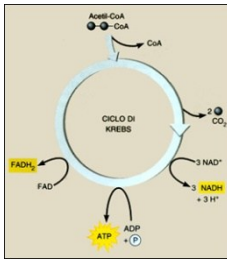


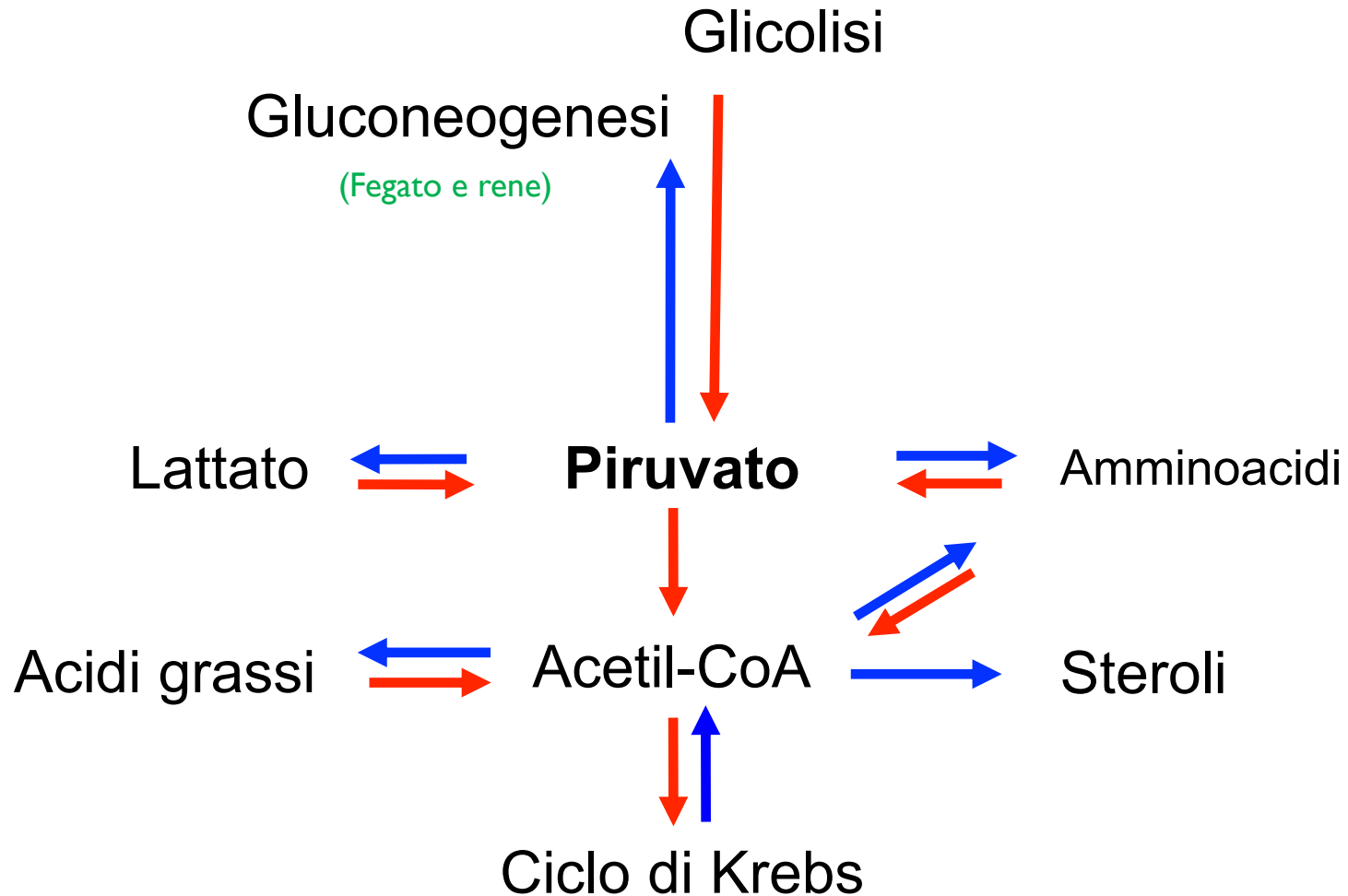
Modulo 11

Il ciclo di Krebs



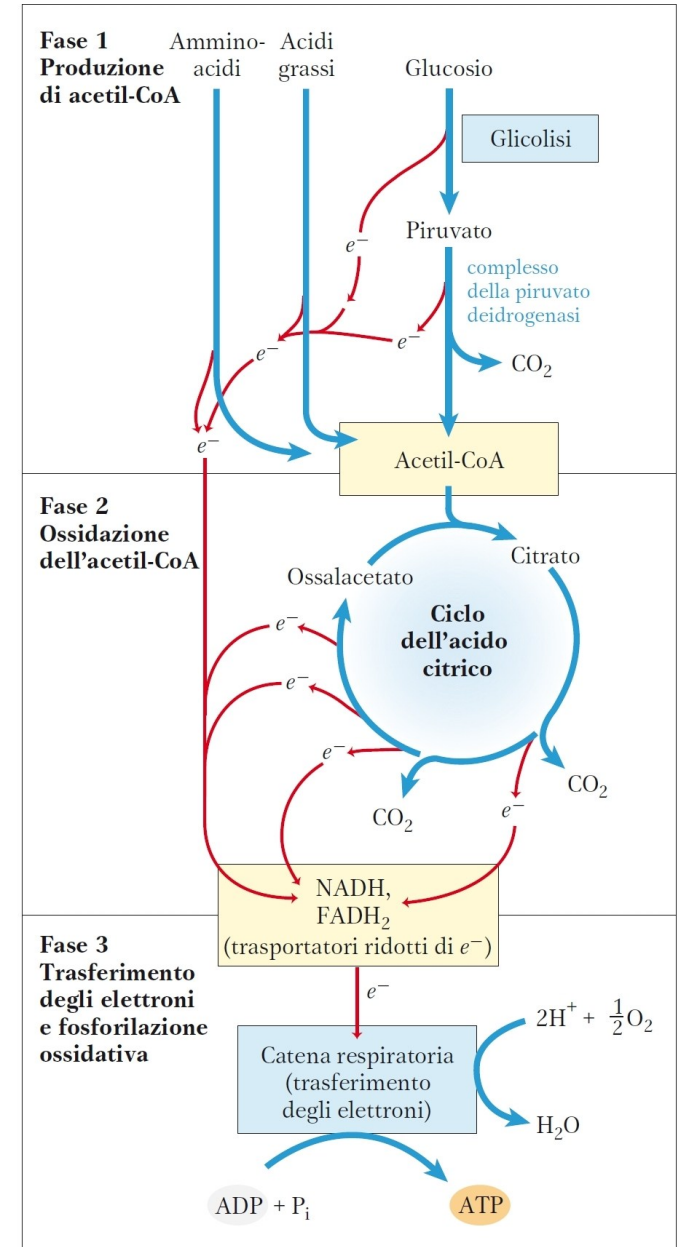
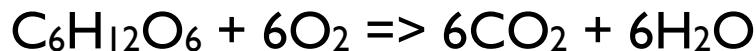
CdS in MCdS in Medicina e chirurgia ,
Odontoiatria e protesi dentaria 2025-26

Alternative metaboliche del piruvato

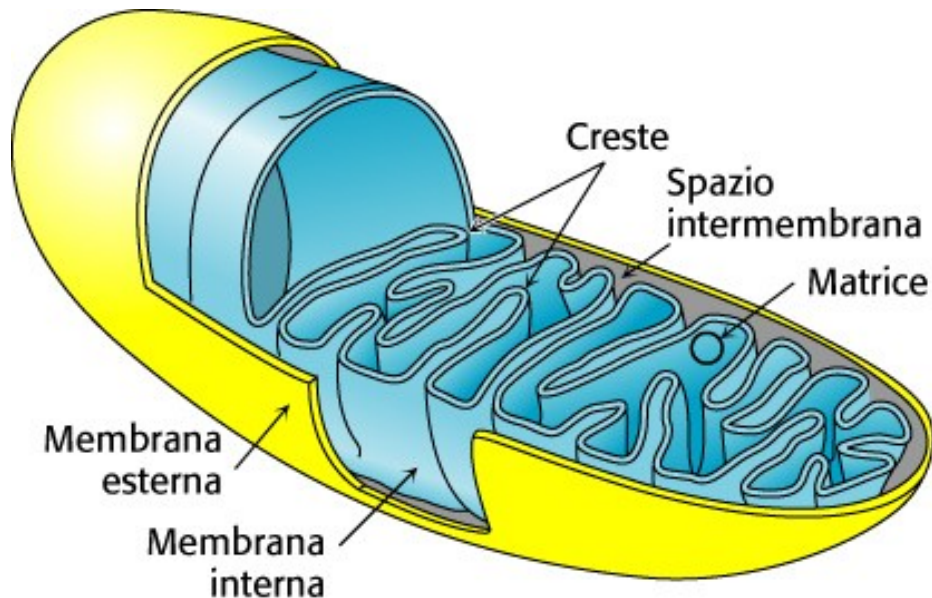


Il destino metabolico ossidativo del piruvato

- ▶ In condizioni **aerobie** il **piruvato** viene decarbossilato ad **acetato (acetil-Coa)**. L'acetil-Coa viene quindi ossidato ulteriormente nel **ciclo dell'acido citrico** (Krebs).
- ▶ **Ciclo dell'acido citrico**: serie di reazioni ossidoreduattive che portano alla formazione di **CO₂** dei 2 carboni dell'acetato e al trasferimento degli e⁻ al NAD⁺ e FAD riducendoli a **NADH e FADH₂**
- ▶ Gli **e⁻** (sotto forma di NADH e FADH₂) estratti sono quindi trasferiti alla catena di trasporto degli elettroni e infine all'ossigeno molecolare per guidare la fosforilazione dell'ADP → ATP (**respirazione cellulare**).



