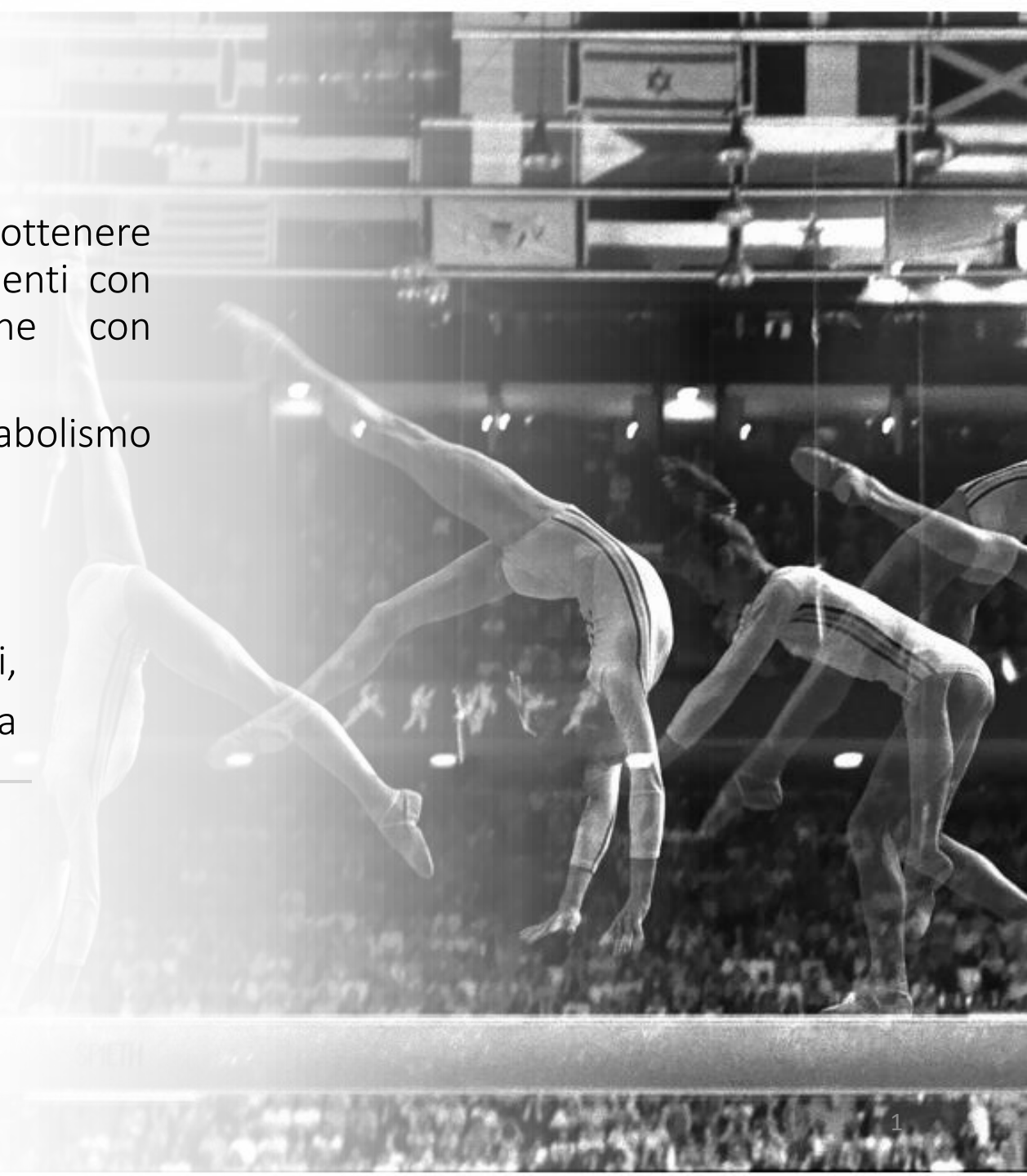


Gli organismi possono ottenere molta più energia dai nutrienti con l'ossidazione aerobica che con l'ossidazione anaerobica.

Processi importanti nel metabolismo aerobico:

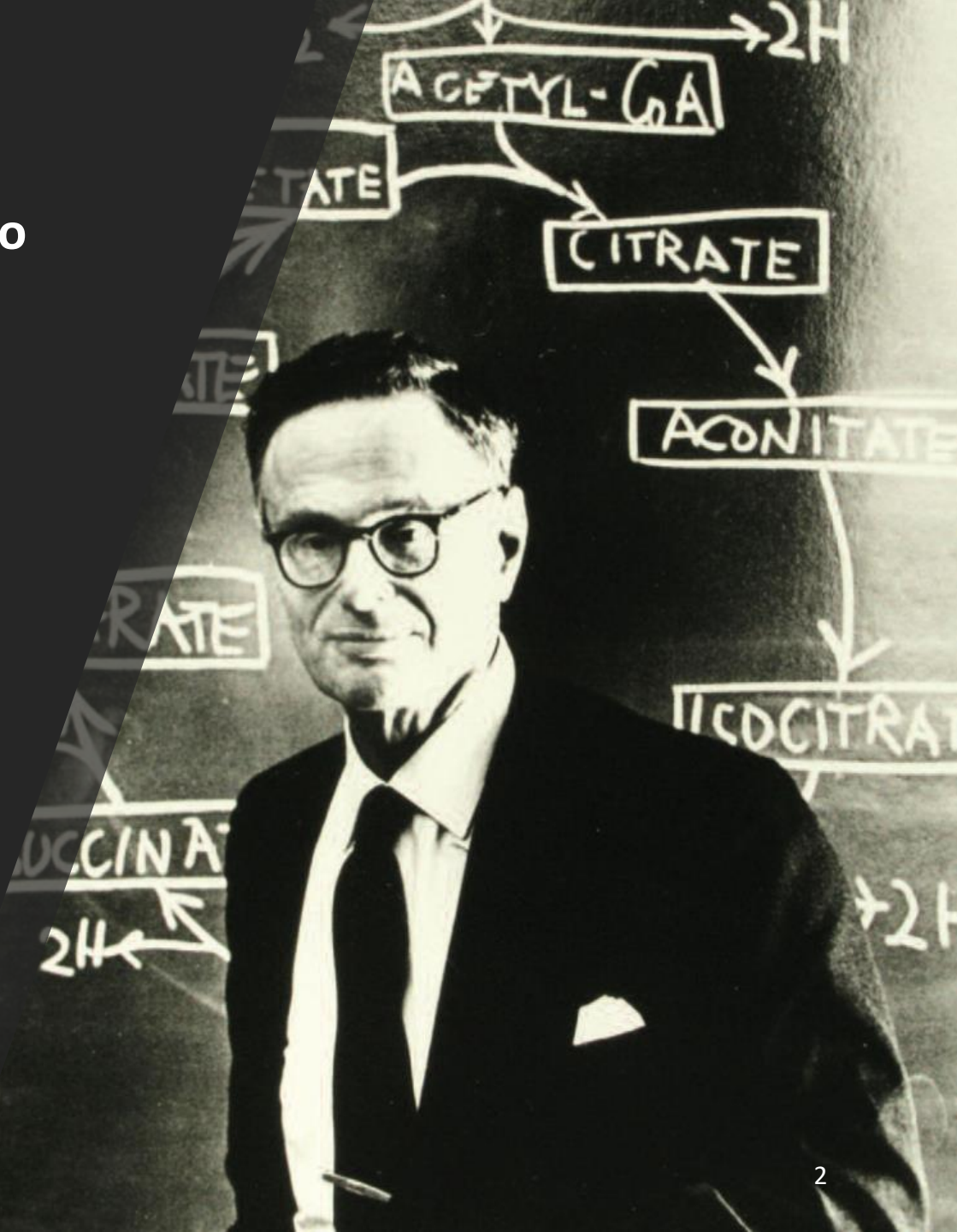
- la glicolisi,
 - il ciclo dell'acido citrico,
 - il trasporto degli elettroni,
 - la fosforilazione ossidativa
-



Ciclo di Krebs

Ciclo dell'acido citrico o Ciclo degli acidi tricarbossilici

- Genera numerosi precursori biosintetici
- Responsabile dell'ossidazione di carboidrati, proteine e acidi grassi



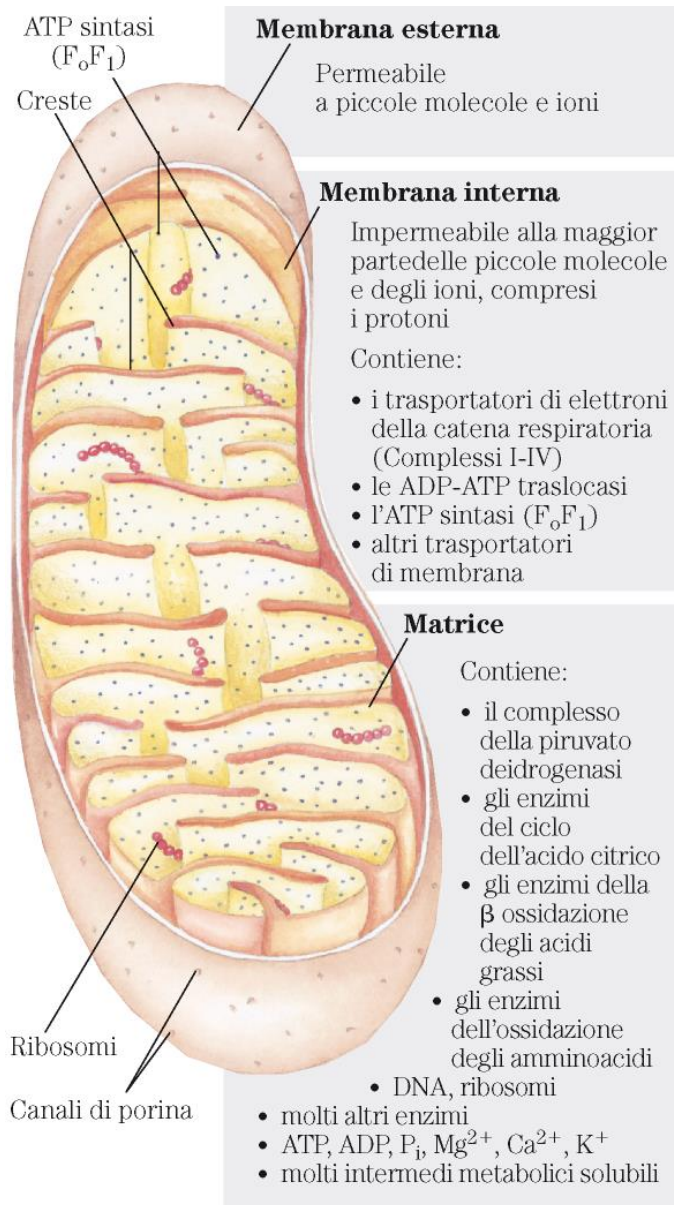
Struttura di un mitocondrio

Ha una membrana interna e una esterna.

La regione racchiusa dalla membrana interna è definita matrice mitocondriale e tra le membrane interna ed esterna c'è lo spazio intermembrana.

La membrana interna è una barriera rigida e pochi composti possono attraversare tale barriera senza una specifica proteina di trasporto.

Le reazioni del ciclo di Krebs avvengono nella matrice a parte quella in cui l'accettore intermedio degli elettroni è il FAD dove l'enzima che catalizza la reazione è componente della catena di trasporto degli elettroni

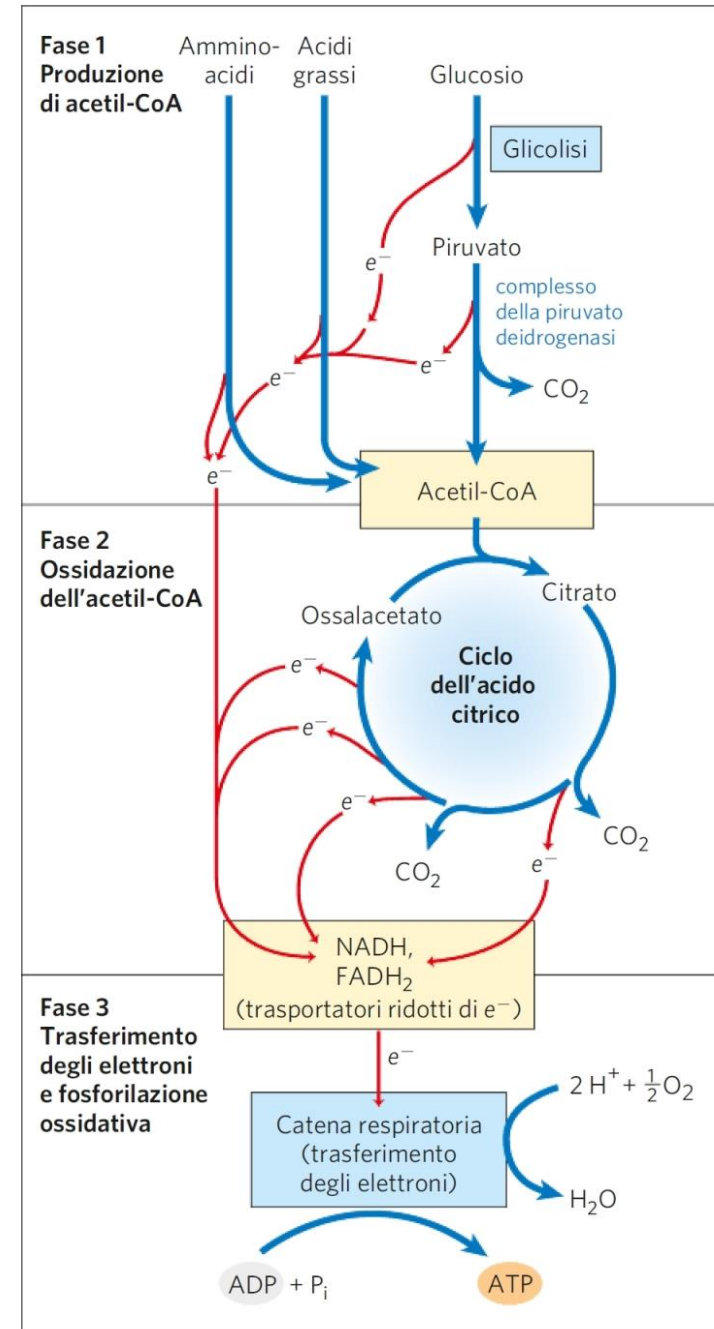


Respirazione cellulare

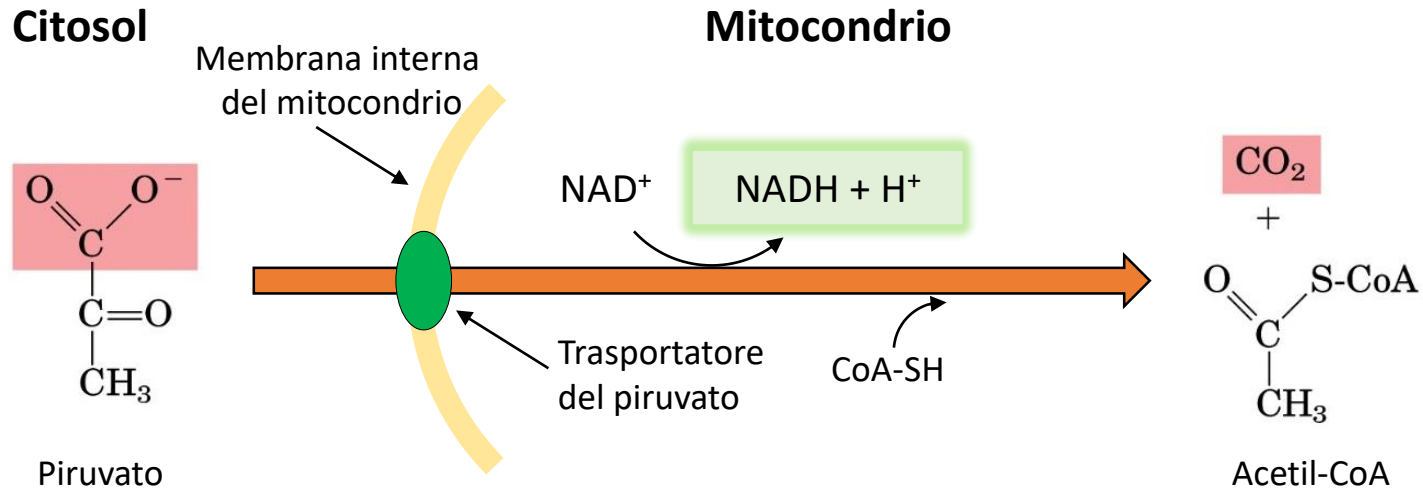
FASE 1: l'ossidazione degli acidi grassi, del glucosio e di alcuni aminoacidi produce Acetil-CoA;

FASE 2: l'ossidazione dei gruppi acetilici nel ciclo dell'acido 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.



