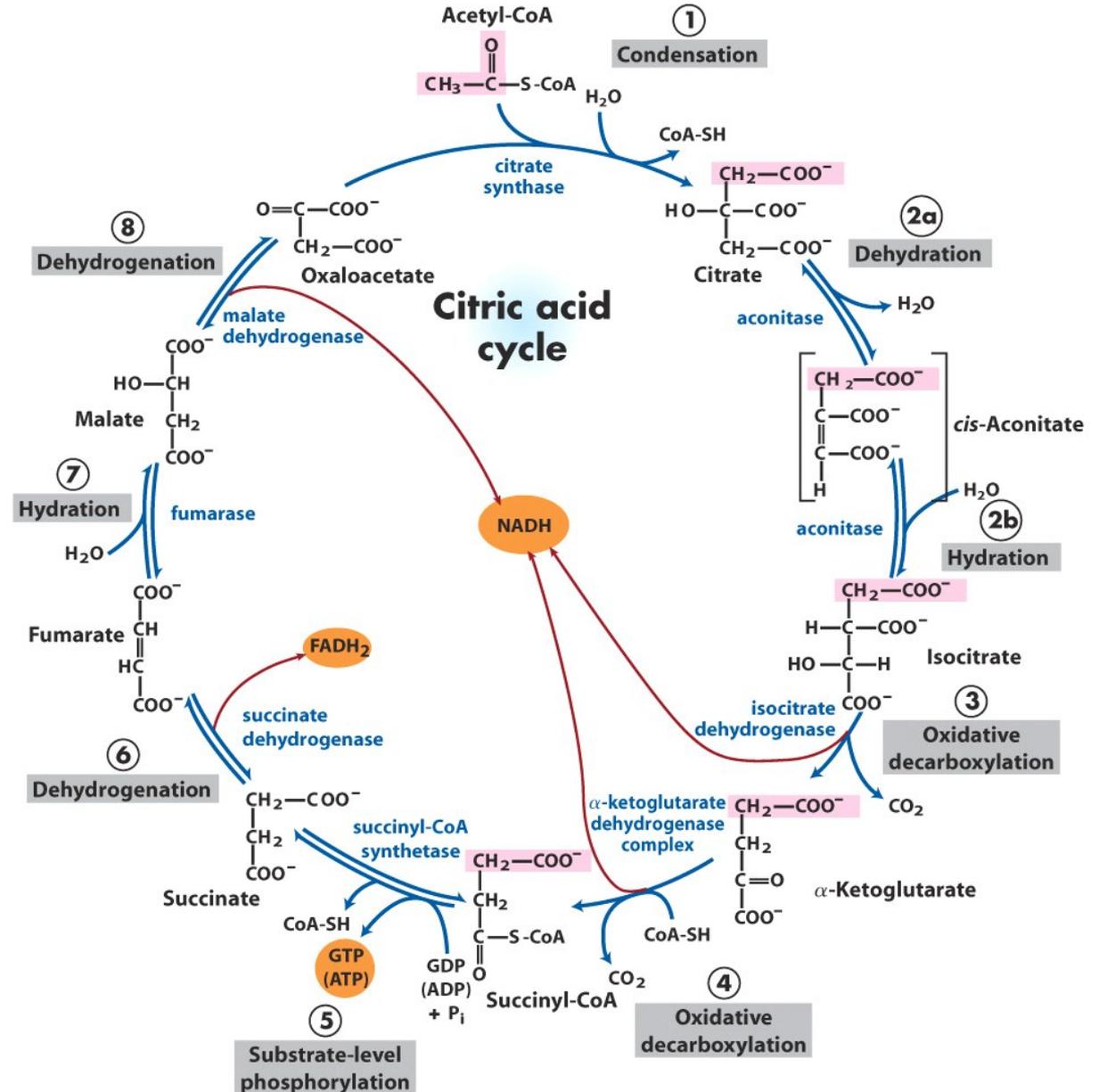


Il ciclo dell'acido citrico rappresenta il processo centrale attraverso il quale vengono catabolizzati tutti i combustibili metabolici

Per entrare nel ciclo, lo scheletro carbonioso di zuccheri, a. grassi e alcuni AA deve essere degradato a gruppo acetilico (acetilCoA)

# Il ciclo dell'acido citrico

Krebs, H.A., Johson, W.A. (1937), The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues  
Enzymologia 4, 148-156.

