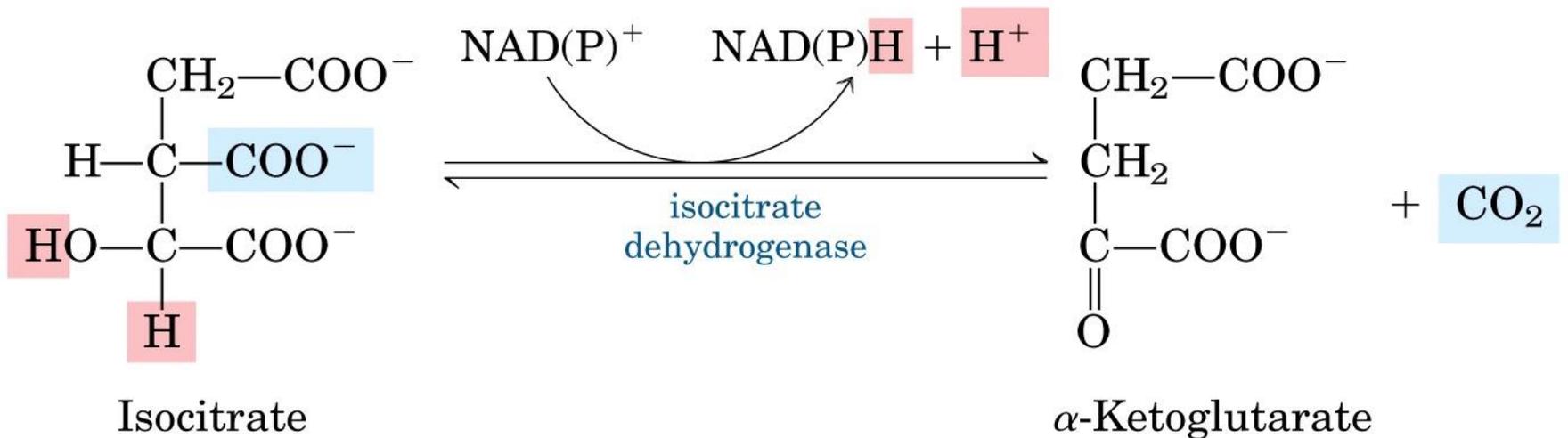
Quando si lega l'ossalacetato, il dominio flessibile di ciascuna subunità va incontro ad una marcata variazione conformazionale, creando un sito di legame per l'Acetil CoA (a) Forma aperta dell'enzima da solo (b) Forma chiusa con l'ossalacetato e un analogo stabile dell'Acetil-CoA legati

Meccanismo d'azione: Cittrato sintasi



3. TAPPA *Isocitrato è ossidato e decarbossilato a α -chetoglutarato*

Si forma la prima molecola di CO_2

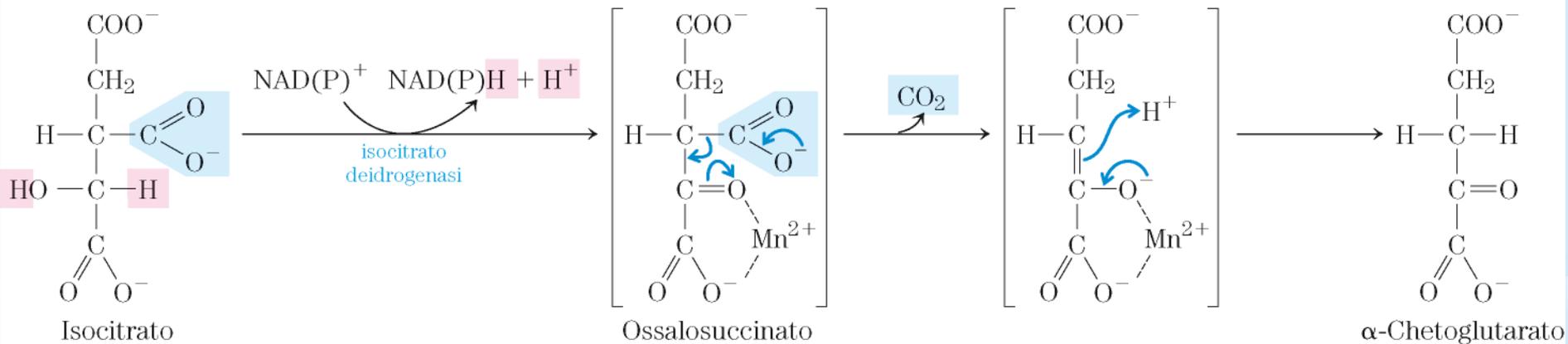


$$\Delta G'^{\circ} = -20.9 \text{ kJ/mol}$$

Due forme isoenzimatiche: una NAD-dipendente opera nel ciclo di Krebs

ISOENZIMA NADP-dipendente presente sia nella matrice mitocondriale che nel citoplasma ha la funzione di generare NADPH, coenzima essenziale per le reazioni anaboliche riduttive.