La decarbossilazione del piruvato e l'ossidazione dell'acetato hanno luogo nella matrice mitocondriale

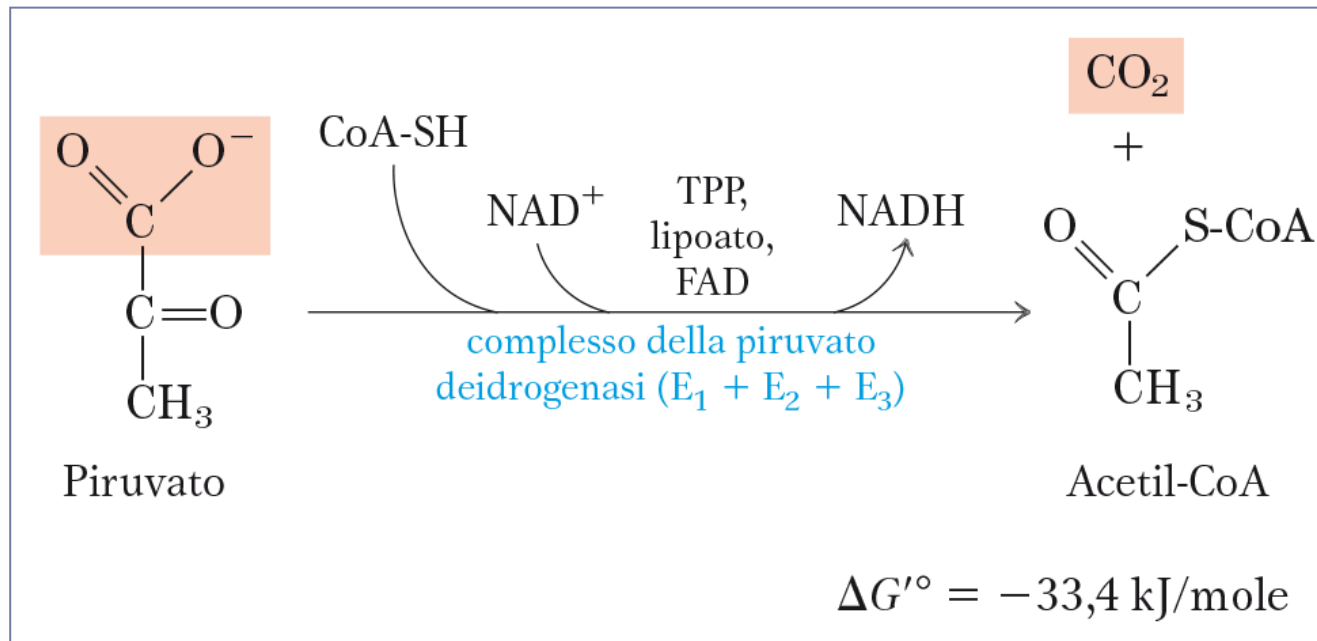


Il **piruvato** viene trasportato dal **trasportatore del piruvato** all'interno della **matrice mitocondriale** dove avviene anche il **ciclo dell'acido citrico**. La sintesi di ATP attraverso la **fosforilazione ossidativa** avviene sul lato interno (matrice) della membrana interna del mitocondrio.



Il piruvato viene decarbossilato ed ossidato ad acetil-Coa

Il **piruvato** viene convertito ad **acetil-Coa** e **CO₂** da una **decarbossilazione ossidativa** ad opera del **complesso della piruvato deidrogenasi (PDH)**. La reazione nelle condizioni cellulari è irreversibile.



PDH: complesso enzimatico formato da un insieme di subunità, appartenenti a tre diversi enzimi (E₁, E₂, E₃). MW = 4-10⁶ dalton. La reazione richiede l'intervento di 5 coenzimi: TPP, lipoato, CoA, FAD e NAD⁺

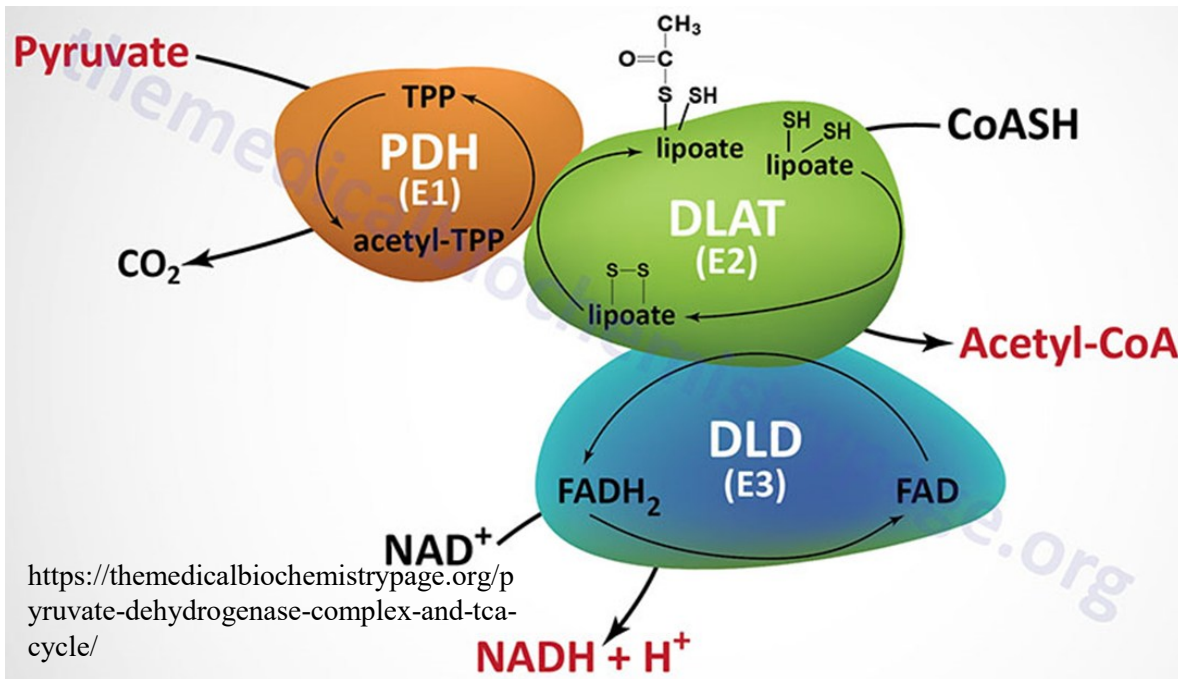
Il complesso della piruvato deidrogenasi e dei suoi cofattori

Piruvato deidrogenasi (PDH)	E1	Tiamina pirofosfato
Diidrolipoil transacetilasi (DLAT)	E2	Lipoamide (lipoato +Lys)
Diidrolipoil deidrogenasi (DLD)	E3	FAD

PDH (E1): è la componente decarbossilante del piruvato, il composto risultante (C2) viene trasferito sul lipoato, del DLAT (E2) per essere ossidato ad acetile.

L'acetile viene legato da E2 al Coenzima A per dare **acetil-Coa**.

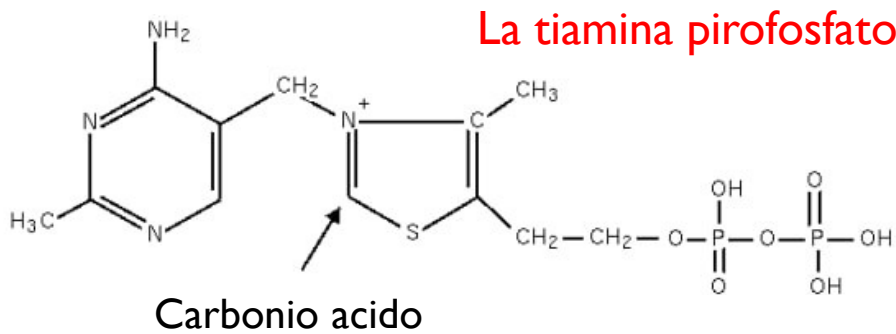
La 3 componente, DLD (E3), serve a ripristinare il lipoato ossidato utilizzando sia il FAD legato sia NAD^+ .



La Tiamina Pirofosfato (TPP) e la Decarbossilazione

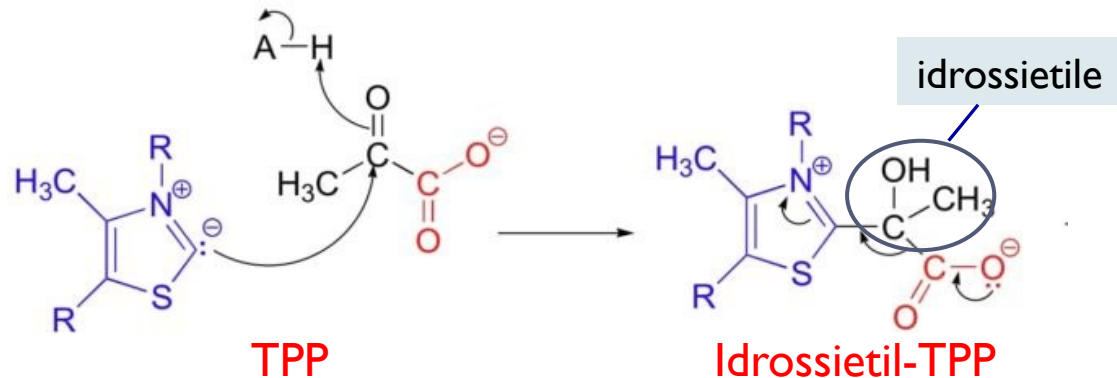
La tiamina pirofosfato (**TPP**) è il coenzima che partecipa a reazioni di **decarbossilazione** degli **α -chetoadidi**. Derivazione: **TPP** deriva dalla **tiamina (vitamina B1)** per aggiunta di un pirofosfato.

