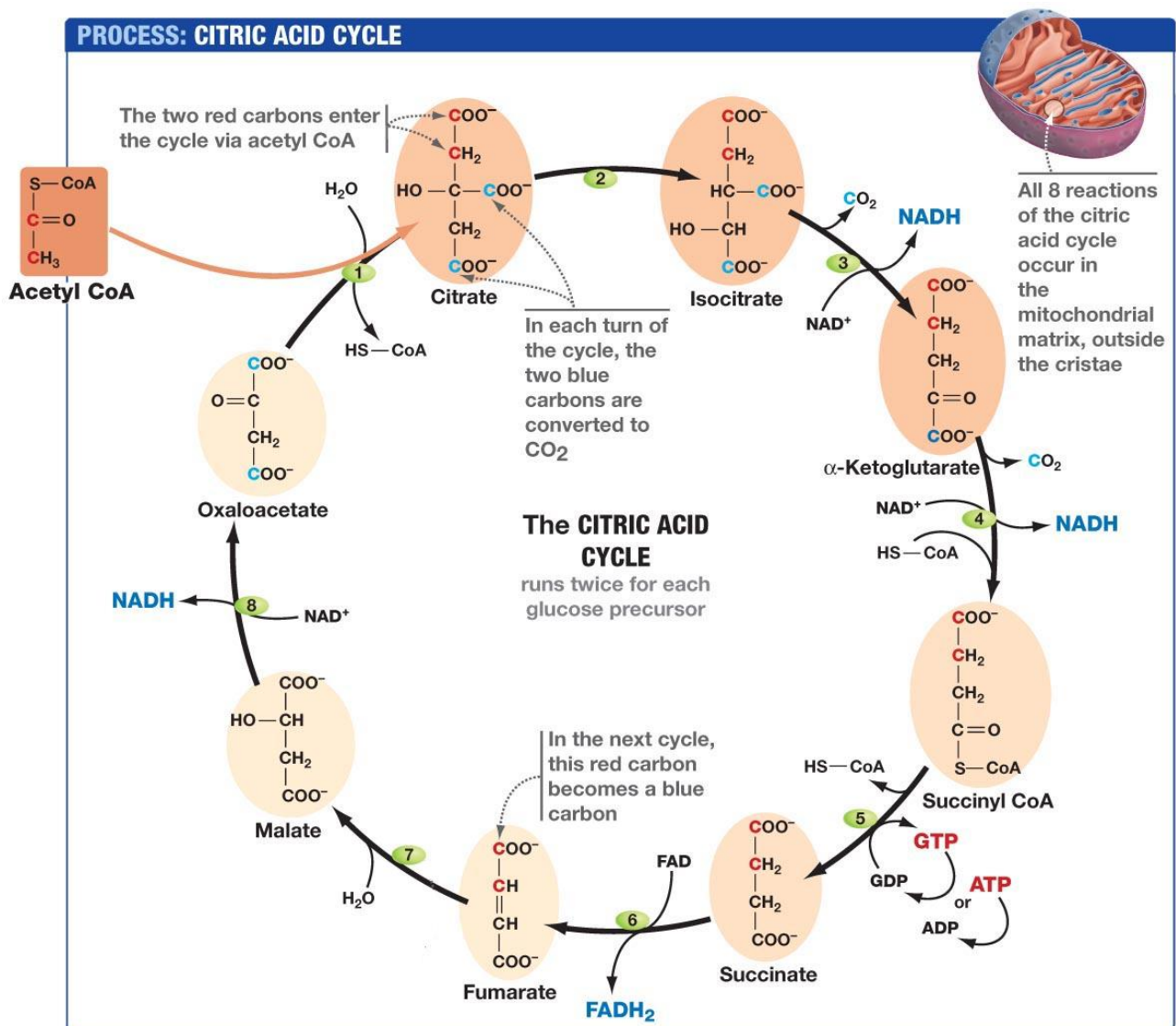


TCA cycle (ciclo di Krebs)

Come abbiamo detto la glicolisi produce due molecole di ATP e due di NADH per ogni molecola di glucosio. La maggior parte dell'energia potenziale contenuta nella molecola di glucosio però non è ancora stata sfruttata. In presenza di ossigeno si attua un processo di ossidazione più completo dal punto di vista termodinamico, il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) o ciclo di Krebs.