Meccanismo d'azione: isocitrato deidrogenasi



①

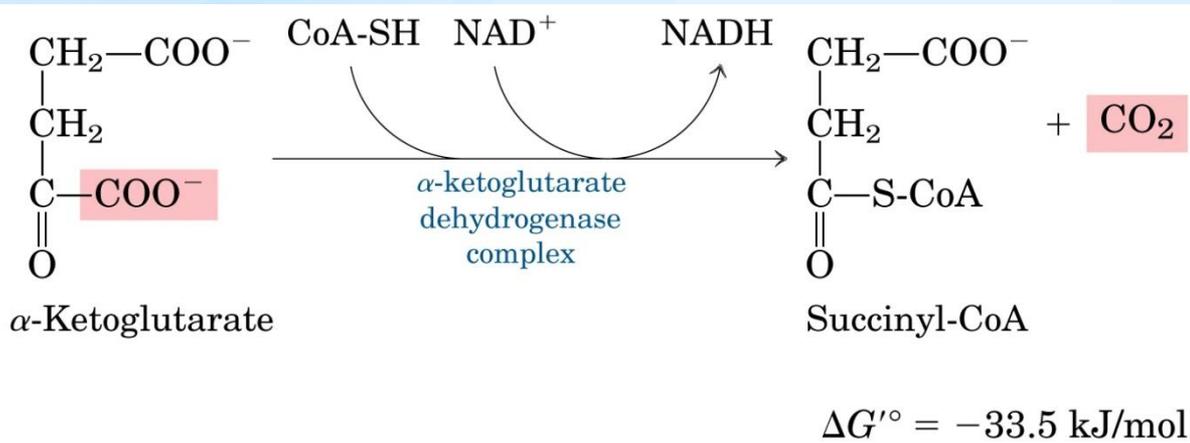
L'isocitrato viene ossidato dal trasferimento di uno ione idruro al NAD⁺ o al NADP⁺ (a seconda della forma isozimatica)

②

La decarbossilazione viene favorita dalla sottrazione di un elettrone da parte dello ione Mn²⁺ legato

③

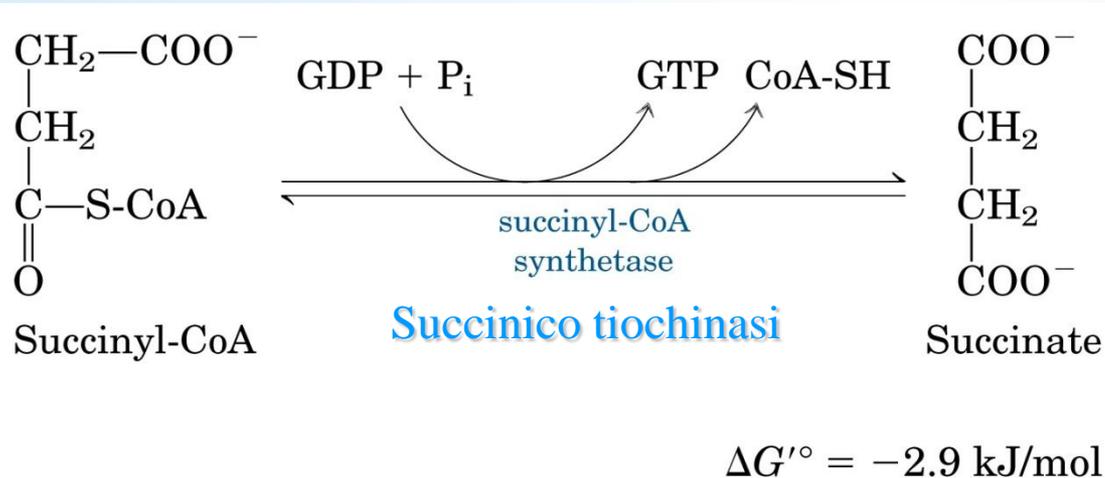
Il riarrangiamento dell'intermedio enolico genera l'α-chetoglutarato



4. TAPPA : OSSIDAZIONE DELL' α -CHETOGLUTARATO A SUCCINIL-CoA E CO₂

Reazione uguale a quella della piruvato deidrogenasi vista in precedenza.