TPP è formata da due anelli, pirimidinico (come le basi) e tiazolico (come istidina) uniti da un ponte metilenico CH_2 .



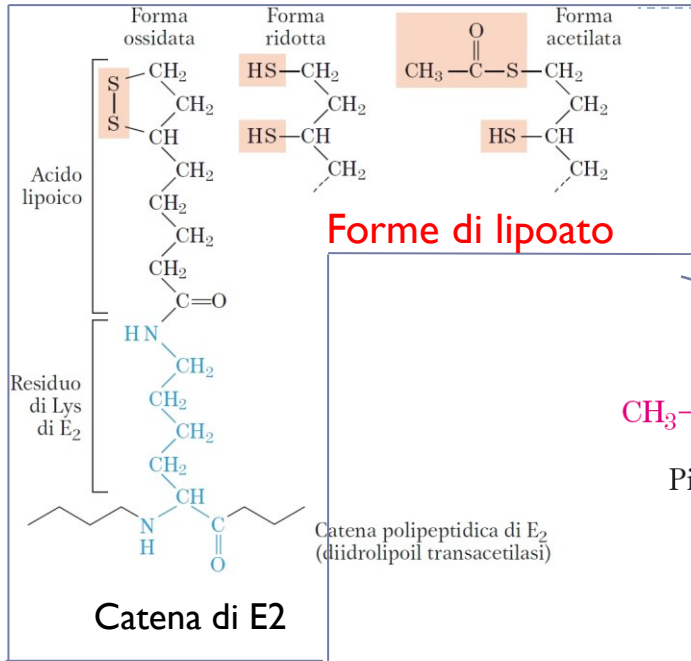
La parte reattiva è il carbonio tra N e S dell'anello tiazolico: è particolarmente acido e perde un protone formando un **carboanione** (indicato dalla freccia)

Il carbanione attacca il carbonio carbonilico del piruvato. La reazione porta alla liberazione di CO_2 (**in rosso**) e alla formazione di un intermedio **idrossietil-TPP**

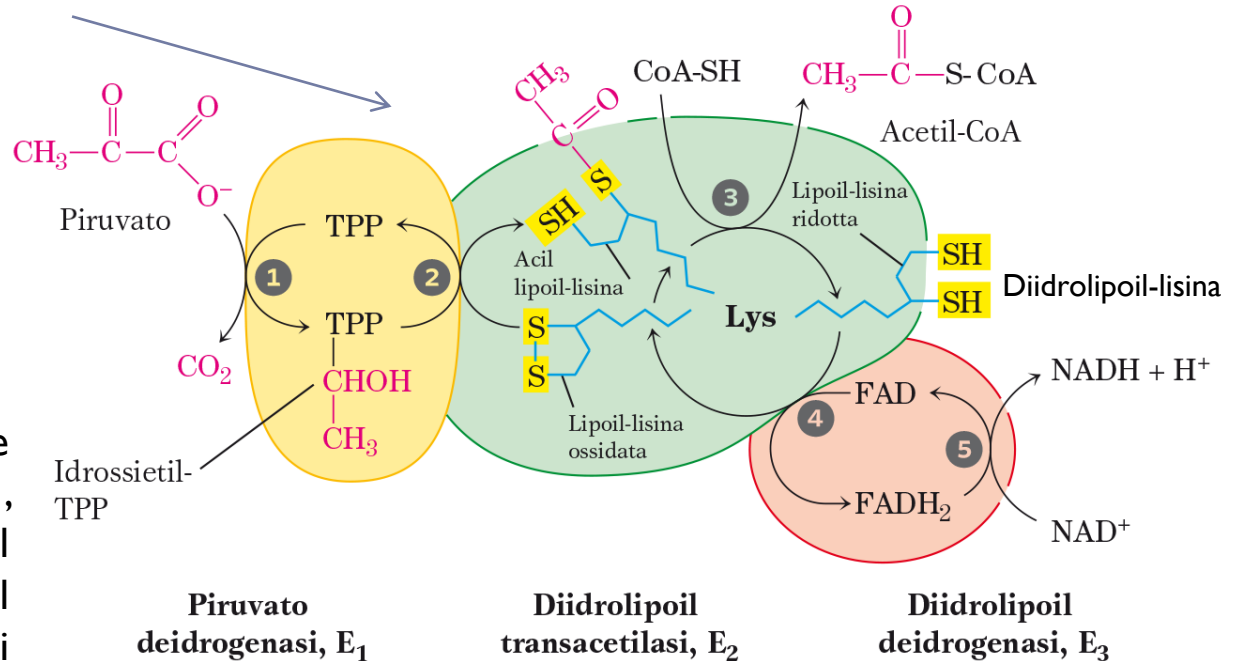


Una carenza di Vitamina B1 blocca la **PDH**, ma anche il ciclo di Krebs (**α -chetoglutarato DH**) e la via del pentosio fosfato (**transchetolasi**), quindi blocca i principali snodi del metabolismo

Il complesso della piruvato deidrogenasi: l'azione di E2 ed E3



Enzima		Gruppo prostetico
Piruvato deidrogenasi	E1	Tiamina pirofosfato (TPP)
Diidrolipoil transacetilasi	E2	Acido lipoico (lipoato)
Diidrolipoil deidrogenasi	E3	FAD



Il braccio della lipoamide raccoglie il gruppo **idrossietilico** da E₁, ossidandolo a gruppo **acetile**. Il gruppo acetile viene trasferito al CoA, formando **Acetil-CoA** che si stacca dal complesso.

E₃ riossida la diidrolipoamide di E₂. Gli elettroni passano dalla lipoamide al FAD, che diventa FADH₂. Il FADH₂ cede immediatamente gli elettroni al NAD⁺, producendo NADH + H⁺.

Incanalamento del substrato all'interno della PDH

La PDH non è un semplice enzima, ma una "macchina molecolare" coordinata la cui struttura garantisce un'efficienza catalitica eccezionale.

Architettura del complesso (nei mammiferi)

- Dimensione di 50 nm (5x un ribosoma)
- Stechiometria: Un nucleo centrale di 60 copie di E2, circondato da 30 copie di E1 e 12 copie di E3. Questa organizzazione spaziale permette a più reazioni di avvenire simultaneamente.

Fenomeno dell'**incanalamento del substrato**.

Grazie al braccio flessibile della lipoamide (su E2), gli intermedi della reazione vengono passati direttamente da un sito attivo all'altro senza mai lasciare il complesso (nessuna diffusione).

Mantenendo i substrati "incanalati" all'interno del complesso, la concentrazione locale effettiva è altissima: aumenta drasticamente la probabilità di incontri produttivi tra enzima e reagente, velocizzando l'intero processo di produzione di Acetil-CoA.

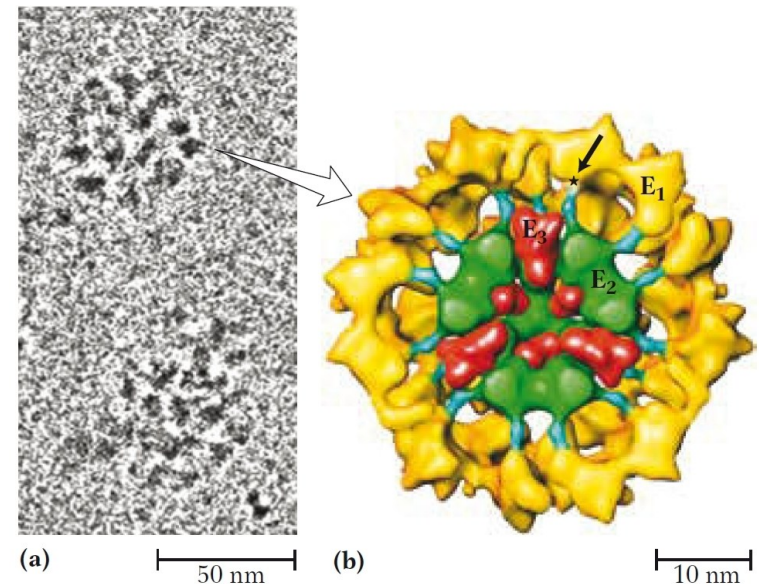


Immagine al criomicroscopio elettronico. Le particelle, visualizzate da più angolazioni, vengono combinate assieme, per dare una visualizzazione 3D (a dx).