Gli elettroni in questo ciclo vengono ceduti a coenzimi (NAD^+ e FAD), che successivamente, nella fosforilazione ossidativa, trasferiranno questi elettroni all'ossigeno. Questo processo ossidativo, che avviene nei mitocondri, è accoppiato alla formazione di un gradiente protonico trans-membrana.

Sarà questo gradiente infine ad alimentare la sintesi delle molecole di ATP. In totale (comprese quelle prodotte nelle reazioni accoppiate) si può produrre una massimo di 38 molecole di ATP da ogni molecola di glucosio.

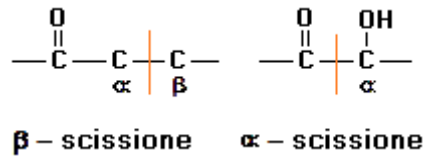


Il ciclo mostrato sopra sembra, a prima vista, un modo complicato per ossidare le unità di acetato a CO_2 , ma questa apparente complessità risponde a una precisa logica chimica.

La ossidazione del gruppo acetilico prevede la rottura di un legame C-C.

Nei sistemi biologici (che ricordiamo operano in condizioni blande, pH 7 e T=37°C nelle cellule umane) ci sono due modi per ottenere questa rottura:

- β -scissione, cioè l'inverso di una condensazione aldolica, come abbiamo visto ad esempio nella reazione 4 della glicolisi (la rottura del legame C3-C4 catalizzata dall'aldolasi)
- α -scissione di un α -idrossichetone



Nessuna di queste strategie però è adatta per l'acetato.

Non ha nessun atomo di carbonio in beta e la seconda reazione richiederebbe una ossidrilazione non favorevole per l'acetato.

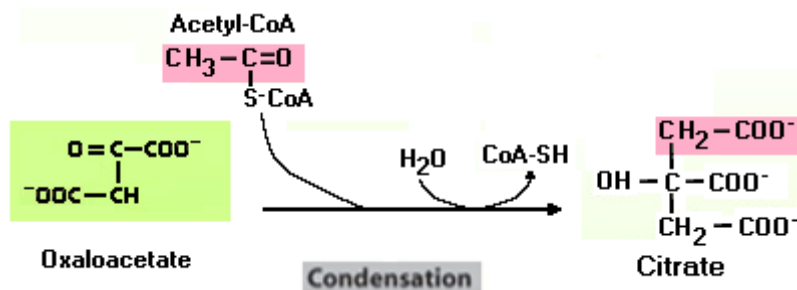
Nelle cellule invece si è evoluta una strategia di condensazione (dell'acetato con l'ossalacetato) che permette in seguito di effettuare la beta-scissione.

In definitiva ciò che accade nel ciclo di Krebs è, in successione:

- Una condensazione col carrier (da C4 a C6)
- Due decarbossilazioni (da C6 a C5, quindi da C5 a C4)
- Una serie di riarrangiamenti per riformare il carrier (C4)

In questa serie di reazioni (otto in totale) l'energia viene liberata sotto forma di coenzimi ridotti (NADH e FADH2) e di ATP.