FASE 2: rigenerazione dell'ossalacetato



5.TAPPA: CONVERSIONE DEL SUCCINIL-CoA A SUCCINATO E GTP

L'energia rilasciata dall'idrolisi del legame tioestere viene usata per la sintesi di GTP

Tappa 5: fosforilazione a livello di substrato

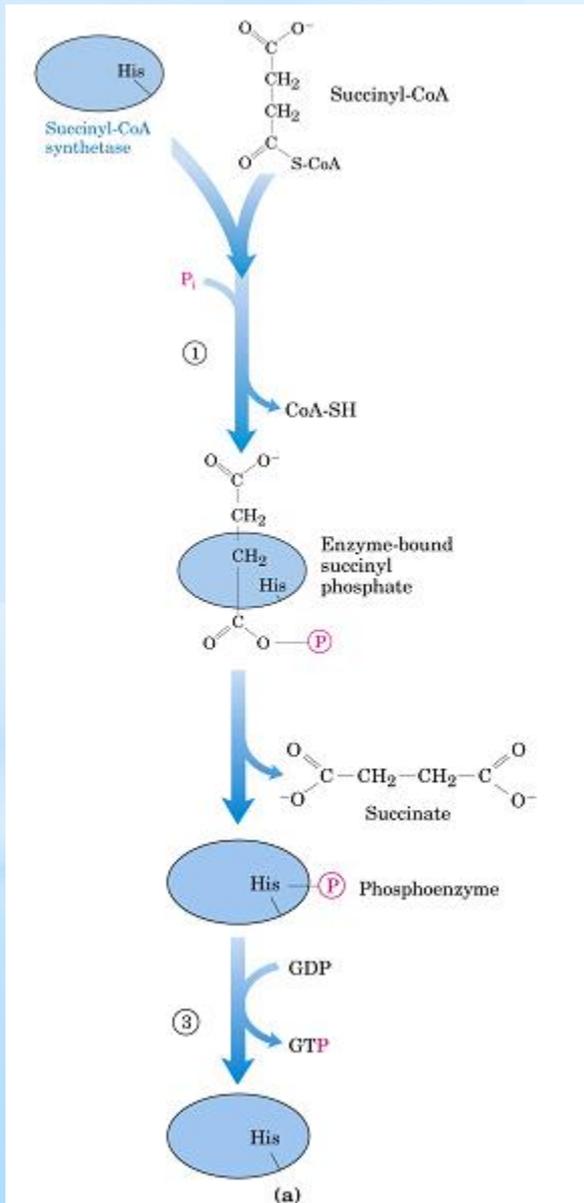
*Il gruppo fosfato libero
sostituisce il CoA-SH*

*Il gruppo fosfato è
donato all'istidina
dell'enzima,
producendo un
fosfoistidil-enzima*

*Il fosfato è trasferito al
GDP*

*Negli animali, le cellule
epatiche contengono
principalmente succinil-CoA
sintetasi legata al GTP,
mentre nel cervello e nel
cuore predomina l'enzima
legato all'ATP.*

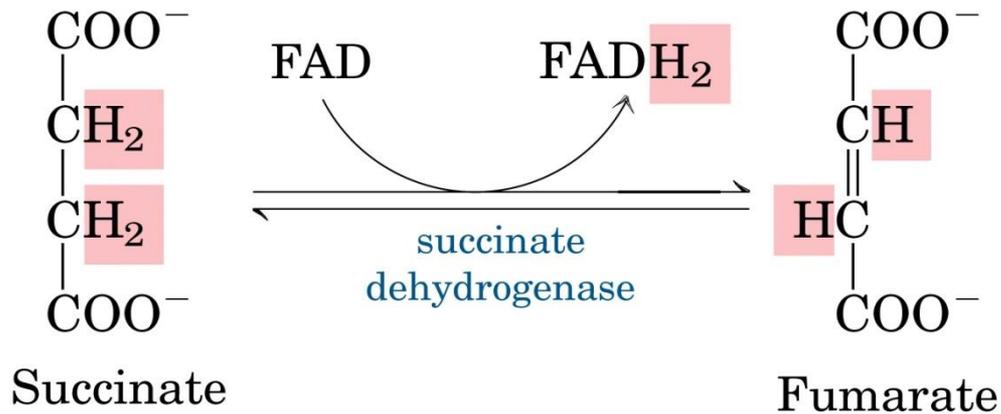
Il GTP formato può donare il
suo gruppo fosforico all'ADP



6. TAPPA

OSSIDAZIONE DEL SUCCINATO A FUMARATO

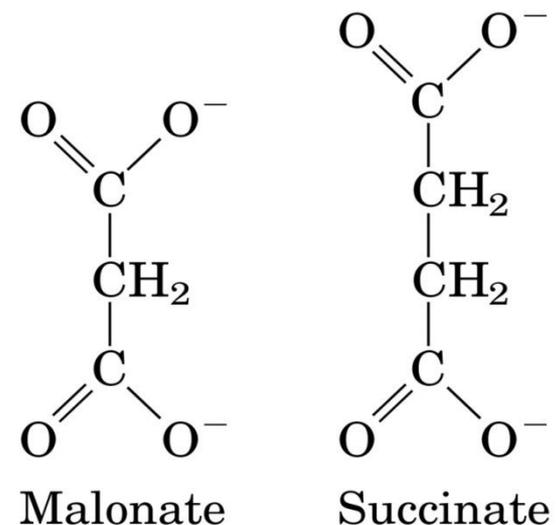
Negli eucarioti la succinato deidrogenasi è legata saldamente alla membrana interna dei mitocondri, nei procarioti alla membrana plasmatica.