Il ciclo dell'acido citrico (ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici)

Il processo di ossidazione dell'acetil-Coa avviene nel ciclo dell'acido citrico



Il ciclo dell'acido citrico è il punto di partenza circolare di molte vie metaboliche



Il ciclo di Krebs (o dell'acido citrico): uno sguardo d'assieme

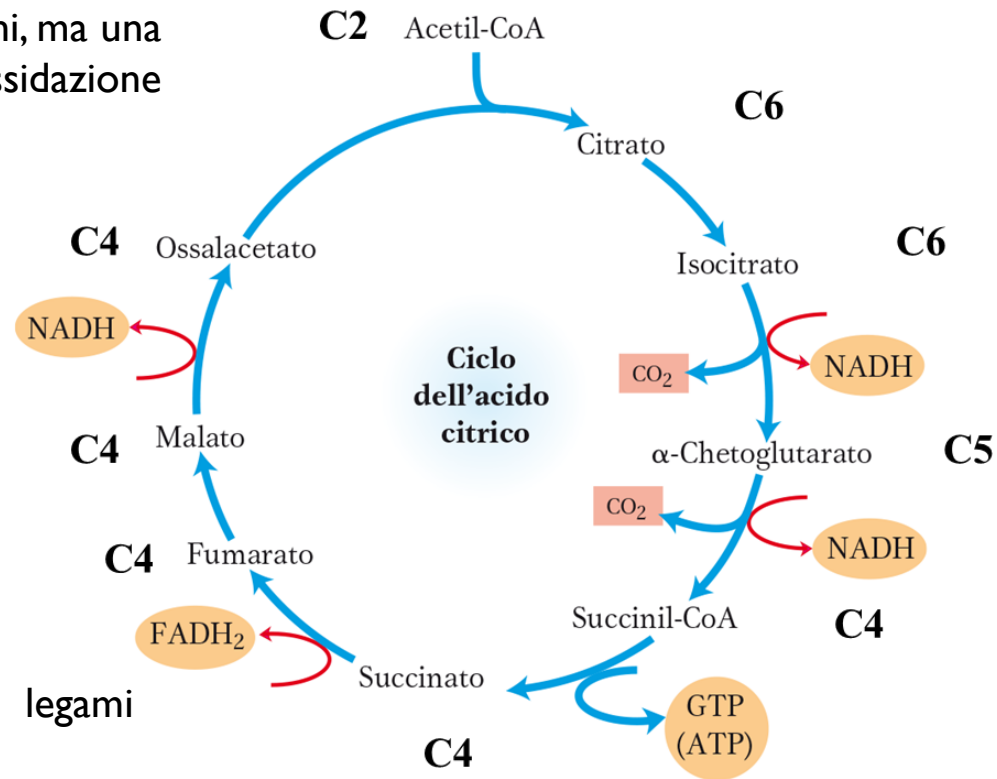
Il ciclo di Krebs non è solo una serie di reazioni, ma una soluzione chimica elegante al problema dell'ossidazione del gruppo acetile.

L'obiettivo del ciclo è ossidare l'unità bi-carboniosa dell'Acetil-CoA

a CO_2 . Tuttavia, la rottura diretta di un legame C-C nell'acetato non è chimicamente favorevole nelle condizioni cellulari. La soluzione: La cellula condensa l'acetato (2C) con l'ossalacetato (4C) per formare il citrato (6C).

All'interno del citrato e dei suoi derivati, i legami diventano molto più facili da rompere.

Una volta riottenuto un C4 (succinil-Coa) , le successive 4 reazioni servono a riottenere l'ossalacetato per ricominciare il ciclo



I tappa: Il citrato è sintetizzato a partire da ossalacetato e acetil-Coa

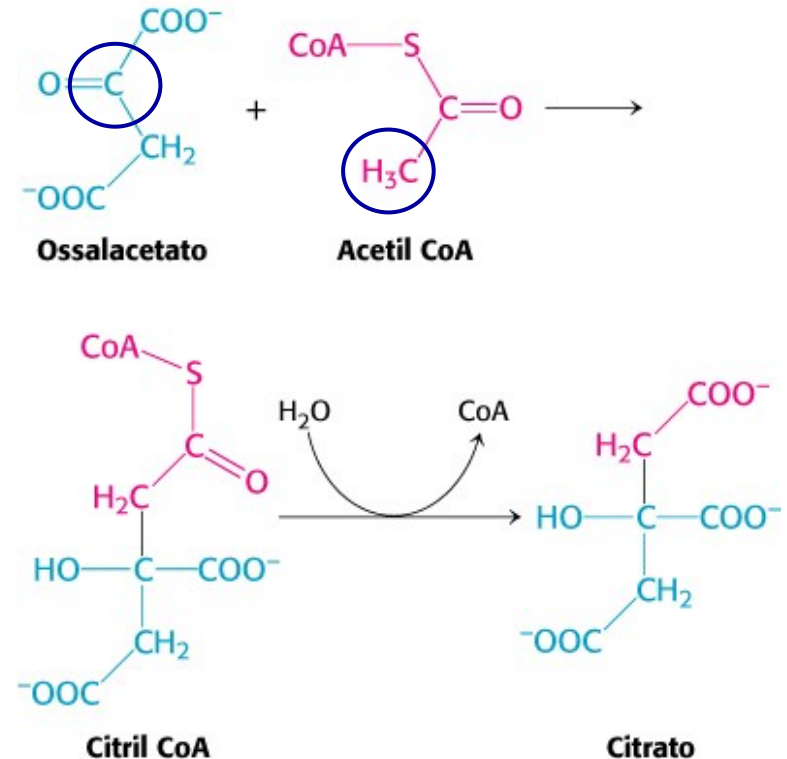
La prima tappa è una reazione di condensazione che funge da "porta d'ingresso" del ciclo di Krebs.

L'ossalacetato (OA) è un α -chetoacido a 4 atomi di carbonio che agisce come "accettore" o trasportatore dell'unità acetilica.

La **citrato sintasi** catalizza la reazione di condensazione aldolica (di Claisen) tra l'**ossalacetato** ed l'**acetil-Coa** attraverso i passaggi chiave:

L'ossalacetato e l'acetil-CoA reagiscono per produrre il citril-CoA (un tioestere legato all'enzima).

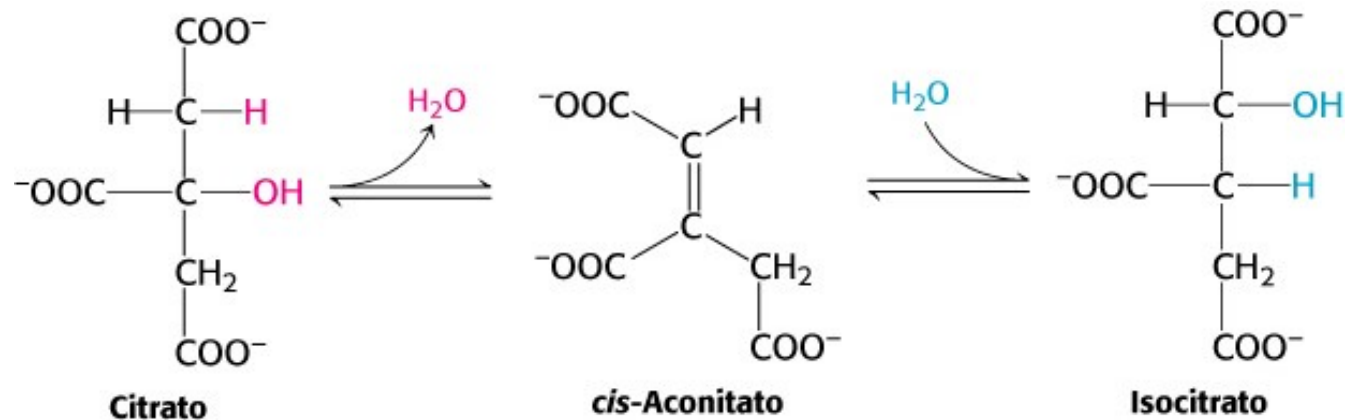
L'idrolisi del citril-Coa libera molta energia utilizzata per ottenere **il citrato** attraverso una reazione irreversibile in condizioni fisiologiche.



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

2 tappa: isomerizzazione del citrato

Il citrato deve essere trasformato in isocitrato per predisporre la molecola alle successive decarbossilazioni ossidative. L'**aconitasi** è l'enzima che catalizza una reazione a due passaggi di deidratazione, e formazione dell'intermedio *cis*-aconitato, seguita da idratazione

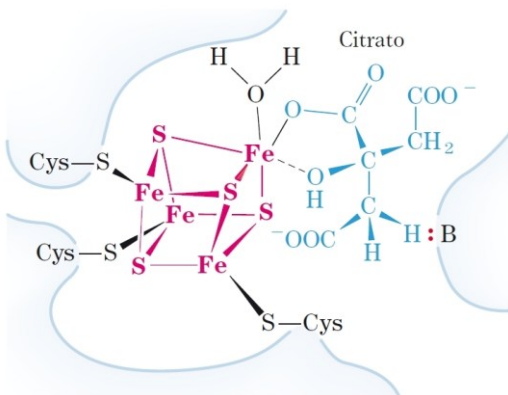


$$\Delta G^{\circ} = +13,0 \text{ kJ/mol}$$

Aconitasi contiene un centro Ferro-Zolfo: essenziale nel legame al substrato e nella catalisi.