1. Ossalacetato + Acetil-CoA → Citrato + HS-CoA



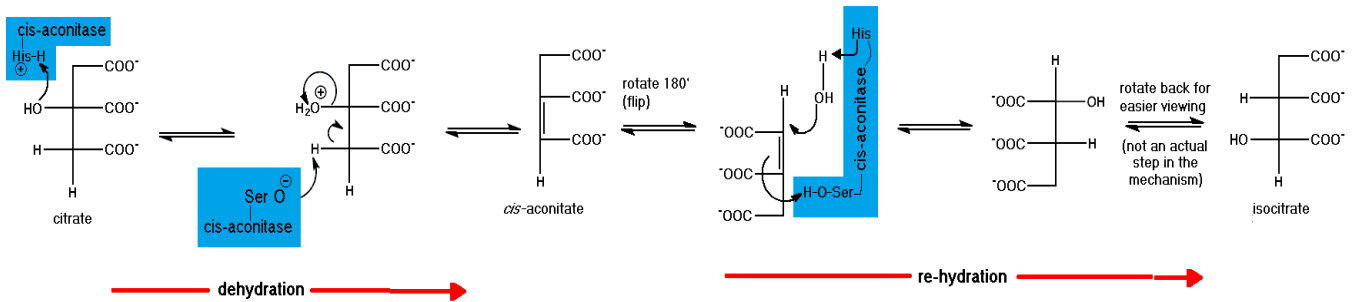
La prima reazione, quella che fa entrare l'acetile nel ciclo TCA, è una condensazione di Perkin.

Il carbonio beta dell'acetile, caricato negativamente, attacca il carbonile chetonico formando il citril-CoA che poi si idrolizza a citrato. Questa seconda parte della reazione è molto esoenergetica (il legame tioestere è piuttosto instabile) e rende praticamente irreversibile la reazione complessiva ($\Delta G = 53,9$ in condizioni cellulari). Questo è fondamentale per "far partire" il ciclo.

La reazione è catalizzata dall'enzima citrato sintasi che, come tutti gli enzimi che catalizzano reazioni fortemente esoenergetiche nei processi catabolici, è fortemente regolato.

Il NADH e il succinil-CoA sono inibitori allosterici.

2. Citrato → Isocitrato



La seconda reazione è una isomerasi.

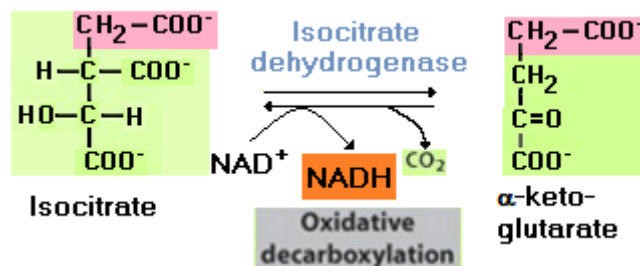
In realtà, come si vede dallo schema, è il risultato di una disidratazione seguita da una reidratazione. L'acido intermedio che si forma si chiama acido cis-aconitico, da cui il nome dell'enzima.

Il vantaggio biologico di questa isomerizzazione consiste nell'aver trasformato un alcol terziario in alcol secondario, più facile da ossidare.

L'aconitasi contiene nel sito attivo un gruppo Ferro Zolfo (Fe3S4) disposto in forma cubica.

Questo enzima è inibito dal fluoro citrato, che viene prodotto dall'azione del veleno fluoroacetato (trojan horse inhibitor).

3. Isocitrato → α-chetoglutarato



In questa tappa si forma la prima molecola di NADH e la molecola di isocitrato(C6) si ossida perdendo una molecola CO2 trasformandosi in alfa chetoglutarato (C5).

Anche questa reazione avviene in realtà in due passaggi.

In un primo tempo si ossida il gruppo alcolico in C2, successivamente ha luogo una beta decarbossilazione che elimina il gruppo carbossilico centrale.