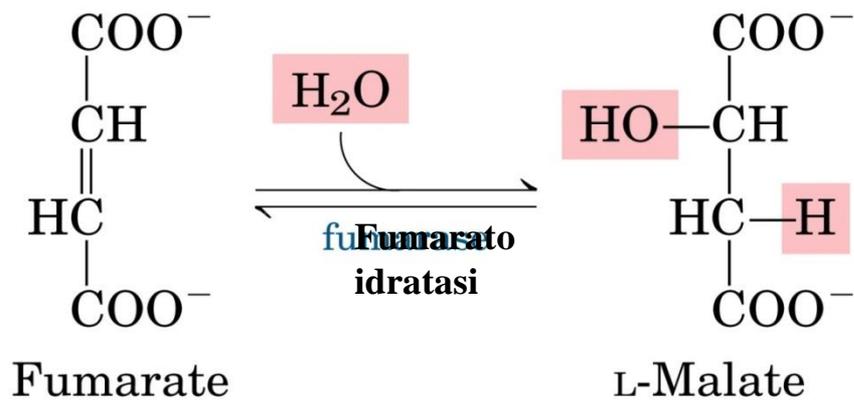


$$\Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

L'enzima contiene tre diversi centri ferro-zolfo ed una molecola di FAD legata covalentemente

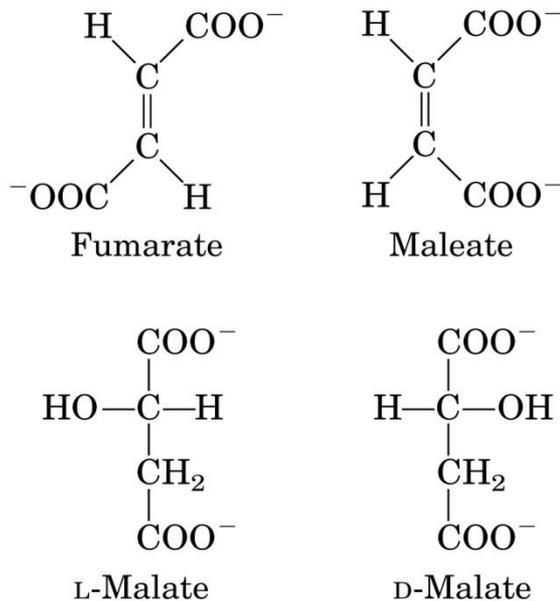
Il malonato analogo al succinato è inibitore competitivo dell'enzima





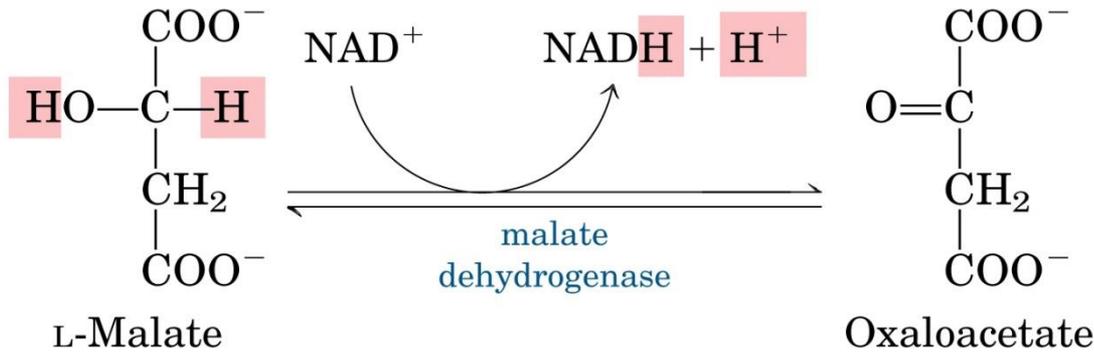
$$\Delta G'^{\circ} = -3.8 \text{ kJ/mol}$$