Sebbene la reazione sia leggermente sfavorita verso l'isocitrato, l'equilibrio è spinto a destra dall'azione di massa

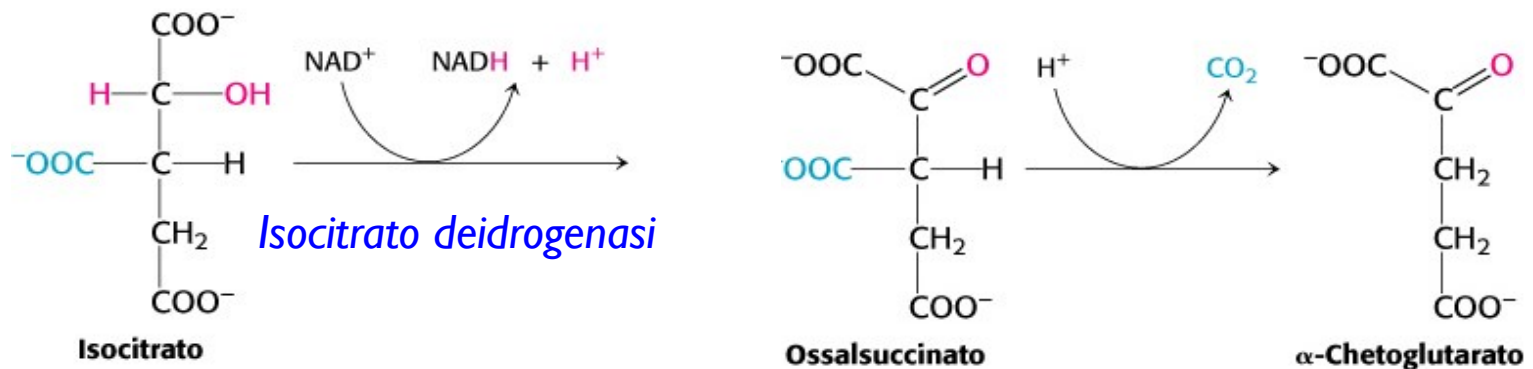
Aconitasi: esempio di proteina “**moonlighting**” (che hanno seconda attività differente). Quando i livelli di ferro sono bassi, l'isoenzima citosolico perde il suo centro 4Fe-4, cambia conformazione e diventa una proteina che regola la sintesi di proteine coinvolte nell'omeostasi del ferro



3 tappa: ossidazione e decarbossilazione dell'isocitrato

In questa fase avviene la trasformazione dell'**isocitrato** in **α -chetoglutarato**, segnando il passaggio da una molecola a 6 atomi di carbonio a una a 5 e producendo la prima molecola di NADH.

La **isocitrato DH** ossida l'**isocitrato** a **ossalsuccinato**, un intermedio instabile legato all'enzima che perde una molecola di CO_2 trasformandosi in **α -chetoglutarato**.



$$\Delta G^{\circ} = - 21 \text{ kJ/mol}$$

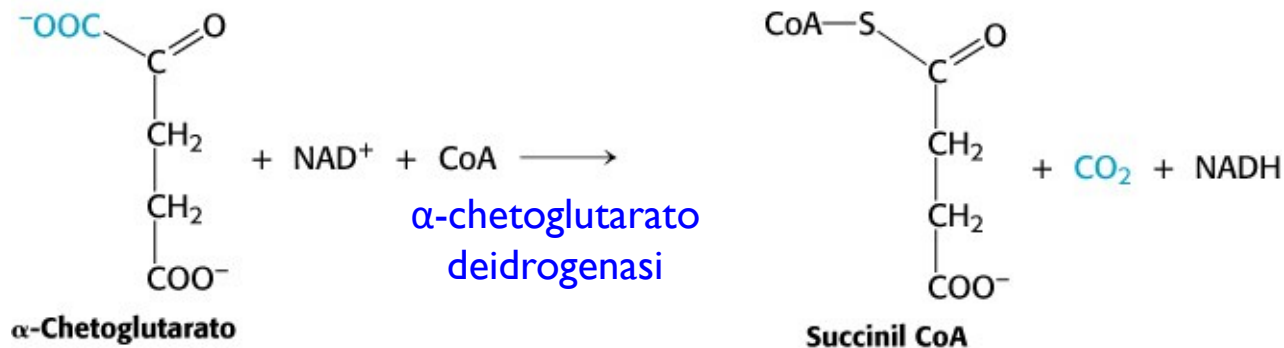
L'evoluzione ha differenziato l'uso di questo enzima in base al compartimento cellulare:

- isoforma mitocondriale, NAD⁺-dipendente, parte integrante del ciclo di Krebs,
- isoforma citosolica, NADP⁺-dipendente, e fonte di NADPH necessario nelle biosintesi riduttive.

4 tappa: Ossidazione e Decarbossilazione dell' α -chetogluturato

Questa fase completa la seconda decarbossilazione ossidativa del ciclo, trasformando un composto a 5 atomi di carbonio in uno a 4 producendo NADH. Il complesso della **α -chetogluturato DH** è quasi identico alla **piruvato DH** (stessi cofattori: TPP, Lipoamide, FAD, NAD⁺, CoA)..

L' **α -chetogluturato** viene decarbossilato, ossidato e legato al **CoA** per originare **succinil-Coa**. L'energia liberata dall'ossidazione è conservata nella formazione di un **legame tioestere** ad alta energia del **succinil-Coa**. La reazione in direzione del succinil-Coa è irreversibile.



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

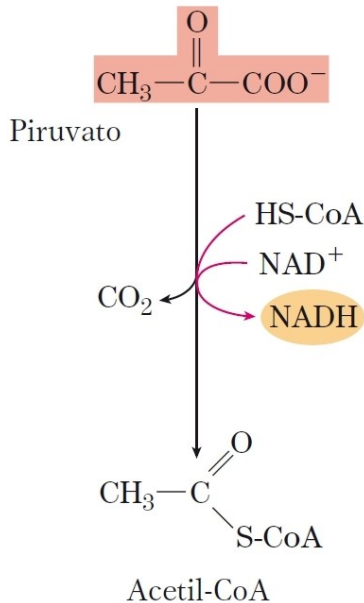
Bilancio del Ciclo fino a questo punto:

Logica dei carboni: si è partiti dall'Ossalacetato (4C) che, condensandosi con l'Acetile (2C), ha formato citrato (6C). Attraverso le tappe 3 e 4, sono stati rimossi 2 atomi di carbonio come CO₂. Risultato: Siamo tornati a uno scheletro a 4 atomi di carbonio (Succinil-CoA).

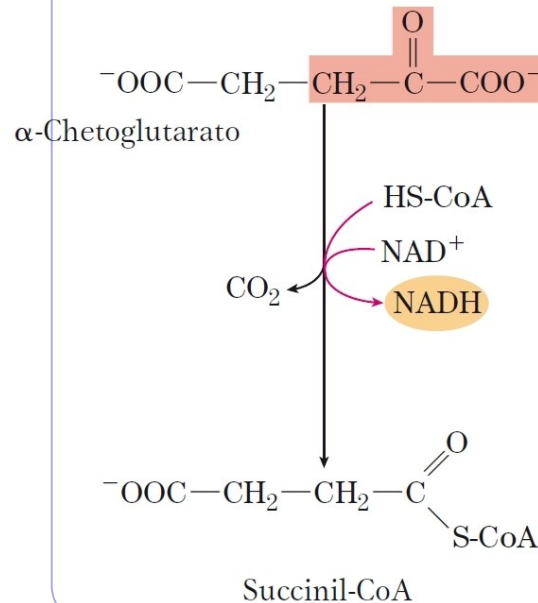
Complesso dell'alfa-chetoglutarato deidrogenasi

La reazione della **α-chetoglutarato DH** è molto simile a quella che porta alla decarbossilazione ossidativa del **piruvato** ad **acetil-Coa** (**piruvato deidrogenasi**) e della ossidazione di **alfa chetoacidi** derivanti da amminoacidi ramificati. Presenti component E1, E2 e E3 con gli stessi coenzimi (TPP, lipoato etc).

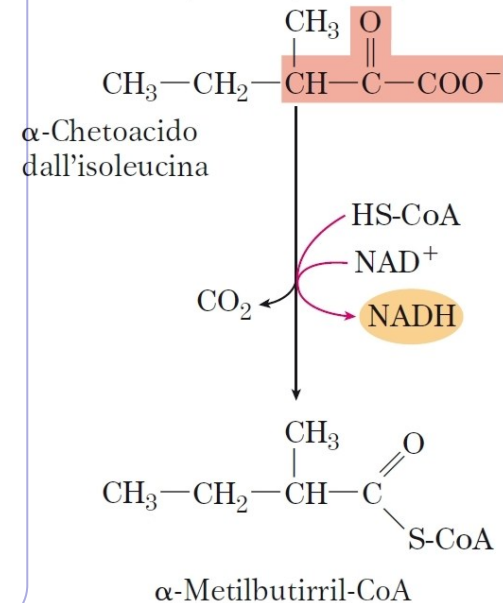
Complesso della piruvato deidrogenasi



Ciclo dell'acido citrico



Ossidazione dell'isoleucina (leucina, valina)

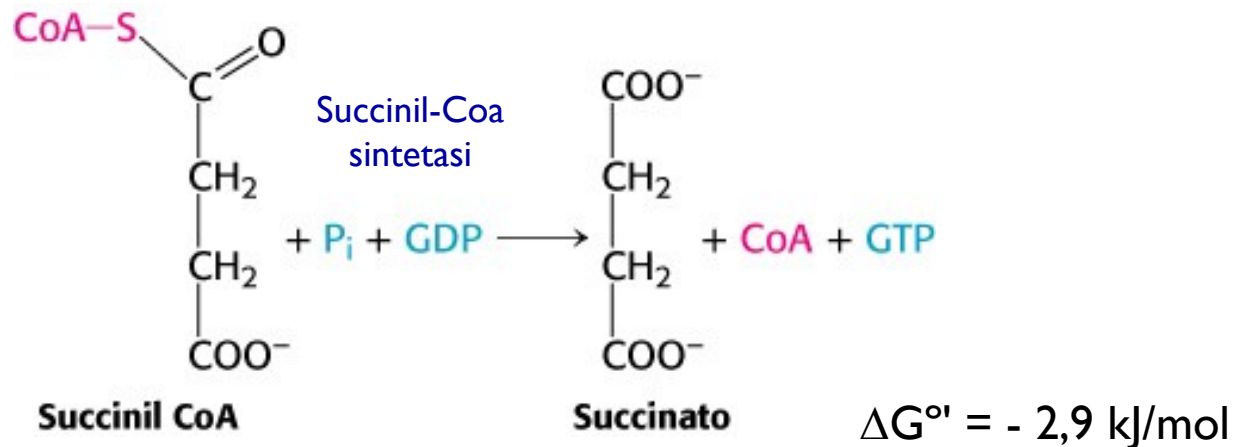


Esempio di evoluzione divergente: duplicazione genica con modifiche per quel che concerne i siti che legano i substrati (per E1 ed E2).



