

# PIRUVATO DEIDROGENASI E CICLO DI KREBS

## COMPLESSO DELLA PIRUVATO DEIDROGENASI

Una volta completato il processo della glicolisi, il prodotto finale, ossia il piruvato, deve andare incontro al Ciclo di Krebs. Per poter entrare nel Ciclo di Krebs deve prima essere trasformato in **acetil-CoA**, ossia il rifornitore del Ciclo di Krebs. Questo ciclo rappresenta la crocevia del metabolismo, su cui convergono le vie degradative e da cui si dipartono le vie biosintetiche.

Il piruvato può dare origine all'acetil-CoA mediante una decarbossilazione ossidativa. Infatti, se si eseguisse solo una decarbossilazione del piruvato, si porterebbe alla formazione di un intermedio, ossia un aldeide. Mediante l'ossidazione di questa aldeide si porta alla formazione dell'acido acetico, il quale andrà a legarsi con il coenzima A portando alla formazione dell'acetil-CoA. Il processo di decarbossilazione ossidativa è un processo irreversibile in cui il gruppo carbossilico viene rimosso dal piruvato sotto forma di una molecola di  $\text{CO}_2$ , e i due atomi di carbonio che restano diventano il gruppo acetilico legato al coenzima A.

Per poter garantire l'efficienza di questo meccanismo deve esistere un complesso multienzimatico che permetta la formazione dell'acetil-CoA mediante un susseguirsi di reazioni. Un complesso multienzimatico è un'organizzazione strutturale di enzimi che catalizzano reazioni successive all'interno di una via metabolica. L'organizzazione spaziale dei complessi enzimatici è precisa, in quanto è un'aggregazione non casuale degli enzimi da cui sono composti, seguendo una stechiometria ben precisa. Infatti per ogni enzima che trasforma il substrato in un prodotto, deve esistere un enzima che accetta il prodotto.

Nel processo di glicolisi non esiste alcun tipo di complesso multienzimatico, in quanto gli enzimi che intervengono nella glicolisi sono tutti enzimi liberi che catturano il substrato da trasformare e lo rilasciano nella cellula, senza avere interazioni con altri enzimi. Ovviamente, l'esistenza di un complesso multienzimatico comporta molti vantaggi, soprattutto sotto l'aspetto del risparmio di energia.

Il complesso della piruvato deidrogenasi è un complesso multienzimatico in cui una serie di intermedi chimici rimangono legati alle molecole enzimatiche finché il substrato non è stato trasformato nel prodotto finale.

Il complesso multienzimatico che permette la formazione dell'acetil-CoA è chiamato complesso della piruvato deidrogenasi, formato da 3 enzimi e 5 cofattori, di cui quattro derivati dalle vitamine. I tre enzimi che compongono questo complesso sono:

- L'**enzima E1**, ossia l'enzima piruvatodeidrogenasi, è legato alla **TPP**. Questo enzima è implicato nella defosforilazione semplice.
- L'**enzima E2**, è legato all'**acido lipoico**. L'acido lipoico rappresenta una specie di **braccio mobile**, come la biotina. Questo acido presenta 2 atomi di zolfo, i quali si uniscono e portano alla formazione del ponte disolfuro.
- L'**enzima E3** ha la funzione di riportare l'acido lipoico allo stato ossidato e questo enzima lega, come coenzima, il **FAD**, utile per riossidare l'acido lipoico, in quanto si riduce riossidando l'acido lipoico.