In condizioni aerobiche il piruvato prodotto dalla glicolisi viene ulteriormente ossidato dando come prodotti finali $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.



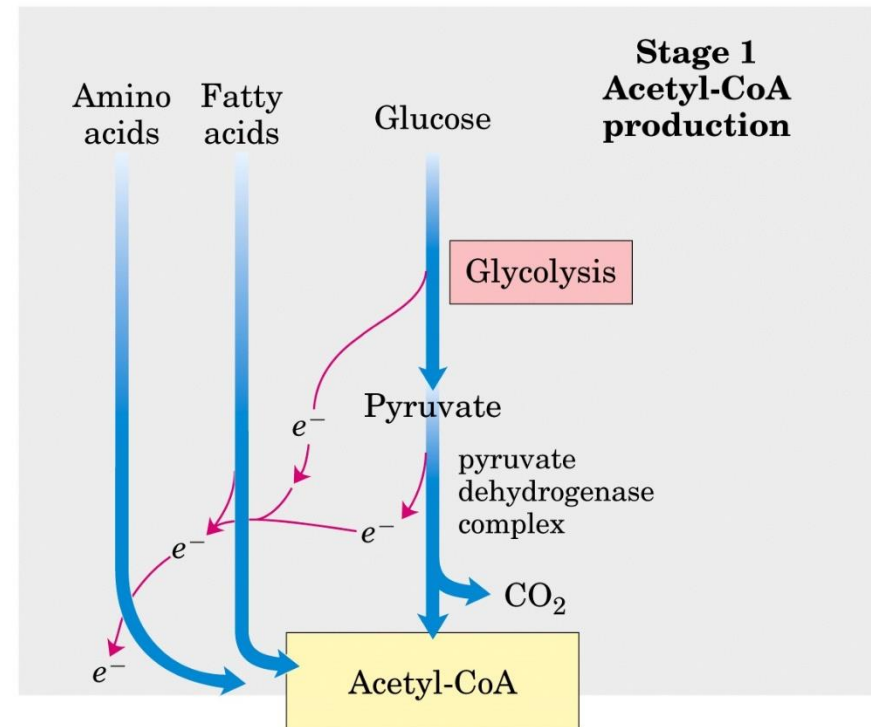
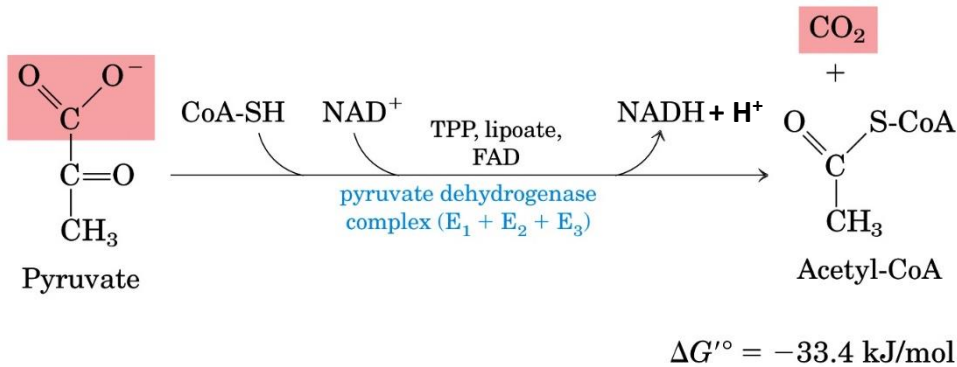
Si sposta dal citosol nel mitocondrio (diffonde attraverso delle grandi aperture nella membrana mitocondriale esterna), poi viene trasportato attraverso la membrana interna dal trasportatore del piruvato mitocondriale (MPC) un trasportatore passivo specifico per il piruvato. Nelle cellule il piruvato nella matrice mitocondriale viene ossidato ad acetil-CoA e CO_2 dal complesso enzimatico della piruvato deidrogenasi.

METABOLISMO OSSIDATIVO

1ª parte

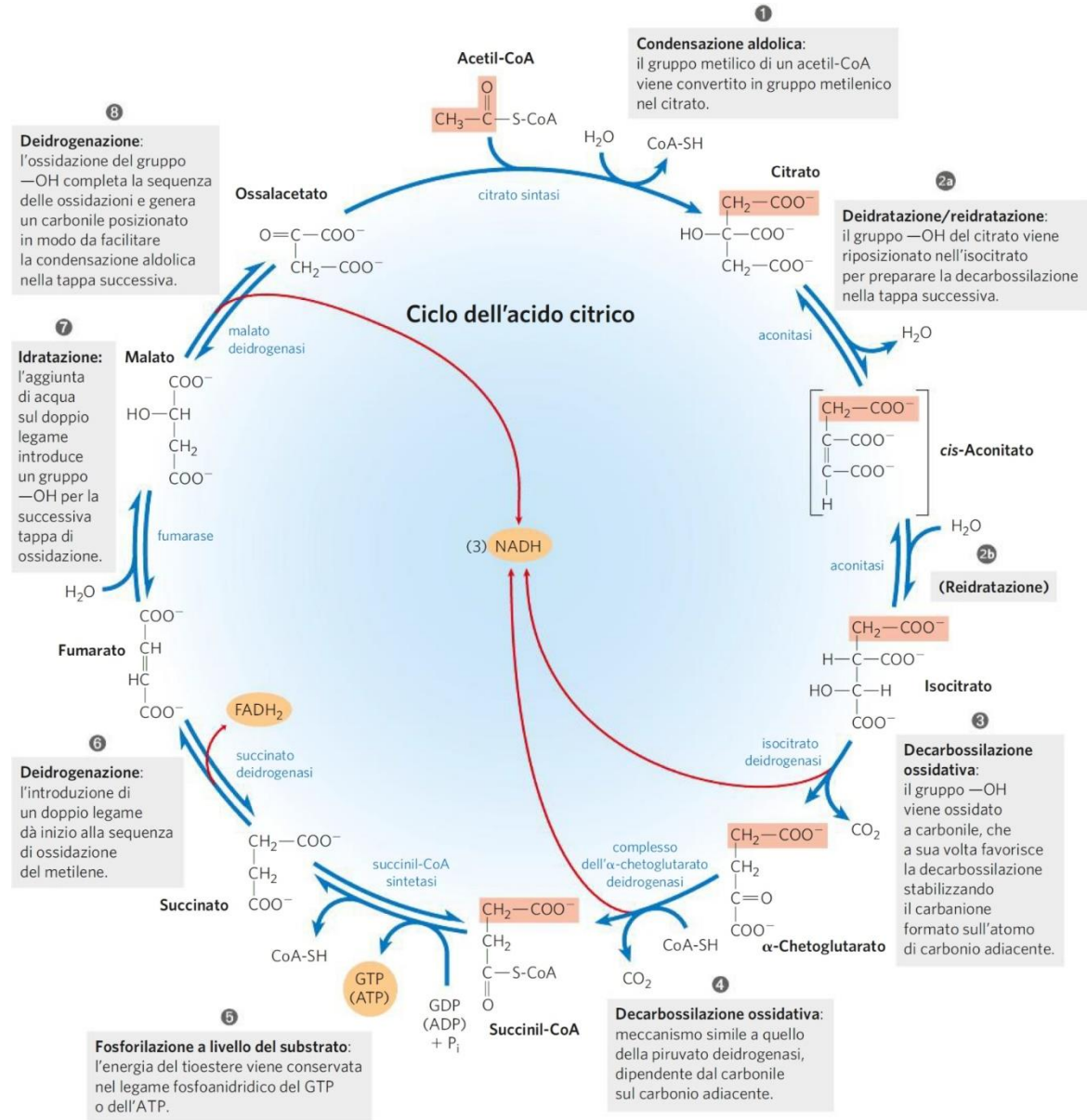
Le sostanze nutrienti: a. grassi, glucosio e qualche amminoacido, sono ossidate fino a formare frammenti a due atomi di carbonio: gruppo acetilico

Processi molecolari in cui è coinvolto il consumo di ossigeno e la formazione di CO₂ da parte della cellula

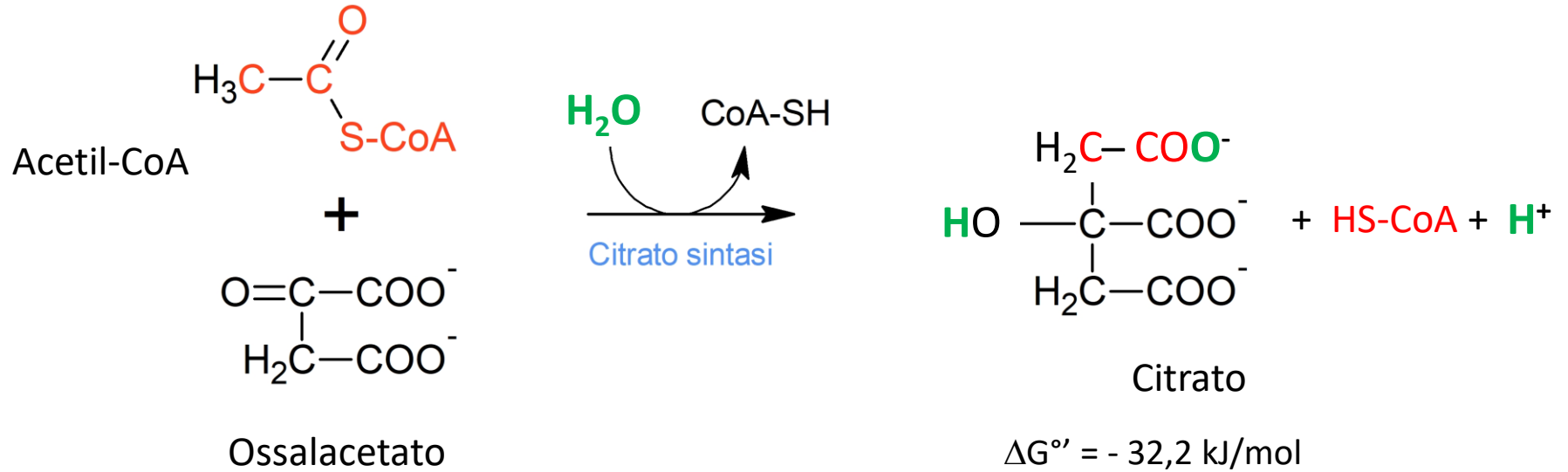


Schema del ciclo di Krebs

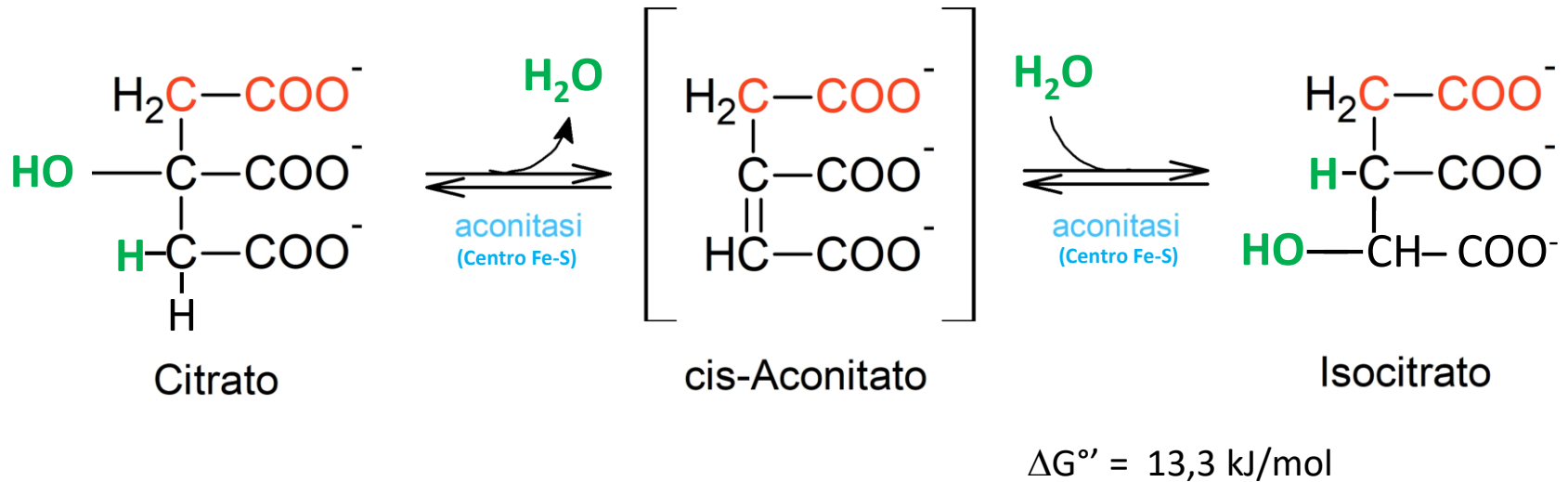
- L'Acetil CoA dona il suo gruppo acetilico all'ossalacetato formando il citrato che viene poi trasformato in isocitrato. L'isocitrato viene deidrogenato con perdita di CO₂ dando origine all'α-chetoglutarato. Quest'ultimo perde una molecola di CO₂ per formare succinato. Il succinato viene convertito in ossalacetato in tre tappe ed è di nuovo pronto a reagire con un'altra molecola di Acetil CoA per iniziare un secondo ciclo.
- In ogni giro entra un gruppo acetilico sotto forma di Acetil CoA ed escono due molecole di CO₂.
- 4 delle 8 tappe di questo processo sono ossidazioni in cui l'energia viene conservata mediante la formazione di NADH e FADH₂.