Tappa 5: Il succinil-Coa è convertito in succinato (fosforilazione a livello di substrato)

L'energia conservata nel legame **tioestere** del **Succinil-CoA** viene utilizzata per produrre una molecola di fosfato ad alta energia. Il Succinil-CoA possiede un alto potenziale di trasferimento del gruppo acilico



$$\Delta G^\circ = - 36 \text{ kJ/mol idrolisi tioestere} + \Delta G^\circ = +31 \text{ kJ/mol formazione fosfato}$$

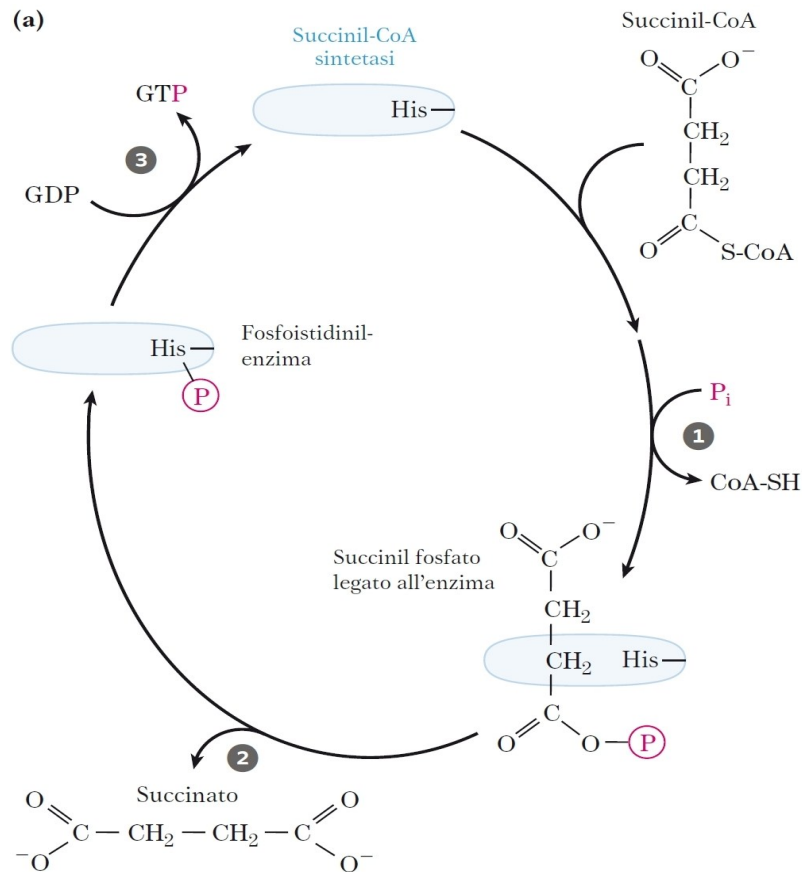
La **succinil-Coa sintetasi** (nome della reazione opposta) catalizza la rottura del legame tioestere e utilizza l'energia rilasciata per legare un fosfato inorganico P_i a un nucleoside difosfato. Esempio di **fosforilazione a livello di substrato**. Unica tappa del ciclo dell'acido citrico dove si produce **GTP** (o **ATP**).



Nel caso in cui sia prodotto **GTP**, questo viene convertito a **ATP** dalla **nucleoside difosfochinasi**

Meccanismo catalitico della succinil-CoA sintetasi

La catalisi si svolge in tre fasi:



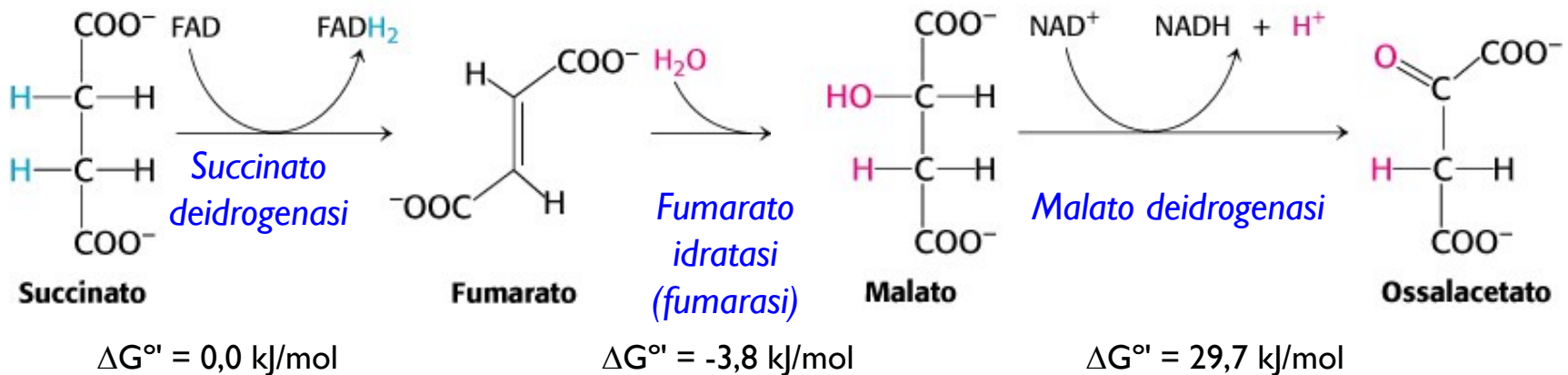
1) Fosforolisi: Un gruppo fosfato inorganico (Pi) attacca il Succinil-CoA, spiazzando il Coenzima A e formando **Succinil-fosfato**. Questo è un anidride mista (acil-fosfato) ad altissima energia, che trasferisce il P ad un residuo di His all'enzima liberando succinato.

2) Formazione della Fosfo-Istidina: Il gruppo fosfato viene trasferito dal succinil-fosfato a un residuo di **Istidina** nel sito attivo dell'enzima. Viene così rilasciato il **succinato**.

3) Trasferimento al nucleoside: Il fosfato è trasferito al GDP (ADP) formando **GTP (ATP)** (Fosforilazione a livello di substrato) e ripristinando l'enzima.

Tappe 6-7-8: rigenerazione dell'ossalacetato (OA)

Nelle ultime tre tappe, ossidazione-idratazione-ossidazione, un gruppo CH₂ del **succinato** viene trasformato in chetone C=O per ridare **OA**, il composto di partenza del ciclo di Krebs.



Succinato deidrogenasi: flavoproteina legata alla membrana mitocondriale interna. Contiene 3 centri Fe-S. Ossida il succinato in fumarato, trasferendo gli e- del FADH₂ alla catena respiratoria.

Fumarato idratasi: reazione di idratazione stereospecifica del doppio legame del fumarato per generare **L-malato**

Malato deidrogenasi: ossida l'L-malato in OA e NADH. Reazione spinta a dx perché **OA** è tenuto a bassissima concentrazione perché consumato dalla citrato sintasi. (è il sistema navetta malato-ossalacetato).

Bilancio del ciclo dell'acido citrico

Ogni giro del ciclo rappresenta la completa ossidazione di un'unità acetile, con la cattura dell'energia sotto forma di coenzimi ridotti e legami fosforici.

Ingresso: 1 unità acetile (**Acetil-CoA**, 2C).

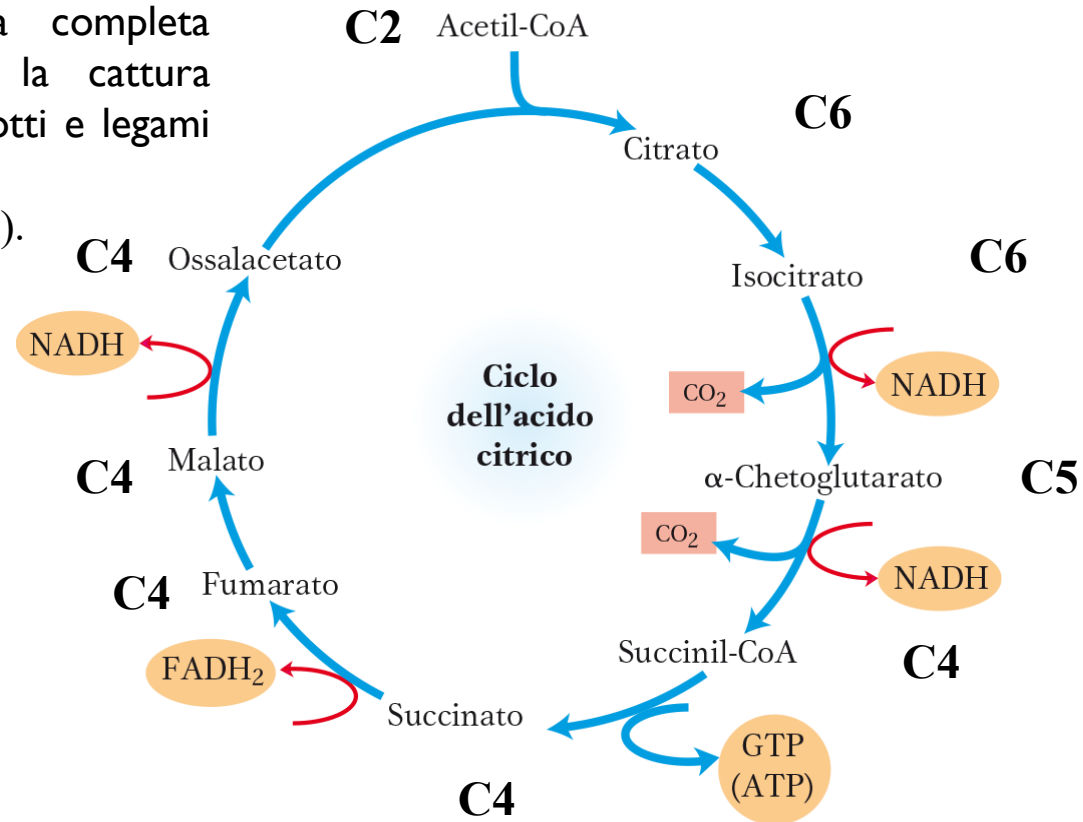
Uscita: 2 molecole di CO₂.