### Tappe del ciclo

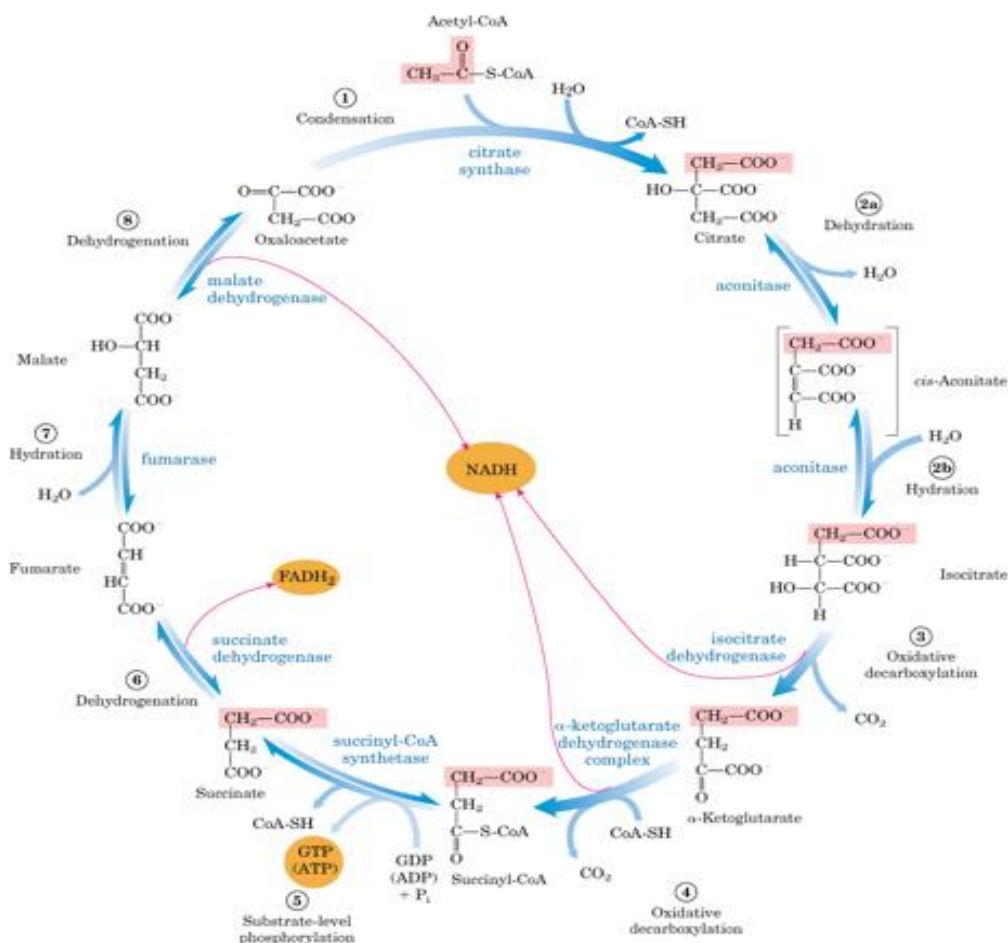
1) La prima tappa del ciclo che porta alla formazione dell'acetil-CoA prevede la modificazione del piruvato. Non appena il piruvato raggiunge il complesso multienzimatico, esso si lega alla TPP dell'enzima E1. Successivamente, il carbonio 1 del piruvato viene rilasciato sotto forma di  $\text{CO}_2$ , mentre il carbonio 2, che nel piruvato ha lo stato di ossidazione di un aldeide, viene legato alla tiammina pirofosfato come un gruppo idrossietilico. Quindi si crea un'acetaldeide in forma attiva.

2) Nella seconda tappa, il gruppo idrossietilico viene ossidato a formare l'acetato. A questo punto interviene il braccio mobile del lipoato, che, mettendosi in contatto con la TPP, causa la rottura del ponte disolfuro. In seguito alla rottura, un atomo di zolfo lega l'acetaldeide, mentre l'altro atomo di zolfo lega un atomo di idrogeno proveniente dall'acetaldeide. Mediante l'intervento del secondo enzima si riduce il ponte disolfuro e contestualmente si ossida l'aldeide, portando alla formazione dell'acido acetico

3) Nella terza tappa, il residuo acetilico, formatosi precedentemente, viene prima esterificato su uno dei due gruppi tiolici del gruppo lipolitico e poi transesterificato al CoA, formando l'acetil-CoA. L'acetil-CoA esce dal complesso, sotto forma di prodotto finale, ma l'acido lipoico resta in forma ridotta. Infatti, l'acido lipoico, che resta legato all'enzima E2, presenta due gruppi SH liberi.