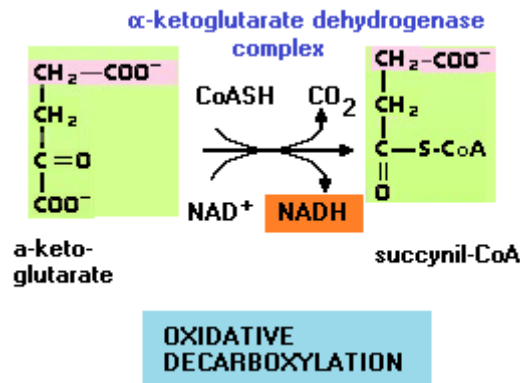
L'alfa chetoglutarato è un intermedio molto importante anche perché è il punto di origine per la sintesi dell'acido glutammico e per tutte le reazioni catalizzate da amminotrasferasi in genere (tutti gli alfa cheto acidi possono dare ammino acidi).

Questa reazione è abbastanza esoenergetica ($\Delta G = -17,5$) ed è quindi in grado di spostare a destra la precedente isomerizzazione.

La isocitrato deidrogenasi è inibita da NADH e ATP, indici di "abbondanza" energetica della cellula e quindi della necessità di rallentare il ciclo di Krebs.

L'enzima è attivato dall'ADP (la Km diminuisce di 10 volte).

4. α-chetoglutarato → succinil-CoA



Questa è la seconda decarbossilazione ossidativa e si passa da C5 a C4.

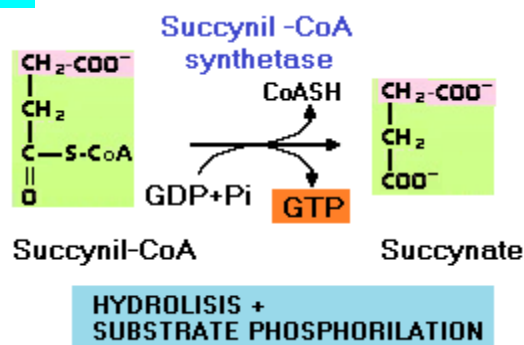
Notare come gli atomi persi con CO₂ siano atomi dell'ossalacetato. Quelli dell'acetato entrati nel primo stadio del ciclo rimangono nella molecola di succinil-CoA.

La reazione è governata da un complesso enzimatico simile a quello della piruvato deidrogenasi.

Anche questo contiene tre enzimi che eseguono la stessa sequenza di reazioni e utilizzano gli stessi 5 coenzimi.

Come la decarbossilazione del piruvato, anche questa reazione produce NADH e un tioestere, prodotti ad alta energia.

5. succinil-CoA → succinato



Il succinil-CoA è un intermedio ad alta energia. La sua idrolisi è una reazione accoppiata con la fosforilazione del GDP (analogo dell'ATP con la guanina al posto dell'adenina). Il GTP formato viene immediatamente trasformato in ATP da una chinasi. Il ΔG netto della reazione è circa zero.

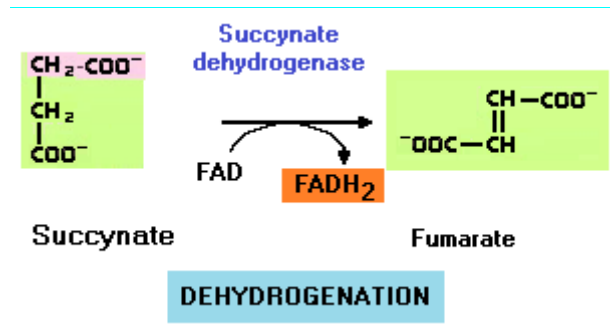
Il meccanismo di reazione prevede nel sito attivo dell'enzima la sostituzione del CoAS⁻ con il fosfato, seguito dal trasferimento del fosfato stesso ad un residuo di istidina dell'enzima ed infine il passaggio del fosfato al GDP.

Le prime cinque tappe del ciclo di Krebs hanno visto la demolizione dell'acetato introdotto nel ciclo con formazione di due molecole di CO₂, due di NADH e una di GTP.

Il carrier è stato nuovamente ricondotto a una molecola di 4 atomi C (succinato), ma con un atomo di ossigeno in meno.