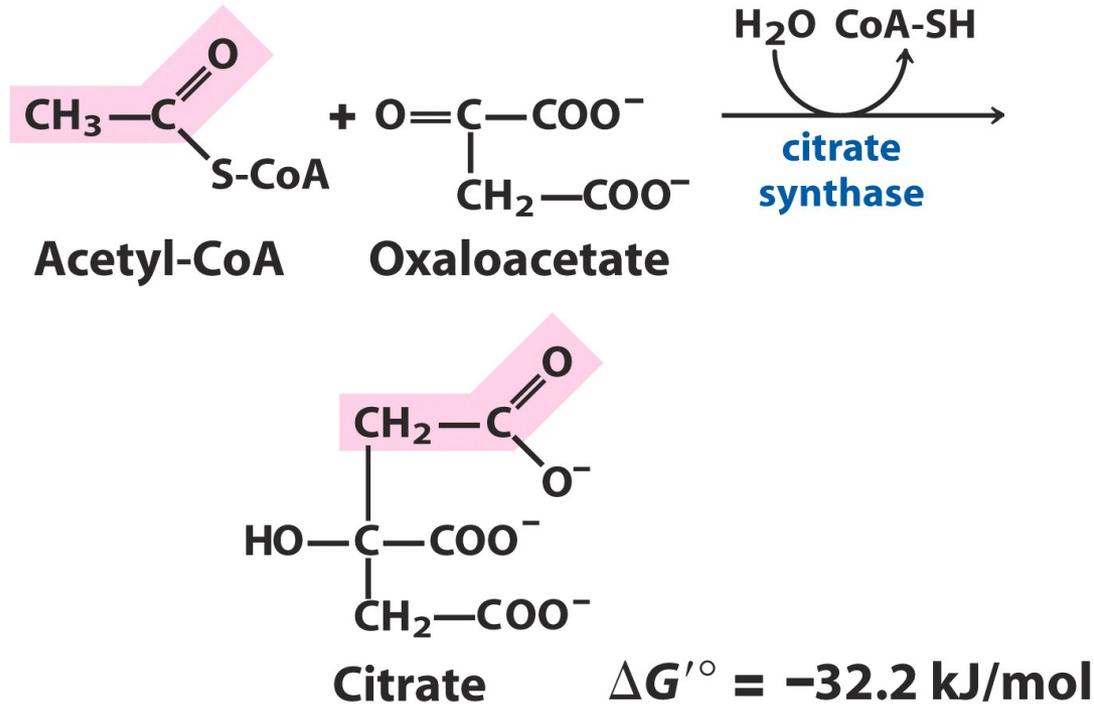


Localizzazione intracellulare:

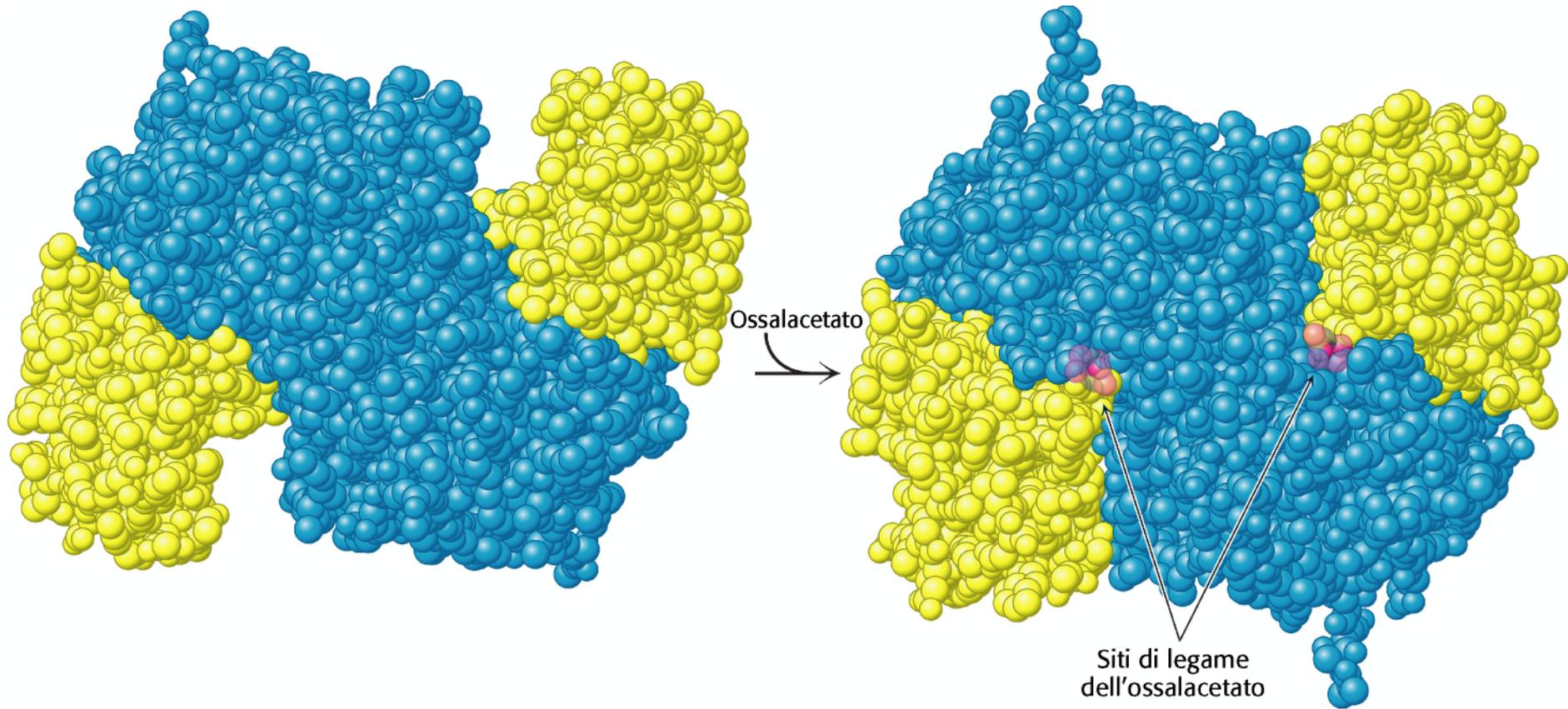
Mitocondri (eucarioti)

Citosol (procarioti)