4) Le ultime due tappe rappresentano una serie di trasferimenti elettronici necessari a rigenerare la forma ossidata dell'acido lipoico ed a preparare il complesso per un altro ciclo di ossidazione. Siccome, riossidando l'acido lipoico il complesso enzimatico ritorna funzionante, a questo interviene l'enzima E3, FAD<sup>+</sup> dipendente. Il FAD<sup>+</sup> lega i due atomi di idrogeno, provenienti dai due gruppi SH, cosicchè si possa ricostituire il ponte disolfuro. Ovviamente il FAD<sup>+</sup> fuoriesce da questa reazione sotto forma di FADH<sub>2</sub>, che deve essere ridotto per fare in modo che il complesso ritorni funzionante. Mediante l'intervento del NAD<sup>+</sup>, che si lega all'enzima E3, si va incontro alla riossidazione del FAD<sup>+</sup>, con una contestuale riduzione del NAD<sup>+</sup> ad NADH. Questo NADH viene rilasciato nel mitocondrio ed è utilizzato per rifornire la catena respiratoria.

## CICLO DI KREBS



Il **Ciclo di Krebs** è il punto di convergenza di tutte le vie metaboliche. Nel ciclo entrano tutti i prodotti che derivano dalla demolizione di molecole la cui energia utilizziamo, inoltre ossida queste molecole fino ad eliminare 2 molecole di CO<sub>2</sub>.

Il Ciclo di Krebs non è solo la via di convergenza di tutte le vie cataboliche, ma è anche il punto di partenza di moltissime vie anaboliche. Il Ciclo di Krebs ha tanti intermedi, perché da ciascun intermedio può partire una serie di vie metaboliche, che trovano nel Ciclo di Krebs il loro punto di partenza.

Il Ciclo di Krebs, oltre ad avere la funzione di produrre coenzimi ridotti per la catena respiratoria, ha la funzione di rifornire le vie biosintetiche ed è necessario che il ciclo sia ben organizzato. Non può succedere che manchi un intermedio e che si chiuda una via biosintetica, poiché ci sono meccanismi regolatori del ciclo, che è regolato dalle cosiddette **reazioni anaplerotiche**, che sono reazioni non del ciclo, ma di supporto, che hanno la funzione di integrare gli intermedi del Ciclo di Krebs che risultassero carenti. L'esempio più classico è quello della piruvato carbossilasi: il piruvato, per diventare ossalacetato, deve entrare nel mitocondrio ed essere carbossilato e l'ossalacetato è un intermedio del Ciclo di Krebs; se tutto l'ossalacetato andasse verso la gluconeogenesi, non ce ne sarebbe più per il Ciclo di Krebs, allora bisogna stimolare la piruvato carbossilasi ad incentivare la produzione di ossalacetato.

Il ruolo fondamentale del Ciclo di Krebs è quello di far entrare nel ciclo l'acetilcoenzima-A, che è il prodotto finale dei vari catabolismi (glucidico e lipidico). Entra l'acetilcoenzima-A, escono due molecole di  $\text{CO}_2$ , vengono prodotti NADH,  $\text{FADH}_2$ . Questi ultimi vanno nella catena respiratoria che trasporta elettroni sull'ossigeno e, contestualmente, l'energia contenuta nei potenziali di ossidoriduzione va a concentrarsi sul gradiente protonico, che fa funzionare l'enzima deputato alla sintesi di ATP, cioè l'ATP-sintasi.

### Reazioni del Ciclo di Krebs

1) **Condensazione tra l'acetilcoenzima-A e l'ossalacetato** (citrato sintasi): il gruppo metilico di un acetilcoenzima-A viene convertito in gruppo metilenico nel citrato.

L'ossalacetato è deputato ad accettare tutti i prodotti del catabolismo. La condensazione avviene tra il  $\text{CH}_3$  dell'acetilcoenzima-A e il carbonio del carbonile dell'ossalacetato. Il prodotto è l'acido citrico (acido tricarbossilico), che è legato ancora al coenzima A, ma il legame si rompe subito e si forma il citrato. Il Ciclo di Krebs è il punto di partenza per vie biosintetiche mitocondriali e non, e l'acido citrico è uno dei trasportatori in grado di biosintetizzare extra-mitocondrialmente, come per esempio per la sintesi di lipidi. L'acido citrico prodotto dal mitocondrio può andare avanti con la reazione del Ciclo di Krebs, ma può anche uscire dal mitocondrio per dare origine all'ossalacetato e all'acetilcoenzima-A, per dare il via ad altre vie biosintetiche. Attraverso questa possibilità che hanno alcuni intermedi di uscire dal mitocondrio, essi possono provvedere alla biosintesi di altre molecole che vengono sintetizzate al di fuori del mitocondrio.