**7. TAPPA IDRATAZIONE
DEL FUMARATO PER
PRODURRE MALATO**



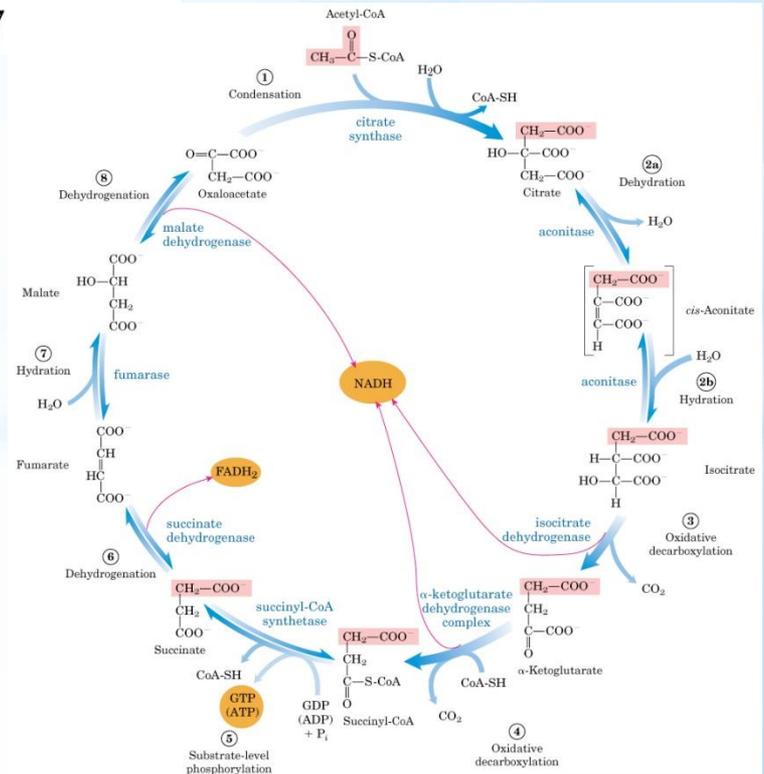
Reazione altamente stereospecifica, l'enzima non reagisce con l'isomero cis del fumarato, il maleato, e la reazione inversa non può procedere con il D-malato.

8. TAPPA OSSIDAZIONE DEL MALATO AD OSSALACETATO



$$\Delta G'^{\circ} = 29.7$$

Nelle condizioni termodinamiche standard la reazione è endoergonica ma nella cellula l'ossalacetato è rimosso continuamente dalla reazione altamente esoergonica della citrato sintasi



I prodotti di un giro del ciclo dell'acido citrico

Ogni giro del ciclo produce:
3 molecole di NADH
1 molecola di FADH₂
ed una di GTP