# 1. Formazione di citrato



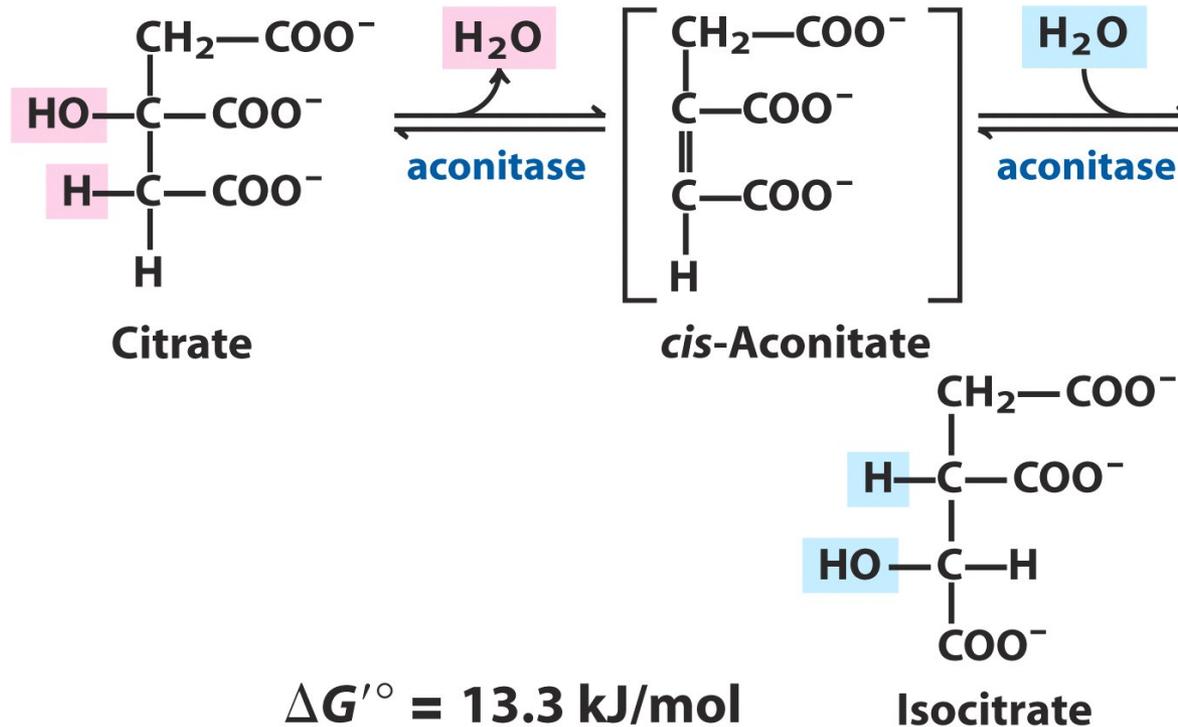
Reazione fortemente esoergonica, punto di regolazione



## Modificazioni conformazionali della citrato sintasi in seguito al legame di ossalacetato

L'ossalacetato induce una importante riorganizzazione strutturale che porta alla formazione del sito di legame per acetil-CoA

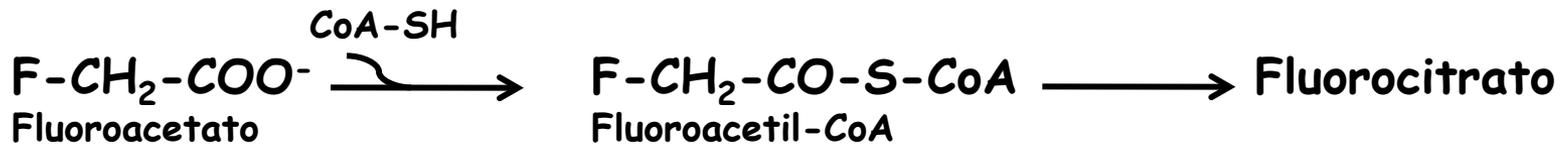
## 2. Formazione di isocitrato



**Isomerizzazione - Passaggio da un gruppo alcolico terziario ad un gruppo alcolico secondario più facilmente ossidabile**

**Reazione stereospecifica: dei quattro possibili diastereoisomeri dell' isocitrato ne viene prodotto solo uno.**

L'aconitasi è il bersaglio dell'azione tossica del **Fluoroacetato**, composto di origine vegetale che è stato usato come veleno per topi.