Resa in coenzimi: 3 NADH e 1 FADH₂ che alimenteranno la cane arespiratoria

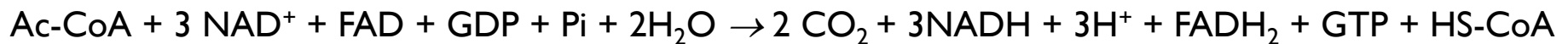
Resa chimica: 1 GTP (ATP)

Termodinamica: il ciclo è favorito:

ΔG° complessiva: - 48,1 kJ/mol
($\Delta G = -115,44$ kJ/mol).

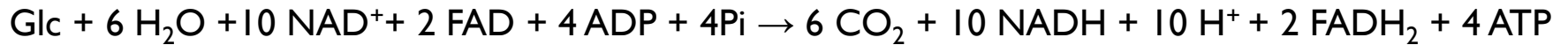


Equazione netta per 1 giro:



Resa Energetica Totale: Glicolisi + Ciclo di Krebs

Quando il glucosio viene completamente ossidato a CO₂ attraverso la glicolisi, la decarbossilazione del piruvato (PDH) e il ciclo di Krebs, il bilancio molecolare è il seguente:



Ogni **Glc** genera 2 mol di **piruvato**, servono 2 giri di ciclo di Krebs e si producono:

Fonte	ATP (diretto)	NADH	FADH ₂
Glicolisi	2	2	0
Complesso PDH	0	2	0
Ciclo di Krebs (2 giri)	2 (GTP)	6	2
TOTALE	4	10	2

Conversione in ATP (vedi fosforilazione ossidativa): 10 NADH x ~ 2,5 ATP = 25 ATP

2 FADH₂ x ~ 1,5 ATP = 3 ATP

Resa in ATP = 25+3 + 4 = **32 ATP**

Analisi dell'efficienza:

Per produrre 32 ATP servono: 32 x +30,5 kJ/mole = +976 kJ/mol.

Energia teorica: l'ossidazione totale del **Glc** libera -2840 kJ/mol (ΔG°)

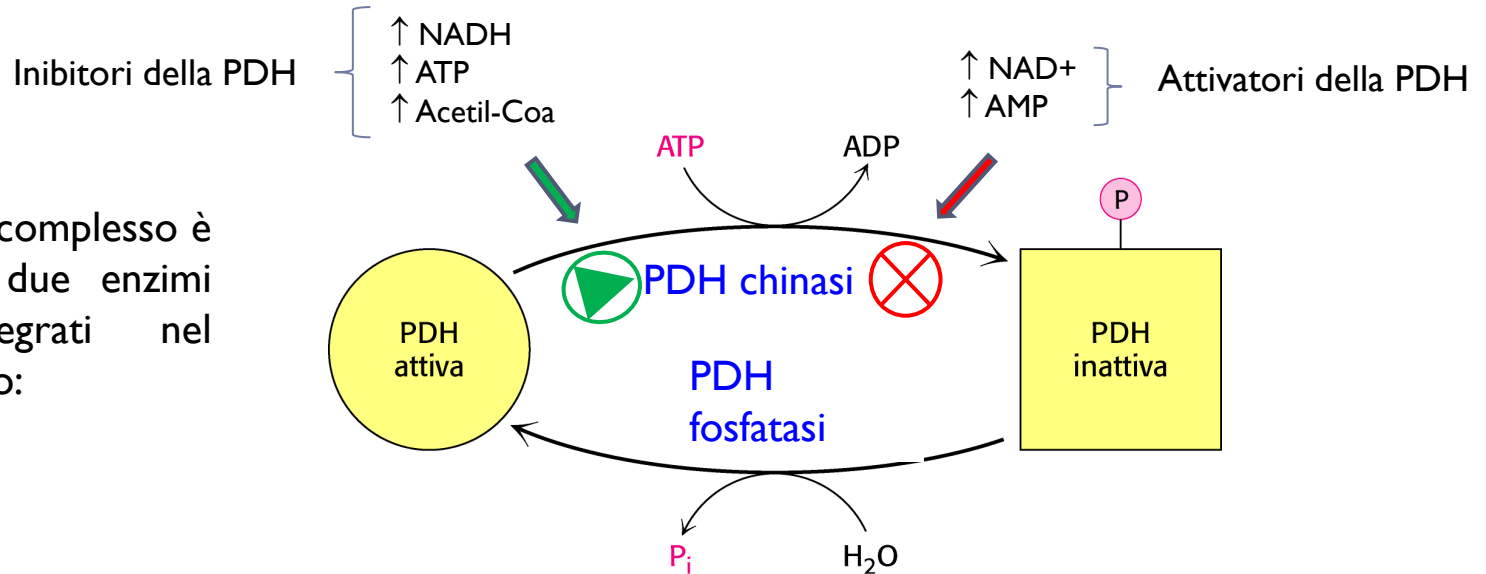
Resa energetica = 976/2840 kJ/mole ~ **il 34 %**.

Resa reale: (ΔG) considerando le concentrazioni reali diventa il **65%**, il restante 35 % è dissipato come calore

L'attività della piruvato deidrogenasi è il principale punto di regolazione del ciclo dell'acido citrico

L'attività della **piruvato deidrogenasi** PDH determina quanto piruvato viene convertito in Acetil-CoA. La regolazione principale avviene tramite fosforilazione.

L'enzima **E1** del complesso è il bersaglio di due enzimi regolatori integrati nel complesso stesso:



PDH chinasi Inattiva il complesso aggiungendo un gruppo fosfato a E1.

PDH Fosfatasi: Riattiva il complesso rimuovendo il gruppo fosfato.

La chinasi decide quando spegnere la PDH rispondendo ai segnali dello stato energetico:

Acetil-Coa, **NADH** e **ATP** segnalano abbondanza energetica, l'effetto finale è inibitorio.

NAD⁺, **AMP** segnalano carenza energetica e hanno effetto attivatorio.

Logica: Se la cellula ha già molto ATP e NADH, è inutile ossidare altro glucosio; la cellula preferisce conservare il piruvato per altre vie (es. sintesi di glucosio o grassi).

Il ciclo dell'acido citrico è regolato a livello delle sue tappe esoergoniche

Il flusso del ciclo di Krebs è modulato in vari modi.

1). Inibizione delle tappe irreversibili: 3 enzimi regolatori vengono inibiti quando la "carica energetica" è alta: **citrato sintasi** (NADH, Succinil-Coa), **isocitrato DH** (ATP) e **α -chetoglutarato DH** (NADH, Succinil-Coa).