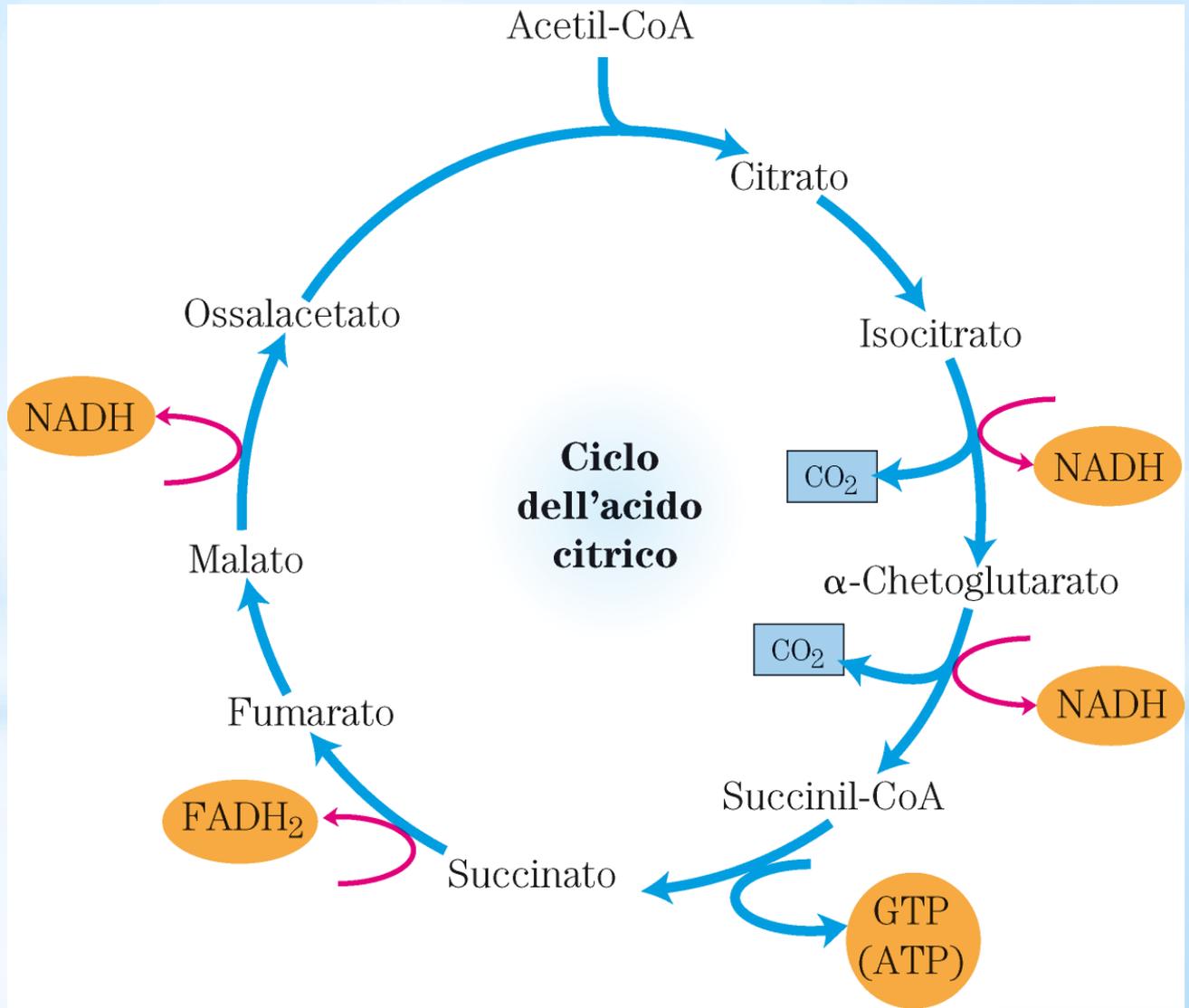


table 16–1

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

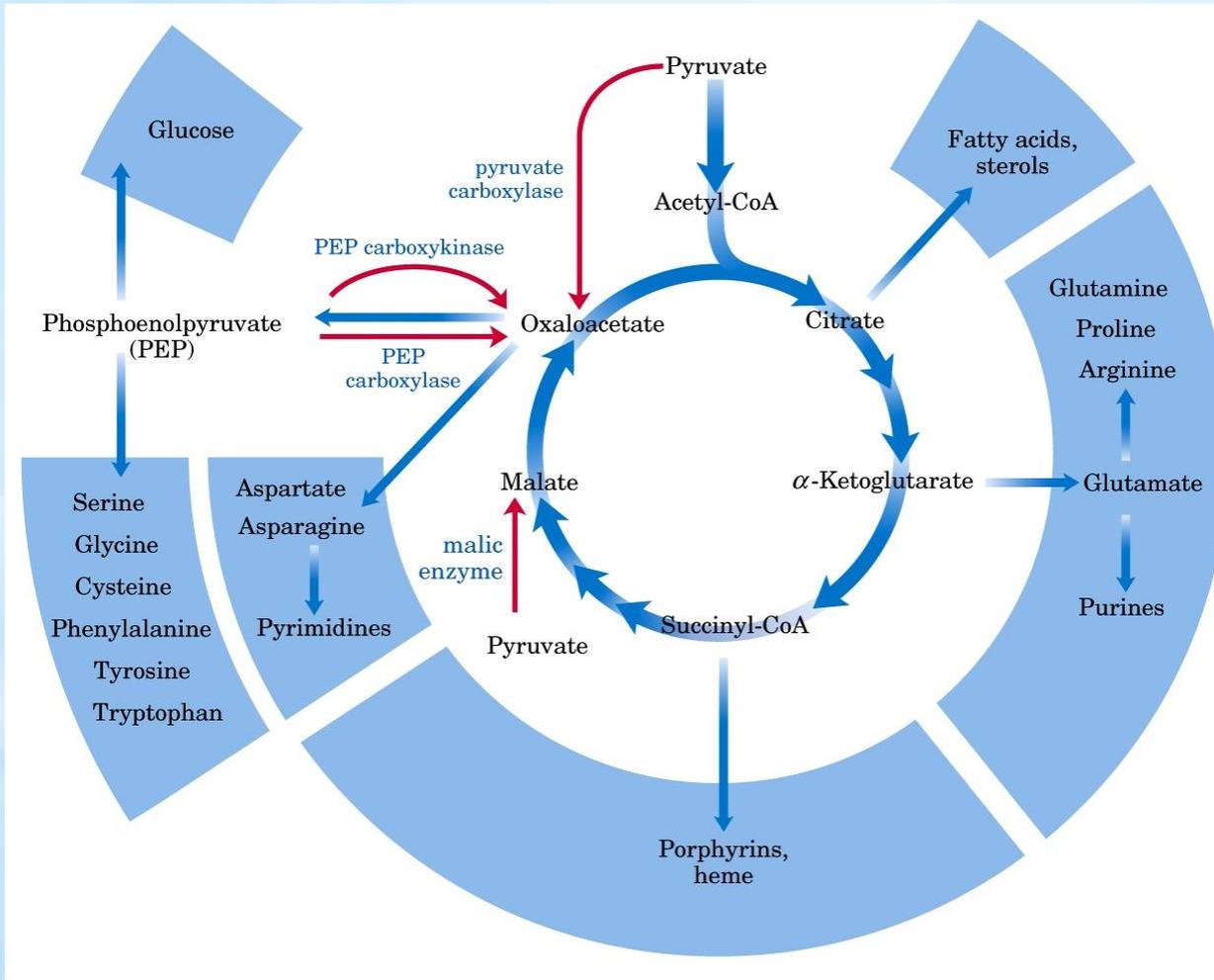
Reaction	Number of ATP or reduced coenzymes directly formed	Number of ATP ultimately formed*
Glucose \longrightarrow glucose 6-phosphate	–1 ATP	–1
Fructose 6-phosphate \longrightarrow fructose 1,6-bisphosphate	–1 ATP	–1
2 Glyceraldehyde 3-phosphate \longrightarrow 2 1,3-bisphosphoglycerate	2 NADH	3–5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

*This is calculated as 2.5 ATP per NADH and 1.5 ATP per FADH₂. A negative value indicates consumption.