2a) **Disidratazione del citrato** (aconitasi): il gruppo OH del citrato viene riposizionato all'isocitrato per preparare la decarbossilazione della tappa successiva. L'H e l'OH vengono prelevati in determinate posizioni. Si forma il cis-Aconitato, che è un intermedio molto instabile.

2b) **Reidratazione del cis-Aconitato** (aconitasi): l'H e l'OH vengono legati in determinate posizioni, ma differenti rispetto a quelle dell'azione precedente. Si forma l'acido isocitrico.

3) **Decarbossilazione ossidativa dell'acido isocitrico** (isocitrato deidrogenasi): il gruppo OH viene ossidato a carbonile, che a sua volta favorisce la decarbossilazione stabilizzando il carbanione formato sull'atomo di carbonio adiacente.

L'acido isocitrico produce un intermedio estremamente importante che è l' $\alpha$ -chetoglutarato ed è l' $\alpha$ -chetoacido che corrisponde al glutammato. L' $\alpha$ -chetoglutarato è molto importante perché è un punto fondamentale dei due Cicli di Krebs (questo che si sta descrivendo e quello che sintetizza urea). L' $\alpha$ -chetoglutarato può legare l'ammoniaca e può trasformarsi da  $\alpha$ -chetoglutarato in glutarato, nella sintesi dell'urea e nei processi di eliminazione dell'azoto. Nella reazione di questo Ciclo di Krebs succede che gli idrogeni che si sottraggono all'isocitrato vanno a finire sul  $\text{NAD}^+$ , con produzione di NADH. È la prima molecola di NADH prodotta nel Ciclo di Krebs.

4) **Decarbossilazione ossidativa dell' $\alpha$ -chetoglutarato** (complesso multienzimatico dell' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi): meccanismo simile a quello della piruvato deidrogenasi, dipendente dal carbonile sul carbonio adiacente.

L' $\alpha$ -chetoglutarato viene trasformato dal complesso dell' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi. La sequenza delle reazioni è la stessa del ciclo che comprende il piruvato, ma gli enzimi non hanno affinità per il piruvato, ma per l' $\alpha$ -chetoglutarato. Dalla decarbossilazione ossidativa dell' $\alpha$ -chetoglutarato ci si aspetta che vada via un carbossile vicino al C=O, rimarrà transitoriamente un'aldeide, che rimane legata alla TPP. Dopodiché interverrà il secondo enzima del complesso legato all'acido lipoico. L'acido lipoico legherà ad uno zolfo un idrogeno e ad un altro zolfo l'acido corrispondente all'aldeide della TPP. Da questa reazione esce CO<sub>2</sub> (la seconda CO<sub>2</sub> che esce) e viene prodotto il succinilcoenzima-A a 4C. Il NADH si libera anche da questa reazione, perché vengono estratti protoni che si legano al NAD<sup>+</sup>.

5) **Fosforilazione del succinilcoenzima-A** (succinilcoenzima-A sintetasi): l'energia del tioestere viene conservata nel legame fosfoanidrinico del GTP o dell'ATP.

Il succinilcoenzima-A cede il coenzima A. I tioesteri sono legami ad alto contenuto energetico, quindi, la rottura del legame con un coenzima-A, provoca la liberazione di energia, che viene utilizzata per fosforilare GTP dal GDP. GTP non è ATP, ma GTP è il substrato adatto a questa reazione:  $GTP + ADP \rightarrow GDP + ATP$ . La produzione di GTP corrisponde quindi alla produzione di ATP. Da questa reazione viene prodotto acido succinico.

L'enzima succinilcoenzima-A sintetasi ha un'istidina sul sito attivo. Questo enzima reagisce con il succinilcoenzima-A e viene liberato coenzima A, mentre l'acido succinico legato all'enzima viene fosforilato. Si ha un intermedio di reazione che è il succinilfosfato. Nella reazione si libera energia che viene utilizzata per formare il succinilfosfato.

La seconda parte della reazione consiste nel succinilfosfato, che viene rilasciato dall'enzima sotto forma di succinato, mentre il fosfato viene trasferito sull'istidina, cioè l'amminoacido presente sul sito attivo. In questo modo si ha la formazione quindi del fosfoenzima. L'istidina fosforilata può cedere il fosfato al GDP, producendo GTP.