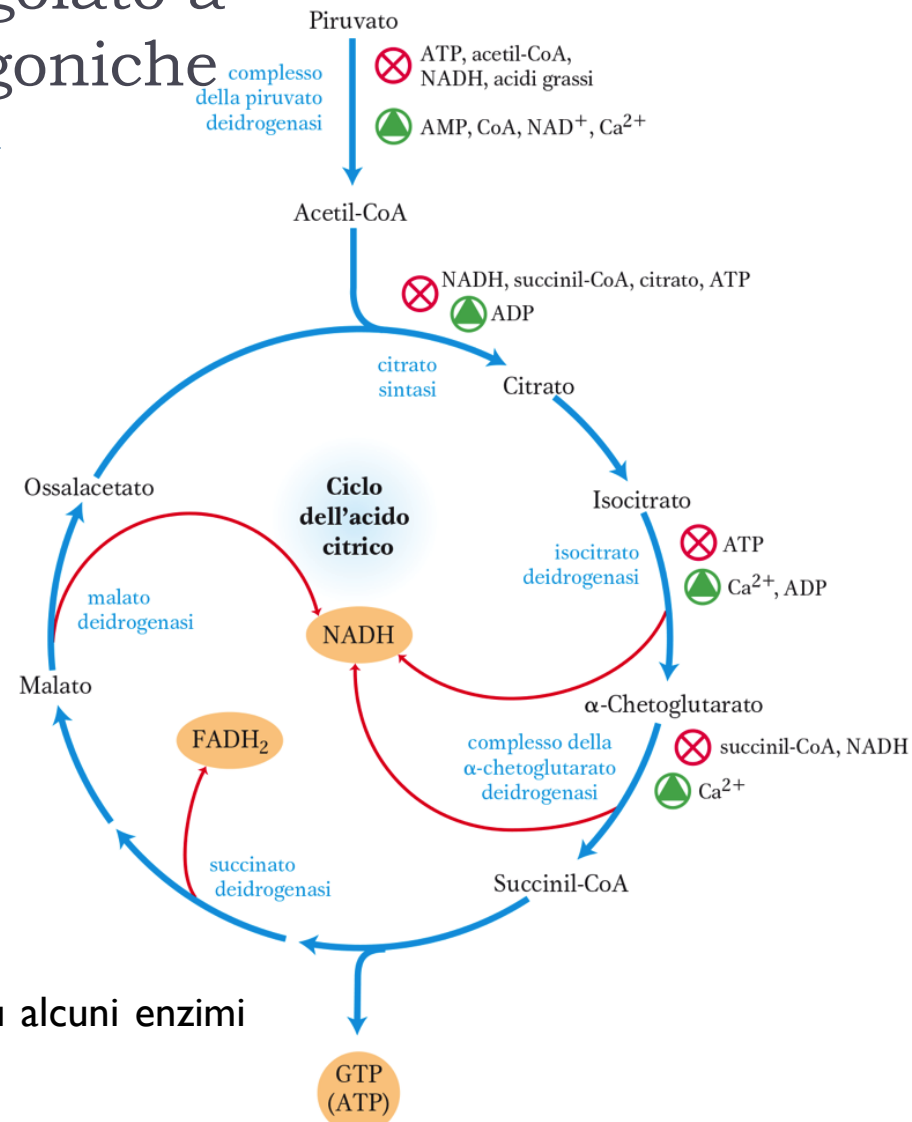
Segnali globali e inibizione da prodotto:

2) Elevati rapporti NADH/NAD⁺ e ATP/ADP segnalano che la cellula ha energia a sufficienza: il ciclo rallenta.

3) Il **Citrato** e il **Succinil-CoA** agiscono come segnali di "ingorgo" a valle, inibendo le tappe precedenti: il ciclo rallenta.

Ca²⁺: nel muscolo è attivatore sia della PDH sia su alcuni enzimi del ciclo di Krebs: sostiene lo sforzo fisico.

Disponibilità di substrato: Se l'OA è scarso, il ciclo rallenta, deve essere rigenerato, Se il ciclo rallenta, il citrato accumulato esce nel citosol e inibisce la PFK-I (l'enzima chiave della glicolisi).

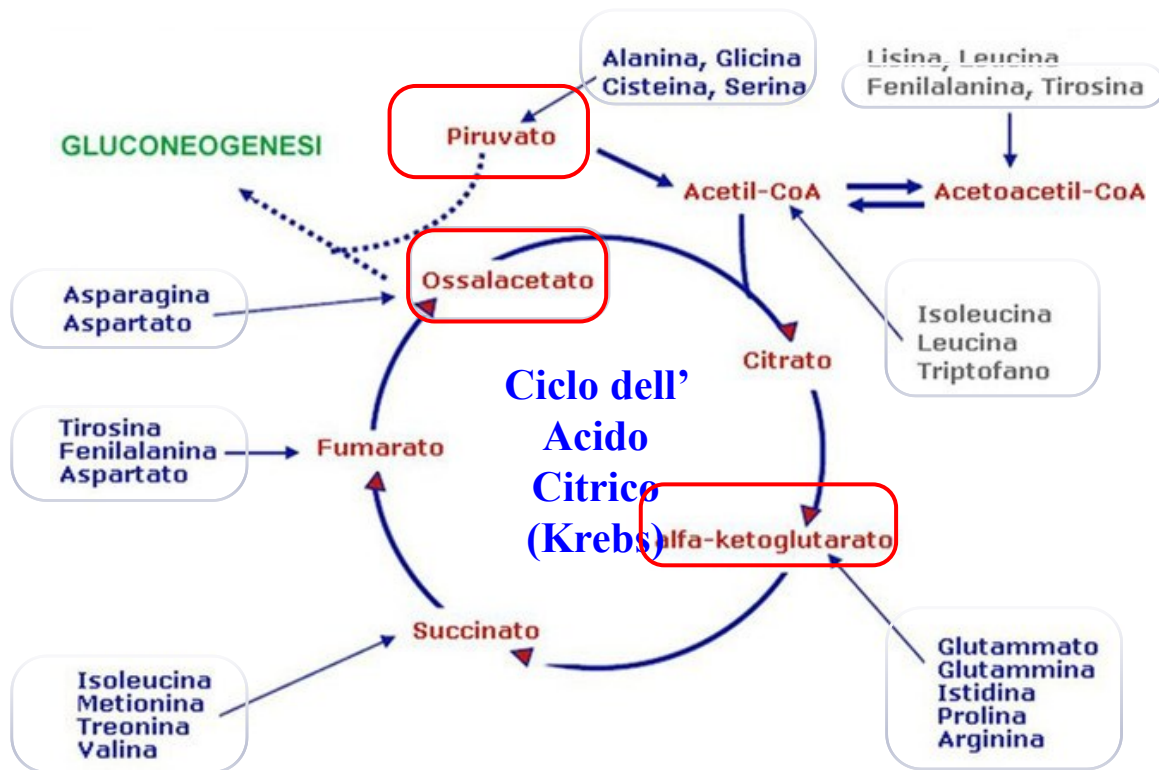


Il ciclo di Krebs come via anfibolica

Il ciclo dell'acido citrico è definito come via **anfibolica** perché svolge un doppio ruolo:

Funzione catabolica: ossidazione dell'acetil-Coa per produrre energia.

Funzione anabolica: Fornitura di scheletri carboniosi per la sintesi di molecole complesse.



Funzione catabolica: il ciclo riceve scheletri carboniosi dalla degradazione di altre molecole (catabolismo degli aminoacidi): per essere usati come combustibile.

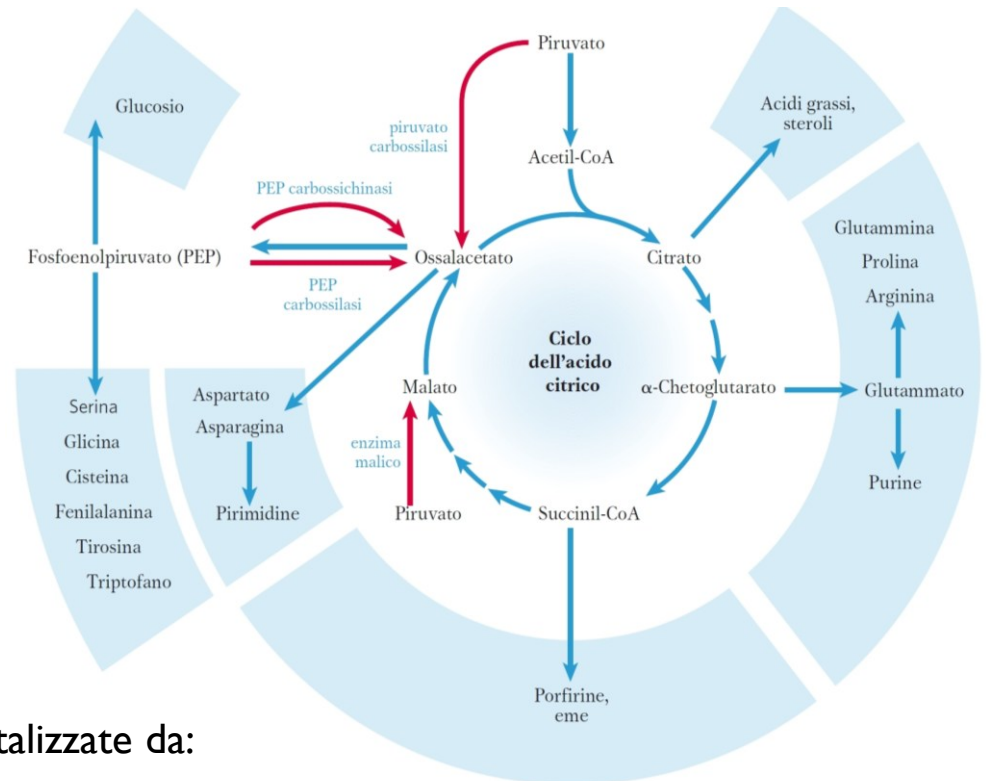
Le proteine alimentari vengono scomposte e i loro aminoacidi possono entrare nel ciclo in diversi punti (come α -chetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e ossalacetato) per essere usati come combustibile.

Alcuni aa sono convertiti in piruvato.

Reazioni di riempimento del ciclo dell'acido citrico

Funzione anabolica: molti intermedi del ciclo vengono sottratti per costruire altre biomolecole **ossalacetato**, **α -chetoglutarato**, **Succinil-Coa**, **Citrato**.

Se venissero sottratti troppi intermedi (es. per fare glucosio o eme), il ciclo rischierebbe di fermarsi per mancanza di "pezzi". Per evitare ciò, è necessario rimpiazzare gli intermedi che escono dal ciclo con reazioni che li sostituiscano: **reazioni di riempimento (anaplerotiche)**.



Le principali reazioni anaplerotiche sono catalizzate da:

- **piruvato carbossilasi** (fegato e rene, gluconeogenesi) che converte il **piruvato** in **OA**
- **PEP carbossichinasi** che converte il **PEP** in **OA** (molti tessuti, fegato, rene)
- - l'**enzima malico** che converte **piruvato** in **malato**:

