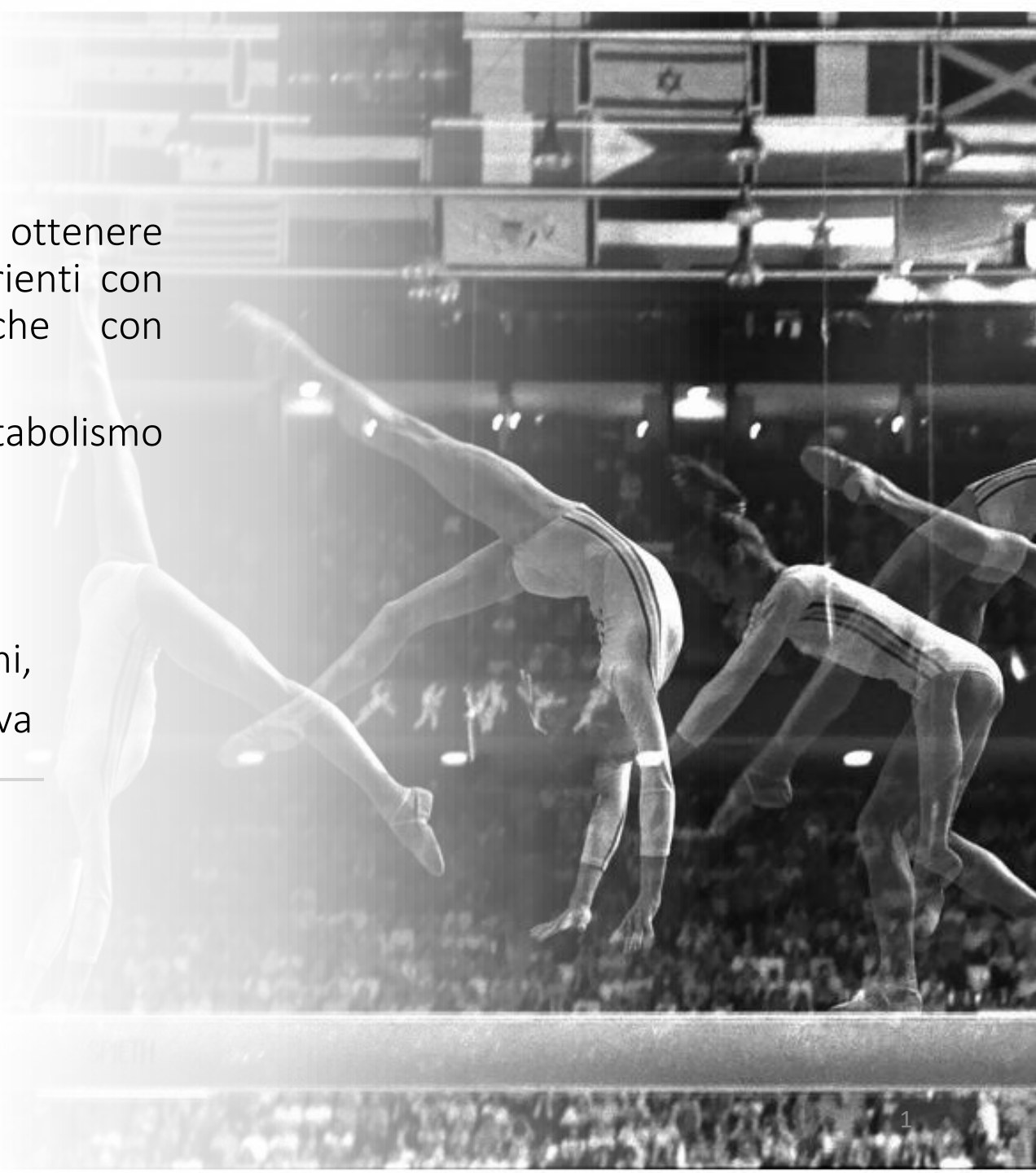


Gli organismi possono ottenere molta più energia dai nutrienti con l'ossidazione aerobica che con l'ossidazione anaerobica.

Processi importanti nel metabolismo aerobico:

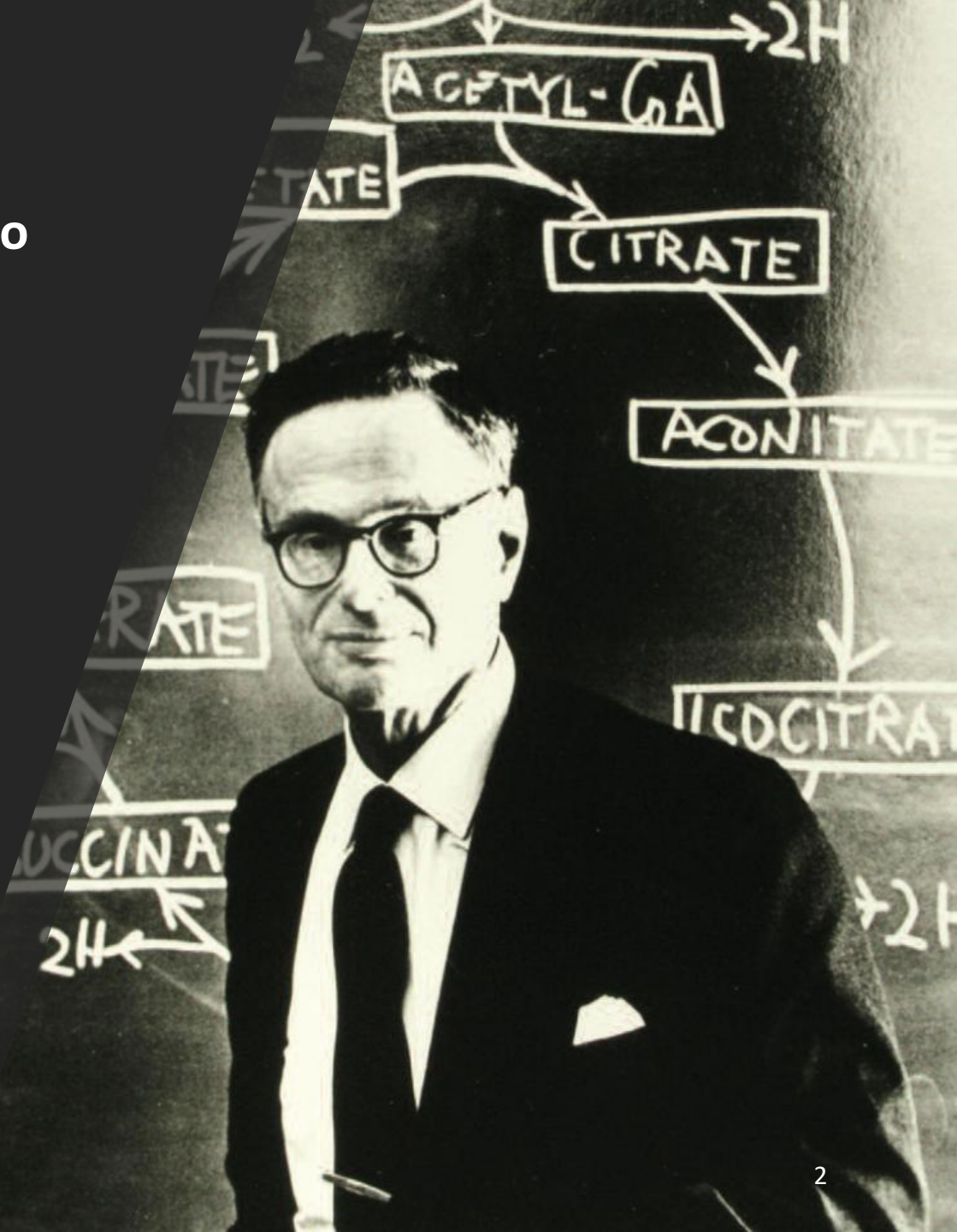
- la glicolisi,
 - il ciclo dell'acido citrico,
 - il trasporto degli elettroni,
 - la fosforilazione ossidativa
-