Tappa 1 l'ossalacetato condensa con l'acetil CoA per formare citrato

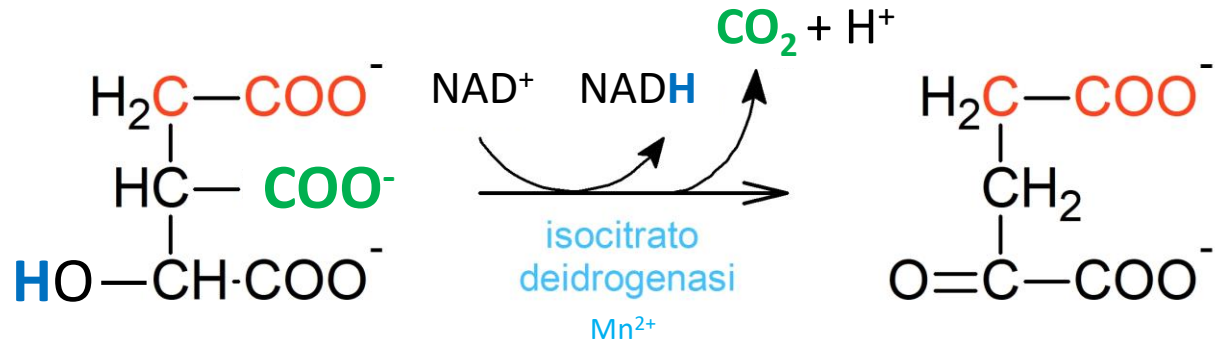


Tappa 2 Il citrato viene isomerizzato a isocitrato



Tappa 3

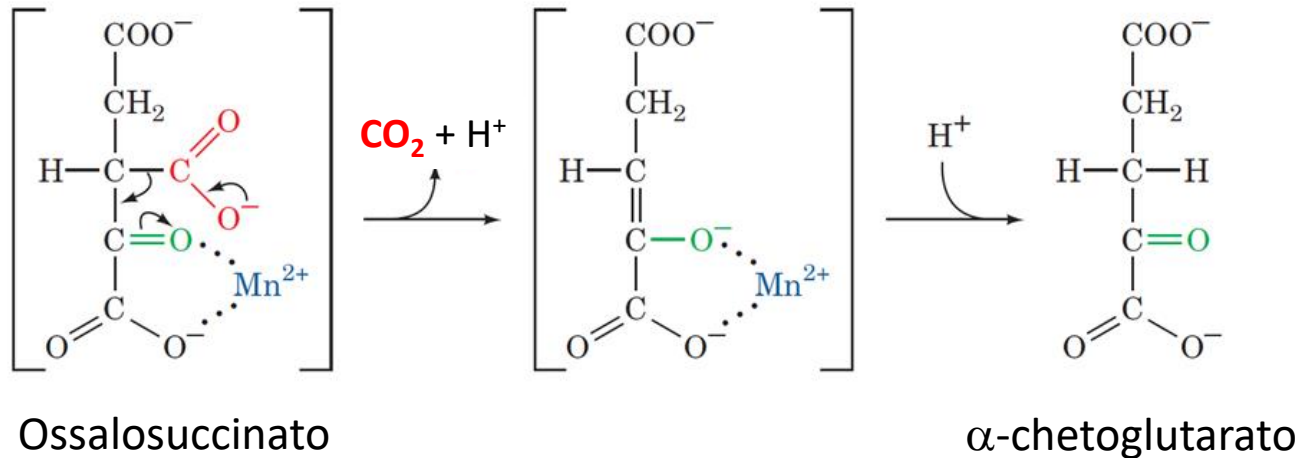
L'isocitrato viene ossidato e decarbossilato ad α -chetogluturato



Isocitrato

α -chetogluturato

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

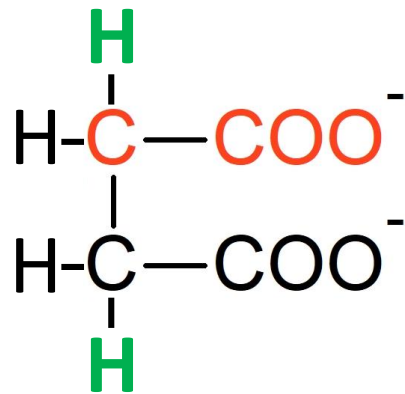


Ossalosuccinato

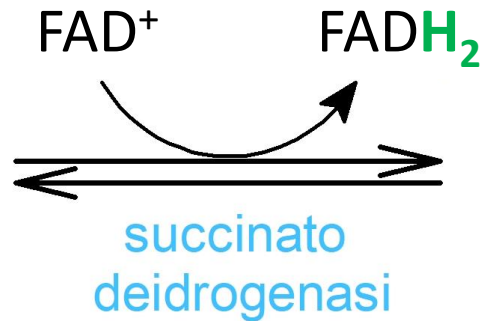
α -chetogluturato

Tappa 6

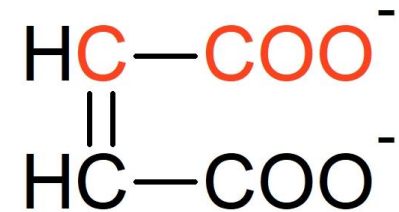
Rigenerazione dell'ossalacetato per ossidazione del succinato



succinato



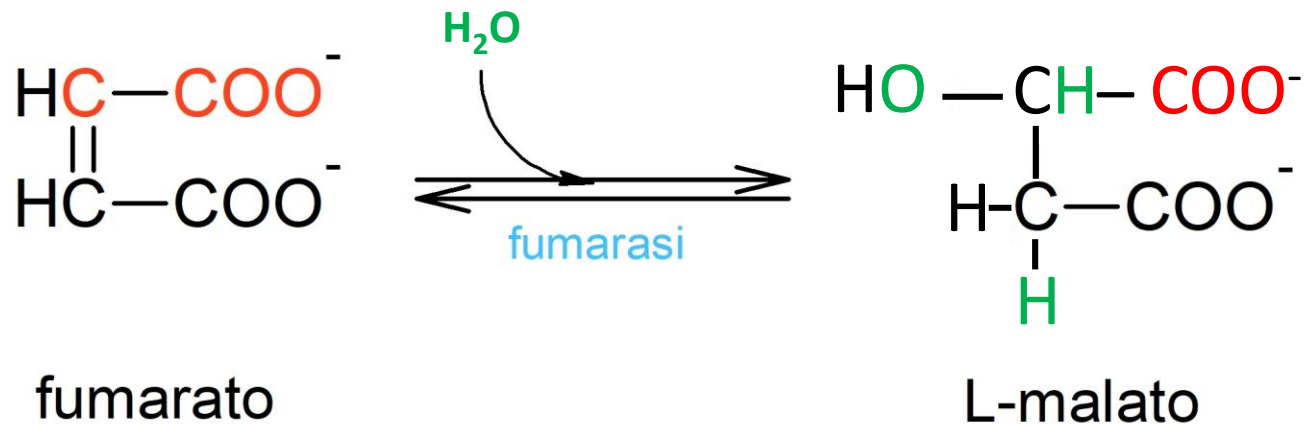
Flavoproteina con tre centri Fe-S



fumarato

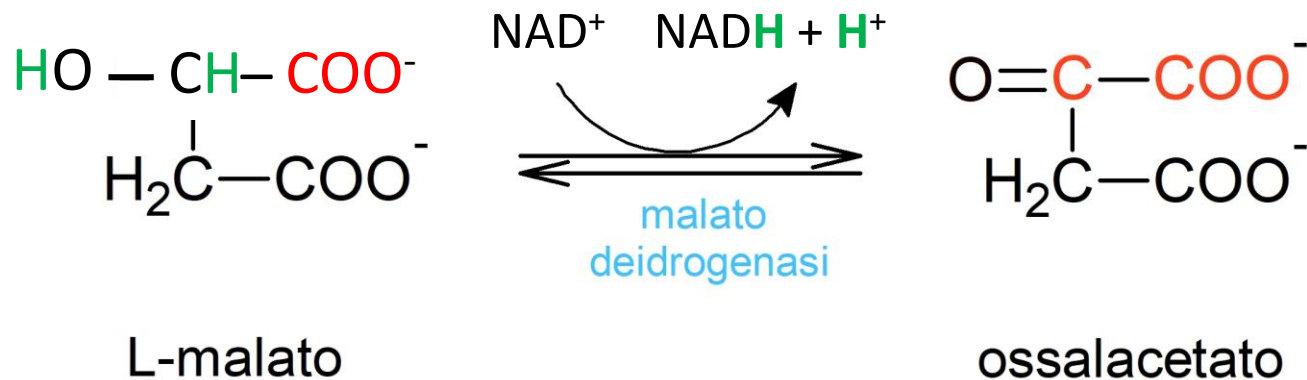
$$\Delta G' = 0 \text{ kJ/mol}$$

Tappa 7 La tappa successiva è l'idratazione del fumarato per formare L-malato



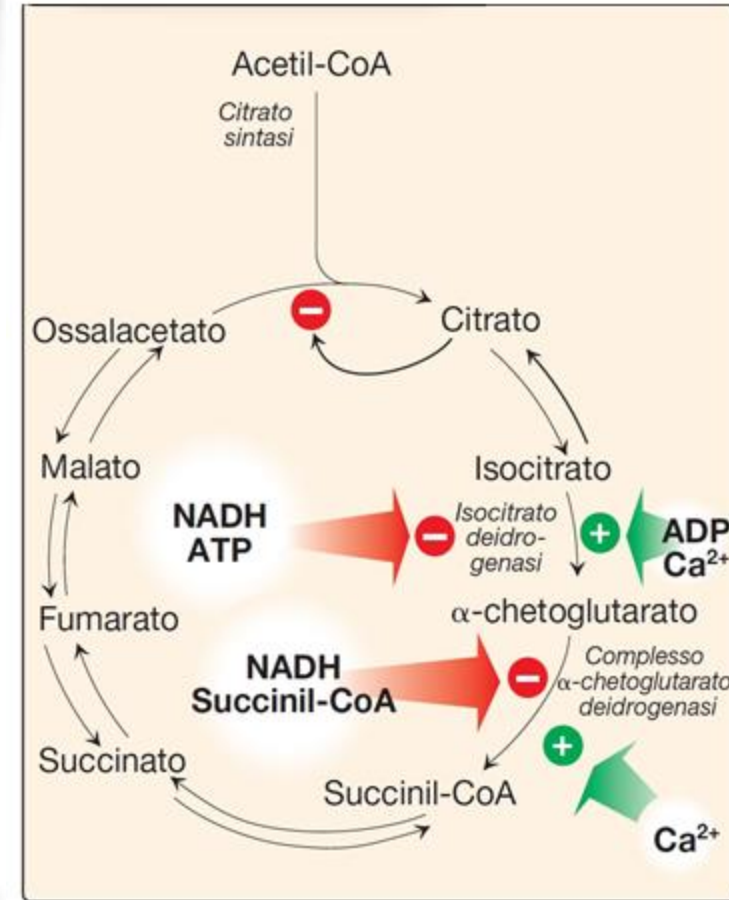
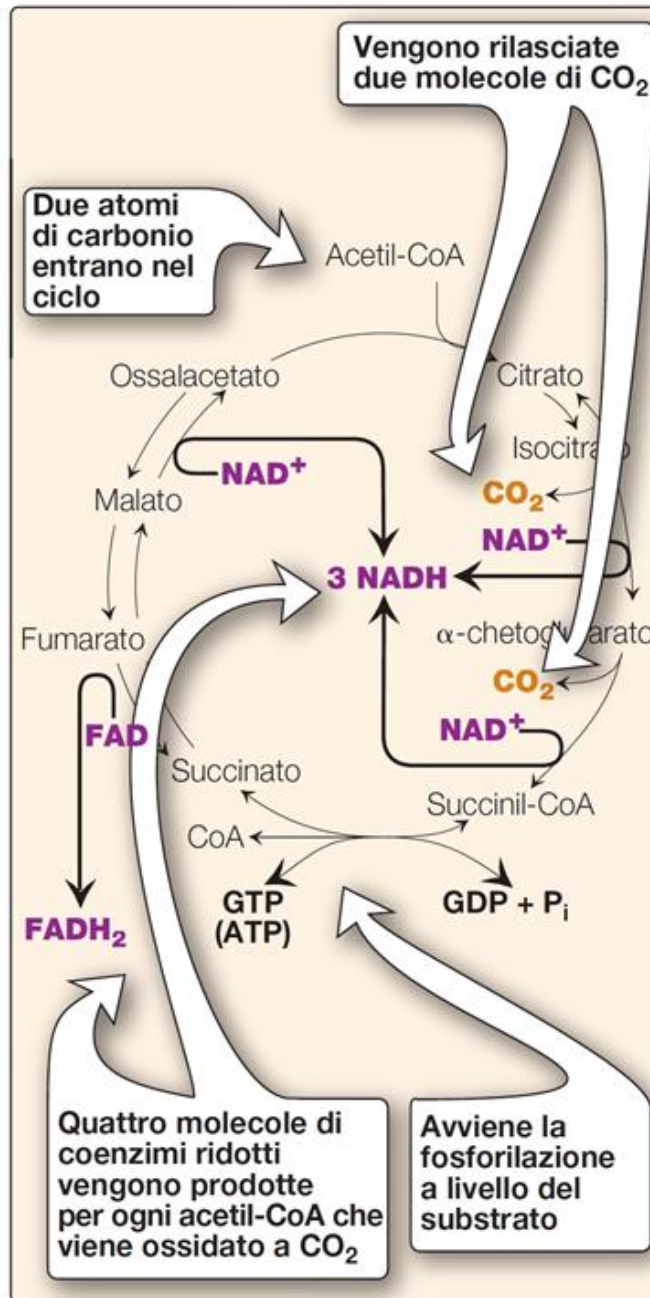
$$\Delta G^{\circ} = -3,8 \text{ kJ/mol}$$

Tappa 8 Nell'ultima tappa L-malato viene ossidato ad ossalacetato



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

Prodotti ottenuti da un giro completo del ciclo dell'acido citrico

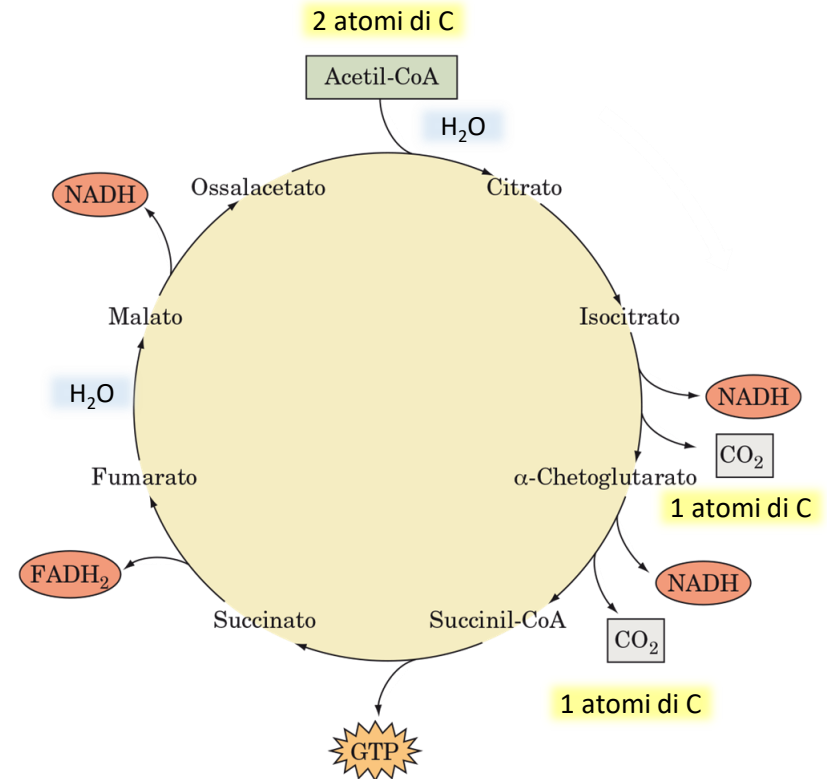


3 molecole di NADH
1 molecola FADH₂
1 molecola di GTP (o ATP)

Stechiometria del ciclo dell'acido citrico



- Nella condensazione dell'Acetil-CoA con l'ossalacetato entrano nel ciclo 2 atomi di carbonio e nelle successive decarbossilazioni catalizzate dall'isocitrato deidrogenasi e dall' α -chetoglutarato deidrogenasi escono dal ciclo 2 atomi di carbonio sotto forma di CO_2
- 4 coppie di elettroni lasciano il ciclo nelle 4 reazioni di ossidazione.
- Viene generato un legame fosforico ad alta energia sotto forma di GTP
- Vengono consumate 2 molecole di H_2O

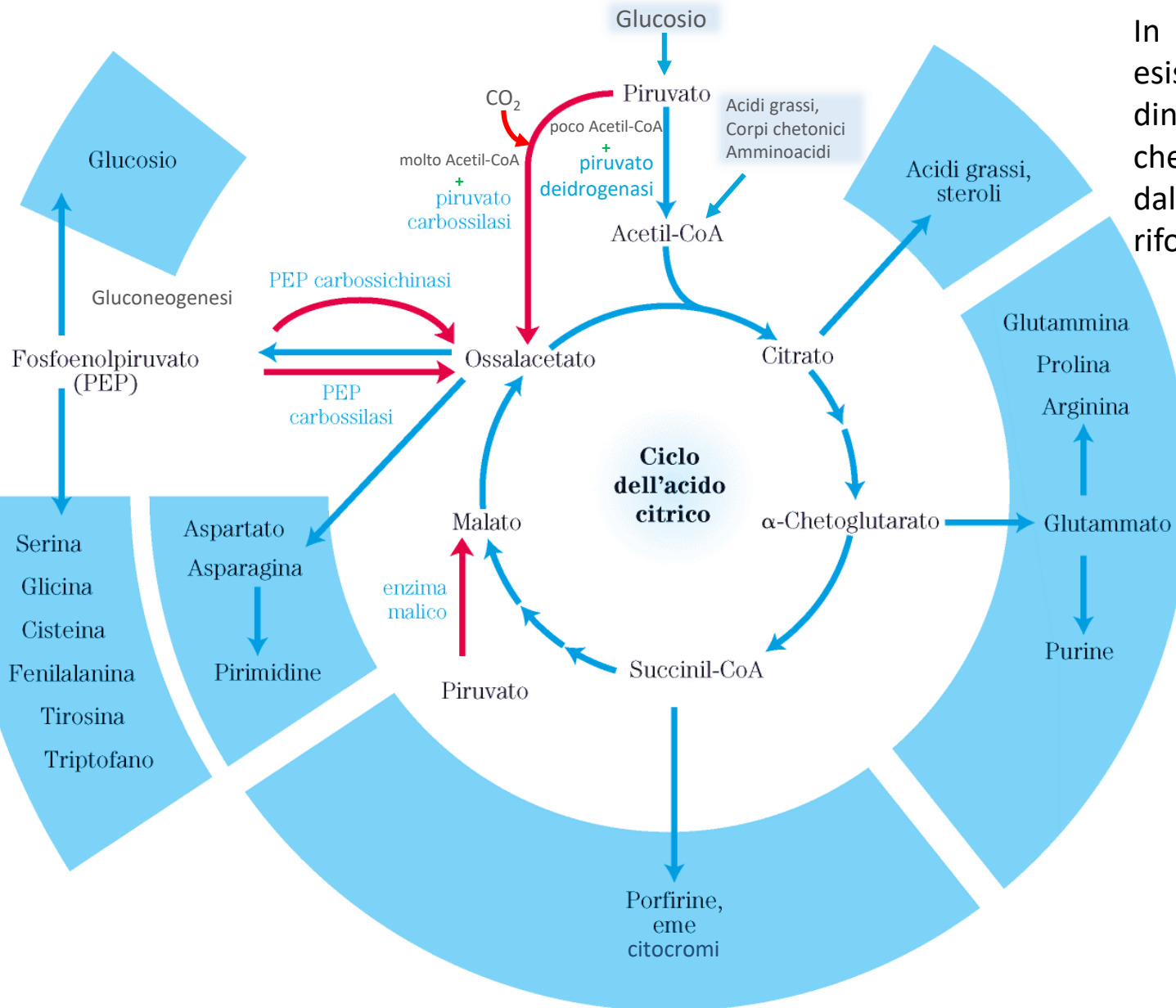


Numero di molecole di ATP prodotto in seguito all'ossidazione di una molecola di acetil-CoA

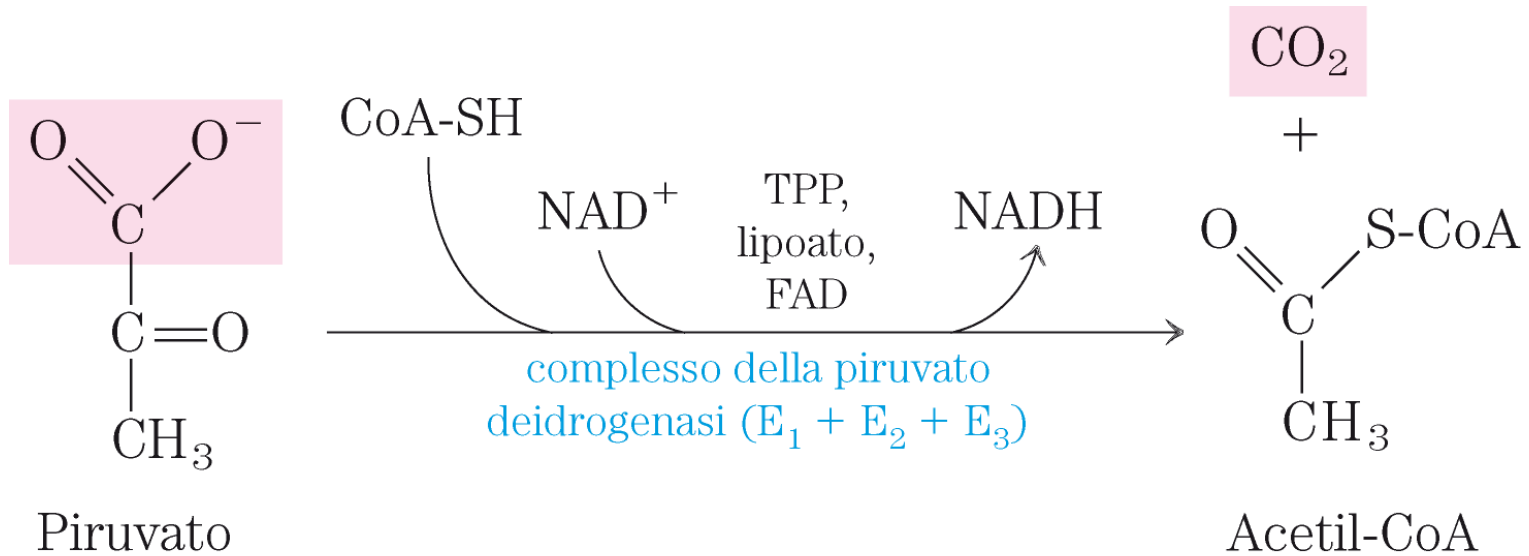
Reazioni che producono energia	Numero di molecole di ATP prodotte
$3 \text{ NADH} \longrightarrow 3 \text{ NAD}^+$	7,5
$\text{FADH}_2 \longrightarrow \text{FAD}$	1,5
$\text{GDP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{GTP}$	1
	<hr/>
	10 ATP/acetil-CoA ossidato

Ruolo del ciclo dell'acido citrico: è una via anfibolica, non solo agisce nel catabolismo ossidativo dei carboidrati, degli acidi grassi e degli amminoacidi ma produce precursori per molte vie biosintetiche.

In condizioni normali esiste un equilibrio dinamico tra le reazioni che rimuovono intermedi dal ciclo e quelle che lo riforniscono.



Quanti enzimi sono necessari per convertire il piruvato in acetil-CoA?

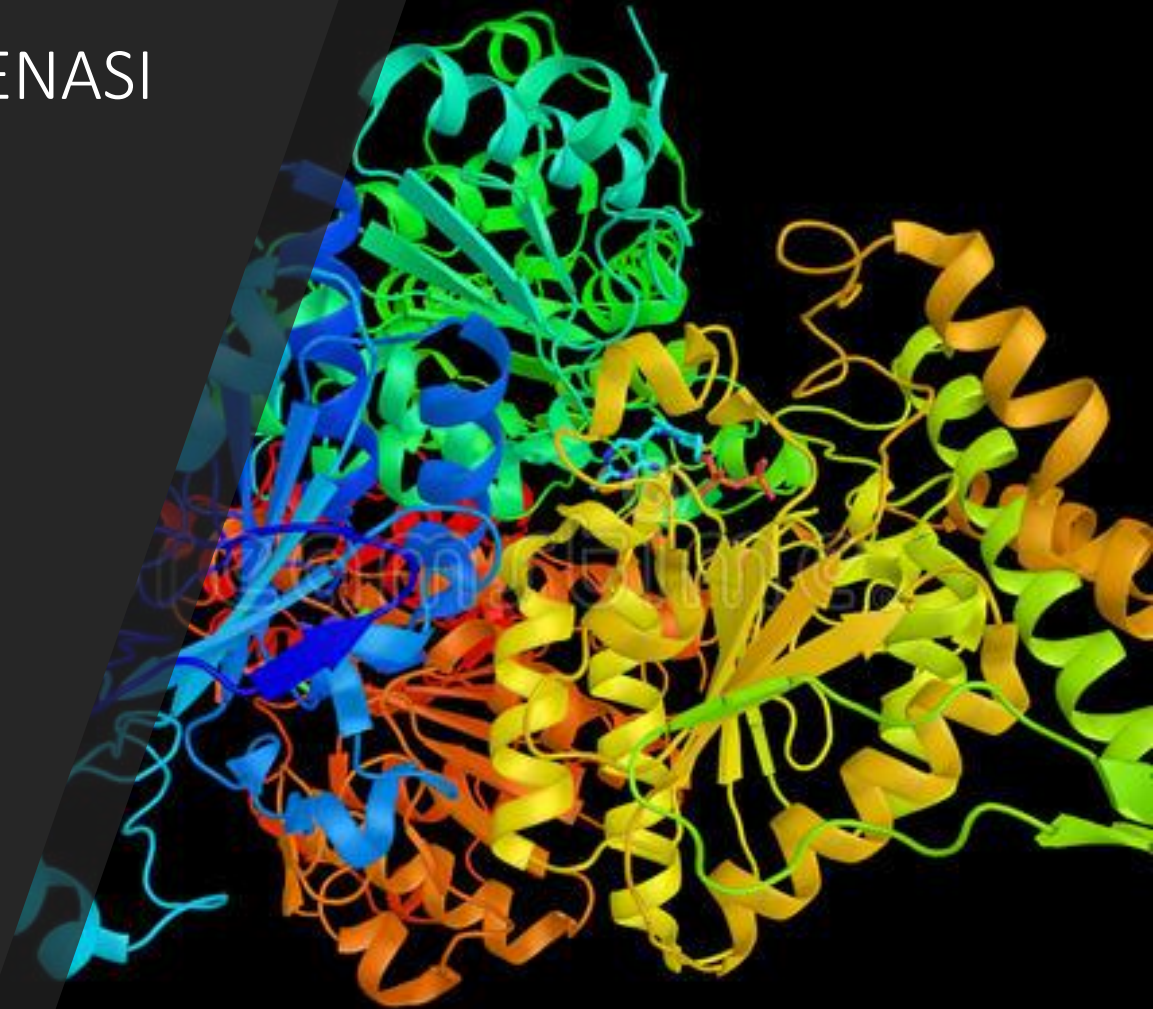


$$\Delta G'^{\circ} = -33,4 \text{ kJ/mole}$$

COMPLESSO DELLA PIRUVATO DEIDROGENASI

- *Costituito da 3 enzimi:*
- **PIRUVATO DEIDROGENASI (E_1)**
- *Piruvato deidrogenasi chinasi (E_1)*
- *Piruvato deidrogenasi fosfatasi (E_1)*
- **DIIDROLIPOIL TRANSACETILASI (E_2)**
- **DIIDROLIPOIL DEIDROGENASI (E_3)**

- *5 gruppi prostetici:*
- *tiamina pirofosfato (TPP)*
- *flavin adenin dinucleotide (FAD)*
- *coenzima A (CoA-SH)*
- *nicotinamide adenin dinucleotide (NAD)*
- *ACIDO LIPOICO (lipoammide).*



Il nucleo è rappresentato dalla diidrolipoil transacetilasi, in blue (E2).

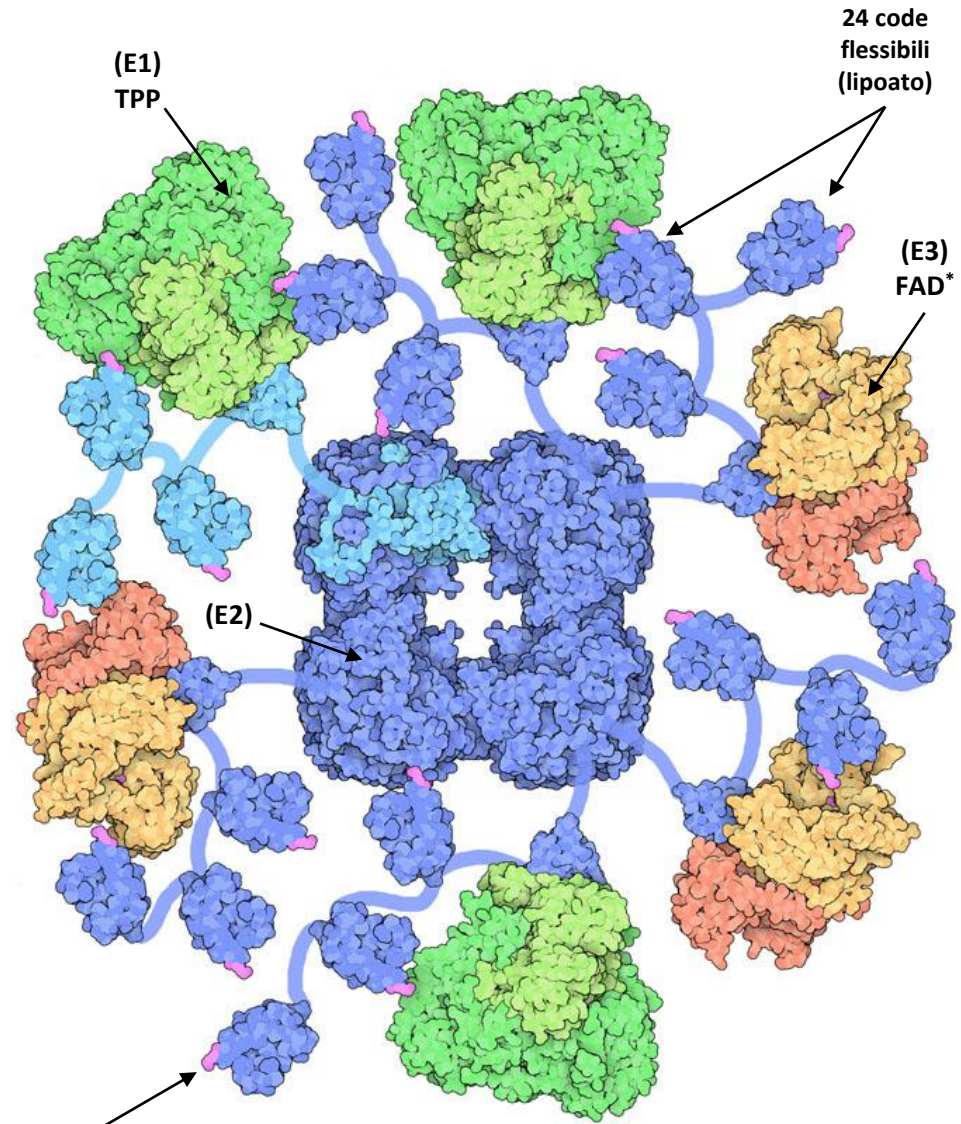
Il legame del lipoato all'estremità della catena laterale di un residuo di lisina di E2 produce il gruppo lipoil-lisina. Nel complesso vi sono anche coppie di piruvato deidrogenasi, in verde (E1) legate al nucleo di E2.

Il complesso è completato da coppie di diidrolipoil deidrogenasi, in arancione (E3) ognuna composta da due subunità identiche.

La piruvato deidrogenasi ha legato a sé la TPP mentre la diidrolipoil deidrogenasi contiene FAD.

Fanno parte del complesso anche due proteine regolatrici (la piruvato deidrogenasi chinasi e la piruvato deidrogenasi fosfatasi)

Il complesso della piruvato deidrogenasi



Lisina dove si legherà l'acido lipoico (rosa) che trasporta le molecole parzialmente reagite da E1 ad E2 ed infine in E3.

Il nucleo diidrolipoil transacetilasi (E_2) presenta 3 domini funzionali distinti:

- Dominio lipoilico amminoterminale (che contiene uno o più residui di lipoil-lisina);
- Dominio centrale di legame ad E_1 ed E_3
- Dominio interno aciltrasferasico che contiene il sito attivo.

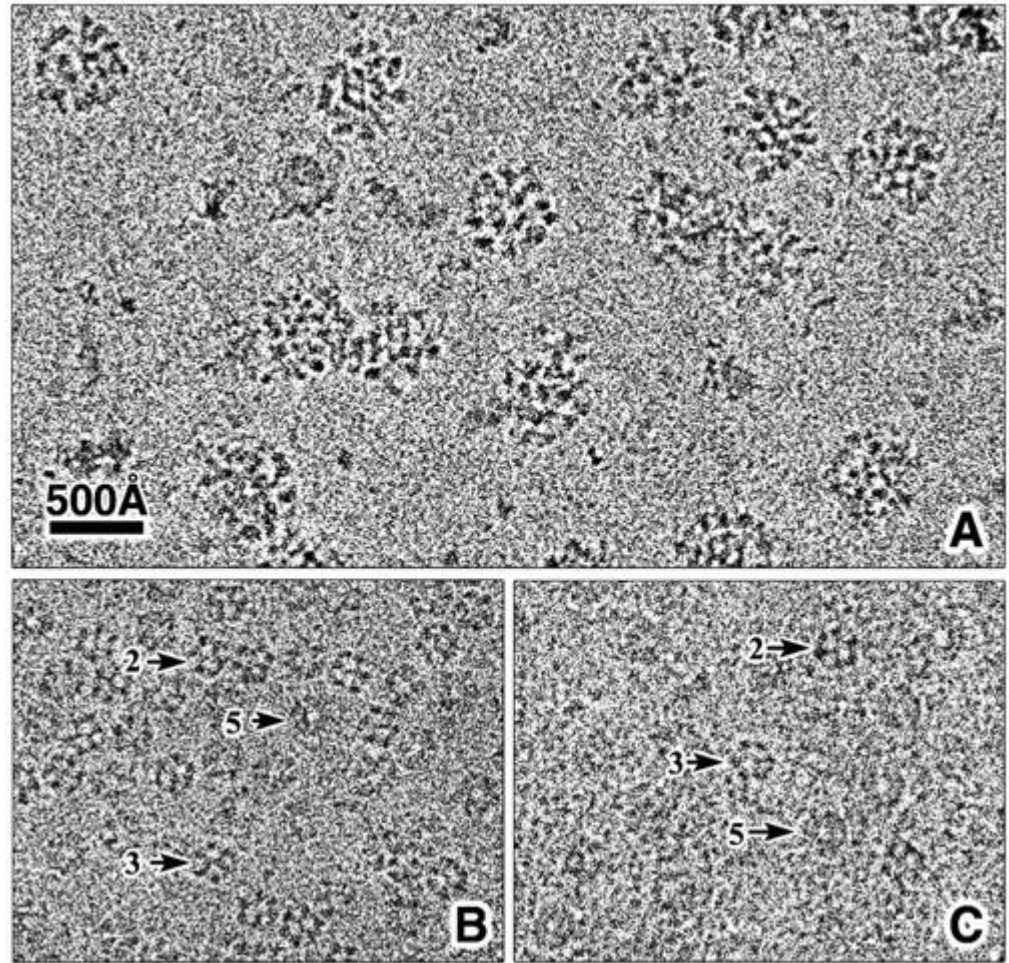


Immagine (Cryo-Electron Microscopy). PDC di bovino (A) e *S. cerevisiae* tE2, residui 221–454 (B) ed E2 (C).

Il sito attivo di E_1 ha la TPP

Al sito attivo di E_3 è legato il FAD.

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

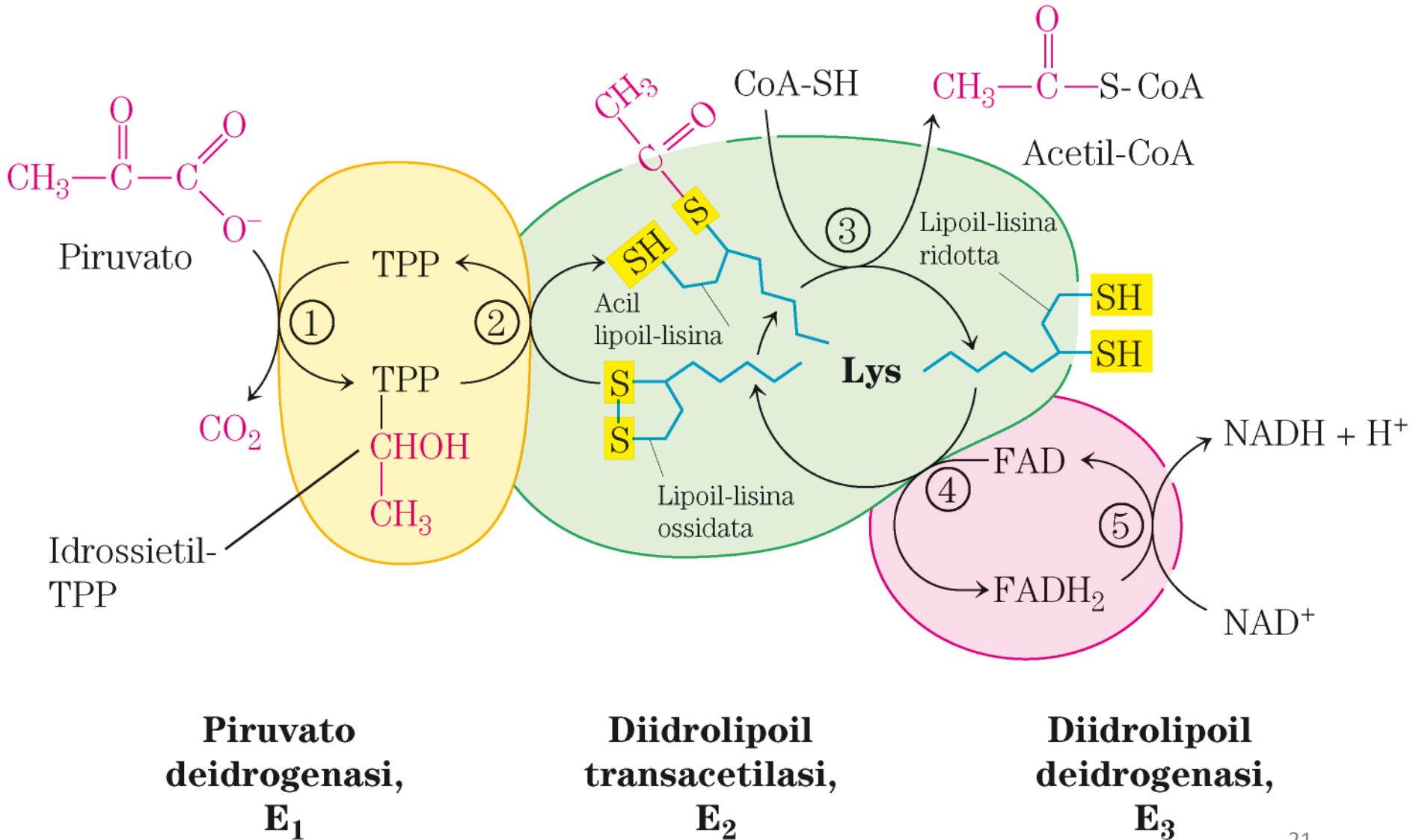


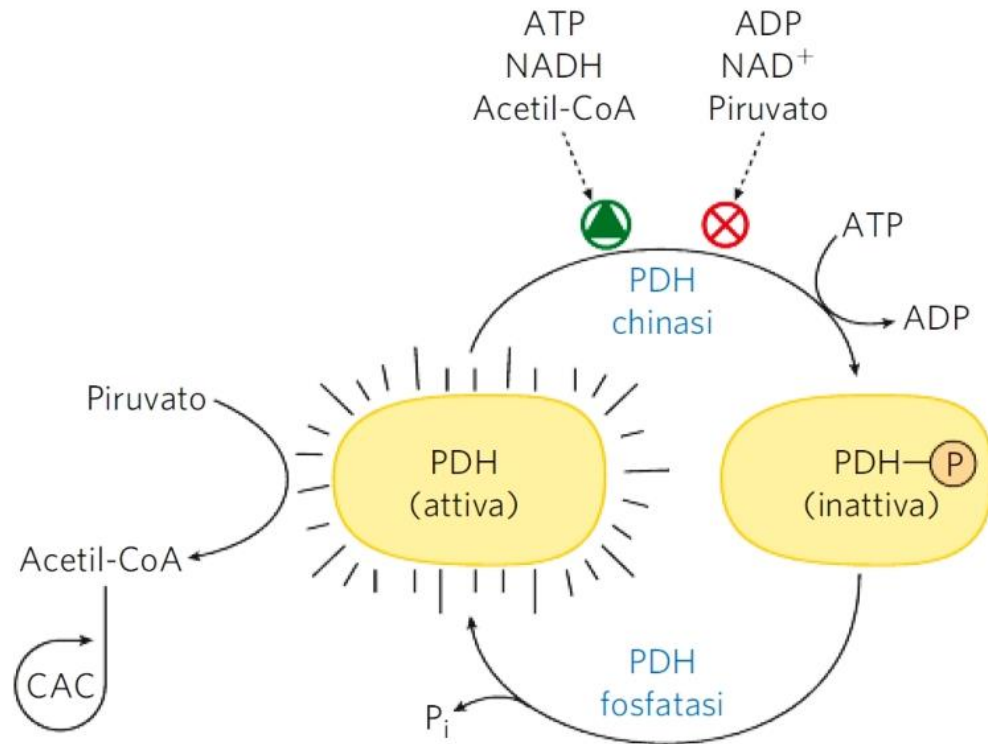
TABLE 17-1 The Coenzymes and Prosthetic Groups of Pyruvate Dehydrogenase

Cofactor	Location	Function
Thiamine pyrophosphate (TPP)	Bound to E1	Decarboxylates pyruvate, yielding a hydroxyethyl-TPP carbanion
Lipoic acid	Covalently linked to a Lys on E2 (lipoamide)	Accepts the hydroxyethyl carbanion from TPP as an acetyl group
Coenzyme A (CoA)	Substrate for E2	Accepts the acetyl group from lipoamide
Flavin adenine dinucleotide (FAD)	Bound to E3	Reduced by lipoamide
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD ⁺)	Substrate for E3	Reduced by FADH ₂

Regolazione della Piruvato deidrogenasi (E_1): *Piruvato deidrogenasi chinasi* e *Piruvato deidrogenasi fosfatasi*

Il complesso della piruvato deidrogenasi è fortemente inibito dall'ATP, dall'acetil-CoA e dal NADH. L'inibizione è una fosforilazione reversibile di uno specifico residuo di Ser, su una delle due subunità E1, da parte della PDH chinasi, mentre la piruvato deidrogenasi fosfatasi rimuove i gruppi fosforici. Entrambi gli enzimi sono associati al complesso della piruvato deidrogenasi (E_1).

La PDH chinasi è attivata allostericamente dai prodotti del complesso PDH (ATP, NADH e acetil-CoA) ed è inibita dai substrati del complesso PDH (ADP, NAD^+ e piruvato). Il complesso contiene anche la PDH fosfatasi, che elimina la inibizione mediata dalla PDH chinasi. Insieme la chinasi e la fosfatasi esercitano un forte controllo sull'ingresso di acetil CoA dal piruvato nel ciclo dell'acido citrico. La piruvato deidrogenasi chinasi è attivata allostericamente dall'ATP, quando i livelli di sono elevati il complesso viene inattivato. Quando i livelli di ATP diminuiscono, l'attività della chinasi si spegne e la piruvato deidrogenasi fosfatasi rimuove i gruppi fosforici da E_1 , riattivando il complesso.

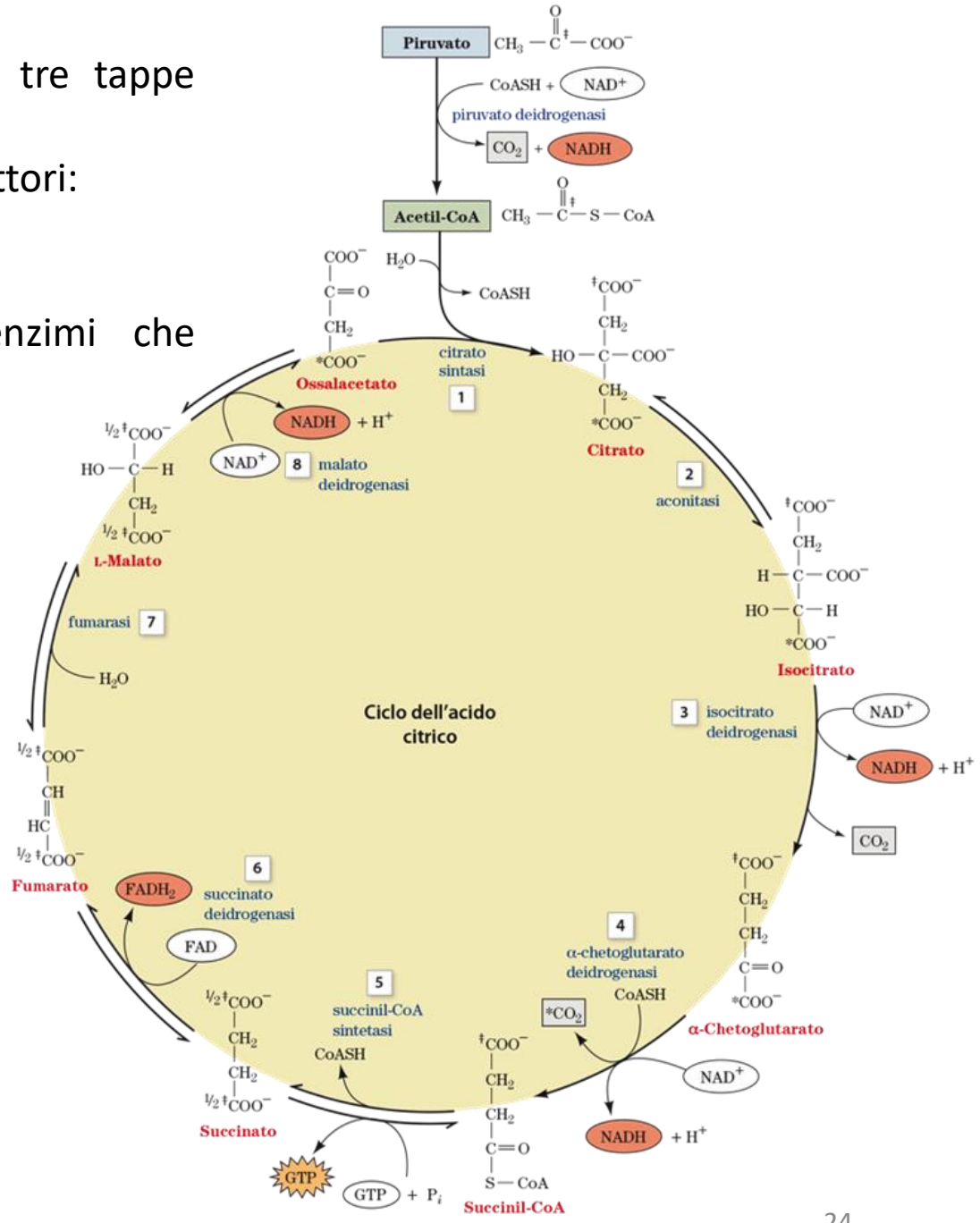


Il ciclo è regolato a livello delle sue tre tappe esoergoniche

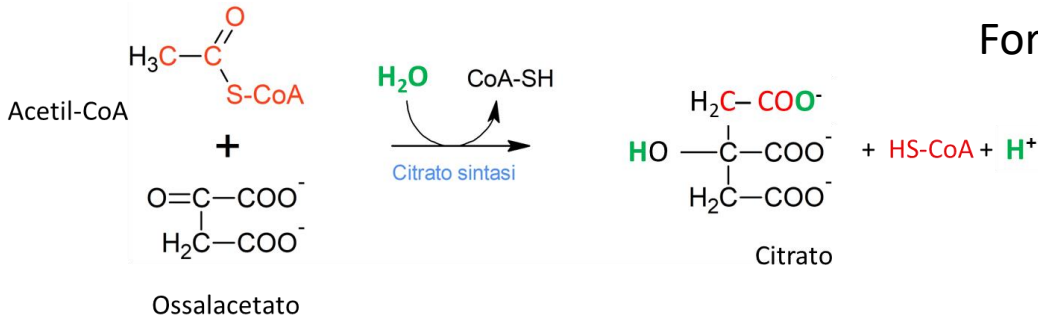
La velocità del flusso è regolata da tre fattori:

- la biodisponibilità di substrato,
- l'inibizione da accumulo di prodotti,
- l'inibizione a feedback degli enzimi che catalizzano le prime tappe del ciclo

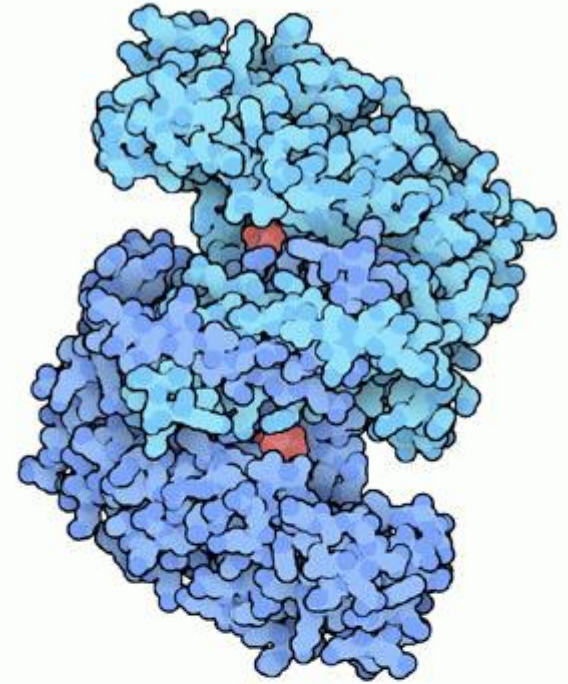
- 1. Citrato sintasi**
- Aconitasi
- 3. Isocitrato deidrogenasi**
- 4. α-chetoglutarato deidrogenasi**
- Succinil-CoA sintetasi
- Succinato deidrogenasi
- Fumarasi
- Malato deidrogenasi



Citrato sintasi



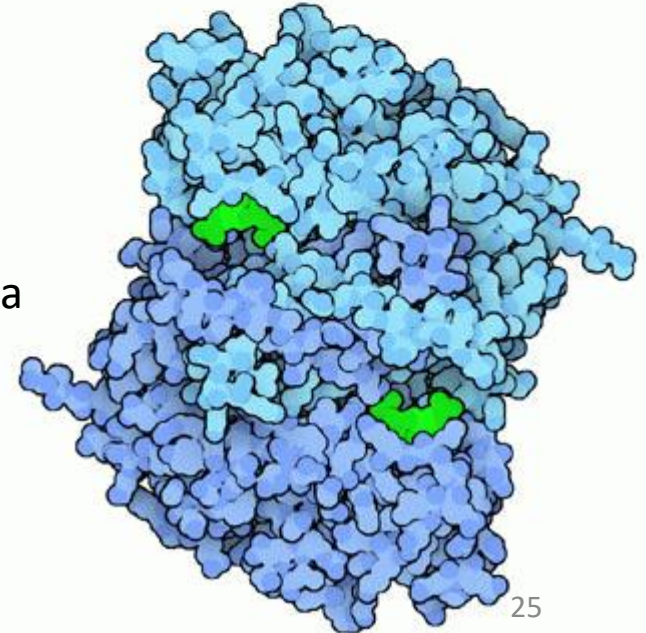
Forma aperta



Catalizza la condensazione dell'**ossalacetato** con l'**acetil-CoA** per formare citrato e CoA.

La citrato sintasi è inibita dal citrato, il suo prodotto. La disponibilità di substrato costituisce un altro mezzo di regolazione dell'enzima.

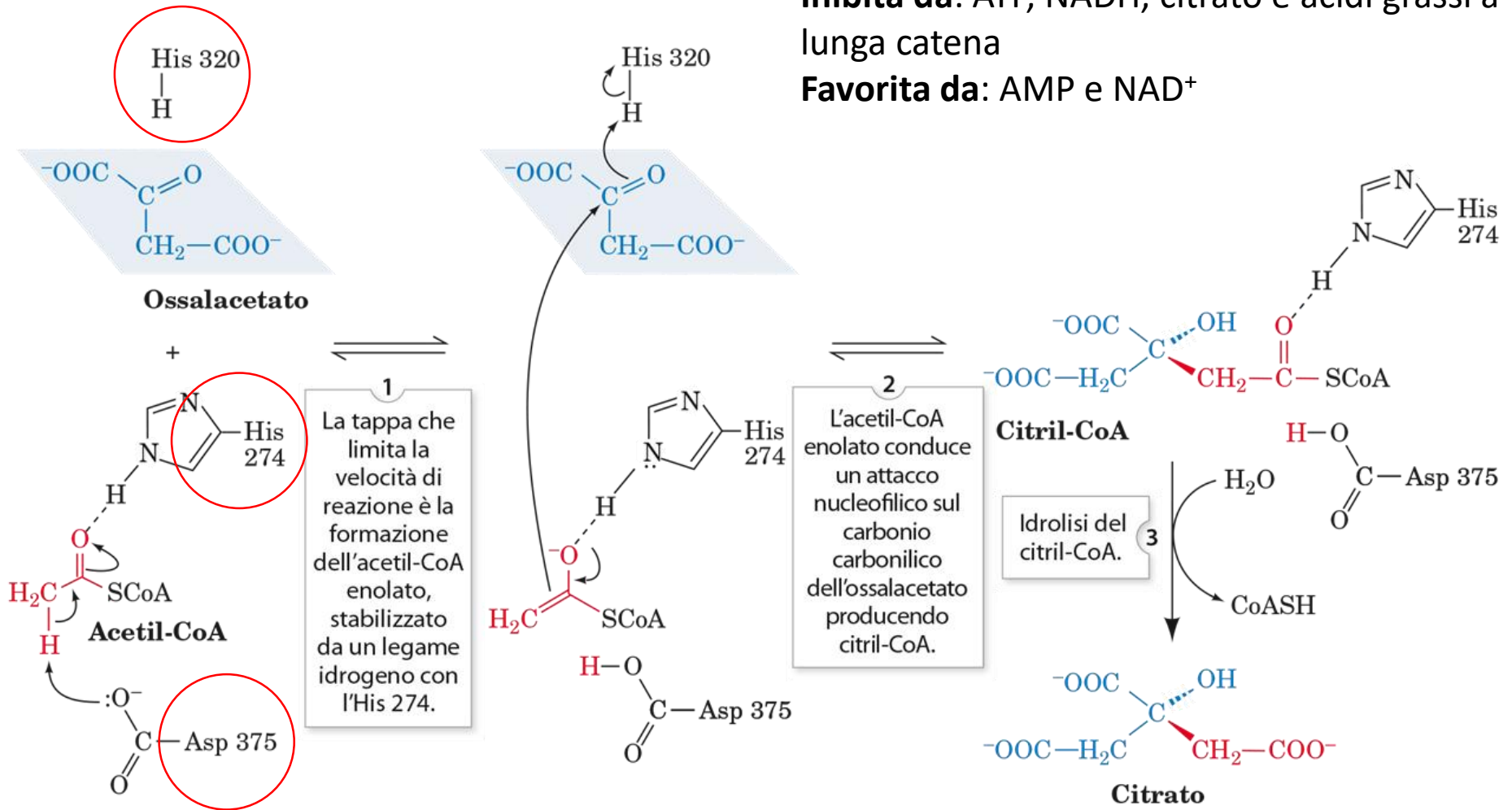
Forma chiusa

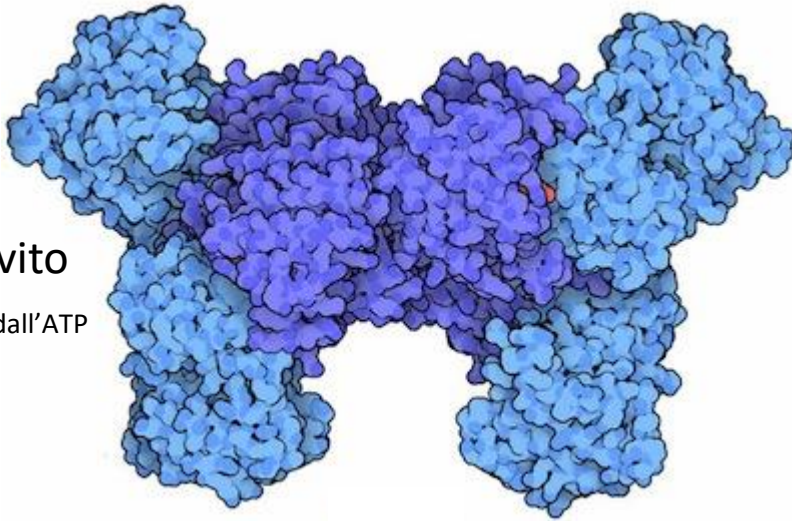


Citrato sintasi:

Inibita da: ATP, NADH, citrato e acidi grassi a lunga catena

Favorita da: AMP e NAD⁺





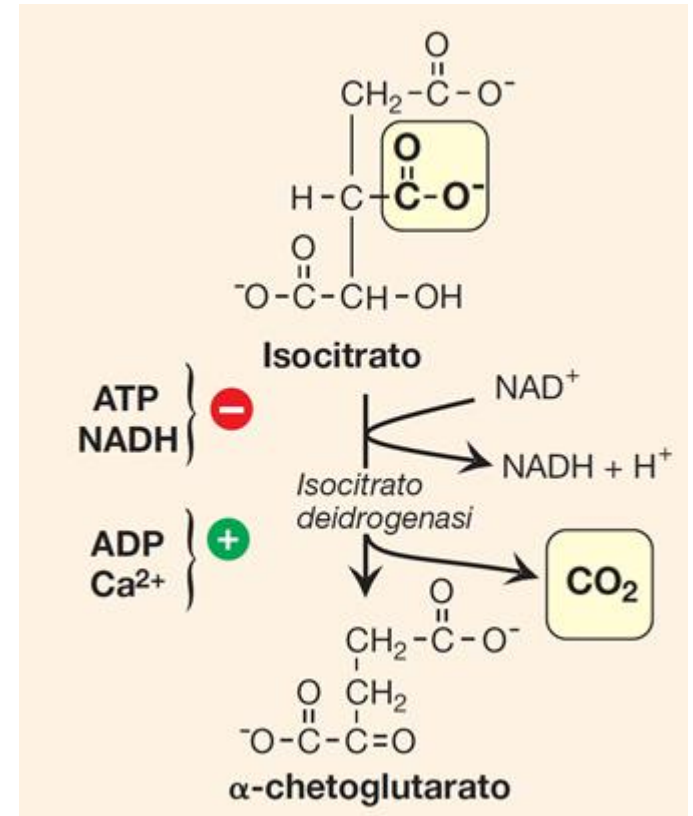
Enzima di lievito

Regolato dall'ADP e dall'ATP nella cellula.

Nei lieviti l'enzima è composto di 4 catene catalitiche (azzurre) che realizzano le reazioni, e 4 catene regolatrici (blu) che attivano o spengono l'enzima a seconda dei livelli di ADP e ATP nella cellula.

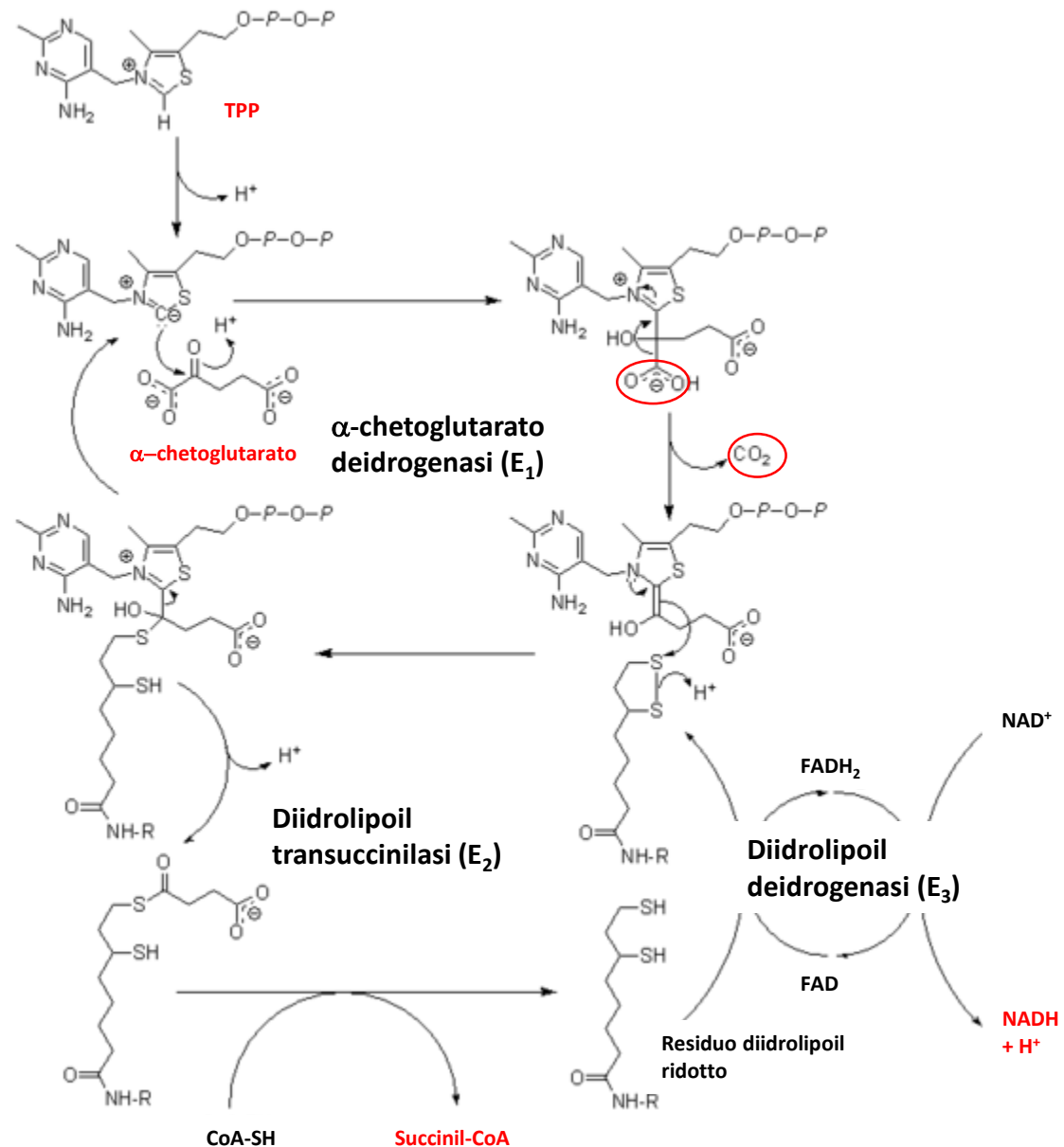
Questa reazione è una delle tappe che limitano la velocità del TCA. L'enzima è soggetto all'attivazione allosterica da parte di ADP (un segnale di basso livello energetico) ed è inibito da ATP e NADH, i cui livelli sono elevati quando la cellula ha riserve energetiche abbondanti.