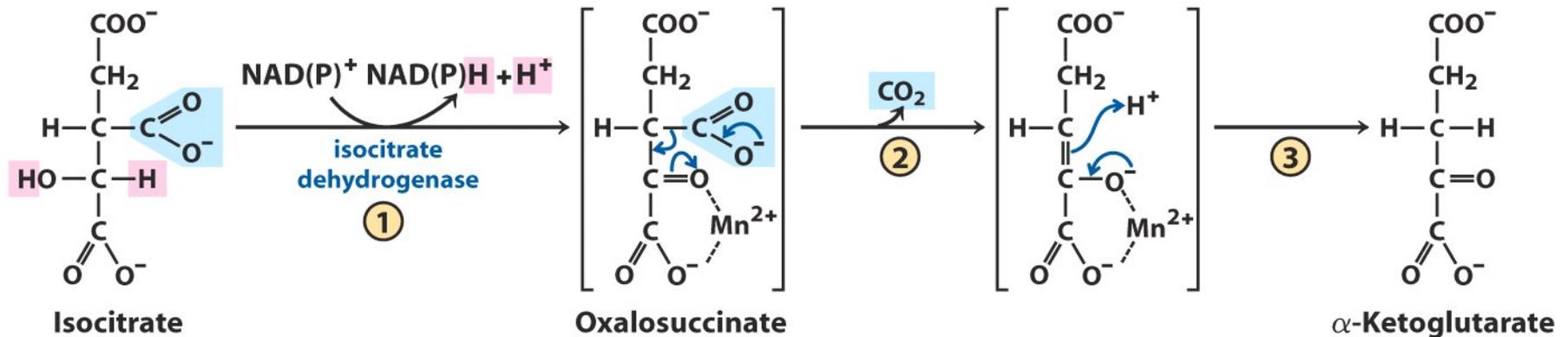


Il fluoroacetato è un esempio di substrato suicida: viene trasformato in fluoroacetil-CoA, che funge da substrato per la citrato sintasi. Il fluorocitrato non può però essere trasformato dall'aconitasi.