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



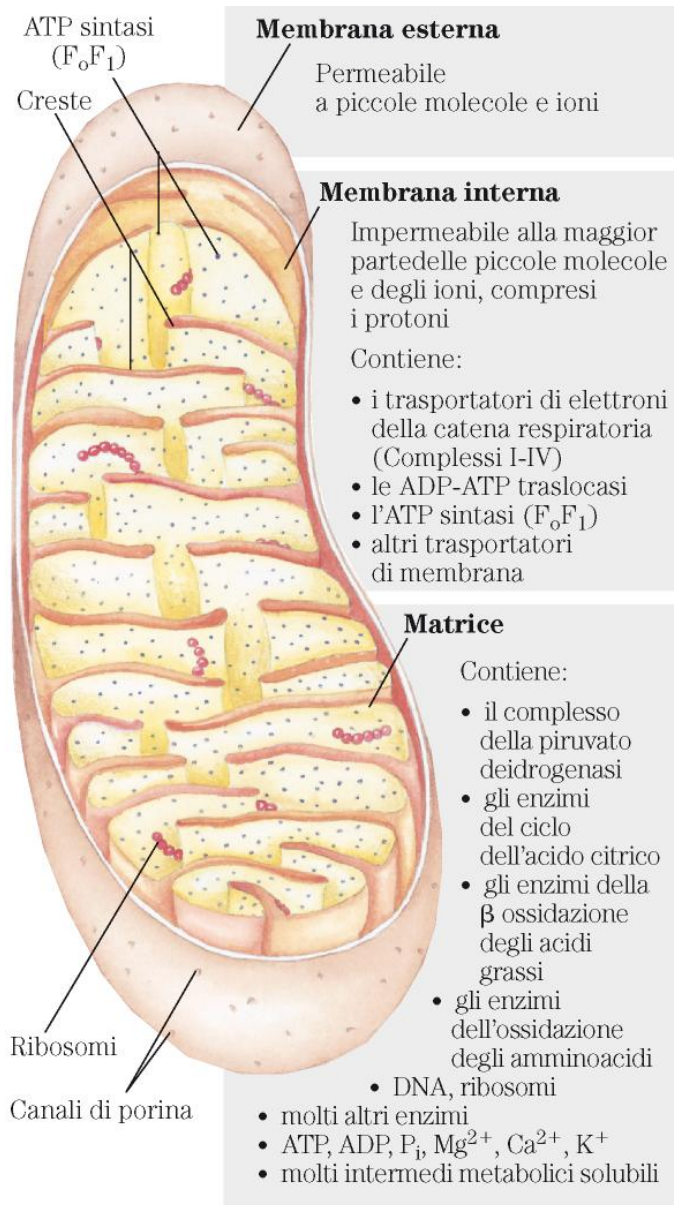
Struttura di un mitocondrio

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

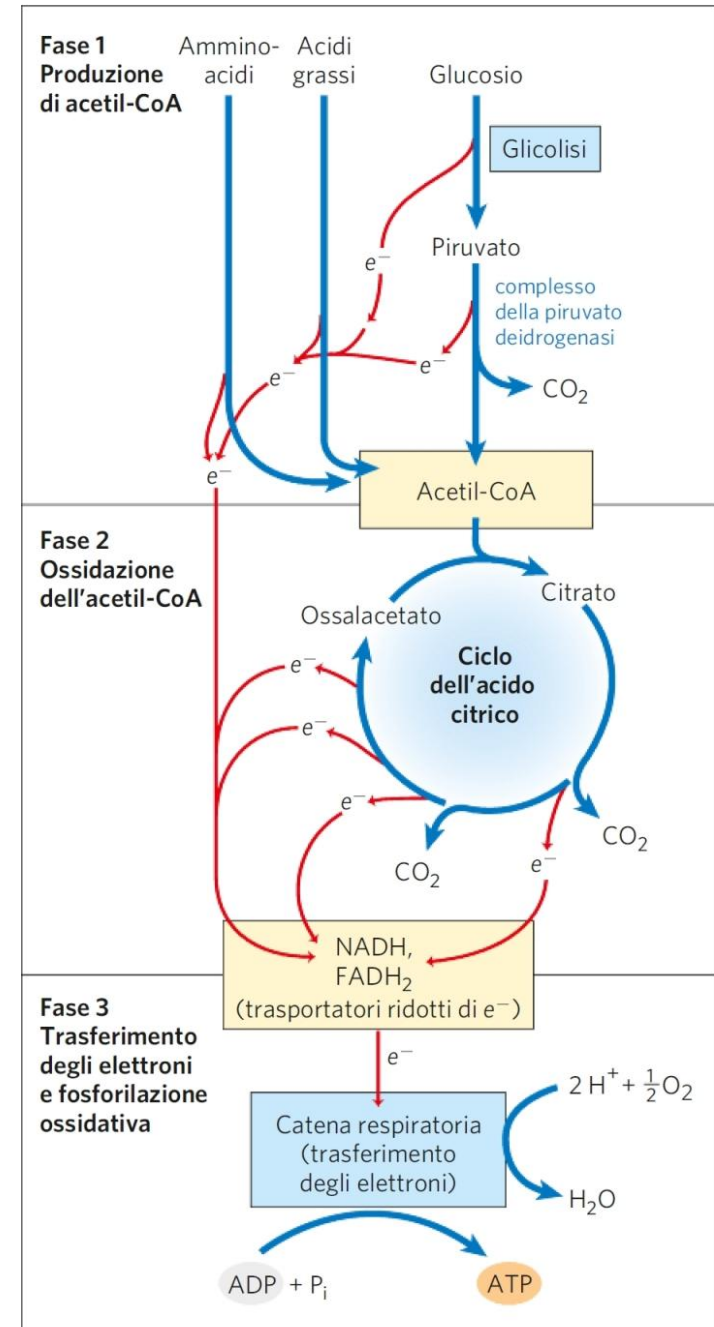


Respirazione cellulare

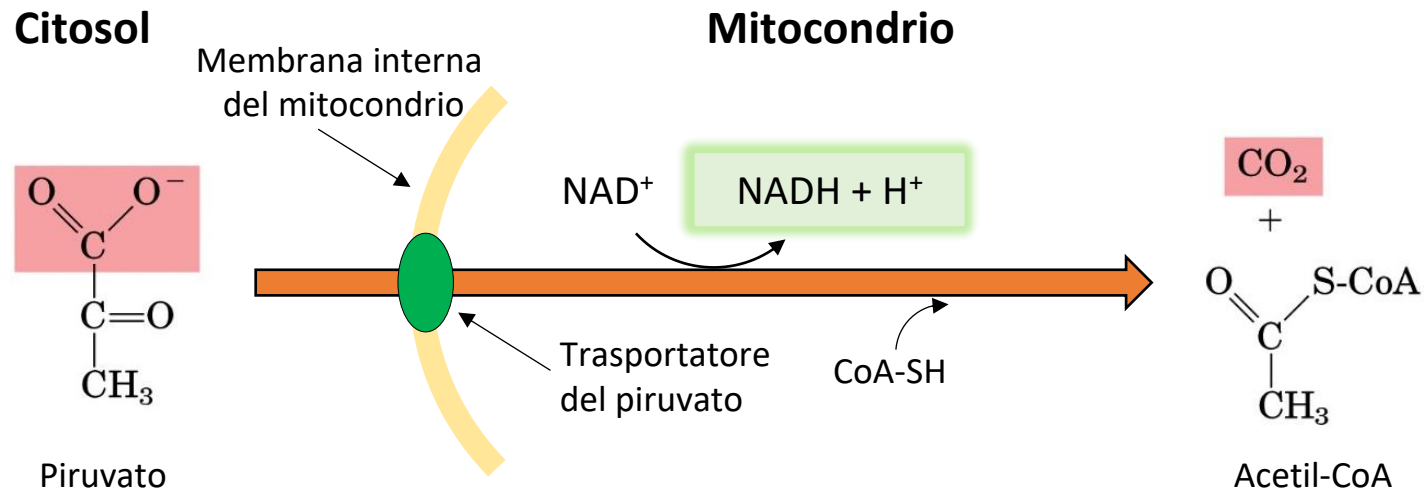
FASE 1: l'ossidazione degli acidi grassi, del glucosio e di alcuni aminoacidi produce Acetil-CoA;

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 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.



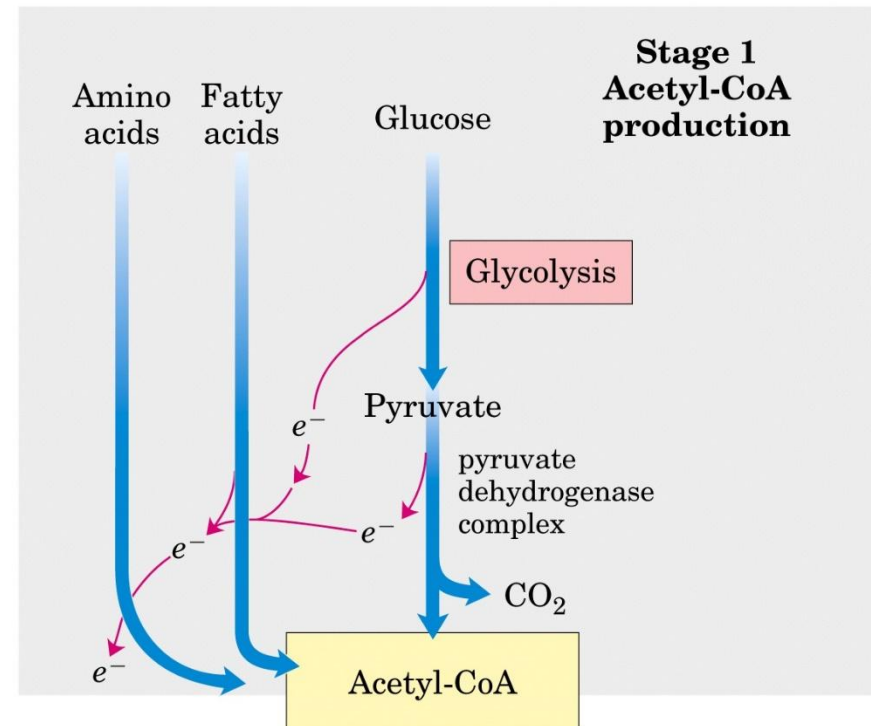
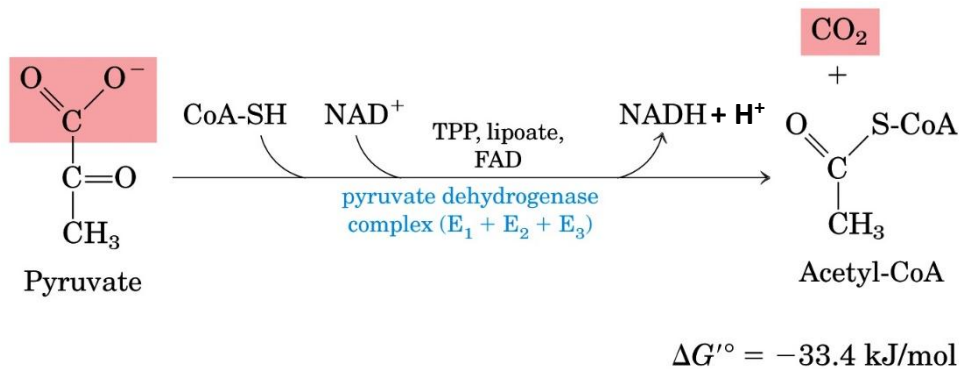
Si sposta dal citosol nel mitocondrio (diffonde attraverso delle grandi aperture nella membrana mitocondriale esterna), poi viene trasportato attraverso la membrana interna dal trasportatore del piruvato mitocondriale (MPC) un trasportatore passivo specifico per il piruvato. Nelle cellule il piruvato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

METABOLISMO OSSIDATIVO

1ª parte

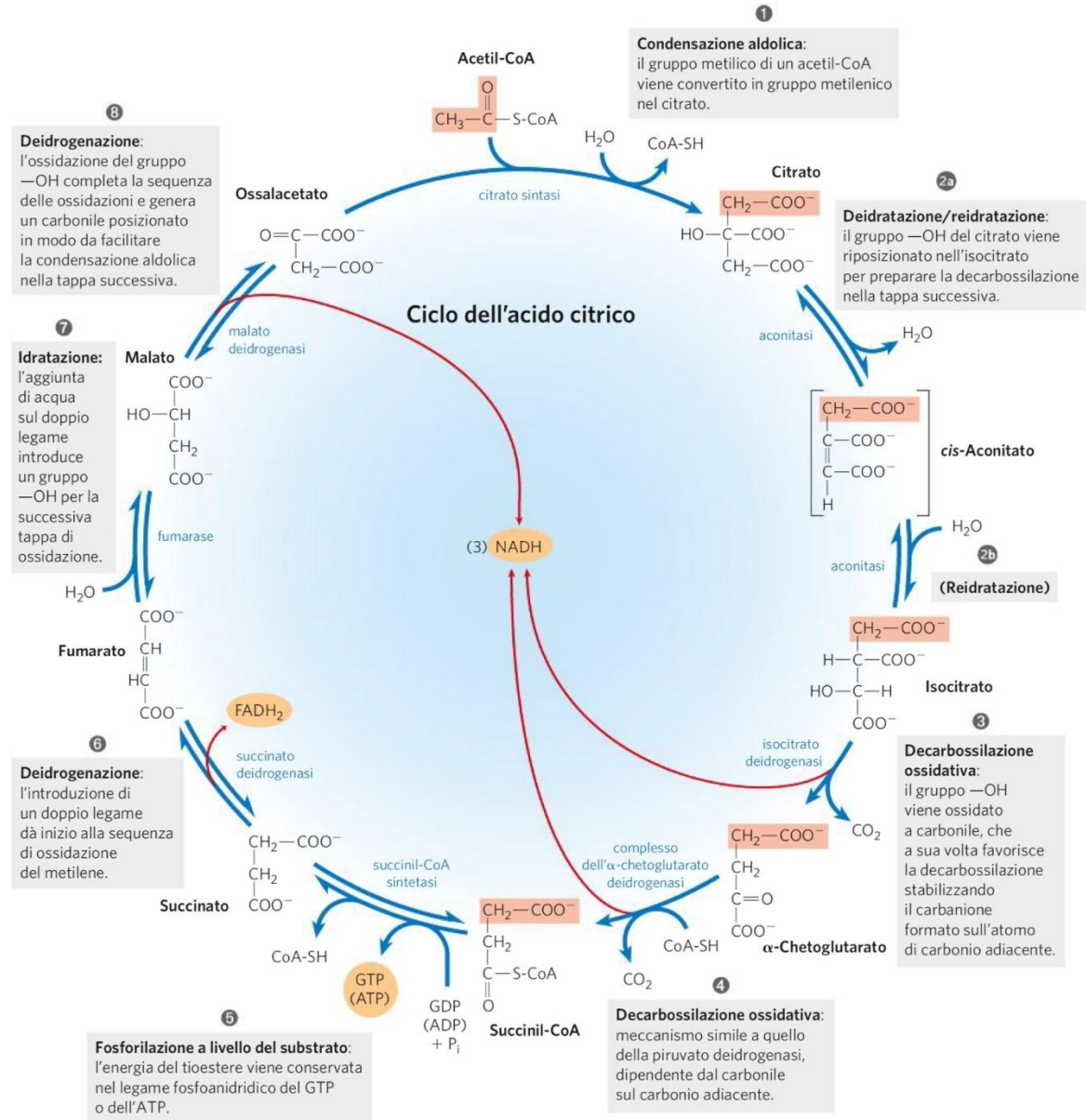
Le sostanze nutrienti: a. grassi, glucosio e qualche amminoacido, sono ossidate fino a formare frammenti a due atomi di carbonio: gruppo acetilico

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

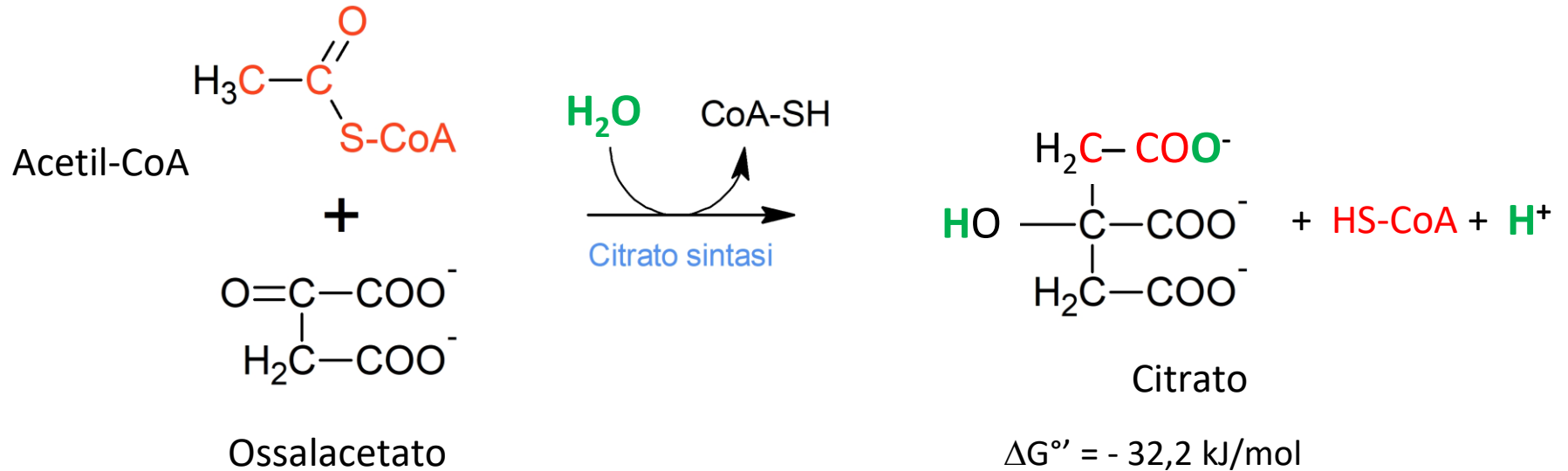


Schema del ciclo di Krebs

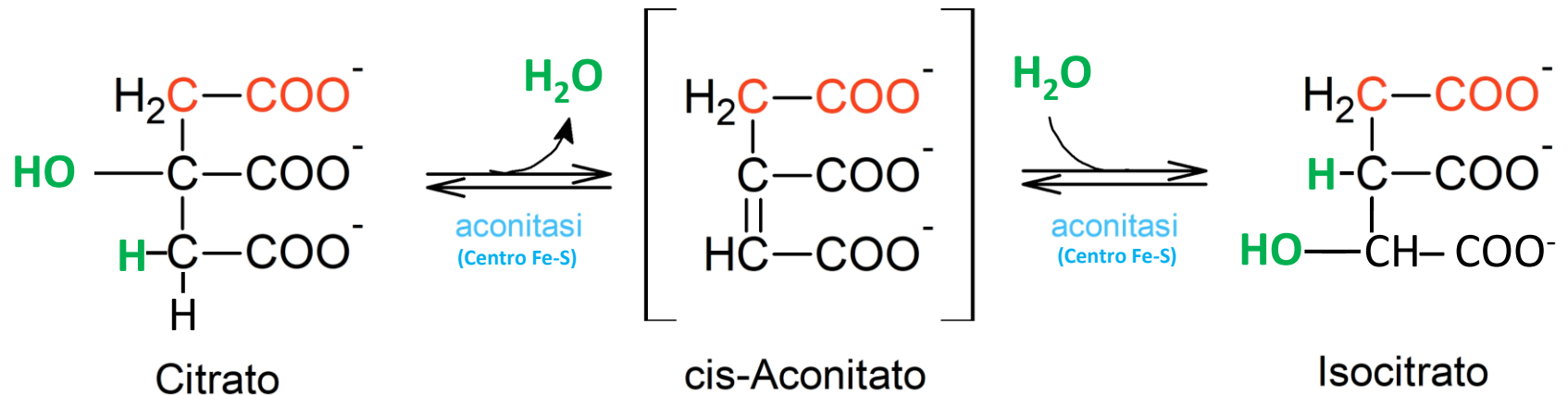
- L'Acetil CoA dona il suo gruppo acetilico all'ossalacetato formando il citrato che viene poi trasformato in isocitrato. L'isocitrato viene deidrogenato con perdita di CO_2 dando origine all' α -chetoglutarato. Quest'ultimo perde una molecola di CO_2 per formare succinato. Il succinato viene convertito 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 CO_2 .
- 4 delle 8 tappe di questo processo sono ossidazioni in cui l'energia viene conservata mediante la formazione di NADH e FADH_2 .



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

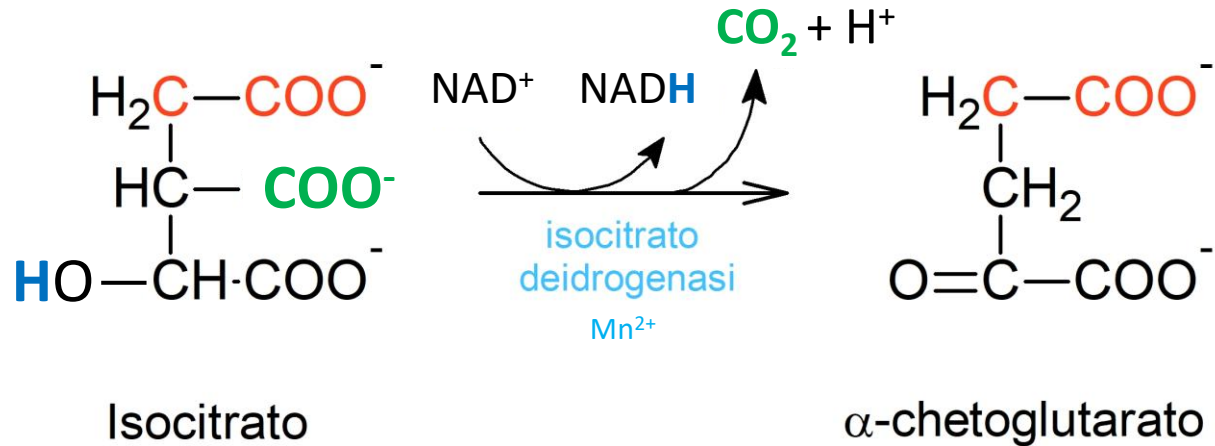


Tappa 2 Il citrato viene isomerizzato a isocitrato

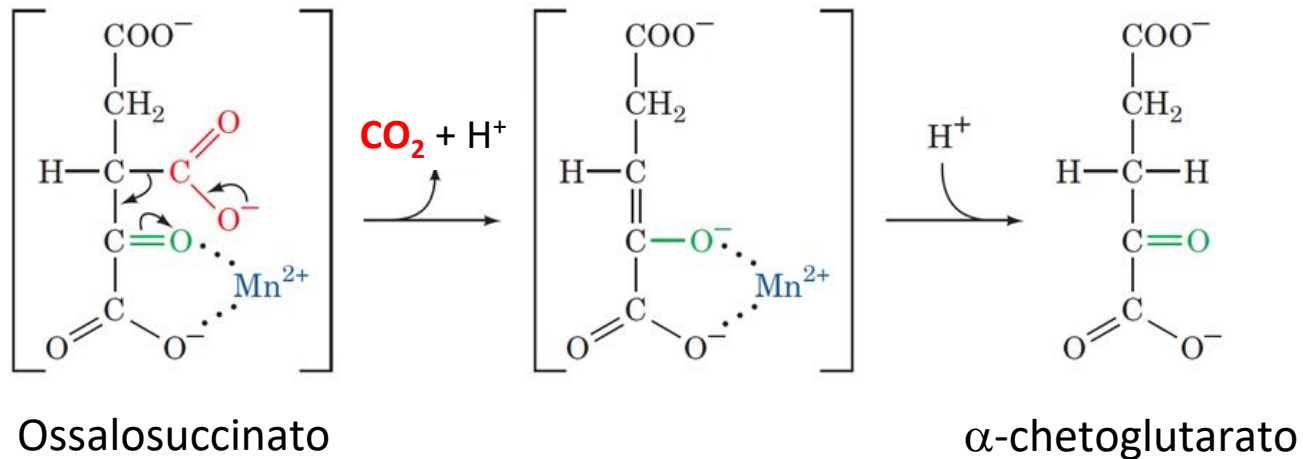


Tappa 3

L'isocitrato viene ossidato e decarbossilato ad α -chetogluturato

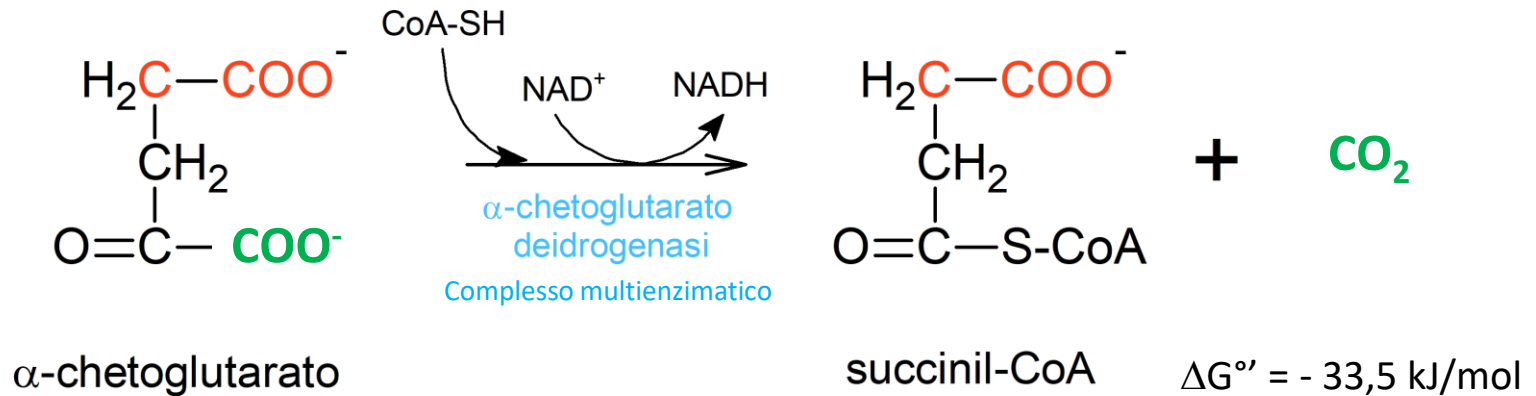


$$\Delta G^{\circ} = -20,9 \text{ kJ/mol}$$



Tappa 4

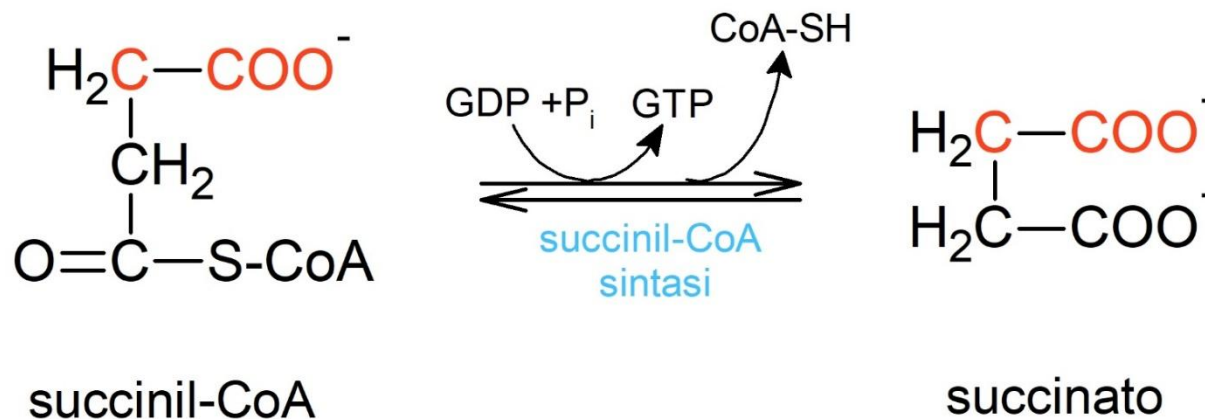
Il succinil coenzima A viene formato per decarbossilazione ossidativa dell' α -chetoglutarato



Tappa 5

Dal succinil coenzima A si forma un legame fosforico ad alta energia

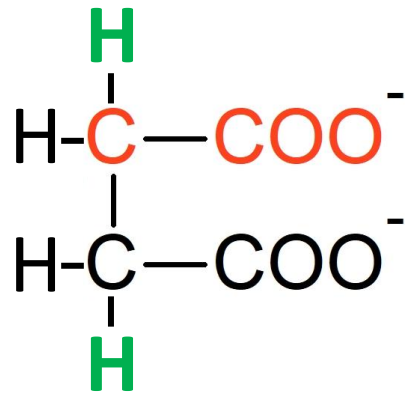
Fosforilazione a livello di substrato



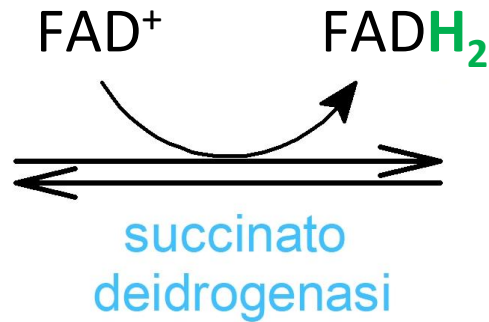
$\Delta G^{\circ'} = -2,9 \text{ kJ/mol}$

Tappa 6

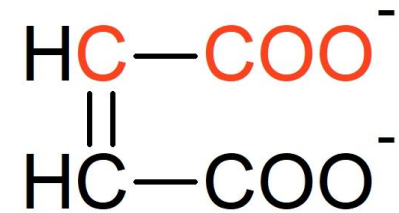
Rigenerazione dell'ossalacetato per ossidazione del succinato



succinato



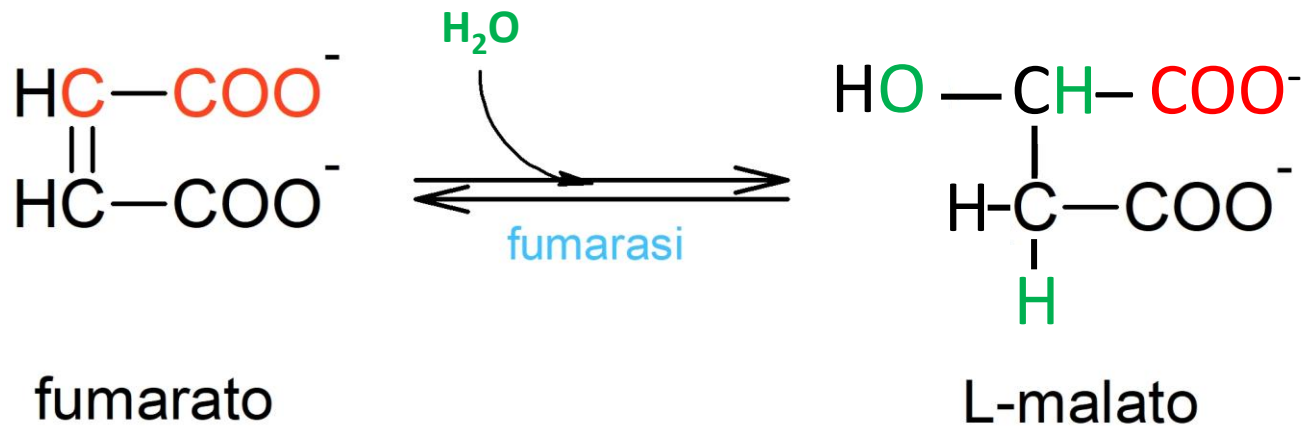
Flavoproteina con tre centri Fe-S



fumarato

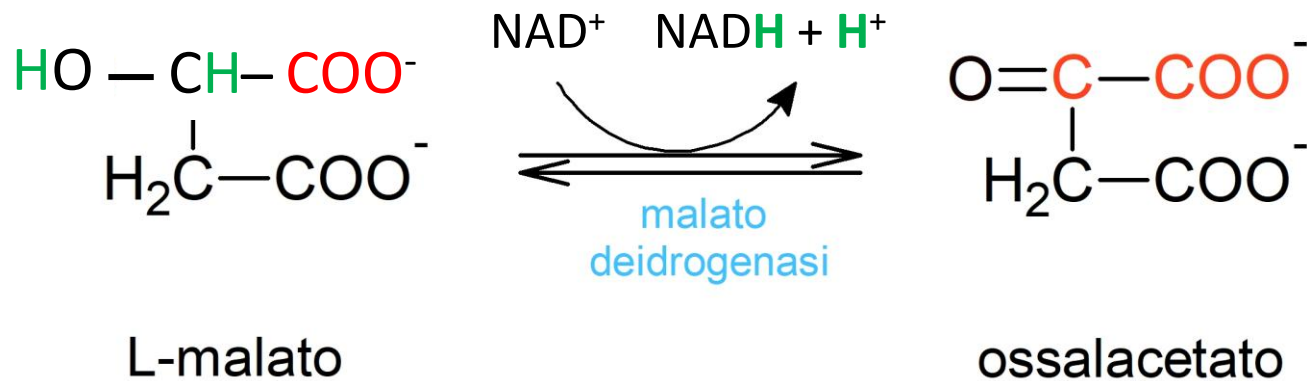
$$\Delta G^{\circ'} = 0 \text{ kJ/mol}$$