6) **Disidratazione dell'acido succinico** (succinato deidrogenasi): l'introduzione di un doppio legame dà inizio alla sequenza di ossidazione del metilene.

Uno degli enzimi dei complessi della catena respiratoria è la succinato deidrogenasi, che è l'enzima che utilizza FADH<sub>2</sub> e dà origine, dando via questi due idrogeni, a un doppio legame, formando un intermedio, che è l'acido fumarico.

7) **Idratazione dell'acido fumarico** (fumarasi): l'aggiunta di acqua sul doppio legame introduce un gruppo OH per la successiva tappa di ossidazione.

L'acido fumarico viene idratato, quindi viene aggiunta una molecola d'acqua, che dà origine all'acido malico: viene aggiunto un idrogeno al C1 e un OH al C2.

8) **Disidratazione dell'acido malico** (malato deidrogenasi): l'ossidazione del gruppo OH completa la sequenza delle ossidazioni e genera un carbonile posizionato in modo da facilitare la condensazione dell'acetilcoenzima-A con l'ossalacetato nella tappa successiva.

La malato deidrogenasi porta via due idrogeni, dando origine all'ossalacetato e producendo un'altra molecola di NADH.

#### Bilancio energetico del Ciclo di Krebs

Durante il Ciclo di Krebs si ha la produzione di tre molecole di NADH, (una dalla isocitrato deidrogenasi, una dalla  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi e una dalla malato deidrogenasi), una molecola di FADH<sub>2</sub> (dalla succinato deidrogenasi) e una molecola di GTP (dalla succinilcoenzima-A sintetasi). Quindi:

- 3NADH
- 1FADH<sub>2</sub>
- 1GTP

In linea di massima, se si fa riferimento al glucosio, da una molecola di glucosio sappiamo che derivano due molecole di piruvato, allora si moltiplica tutto per due. Quindi:

- 6NADH
- 2FADH<sub>2</sub>
- 2GTP

Bisogna considerare anche quello che succede prima dell'inserimento dell'acetilcoenzima-A nel Ciclo di Krebs. La piruvato deidrogenasi produce un altro NADH per 2. Quindi:

- 8NADH
- 2FADH<sub>2</sub>
- 2GTP

Partendo da una molecola di glucosio, ci sono anche i sottoprodotti della glicolisi, che ci rende 2ATP e 2 NADH, quindi:

- 10NADH o 8NADH, a seconda che il NADH possa essere utilizzato per formare lattato.
- 2FADH<sub>2</sub>
- 2GTP
- 2ATP o 3ATP, a seconda che il glucosio provenga dal glicogeno o dalla dieta.

Il NADH non attraversa la membrana mitocondriale, la glicolisi è nel citosol e quel NADH rimane nel citosol, ma questa molecola di NADH può essere in qualche modo utilizzata nella catena respiratoria. E' vero che non entra nel mitocondrio, ma può essere utilizzato per trasformare l'ossalacetato in malato nella gluconeogenesi. Il malato può attraversare la membrana mitocondriale e poi entrare nel mitocondrio, dove esiste la possibilità, utilizzando NAD<sup>+</sup>, di produrre NADH e di produrre ossalacetato. Quindi, con questo **sistema navetta**, il NADH citosolico rimane nel citosol. Il NADH viene nuovamente utilizzato per ossidare il malato in ossalacetato nel citosol. Di fatto, gli equivalenti riducenti del NADH citosolico, vengono trasferiti nel NADH mitocondriale. Il destino del NADH, non è per forza questo, ma può essere quello, soprattutto nel muscolo, di essere utilizzato per la fermentazione. Può essere utilizzato per trasformare piruvato in lattato, utilizzando il NADH a livello della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi. La glicolisi in questo modo può andare avanti, poiché, se non ci fosse questa reazione, una volta depauperata la cellula dal NAD<sup>+</sup>, la glicolisi si fermerebbe, perché ci sarebbero situazioni di debito di ossigeno e di acidosi. Questo consente di fare la glicolisi anaerobia, cioè che non dipende da ossigeno. Si forma tutto l'ATP con l'ossigeno disponibile, ma se si vuole correre ancora più forte allora si deve utilizzare questa reazione, utilizzando NADH.