Il risultato è il blocco del ciclo dell'acido citrico

### 3. Ossidazione di isocitrato ad $\alpha$ -chetoglutarato e $\text{CO}_2$

Prima decarbossilazione ossidativa del ciclo

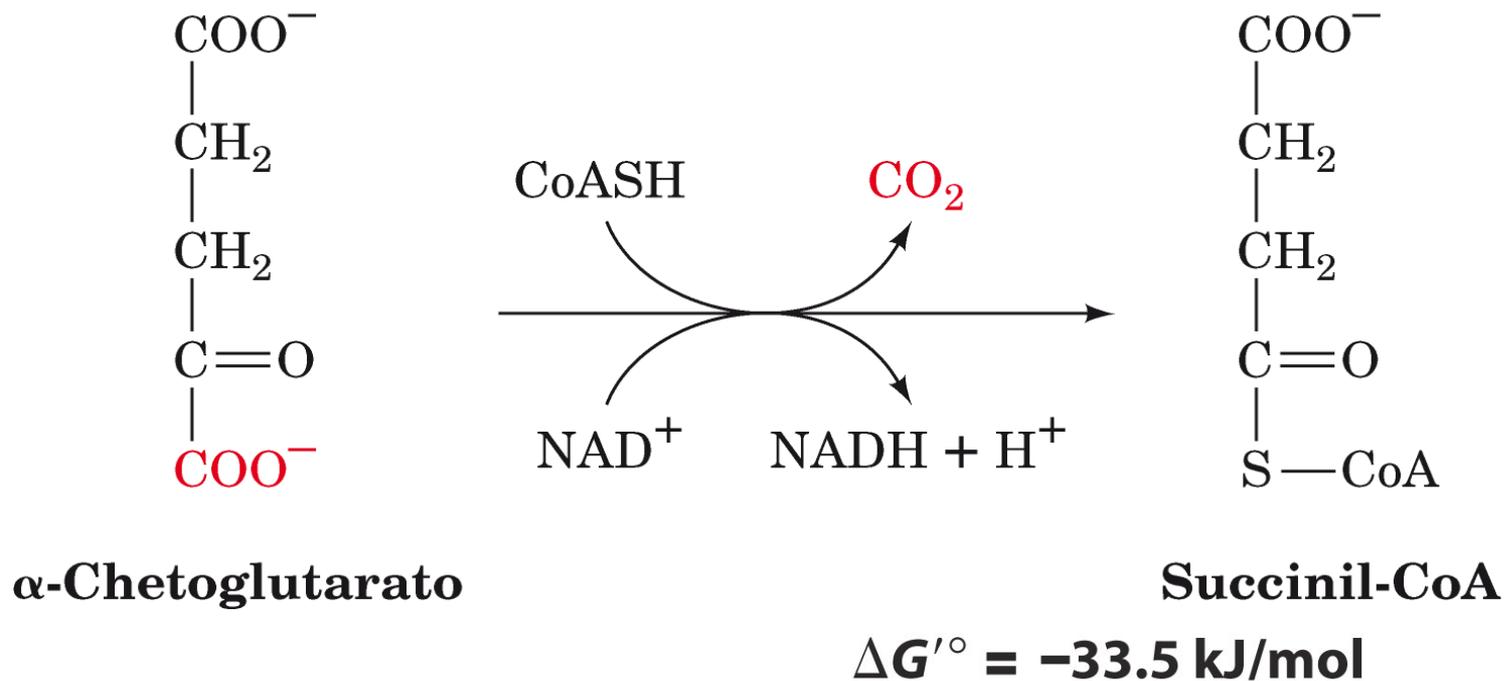


Deidrogenazione a ossalosuccinato, un intermedio instabile legato all'enzima che subisce decarbossilazione spontanea prima del rilascio del prodotto

Esistono due forme isoenzimatiche sia NAD<sup>+</sup> che NADP<sup>+</sup> dipendenti

## 4. Ossidazione di $\alpha$ -chetoglutarato a succinil-CoA e $\text{CO}_2$

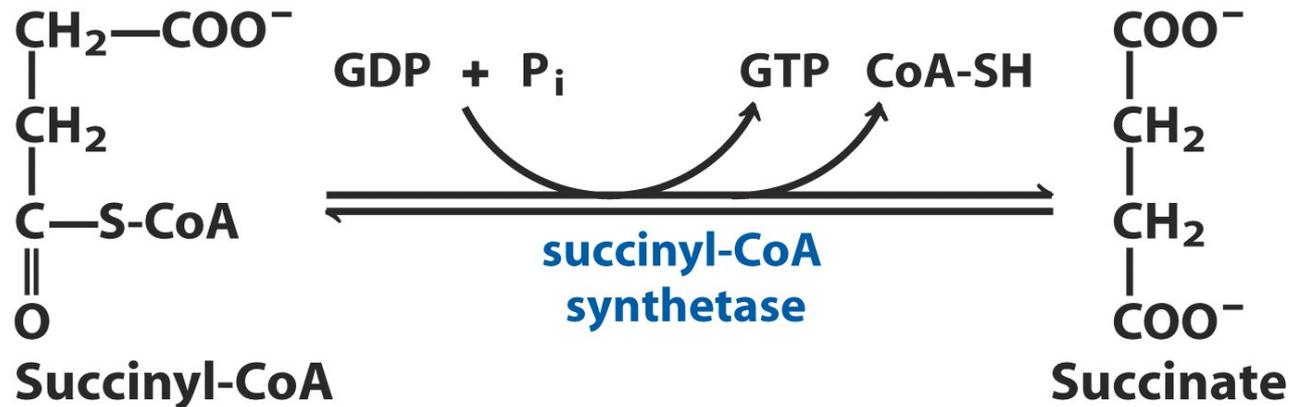
Seconda decarbossilazione ossidativa del ciclo



La reazione è catalizzata dal complesso  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi, molto simile alla piruvato deidrogenasi sia nella struttura che nel meccanismo d'azione.

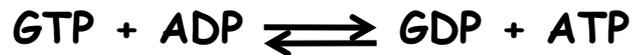
## 5. Conversione di succinil-CoA a succinato