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



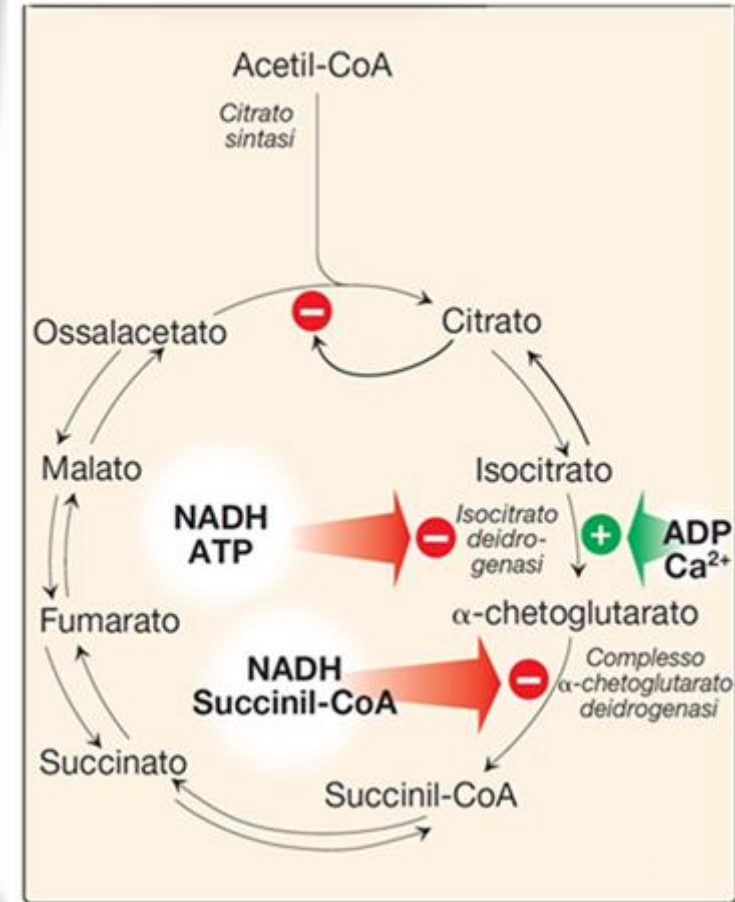
$$\Delta G^{\circ'} = -3,8 \text{ kJ/mol}$$

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



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

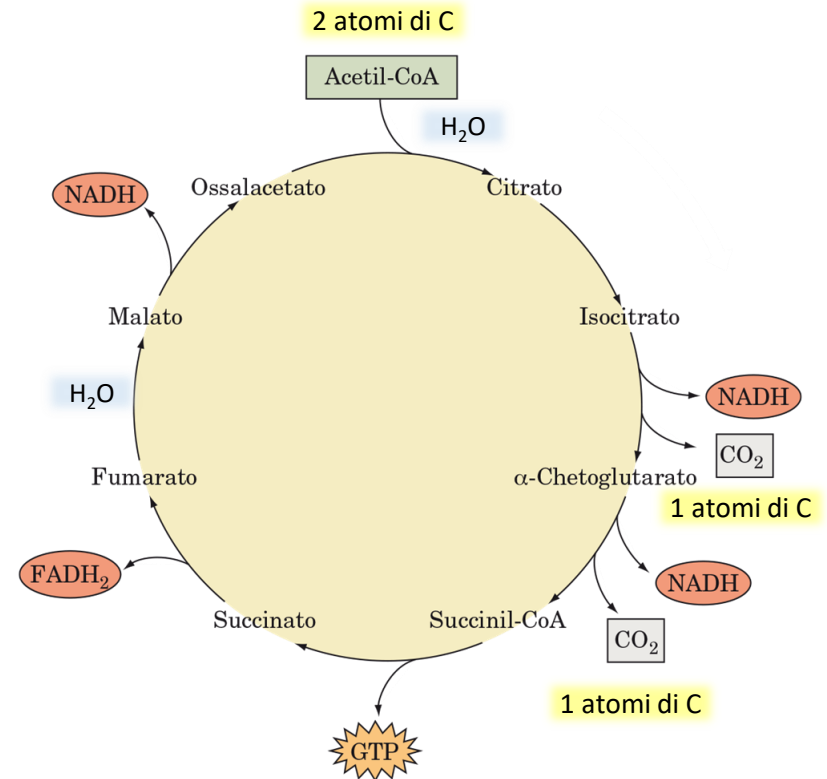
3 molecole di NADH
1 molecola FADH₂
1 molecola di GTP (o ATP)



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

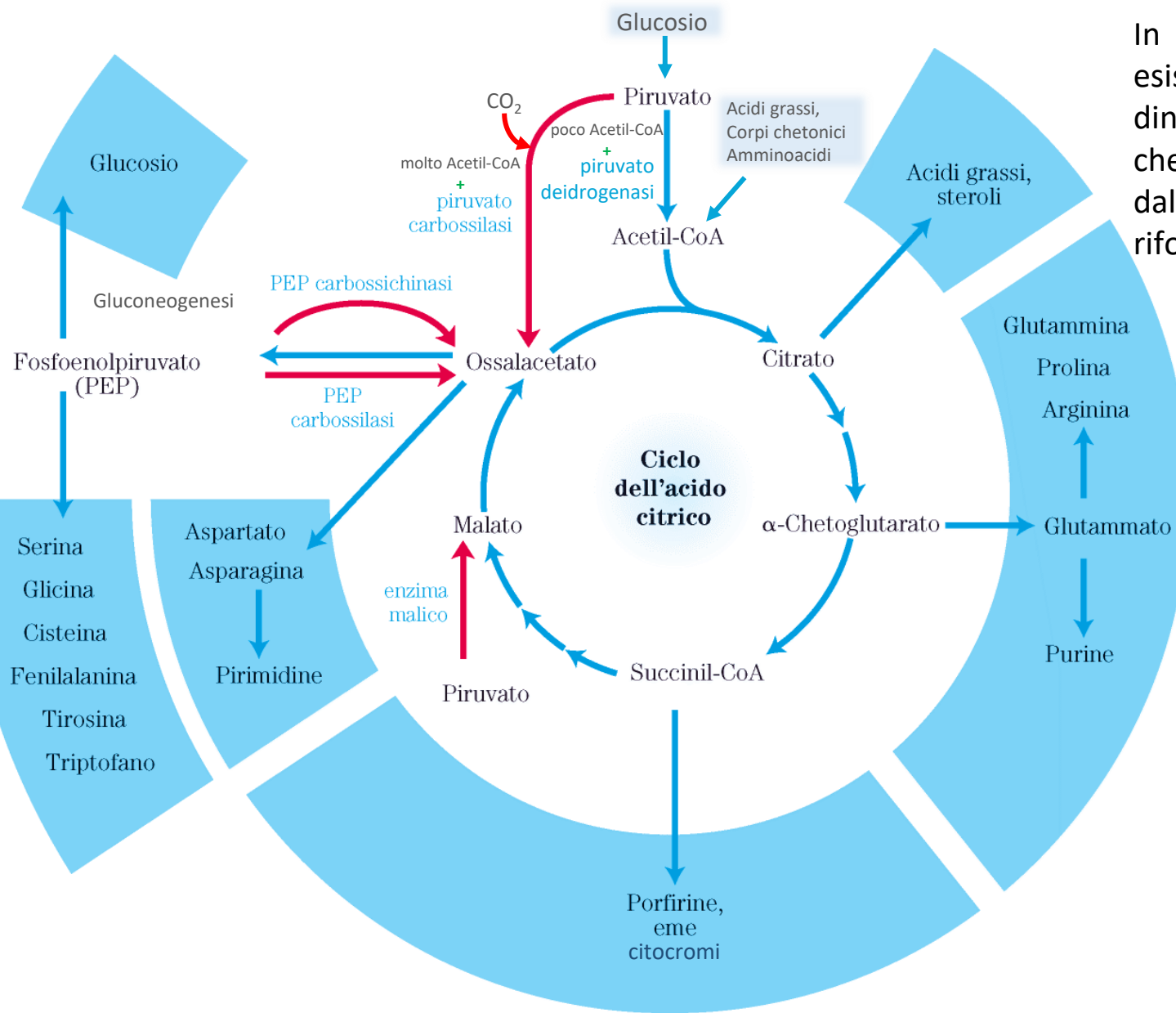


Numero di
molecole di ATP
prodotto in
seguito
all'ossidazione di
una molecola di
acetil-CoA

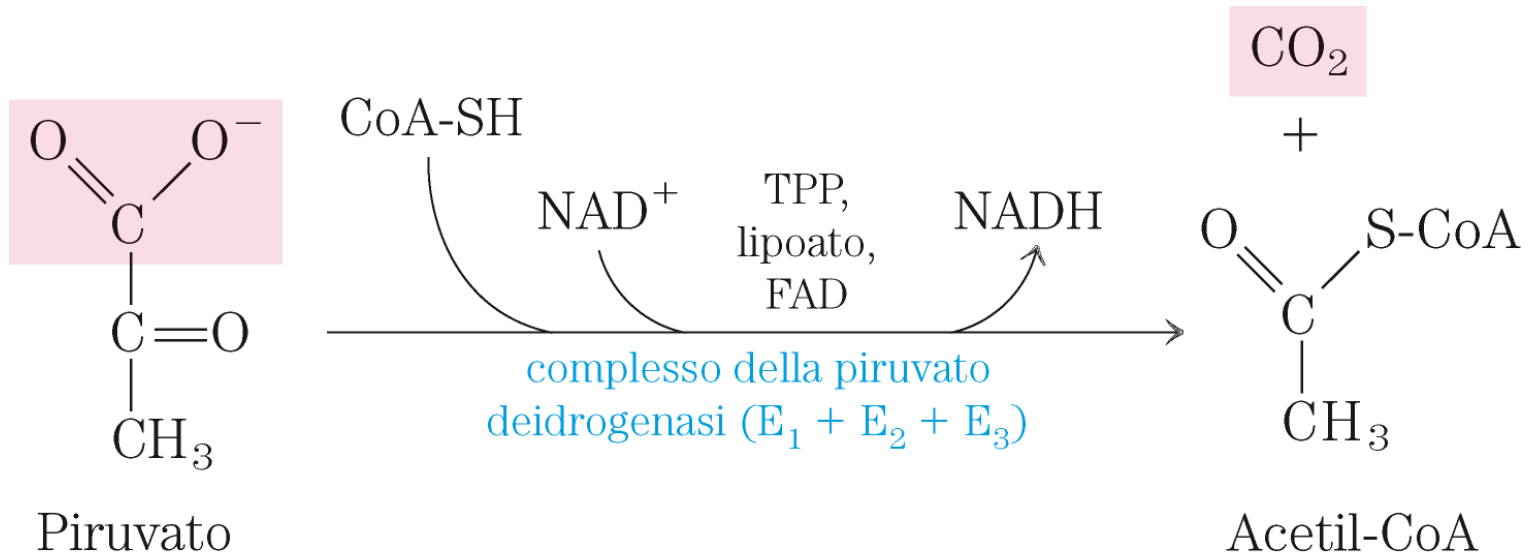
| Reazioni che producono energia | Numero di molecole di ATP prodotte |
|--|------------------------------------|
| $3 \text{ NADH} \longrightarrow 3 \text{ NAD}^+$ | 7,5 |
| $\text{FADH}_2 \longrightarrow \text{FAD}$ | 1,5 |
| $\text{GDP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{GTP}$ | 1 |
| | <hr/> 10 ATP/acetil-CoA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

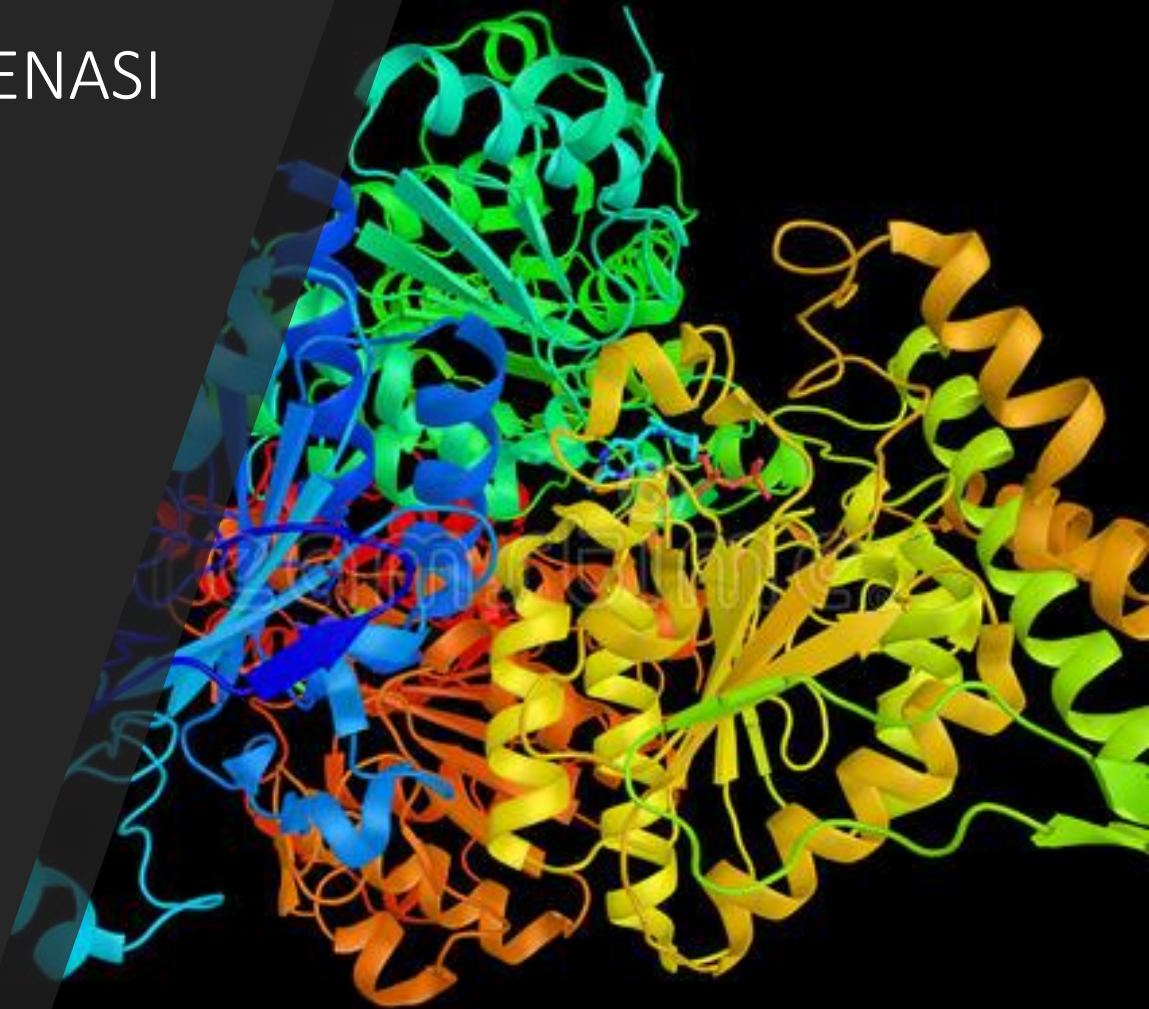


$$\Delta G'^{\circ} = -33,4 \text{ kJ/mole}$$

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).*

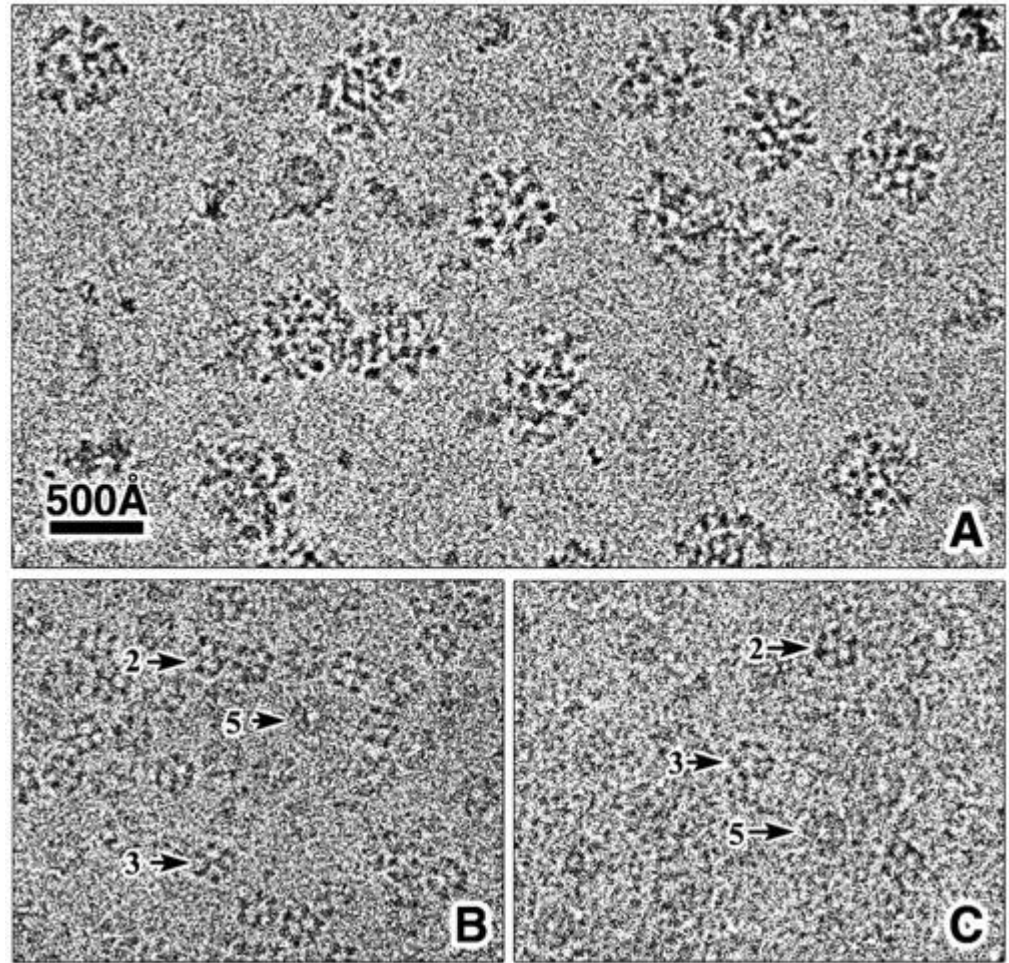


Il nucleo diidrolipoil transacetilasi (E_2) presenta 3 domini funzionali distinti:

- 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.

Il sito attivo di E_1 ha la TPP

Al sito attivo di E_3 è legato il FAD.



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

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

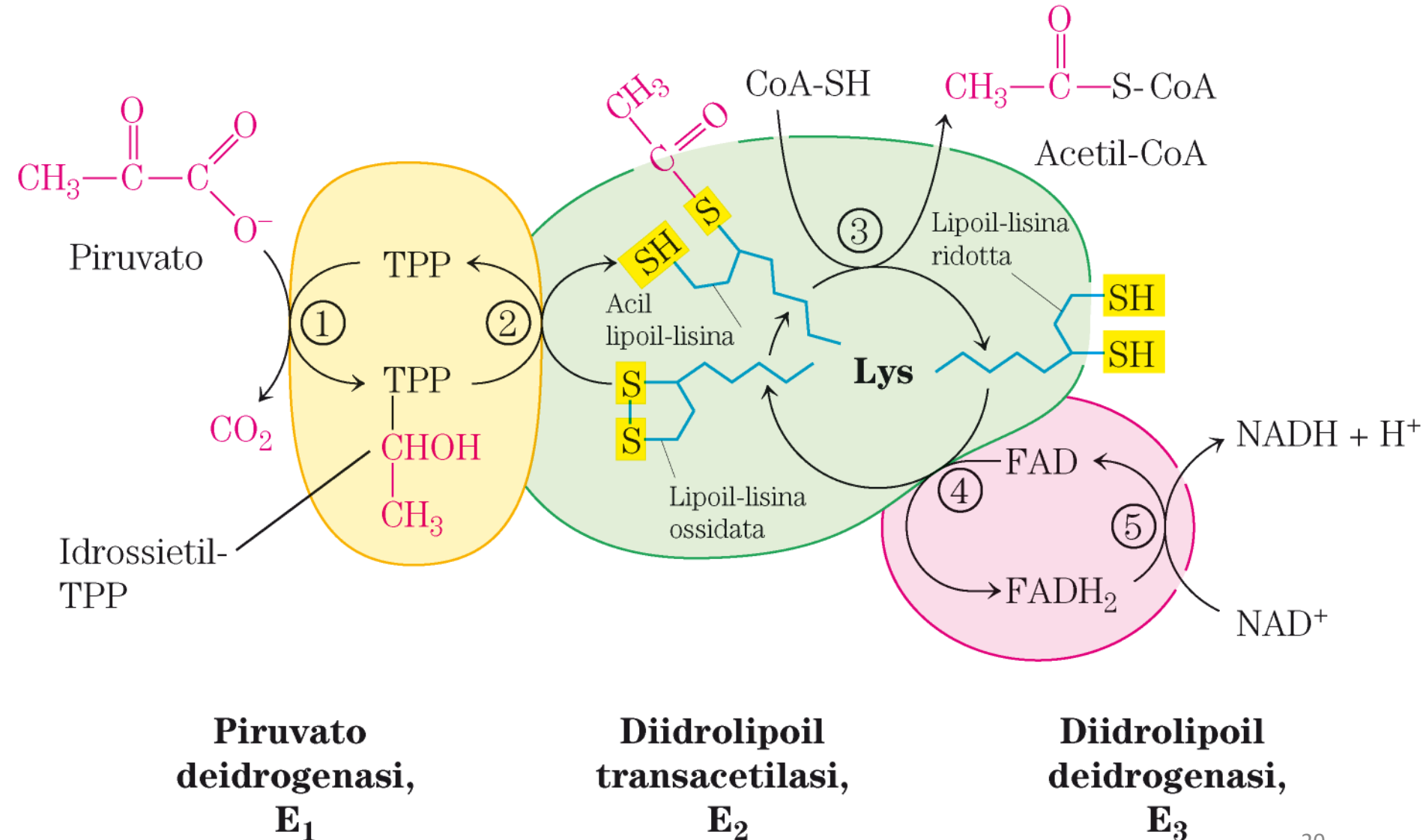


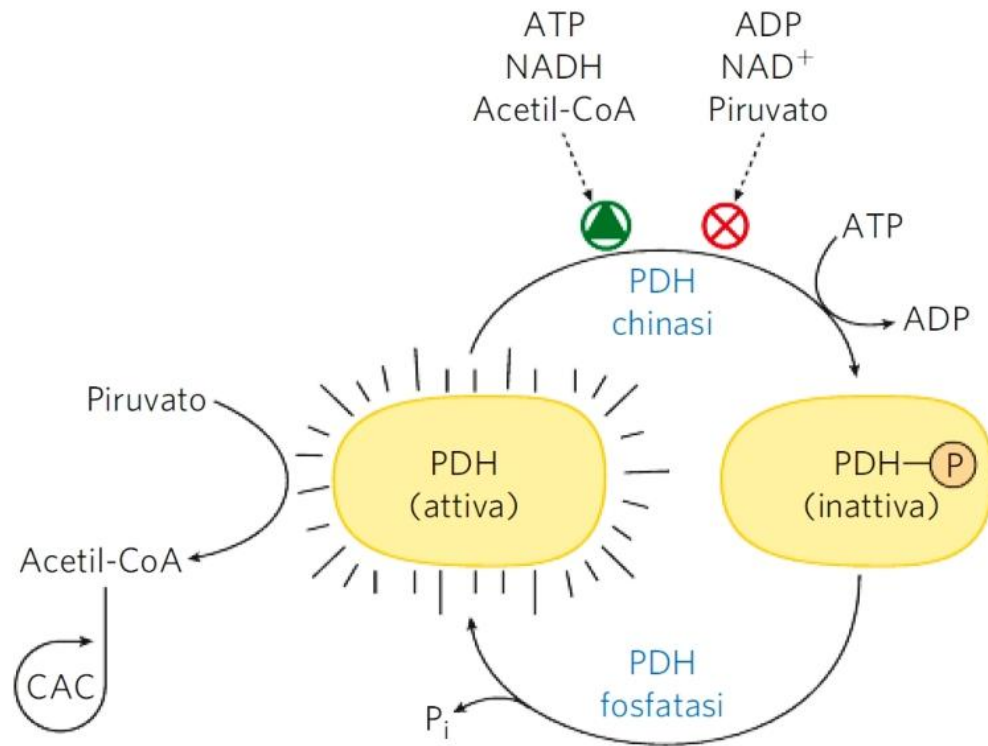
TABLE 17-1 The Coenzymes and Prosthetic Groups of Pyruvate Dehydrogenase

| 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.

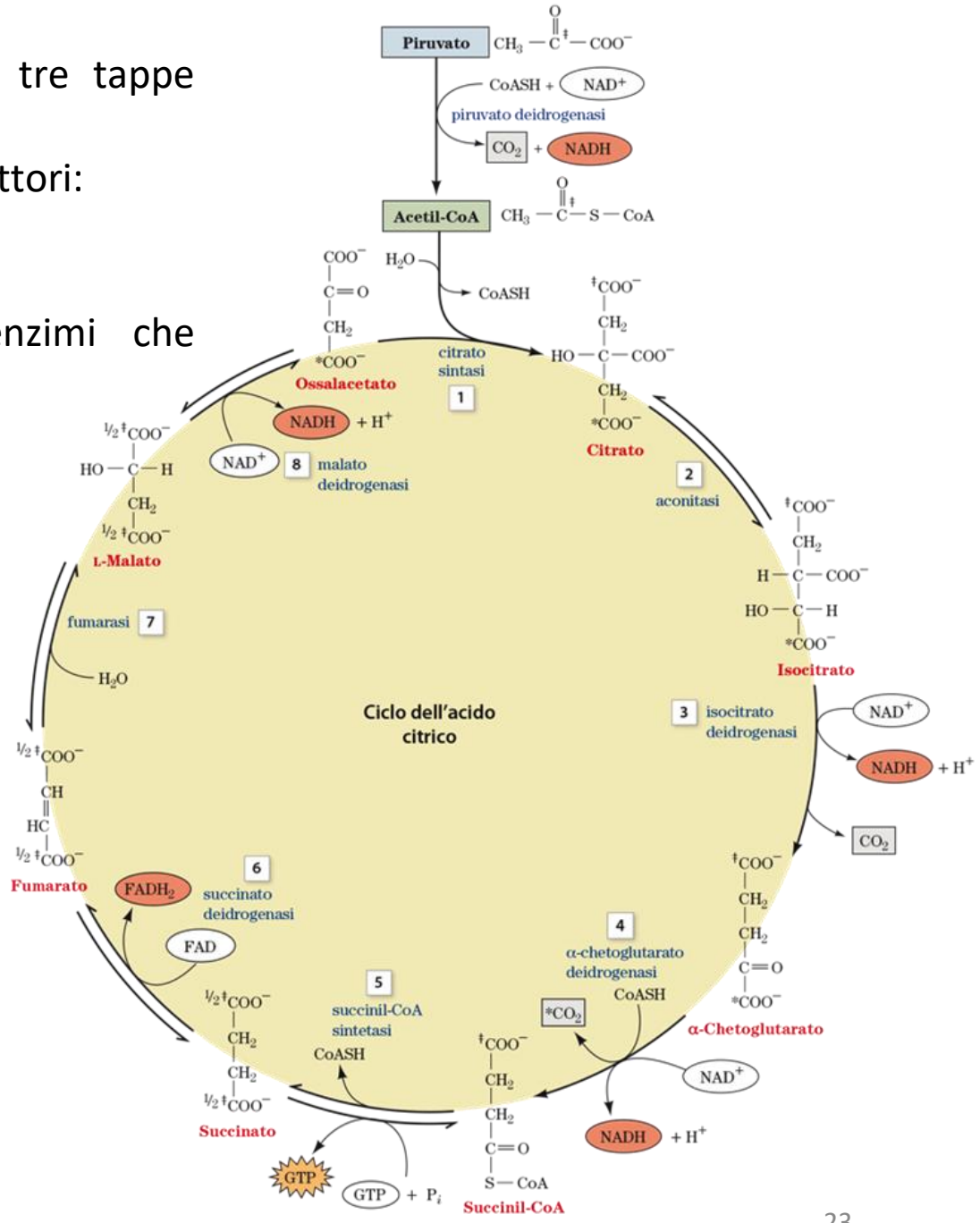


Il ciclo è regolato a livello delle sue tre tappe esoergoniche

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

- Citrato sintasi**
- Aconitasi
- Isocitrato deidrogenasi**
- α-chetoglutarato deidrogenasi**
- Succinil-CoA sintetasi
- Succinato deidrogenasi
- Fumarasi
- Malato deidrogenasi



Citrato sintasi

Regolazione nel lievito:

Inibizione allosterica da ATP e NADH

Quando le cellule hanno alta energia (ATP elevato) o un accumulo di ridotti equivalenti (NADH), l'enzima è inibito allostericamente, rallentando il ciclo di Krebs.