VIA ANFIBOLICA

Ruolo anabolico

Serve sia ai processi catabolici che anabolici



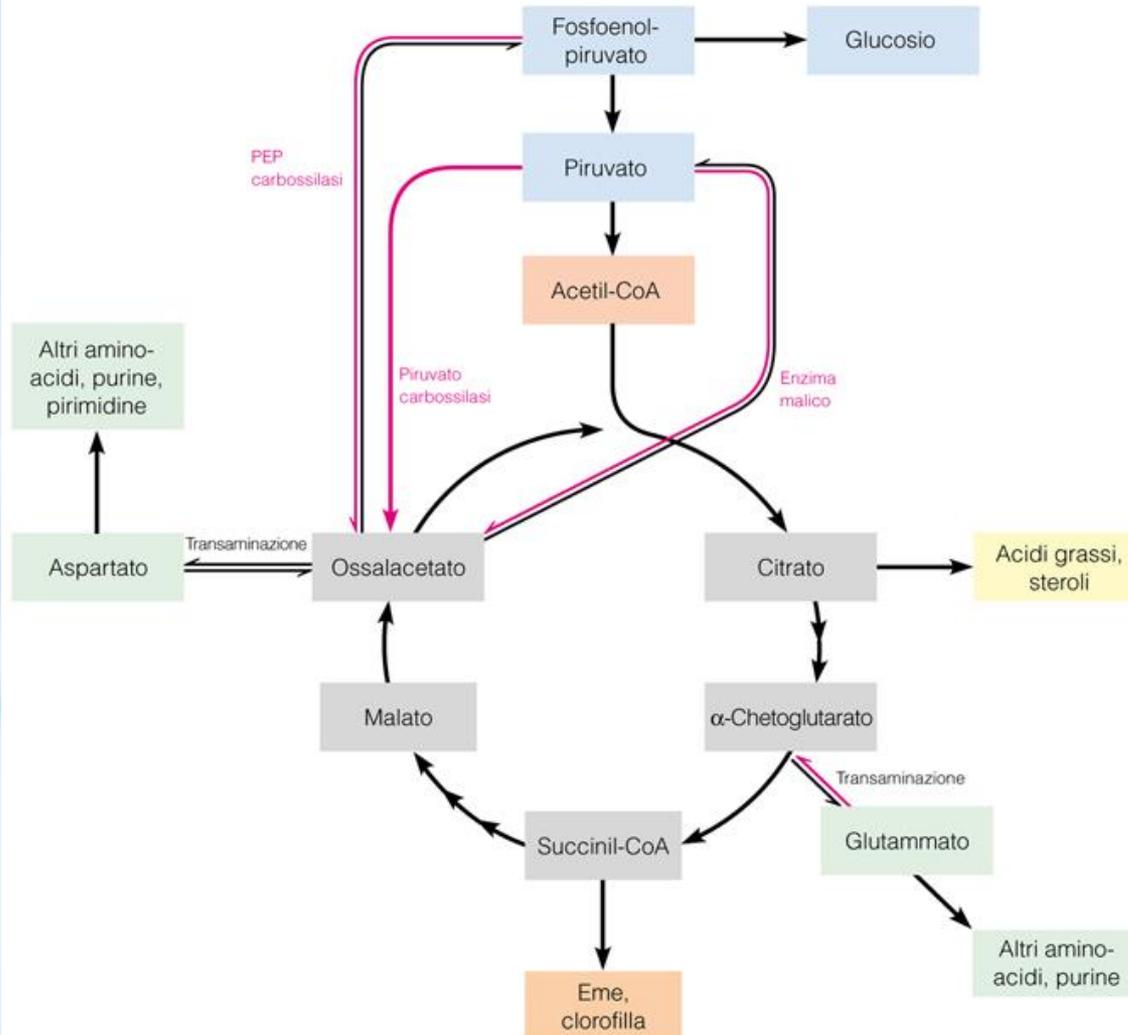
Ossalacetato e α -chetoglutarato danno gli a.a. aspartato e glutammato.