Fosforilazione a livello del substrato



$$\Delta G'^{\circ} = -2.9 \text{ kJ/mol}$$

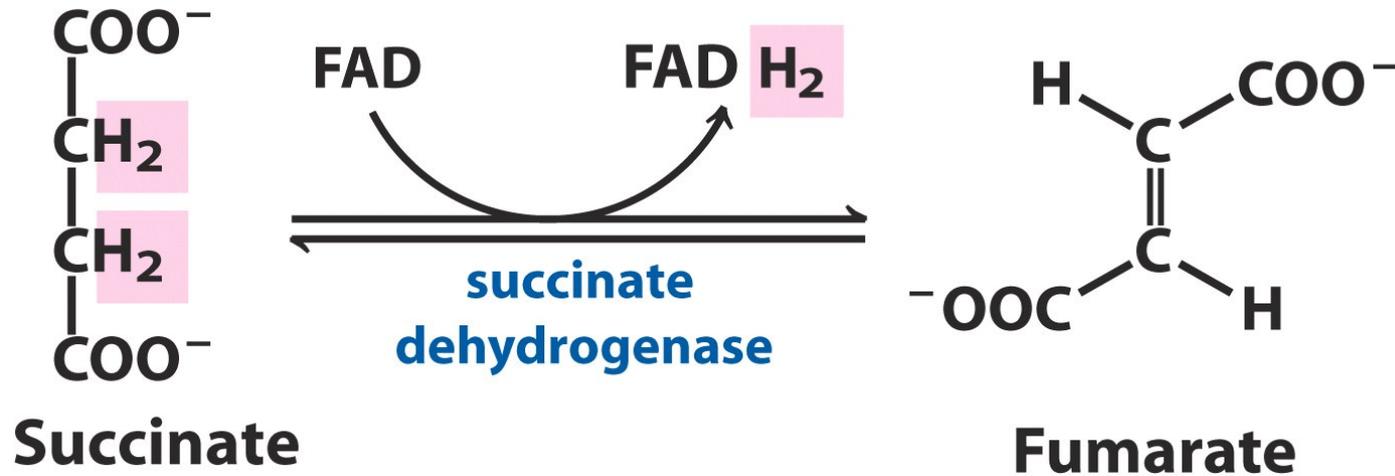
Le cellule animali hanno due isozimi, uno specifico per ADP e un altro per GDP  
Il GTP formato può donare il gruppo  $\gamma$ Pi ad ADP mediante una reazione reversibile catalizzata dalla **nucleoside difosfato chinasi**



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

Il risultato netto dell'attività di entrambi gli isozimi della succinil-CoA sintetasi è la conservazione di energia sotto forma di ATP

## 6. Ossidazione di succinato a fumarato



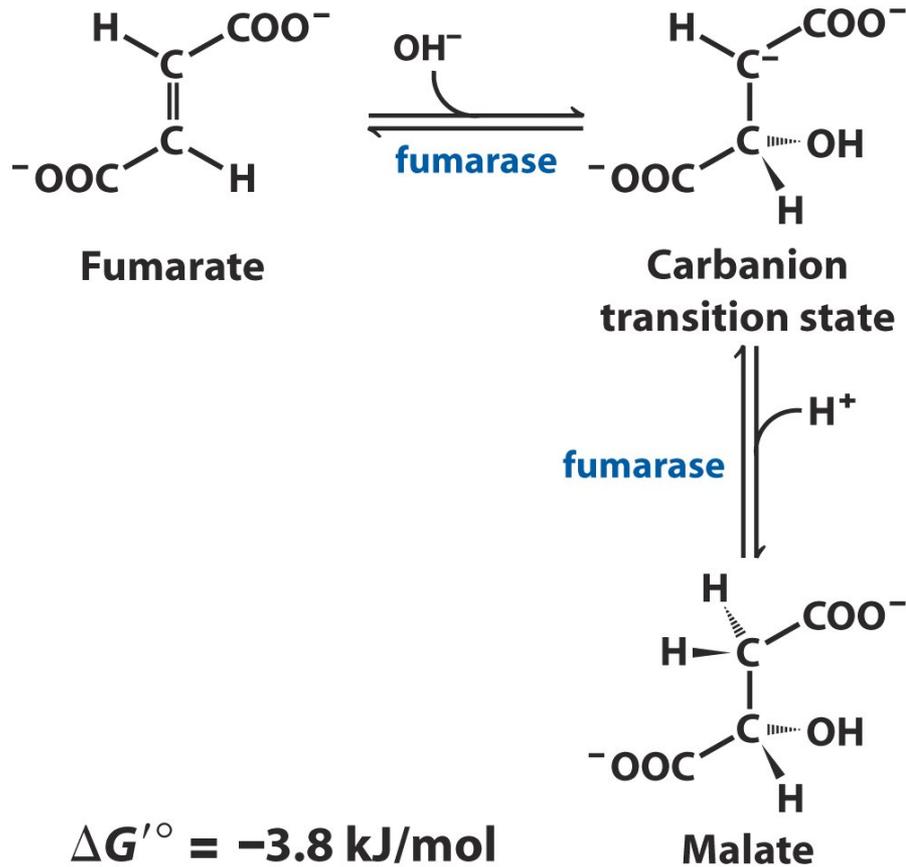
$$\Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