Se il muscolo è a riposo, la glicolisi produce del NADH e questo NADH, in parte, potrà essere utilizzato per produrre acido lattico e, in parte, potrà entrare nel mitocondrio con il sistema navetta. Nel muscolo che lavora tanto, questo non succede. La resa energetica del metabolismo glucidico non può essere definita con precisione assoluta perché c'è questa diversa possibilità di utilizzo di NADH della glicolisi.

Nella catena respiratoria:

$$1\text{NADH} = 2.5\text{ATP} \rightarrow 10\text{NADH} = 25\text{ATP}$$

$$1\text{FADH}_2 = 1.5\text{ATP} \rightarrow 2\text{FADH}_2 = 3\text{ATP}$$

$$1\text{GTP} = 1\text{ATP} \rightarrow 2\text{GTP} = 2\text{ATP}$$

$$2\text{ATP}$$

La somma è di 32ATP ed è il numero totale di molecole di ATP che può essere prodotto a partire da una molecola di glucosio. Può essere 32 o meno, se 2NADH della glicolisi vengono incanalate o meno nella catena respiratoria, mentre se vengono incanalate nella fermentazione lattica, bisogna sottrarre 5ATP.

Il metabolismo lipidico ha una resa energetica maggiore rispetto al metabolismo glucidico.

## REGOLAZIONE DEL CICLO DI KREBS

Le reazioni anaplerotiche sono molto importanti ai fini del metabolismo cellulare, poiché, anche se sono reazioni esterne al Ciclo di Krebs, hanno comunque un intermedio di reazione comune.

- L' $\alpha$ -chetoglutarato può originare il glutammato, che è un amminoacido.
- L'ossalacetato può originare l'aspartato e l'asparagina, che sono due amminoacidi. L'ossalacetato può inoltre originare le purine, che sono una classe di basi azotate.
- Il fosfoenolpiruvato può originare alcuni amminoacidi.

L'enzima piruvato carbossilasi fa in modo che, quando servono intermedi del Ciclo di Krebs, venga bloccata sintesi di piruvato per formare acetil-CoA e venga prodotto ossalacetato per entrare nel Ciclo di Krebs.

### Regolazione

I due principali enzimi di regolazione sono l'enzima che trasforma il piruvato in acetil-CoA (decarbossilazione ossidativa del piruvato) e poi quello che condensa l'acetil-CoA con l'ossalacetato per dare origine al citrato.

#### 1) **Complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi:**

- Inibita da: ATP, NADH e acidi grassi a lunga catena.
- Favorita da: AMP e  $\text{NAD}^+$ .

Tutte le volte che si generano alte concentrazioni di NADH e ATP (quindi basse concentrazioni di  $\text{NAD}^+$  e AMP), il Ciclo di Krebs rallenta, perché ci sono sufficienti molecole ad alto tasso energetico ed è inutile produrne altre. Il metodo con cui queste molecole inibiscono la piruvato deidrogenasi consiste nel legame che si crea tra queste molecole e il sito allosterico dell'enzima, modificandolo conformazionalmente e inibendone l'azione.

Tutte le volte che si registrano alte concentrazioni di  $\text{NAD}^+$  e AMP (quindi basse concentrazioni di NADH e ATP), il Ciclo di Krebs viene favorito, perché non ci sono sufficienti molecole a tasso energetico e serve produrne altre.

Da queste due considerazioni si evince che, nel caso in cui ci sia un alto livello di ATP, c'è un basso livello di AMP e viceversa.

Dire che nella piruvato deidrogenasi ci sono tre tipi di enzimi (E1, E2 ed E3), non è del tutto corretto, infatti i tipi di enzimi che sono presenti nel complesso sono cinque e sono legati all'enzima E1. Questi due enzimi sono una chinasi (fosforila) e una fosfatasi (defosforila).

In presenza di un alto livello di ATP, la chinasi attiva la fosforilazione dell'enzima E1, che, fosforilato, viene inibito.

In presenza di un alto livello di AMP, la fosfatasi attiva la defosforilazione dell'enzima E1, che, defosforilato, viene attivato.

#### 2) **Citrato sintasi:**

- Inibita da: ATP, NADH e acidi grassi a lunga catena.
- Favorita da: AMP e  $\text{NAD}^+$ .

Sia per l'enzima citrato sintasi, che per tutti gli altri enzimi del Ciclo di Krebs, il meccanismo di regolazione è comune a quello del complesso della piruvato deidrogenasi.