Attivazione da ADP

Se i livelli di ADP aumentano (basso stato energetico), la citrato sintasi è attivata, favorendo la produzione di energia tramite ossidazione dell'acetil-CoA.

Inibizione da citrato (feedback)

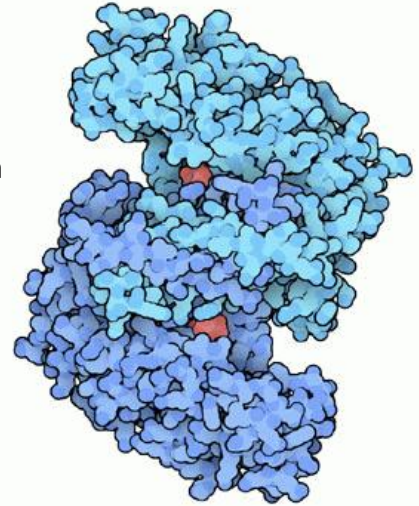
L'accumulo di citrato può inibire l'enzima, regolando l'uscita di carbonio dal ciclo e bilanciando la biosintesi di lipidi e altri metaboliti.

Controllo metabolico indiretto

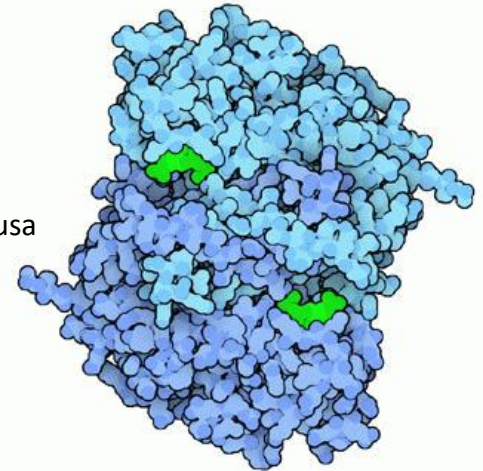
La disponibilità di substrati (acetil-CoA e ossalacetato) influenza l'attività dell'enzima.

Anche la regolazione della produzione di NADH e FADH₂ attraverso la glicolisi e il piruvato deidrogenasi può modulare l'attività della citrato sintasi.

Forma aperta



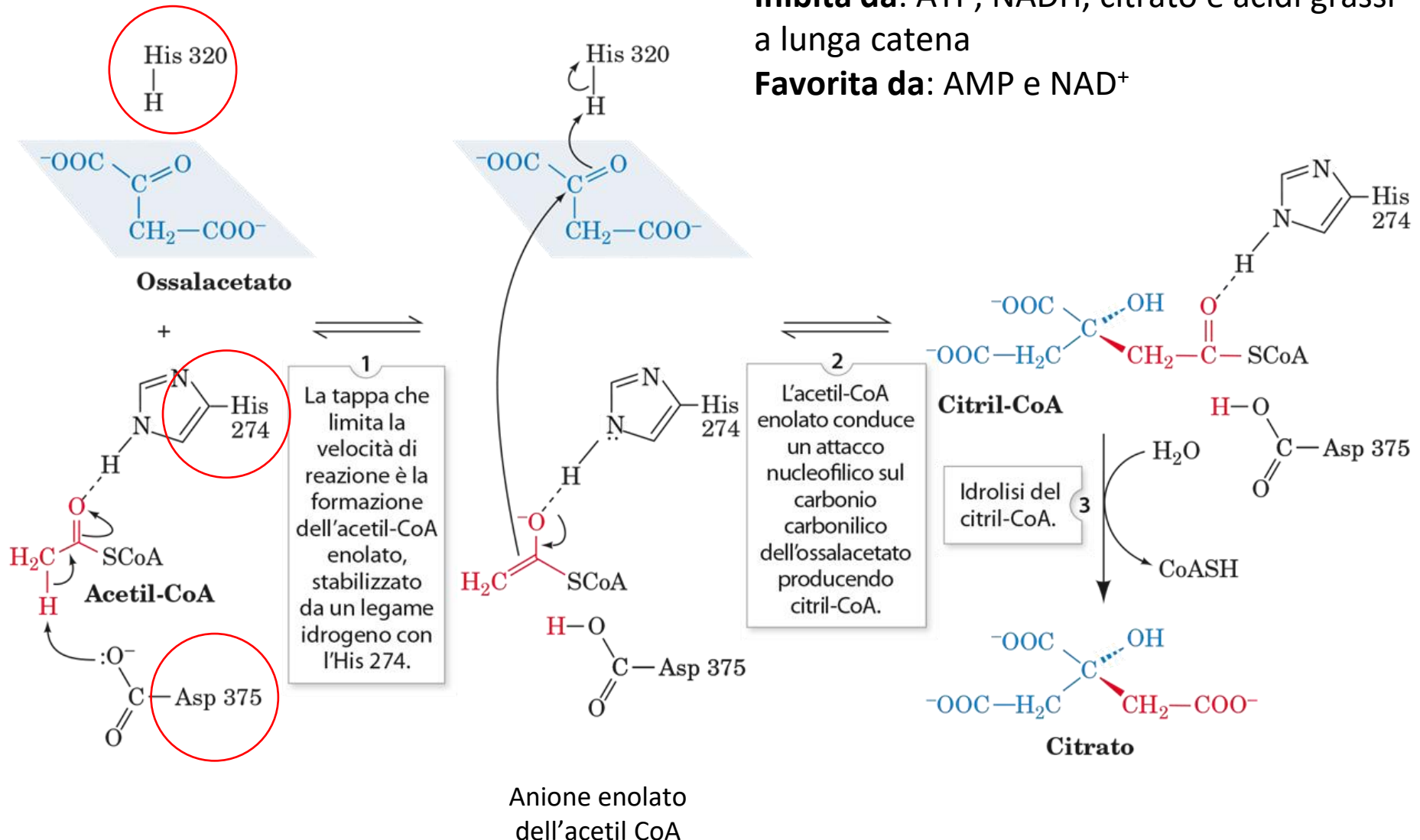
Forma chiusa



Citrato sintasi:

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

Favorita da: AMP e NAD⁺



Principali meccanismi di regolazione nel lievito:

Attivazione da ADP

L'enzima è attivato allostericamente dall'ADP, indicando un basso stato energetico della cellula. Questo aumenta la produzione di NADH e la capacità energetica attraverso la catena respiratoria.

Inibizione da ATP

L'ATP in eccesso inibisce allostericamente l'enzima, rallentando il ciclo di Krebs quando l'energia è sufficiente.

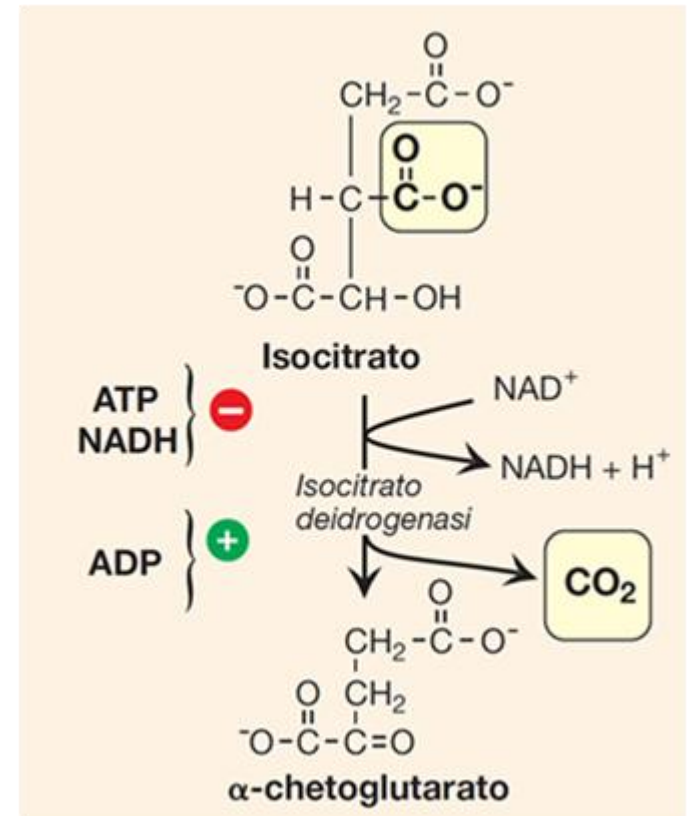
Regolazione da NADH

L'accumulo di NADH segnala uno stato ridotto elevato, che inibisce l'enzima, prevenendo un eccesso di flusso nel ciclo.

Controllo metabolico indiretto

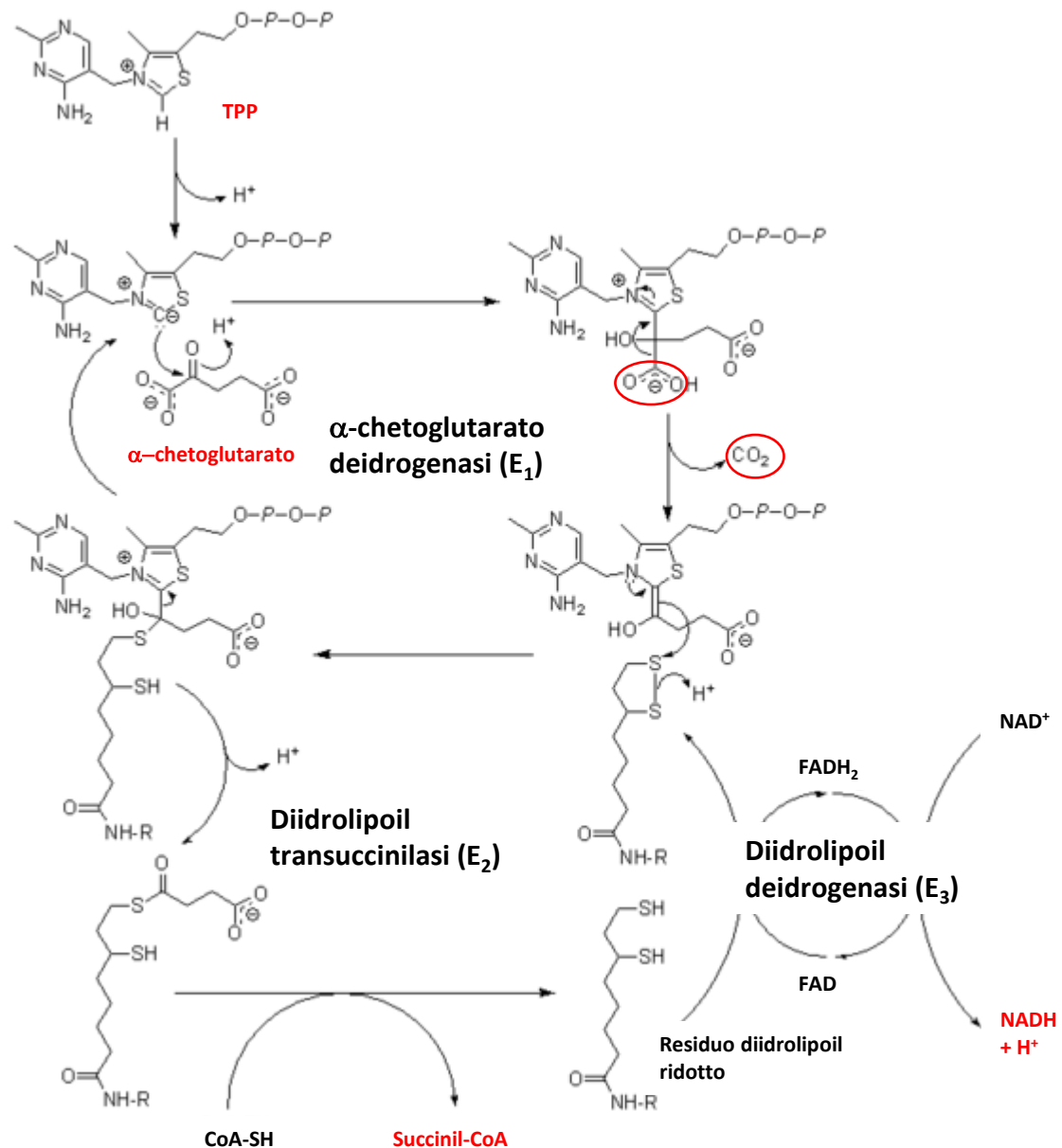
La disponibilità di substrati (isocitrato e NAD^+) e l'equilibrio tra NADH/NAD^+ modulano l'attività dell'enzima.

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 transsuccinilasi (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

Principali meccanismi di regolazione nel lievito:

Inibizione da NADH

L'accumulo di NADH, indicatore di un elevato stato energetico, inibisce l'enzima allostericamente, rallentando il ciclo di Krebs.

Inibizione da succinil-CoA

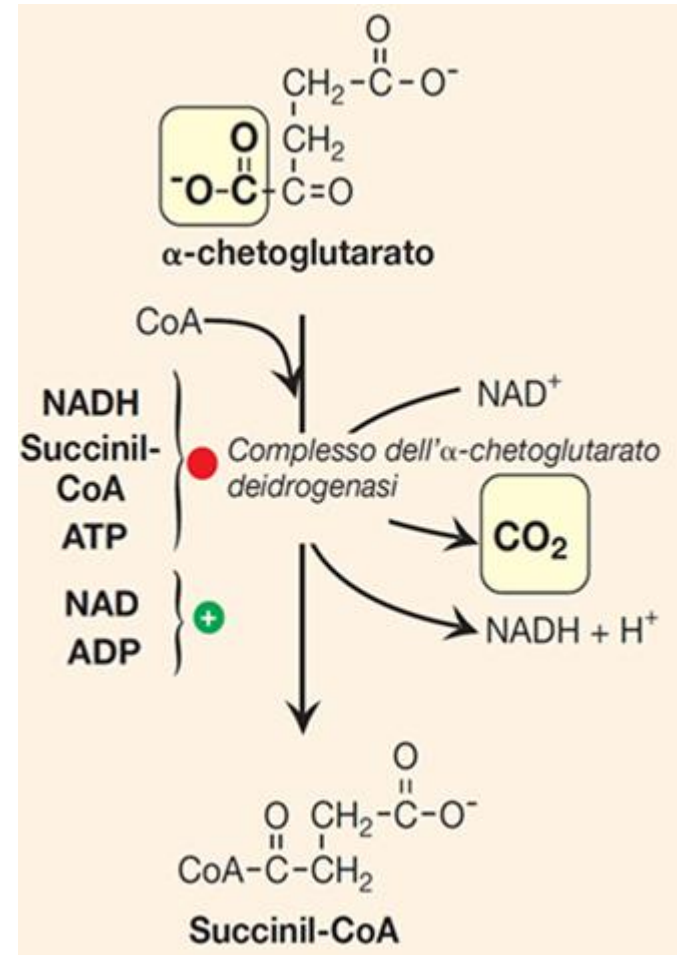
L'accumulo di succinil-CoA funge da feedback negativo, evitando eccessiva produzione di succinil-CoA e regolando il flusso di carbonio.

Inibizione da ATP

L'ATP in eccesso segnala abbondanza energetica e riduce l'attività dell'enzima, limitando la produzione di NADH e GTP (tramite succinil-CoA sintetasi a valle).

Attivazione indiretta da ADP o NAD^+

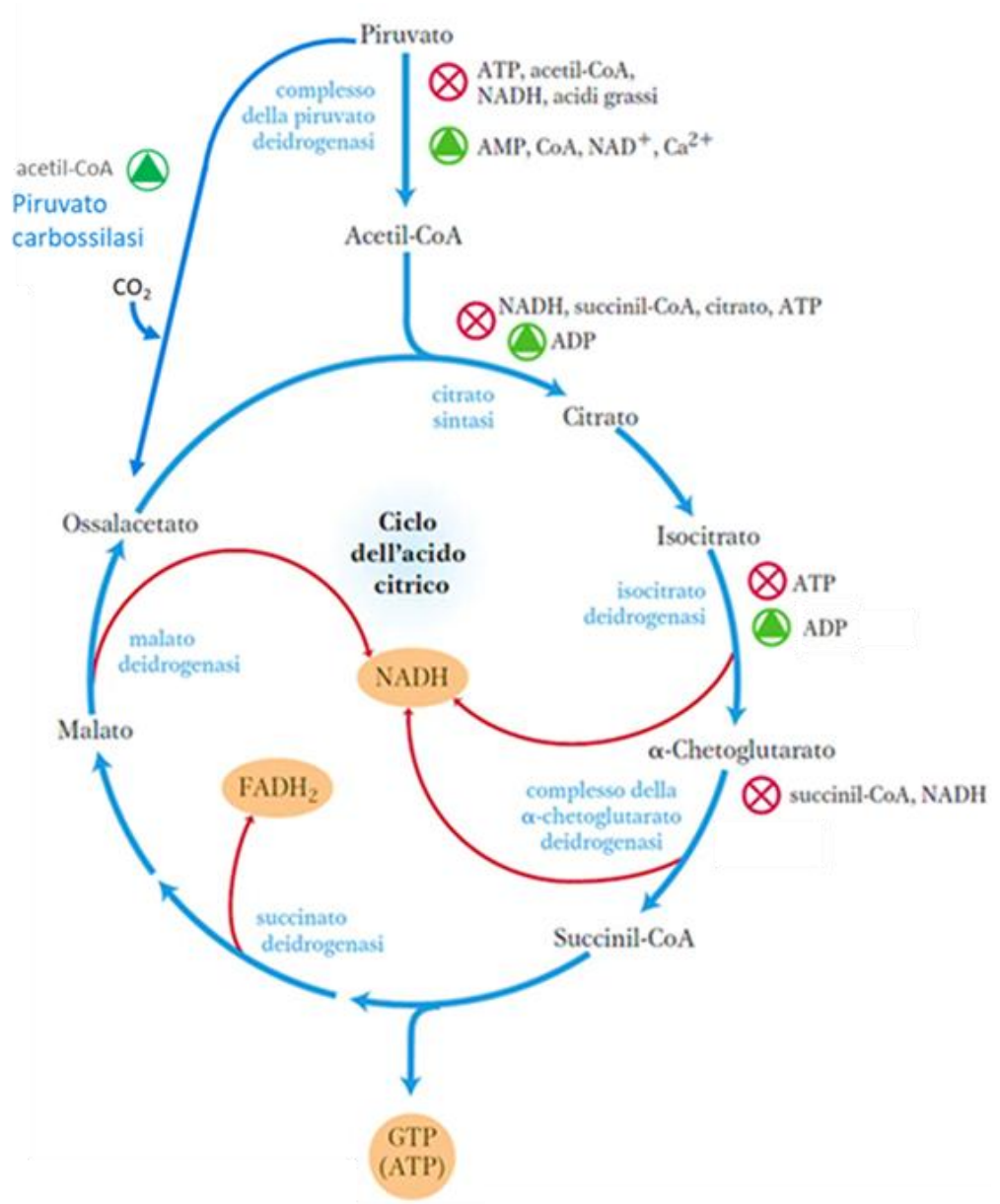
Basso livello di energia (ADP alto) o alta disponibilità di NAD^+ favoriscono l'attività del complesso, stimolando la produzione di energia.



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



Riassunto della regolazione:

Disponibilità di substrati:

- **Acetil-CoA:** il ciclo non può procedere senza acetil-CoA, prodotto dalla degradazione di carboidrati (piruvato), grassi (β -ossidazione) e alcuni aminoacidi.
- **NAD⁺ e FAD:** sono coenzimi ossidanti; se sono ridotti (NADH, FADH₂) in eccesso, il ciclo rallenta.
- **ADP/ATP:** un alto livello di ATP indica che la cellula ha sufficiente energia, mentre un alto livello di ADP stimola il ciclo.

Regolazione generale

Il ciclo è strettamente regolato dall'equilibrio energetico della cellula:

- Quando l'ATP è abbondante: rallenta il ciclo con un meccanismo a feedback negativo.
 - Quando l'ADP/AMP è alto: accelera il ciclo con un meccanismo a feedback positivo.
- Anche i prodotti del ciclo stesso (NADH, FADH₂, succinil-CoA) regolano negativamente gli enzimi chiave.

Altri fattori

Ciclo collegato al metabolismo del piruvato: la piruvato deidrogenasi è anch'essa regolata da ATP/NADH/Acetil-CoA.

Disponibilità di ossalacetato: senza ossalacetato il ciclo si arresta. L'ossalacetato è generato dal metabolismo dei carboidrati o da reazioni anaplerotiche.

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

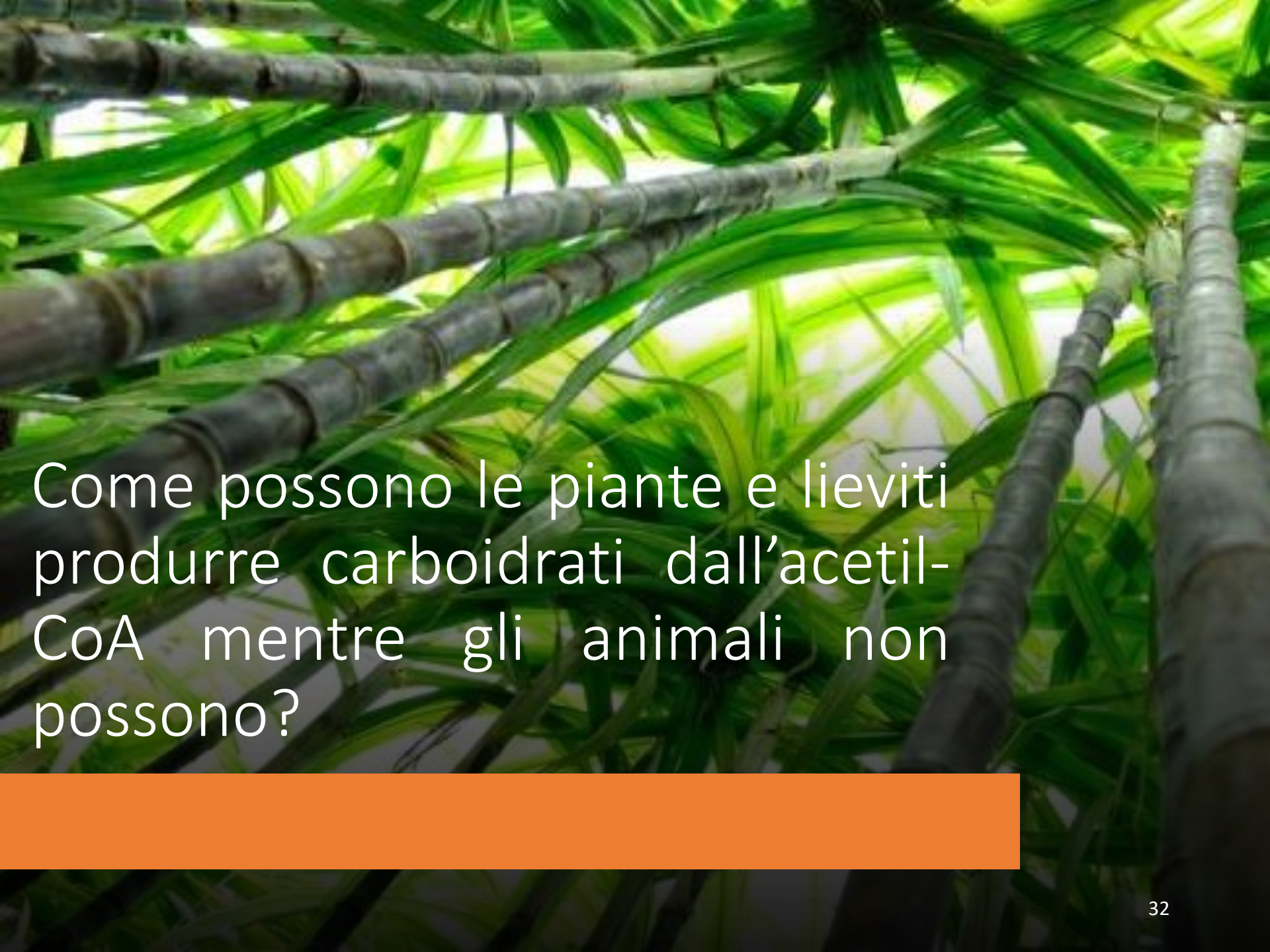
Alti livelli di NADH e bassi livelli di NAD⁺ implicano elevato NADH/NAD⁺

Cellule molto attive

Richiedono e usano più energia della cellula a riposo

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

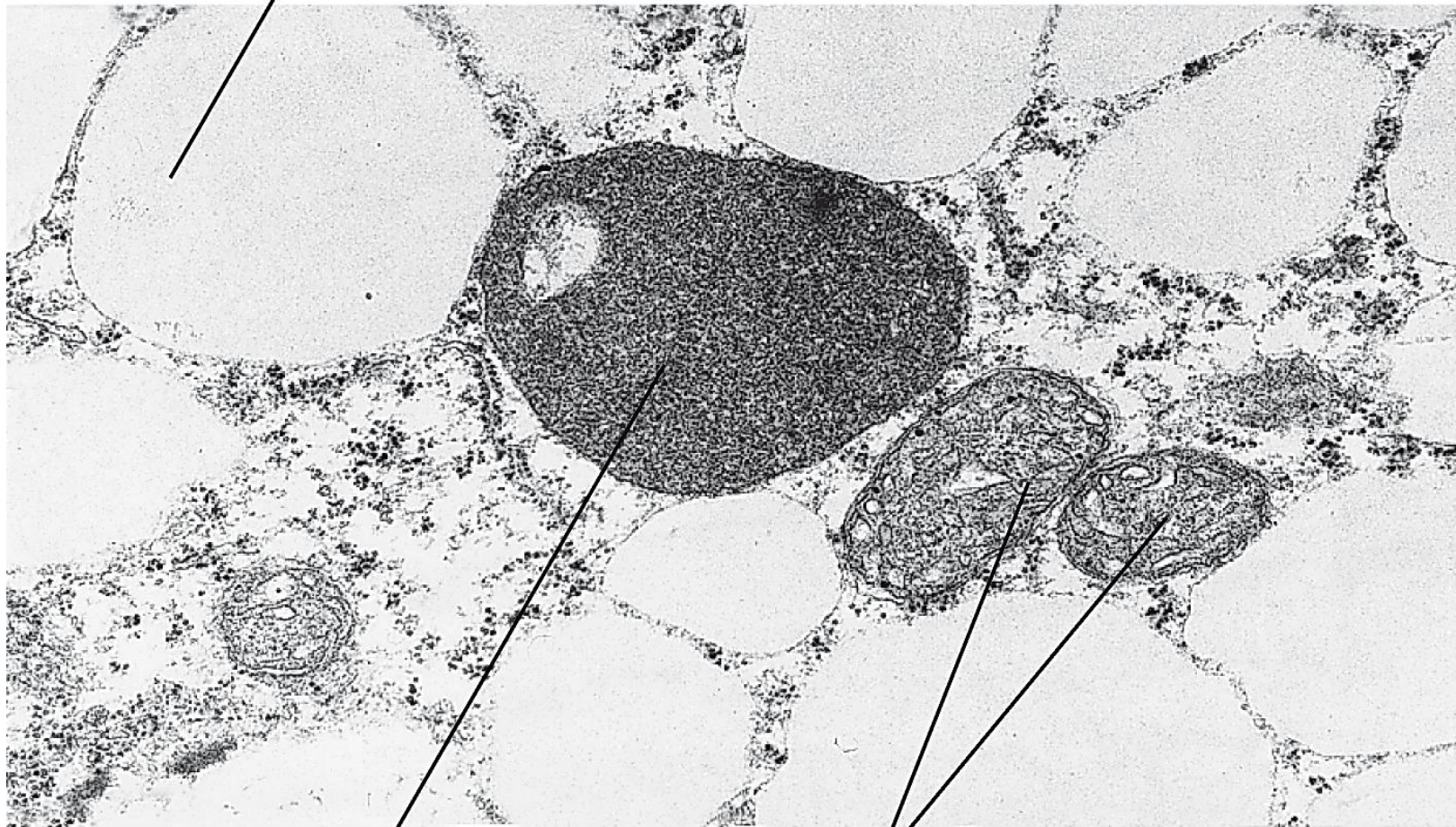
Bassi livelli di NADH ed alti di NAD⁺ implicano basso NADH/NAD⁺



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
gliossisoma, i mitocondri e i vacuoli lipidici che lo
circondano

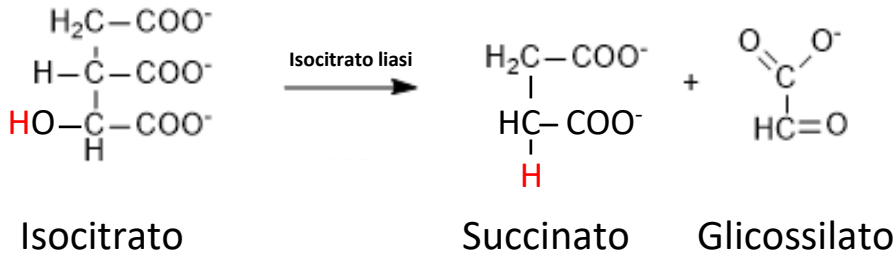


Vacuolo lipidico

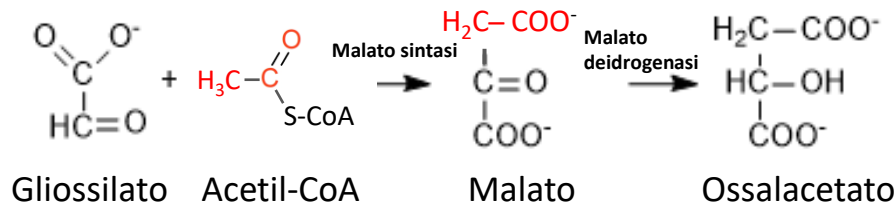
Gliossisoma

Mitocondri

Isocitrato liasi

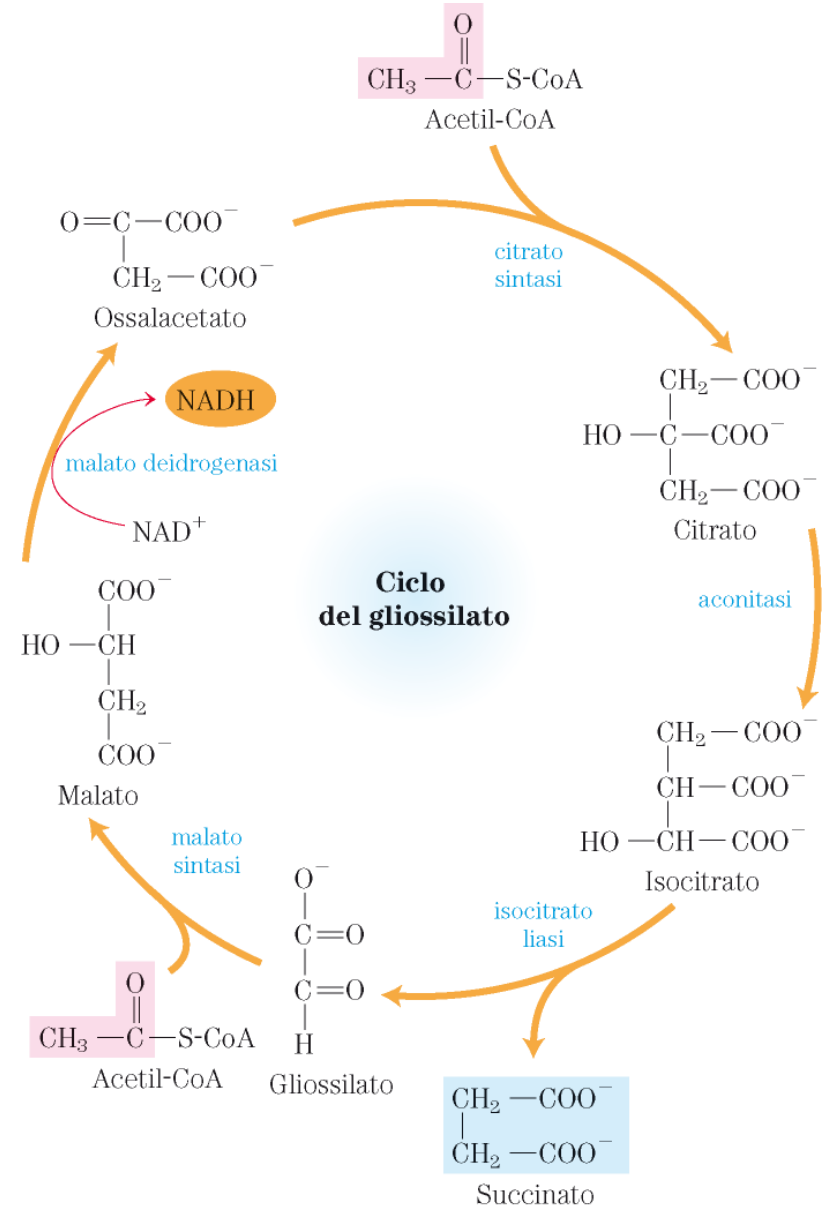


Malato sintasi

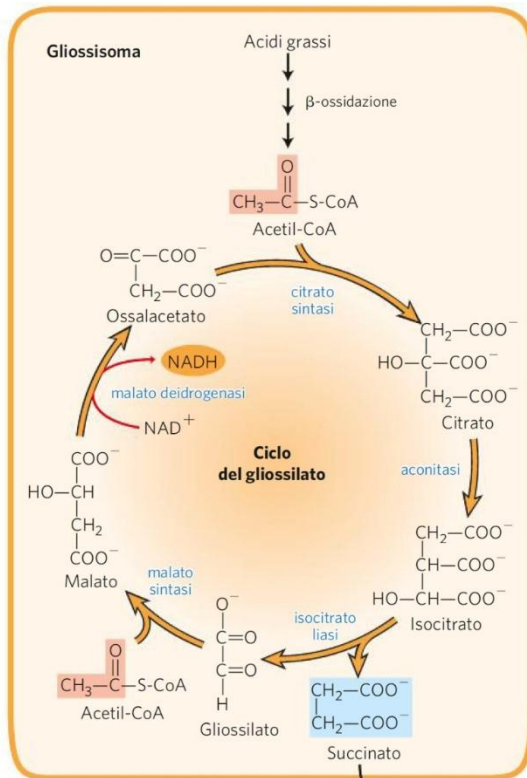


Il succinato prodotto è trasportato nel mitocondrio per essere ulteriormente trasformato.

Substrato di partenza



Prodotto finale

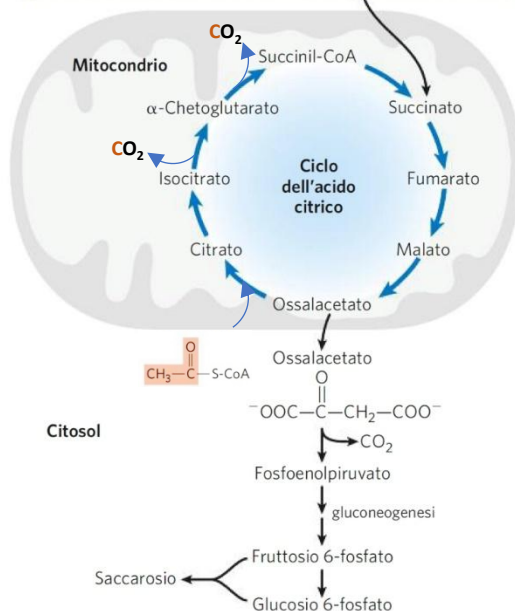


Confronto tra il ciclo di Krebs e del gliossilato nel lievito e il ruolo nel metabolismo:

Krebs: è la principale via catabolica per l'energia e produzione di precursori per la biosintesi (aminoacidi, nucleotidi). Ossidazione completa dell'acetil-CoA a CO₂, produzione di energia (NADH, FADH₂, GTP/ATP).

Gliossilato: permette la gluconeogenesi da fonti di carbonio a due atomi, essenziale per la sopravvivenza del lievito in presenza di substrati come l'etanolo, il glicerolo o l'acetato.

Trasforma l'acetil-CoA in precursori biosintetici (come succinato e malato) senza perdita di carbonio come CO₂



Regolazione: La cellula deve regolare entrambi i cicli in modo coordinato per bilanciare fabbisogno energetico e biosintesi.

Disponibilità di substrati

Acetil-CoA e ossalacetato sono necessari per entrambi i cicli.

Se ossalacetato è scarso, il ciclo di Krebs rallenta, ma il ciclo del glicolato può aiutare a generarlo per la gluconeogenesi.

Equilibrio energetico della cellula

ATP/NADH elevati inibisce il ciclo di Krebs.

ADP/NAD⁺ elevati stimola il ciclo di Krebs.

Il ciclo del glicolato è meno sensibile all'ATP e più influenzato dalla disponibilità di carbonio e dallo stato nutrizionale.

Segnalazione metabolica e repressione da glucosio

La presenza di glucosio reprime il ciclo del glicolato, mentre il ciclo di Krebs funziona normalmente per generare energia.

In assenza di zuccheri fermentabili e in presenza di acetato/etanolo, il ciclo del glicolato viene attivato per fornire precursori carboniosi alla gluconeogenesi.

Nota: L'isocitrato è un metabolita di biforcazione: può andare al Krebs o al ciclo del glicolato, quindi la regolazione dipende dallo stato energetico e dalla disponibilità di carbonio.

Il meccanismo chiave della regolazione è l'isocitrato

Può essere:

- Ossidato a α -chetoglutarato dall'isocitrato deidrogenasi, entrare nel ciclo di Krebs con produzione di energia (NADH) e precursori biosintetici.
- Scisso in succinato e glicossilato dall'isocitrato liasi nel ciclo del glicossilato con conservazione del carbonio per gluconeogenesi e biosintesi.



Diagramma schematico del metabolismo energetico che mostra la via del ciclo dell'acido citrico e la via del ciclo del glicossilato.

Acetil-CoA entra nel ciclo dell'acido citrico, formando **Isocitrato**.

Isocitrato viene convertito in **Succinato, glicossilato** (via **isocitrato liasi**) e in **α-Chetoglutarato** (via **isocitrato deidrogenasi**).

Succinato, glicossilato entra nel ciclo del glicossilato, che produce **Ossalacetato**.

α-Chetoglutarato entra nel ciclo dell'acido citrico, che produce **NADH, FADH₂** e **ATP** (via **fosforilazione ossidativa**).

Ossalacetato può essere convertito in **Glucosio** (via **gluconeogenesi**) o in **Amminoacidi, nucleotidi**.

Il diagramma include anche i regolatori: **AMP, ADP** inibiscono l'**isocitrato liasi** e l'**isocitrato deidrogenasi**, mentre la **proteina chinasi** e le **fosfatasi** regolano l'**isocitrato deidrogenasi**.

Alta richiesta energetica stimola l'isocitrato-DH e l'isocitrato fluisce nel ciclo di Krebs con produzione di NADH e ATP.

Disponibilità di carbonio

Solo acetato o etanolo disponibili l'isocitrato liasi è attiva e il flusso va verso ciclo del glicolito che supporta la gluconeogenesi.

La scelta tra Isocitrato-DH e lisocitrato liasi dipende:

- Permette un **adattamento rapido** del metabolismo del lievito alle condizioni nutrizionali.