Isocitrato deidrogenasi



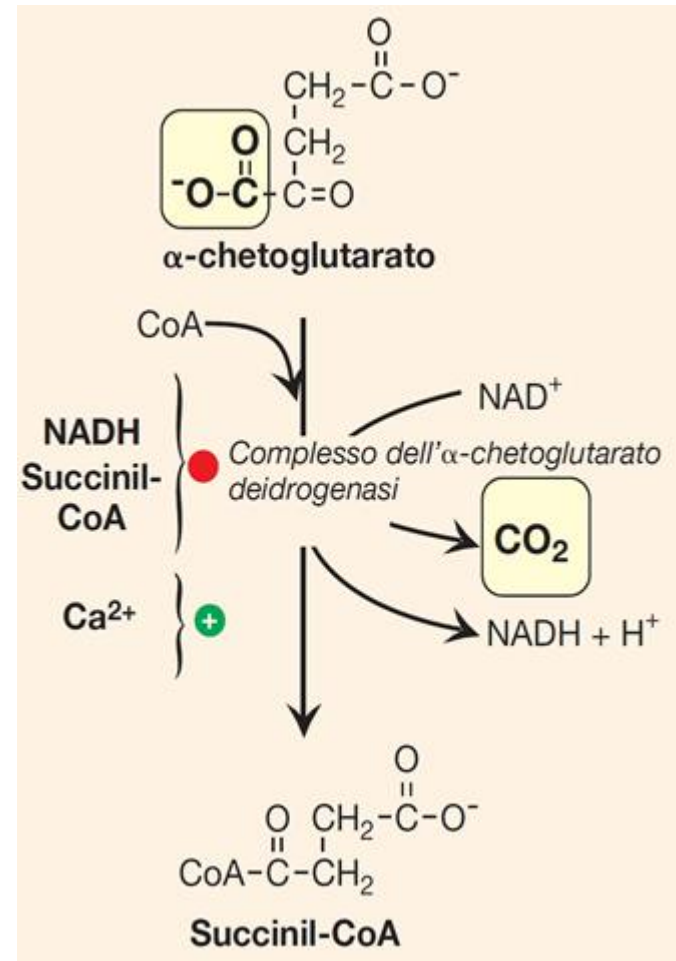
α -chetoglutarato deidrogenasi

- la decarbossilazione ossidativa è catalizzata da un complesso enzimatico strutturalmente simile al complesso della piruvato deidrogenasi.
- Il complesso contiene tre enzimi:
- **la α -chetoglutarato deidrogenasi (E_1)**
- **il diidrolipoil transuccinilasi (E_2)**
- **il diidrolipoil deidrogenasi (E_3)**
- E_1 si lega a E_2
- E_2 si lega a E_3
- E_1 non si lega direttamente E_3 quindi la transuccinilasi è il nucleo del complesso.



Complesso dell' α -chetoglutarato deidrogenasi

Il complesso è inibito dai sui prodotti,
NADH e succinil CoA

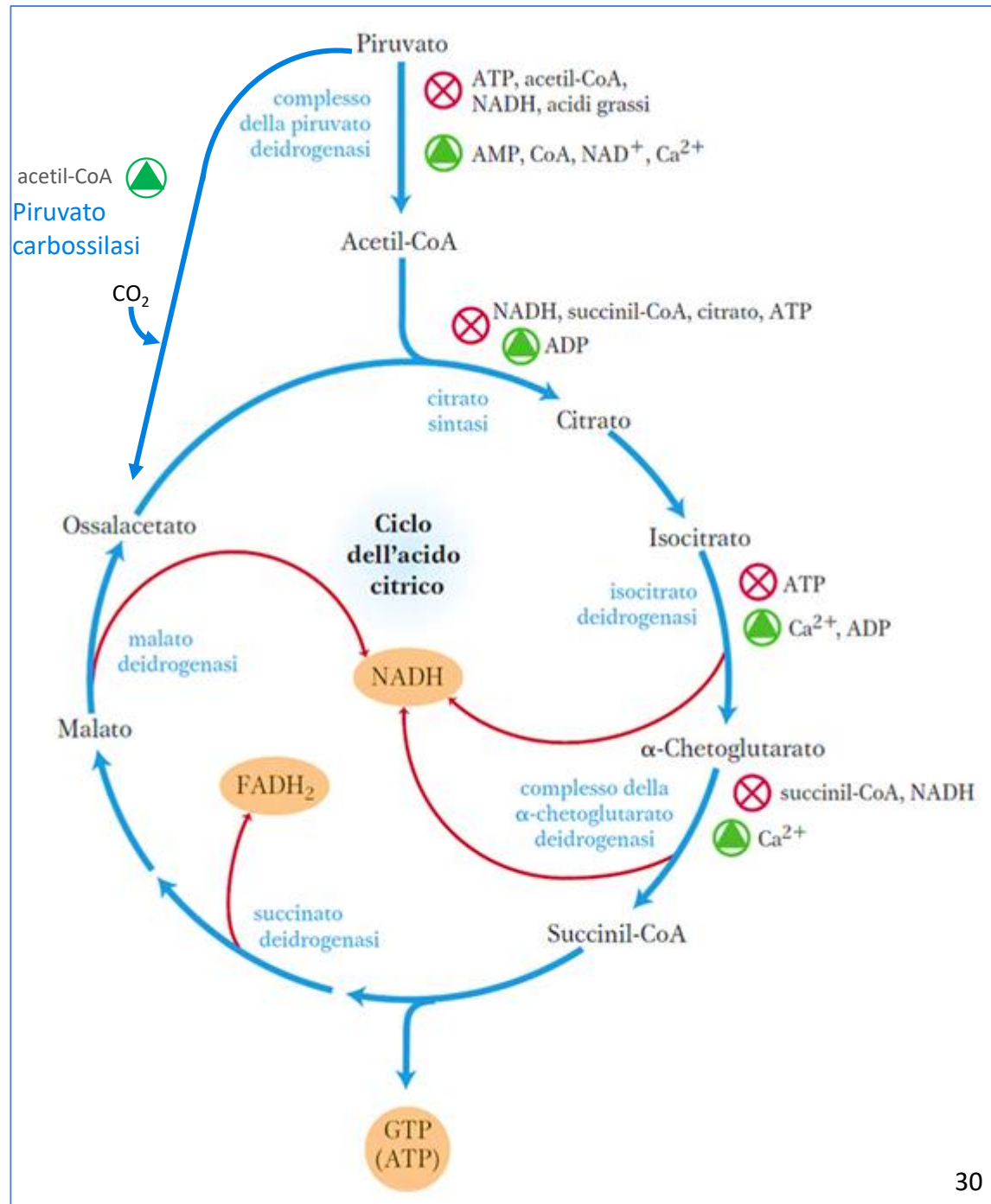


Regolazione del ciclo di Krebs

• Ci sono tre punti di controllo e sono le reazioni catalizzate dalla:

- citrato sintasi,
- isocitrato deidrogenasi
- complesso dell' α -chetoglutarato deidrogenasi

Quando i livelli di $[ATP]/[ADP]$, $[NADH]/[NAD^+]$ e $[acetil-CoA]/[CoA]$ sono elevati, indicando un sufficiente stato energetico della cellula. Quando i rapporti diminuiscono si ha l'attivazione dell'ossidazione del piruvato. La velocità del flusso attraverso il ciclo dell'acido citrico può essere limitata dalla disponibilità dei substrati.



Correlazione tra lo stato metabolico di una cellula e i rapporti ATP/ADP e NADH/NAD⁺

Cellule a riposo

Richiedono e utilizzano poca energia

Alti livelli di ATP e bassi livelli di ADP implicano elevato ATP/ADP

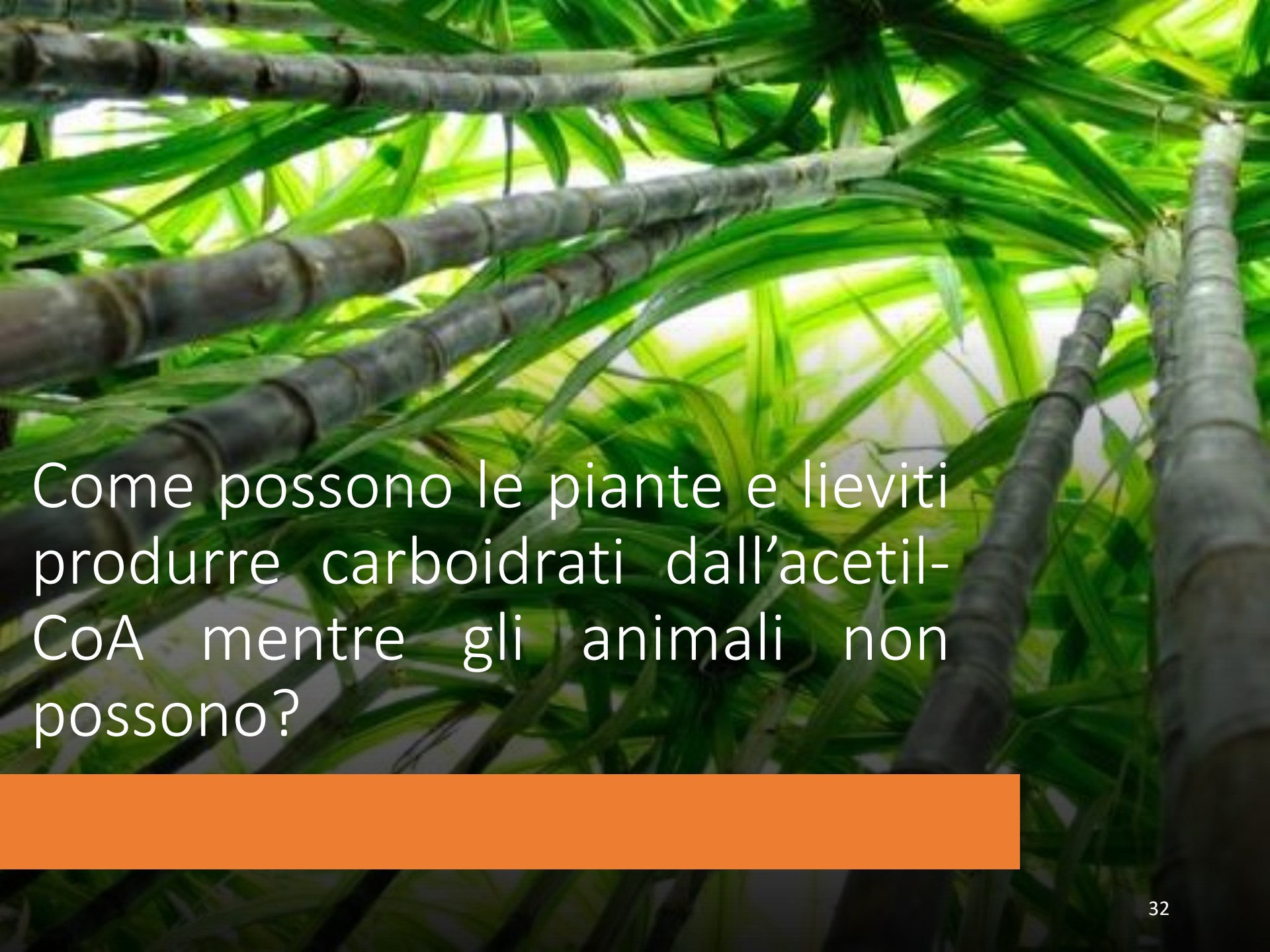
Alti livelli di NADH e bassi livelli di NAD⁺ implicano elevato NADH/NAD⁺

Cellule molto attive

Richiedono e usano più energia della cellula a riposo

Bassi livelli di ATP ed alti di ADP implicano basso ATP/ADP

Bassi livelli di NADH ed alti di NAD⁺ implicano basso NADH/NAD⁺



Come possono le piante e lieviti produrre carboidrati dall'acetil-CoA mentre gli animali non possono?

Ciclo del glicosilato

Un seme di cetriolo in germinazione in cui sono visibili un glicosoma, i mitocondri e i vacuoli lipidici che lo circondano

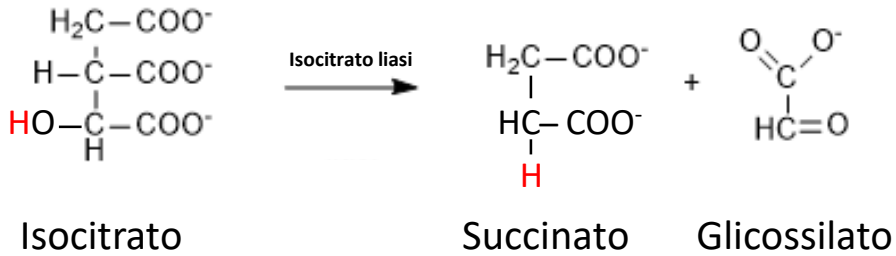
Vacuolo lipidico



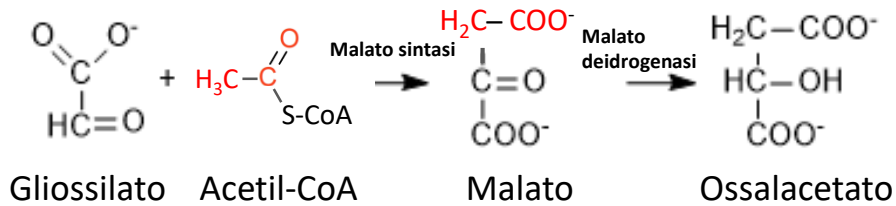
Gliossisoma

Mitocondri

Isocitrato liasi

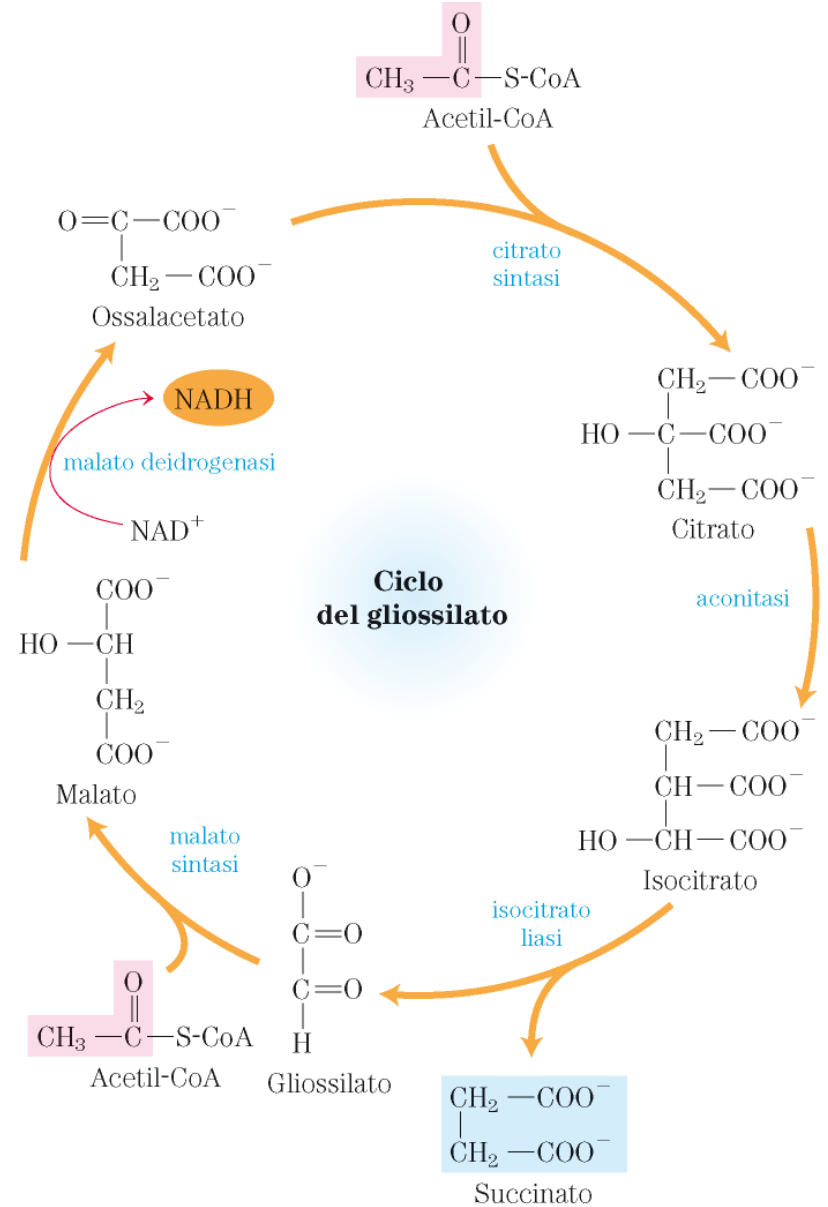


Malato sintasi

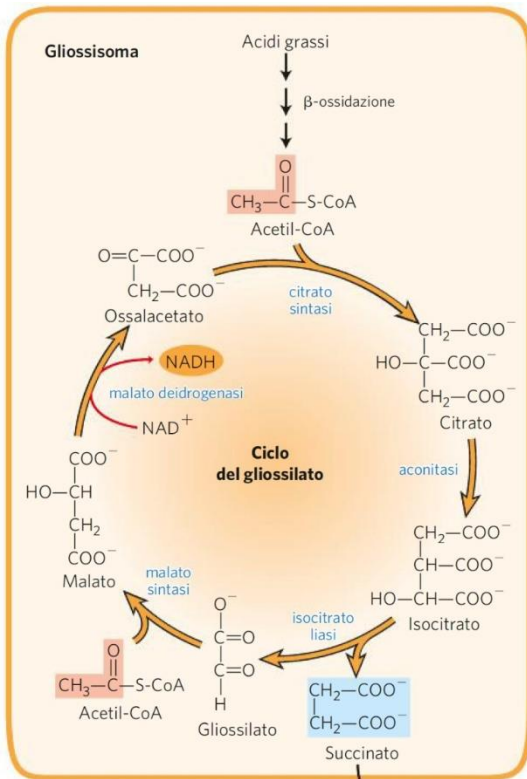


Il succinato prodotto è trasportato nel mitocondrio per essere ulteriormente trasformato.