Ora il ciclo verrà completato "rimettendo a posto" gli atomi di ossigeno (da succinato a ossalacetato). Questi processi rappresentano una ossidazione e verranno sfruttati per produrre altri coenzimi ridotti.

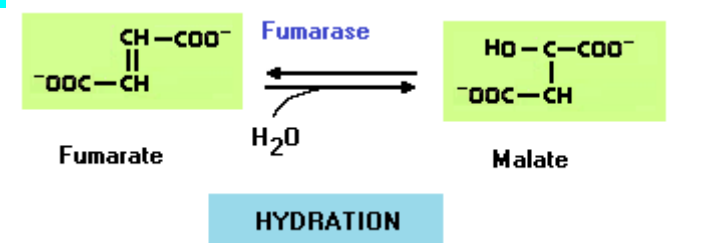
6. succinato → fumarato



L'enzima che catalizza la reazione (succinato deidrogenasi) è un enzima di membrana mitocondriale che fa parte della catena di trasporto degli elettroni della fosforilazione ossidativa.

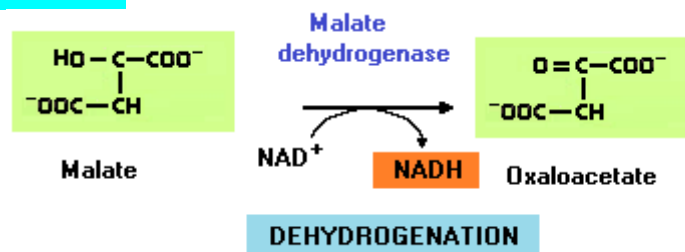
Questa ossidazione produce FADH₂ invece di NADH perché il ΔG di reazione è più basso in quanto la rimozione di atomi H avviene da un legame C-C invece che da un legame C-O come tutte le altre del ciclo. Riossidando il FADH₂ si ottengono infatti 2 molecole di ATP invece di 3 come per il NADH.

7. fumarato → malato



La reazione di idratazione è stereospecifica. Si ottiene solo L-malato. Il meccanismo non è ancora certo (attacco acido o basico).

8. malato → ossalacetato



L'ultima tappa del ciclo è un'ossidazione e qui viene prodotta la terza molecola di NADH.

La reazione è endoenergetica, quindi la concentrazione di ossalacetato è in genere molto bassa nella matrice mitocondriale. La reazione è tuttavia spinta in avanti dal ΔG favorevole della citrato sintasi (la prima reazione del ciclo).

Intermedi per altre vie sintetiche dal ciclo di Krebs

Le specie C₄, C₅ e C₆ del ciclo alimentano diverse altre vie sintetiche.

Dall'α-chetoglutarato si può sintetizzare il glutammato e da quest'ultimo partono le vie per la sintesi per altri amminoacidi (glutamina, arginina, prolina) e dei nucleotidi purinici.

Dal succinil-CoA si ottengono le porfirine.

Dal fumarato e dall'ossalacetato si ha l'aspartato. Da questo si originano le vie per sintetizzare altri amminoacidi (asparagina e [via semialdeide aspartica – vedi Tecnologie] Lisina, treonina, metionina, isoleucina) e nucleotidi pirimidinici.

Dall'ossalacetato si possono avere anche fenilalanina, triptofano e tirosina.

Anche l'acetil coenzima A è molto importante per l'anabolismo. Da esso si dipartono le vie per acidi grassi, amminoacidi (valina, leucina, alanina) e carboidrati (gluconeogenesi)

Reazioni anaplerotiche

In una sorta di scambio compensativo anche la cellula rifornisce il ciclo di Krebs di intermedi mediante le reazioni anaplerotiche (= di riempimento).

Attraverso strade diverse possono essere prodotti ossalacetato e malato partendo da PEP o piruvato.

Il catabolismo degli amminoacidi invece fornisce piruvato, acetil-CoA, ossalacetato, fumarato, alfa cheto glutarato, succinato.