In alcuni tessuti il citrato è trasportato nel citosol, dove viene impiegato nella sintesi degli acidi grassi

Gli intermedi del ciclo che vengono sottratti per la biosintesi devono essere reintegrati

REAZIONI ANAPLEROTICHE

RIFORNISCONO DI INTERMEDI IL CICLO DELL'ACIDO CITRICO



REAZIONI ANAPLEROTICHE

table 16-2

Anaplerotic Reactions

Reaction	Tissue(s)/organism(s)
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{pyruvate carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i$	Liver, kidney
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxykinase}} \text{oxaloacetate} + \text{GTP}$	Heart, skeletal muscle
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{HCO}_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{P}_i$	Higher plants, yeast, bacteria
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightleftharpoons{\text{malic enzyme}} \text{malate} + \text{NAD(P)}^+$	Widely distributed in eukaryotes and prokaryotes

PIRUVATO CARBOSSILASI



$\Delta G^\circ = -2.1 \text{ kJ/mol}$

Importante in particolare in fegato e rene. Enzima praticamente inattivo in assenza di acetil-CoA, suo modulatore allosterico positivo. Quando l'acetil-CoA è in eccesso, stimola l'enzima a produrre più ossalacetato per poter venir così consumato in questo ciclo (feedforward).

Alternativamente l'ossalacetato può essere usato per la sintesi di carboidrati (gluconeogenesi) e l'accumulo di acetil-CoA può essere visto come segnale che è disponibile carbonio a sufficienza per essere immagazzinato come carboidrati.

FOSFOENOLPIRUVATO CARBOSSILASI

Abbondante nel cuore e muscolo scheletrico, è attivata dall'intermedio glicolitico fruttosio 1,6-bisfosfato, che tende ad aumentare quando il ciclo opera ad una velocità troppo bassa e non utilizza tutto il piruvato che è prodotto dalla glicolisi.

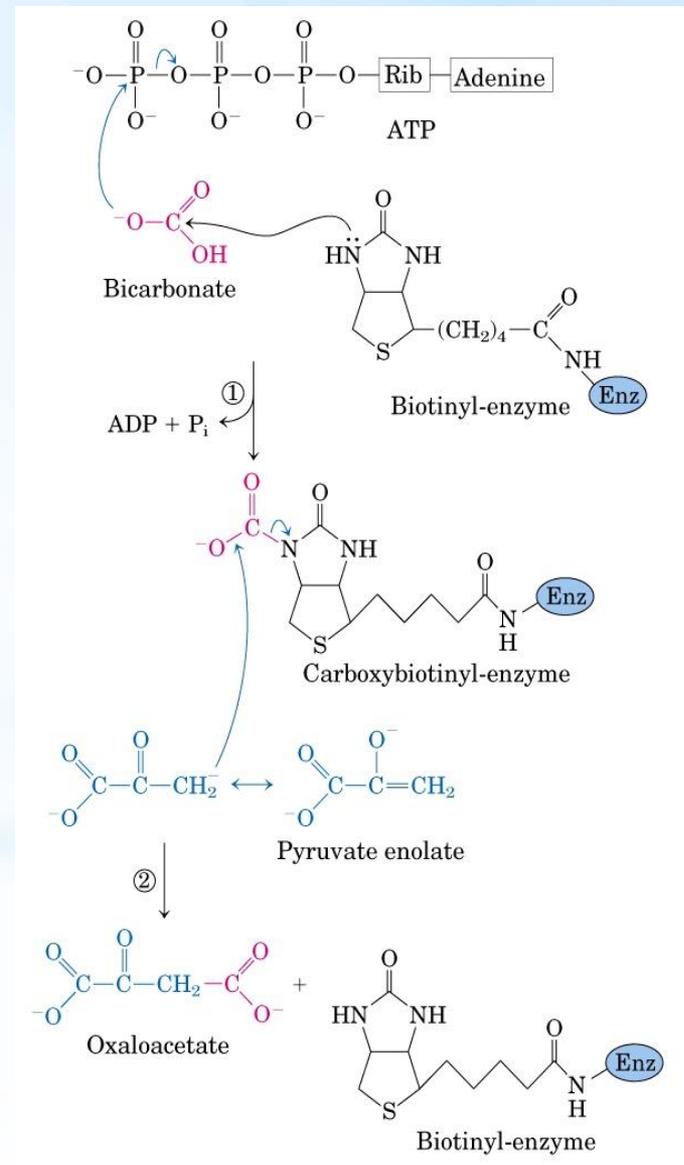
PIRUVATO CARBOSSILASI

La piruvato carbossilasi richiede la vitamina biotina (B₈) come gruppo prostetico

Trasportatore specializzato di gruppi ad un atomo di carbonio nella loro forma più ossidata

BIOTINA

La piruvato carbossilasi è formata da 4 subunità identiche, ognuna delle quali è legata ad una biotina mediante un legame amidico con ϵ -amino gruppo della lisina nel sito attivo dell'enzima



ENZIMA MALICO

Malato deidrogenasi (decarbossilante: NADP⁺)

L'enzima catalizza la carbossilazione riduttiva del piruvato a dare L-malato.