Substrato di partenza



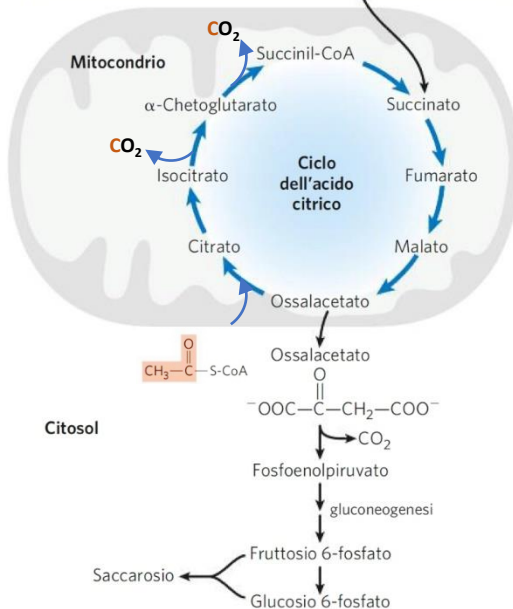
Prodotto finale



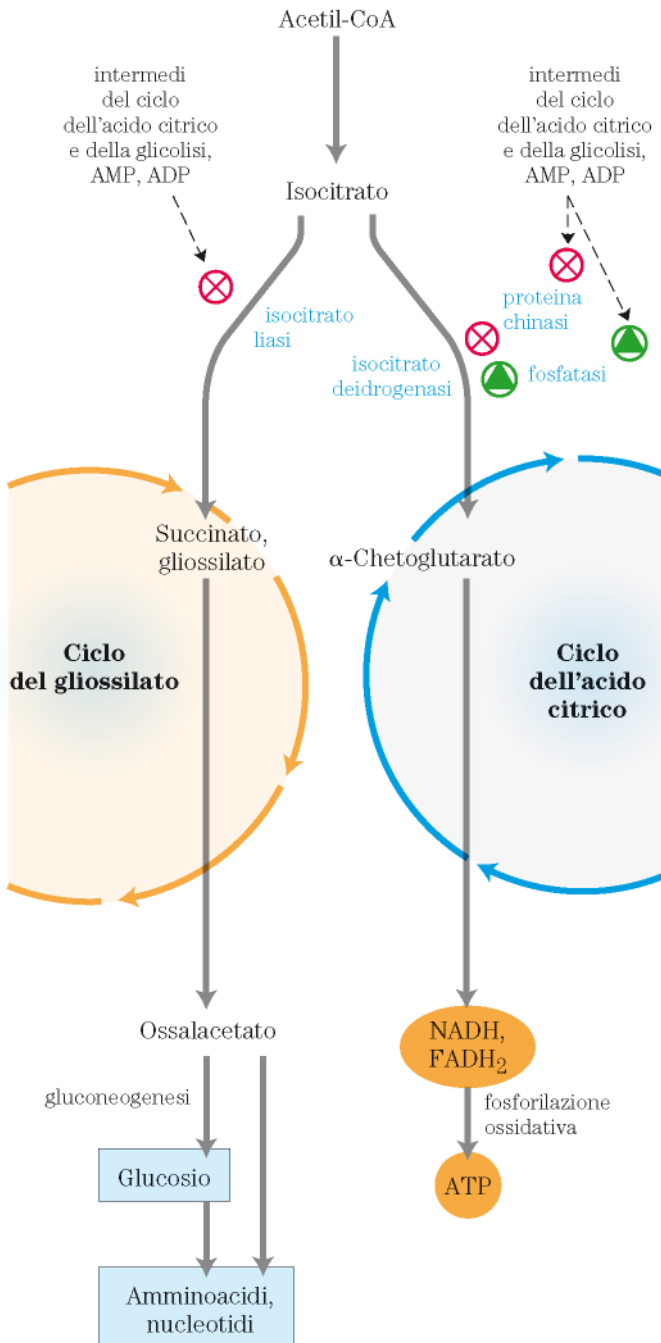
Le reazioni del ciclo del gliossilato (gliossisomi) procedono simultaneamente con quelle del ciclo dell'acido citrico (mitocondri) e gli intermedi passano attraverso il citosol a questi due compartimenti.

Confronto con il ciclo di Krebs:

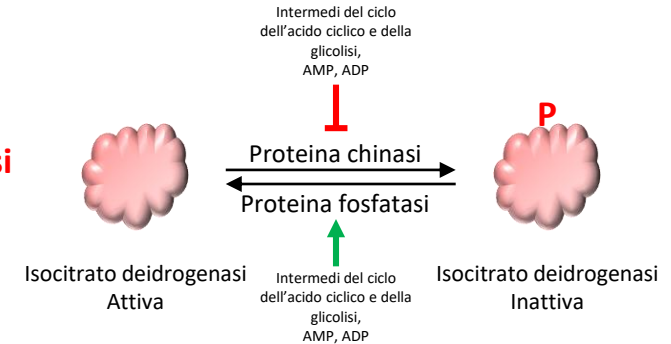
- 1) è costituito da 5 tappe invece di 8
- 2) manca delle reazioni che producono CO_2
- 3) Consuma 2 molecole di acetil-CoA
- 4) Produce unità a 4 atomi di carbonio invece di unità a 2 atomi di carbonio. I gruppi acetilici di 2 acetil-CoA danno luogo ad una unità di 4 atomi di C (malato).



Regolazione coordinata dei cicli del glicossilato e dell'acido ciclico



Regolazione covalente dell'isocitrato deidrogenasi

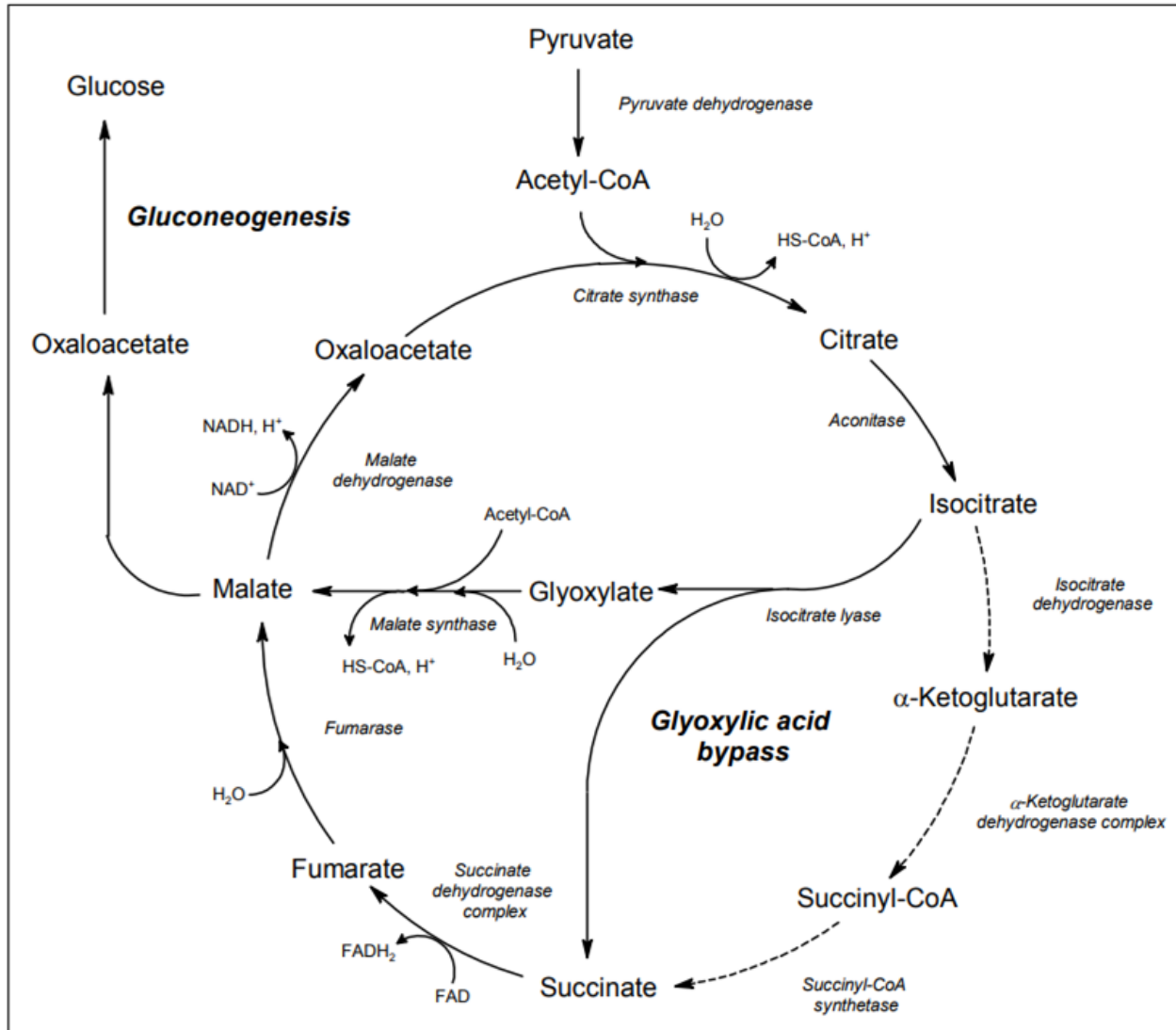


Il ciclo di krebs e il ciclo del glicossilato sono regolati in modo coordinato dall'isocitrato deidrogenasi e dalla isocitrato liasi.

Regolazioni covalente: da parte di una specifica chinasi che fosforila l'isocitrato deidrogenasi inattivandola (l'isocitrato entra nel ciclo dei glicossilato dove verrà convertito in glucosio). La fosfatasi stacca il gruppo fosforico dall'isocitrato deidrogenasi riattivandola (l'isocitrato entra nel ciclo di krebs per produrre energia).

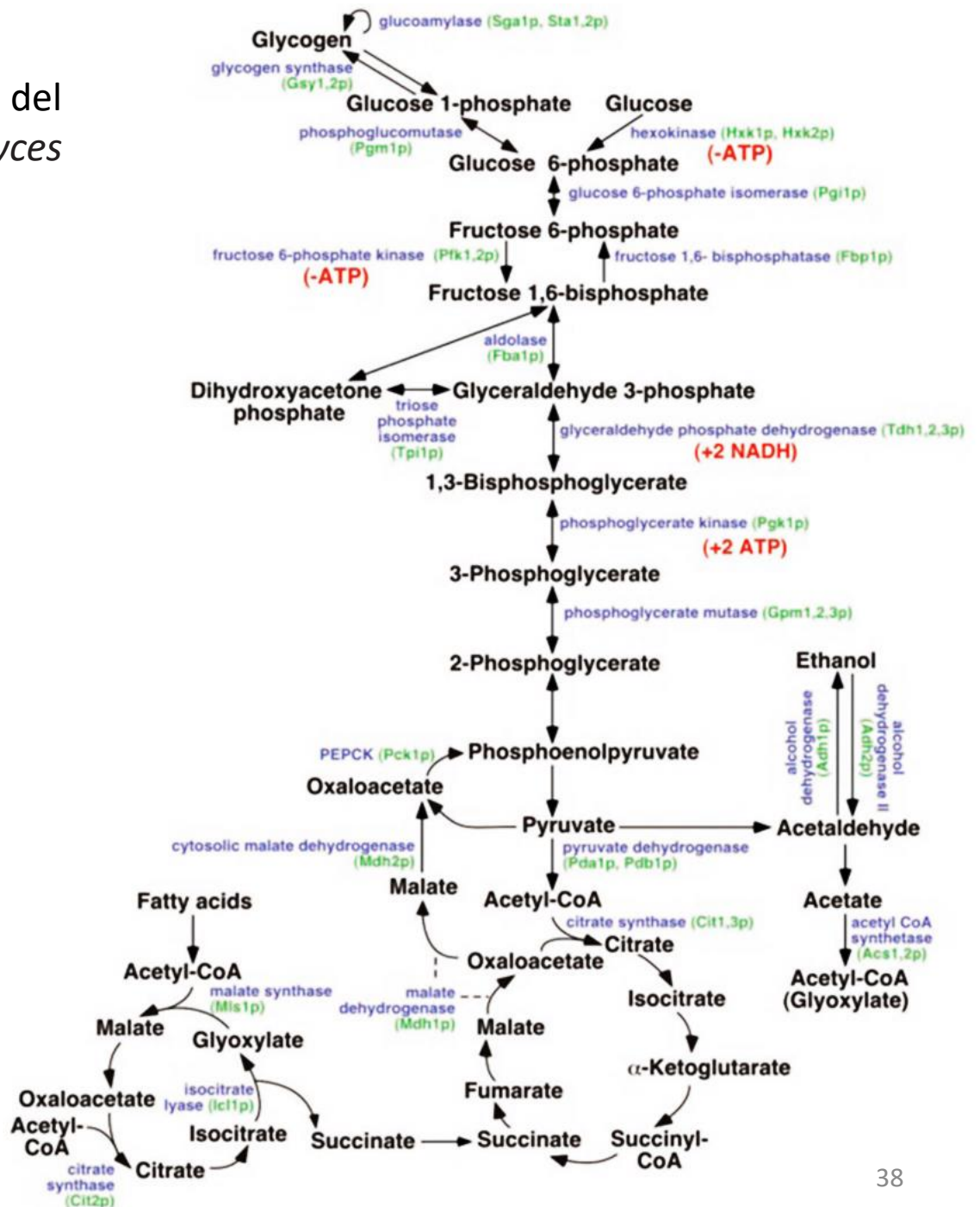
Regolazione allosterica: il NADH e l'ATP si legano ai siti allosterici dell'isocitrato deidrogenasi inibendola.

Il metabolismo attivo nel lievito durante la fermentazione



Il bypass dell'acido gliossilico è costituito da due reazioni in modo tale da fornire un'alternativa anabolica per il metabolismo dell'acetil-CoA. L'isocitrato viene scisso in succinato e gliossilato dall'isocitrato liasi durante la prima reazione del bypass dell'acido gliossilico, dove l'acetil-CoA si condensa con il gliossilato per formare malato in una reazione catalizzata dalla malato sintasi. Il malato può essere convertito in glucosio tramite l'ossalacetato e le reazioni della via gluconeogenica. In altre parole, il bypass del gliossilato consente ai lieviti di crescere in assenza di zuccheri quando sono disponibili altri precursori dell'acetil-CoA, come l'etanolo o l'acido acetico.

Schema del metabolismo cellulare del glucosio nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*



Stephen S. Lin, Jill K. Manchester, and Jeffrey I. Gordon. Enhanced Gluconeogenesis and Increased Energy Storage as Hallmarks of Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 276, No. 38, Issue of September 21, pp. 36000–36007, 2001.