Negli eucarioti l'enzima è legato alla membrana interna dei mitocondri (nei procarioti è associato alla membrana plasmatica)

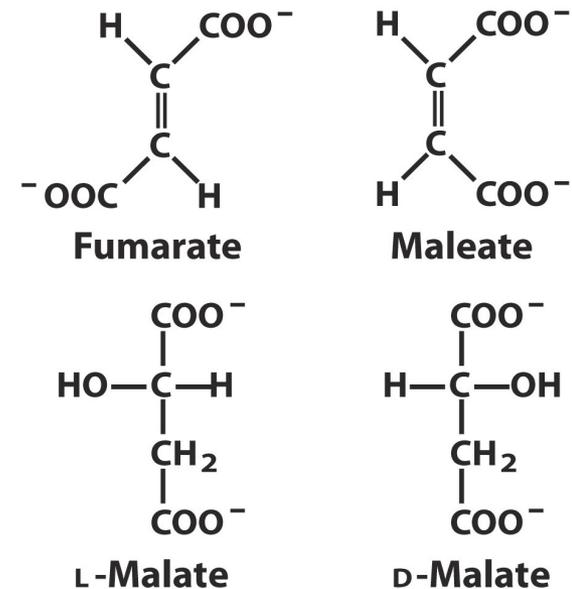
Contiene tre centri ferro-zolfo e una molecola di FAD legata covalentemente

Gli elettroni estratti dal succinato passano attraverso FAD ed i centri ferro-zolfo prima di entrare nella catena di trasporto degli elettroni

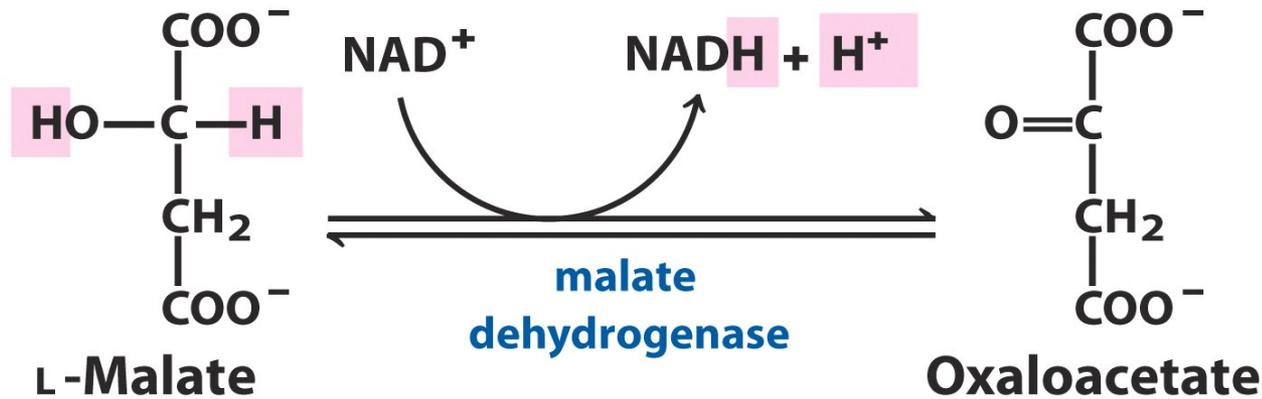
# 7. Idratazione di fumarato a malato



La fumarasi (fumarato idratasi) è altamente stereospecifica: catalizza l'idratazione del doppio legame *trans* del fumarato, ma non quella dell'isomero *cis*, il maleato. Nella direzione inversa (da L-malato a fumarato) la fumarasi è ugualmente stereospecifica: il D-malato non è substrato dell'enzima

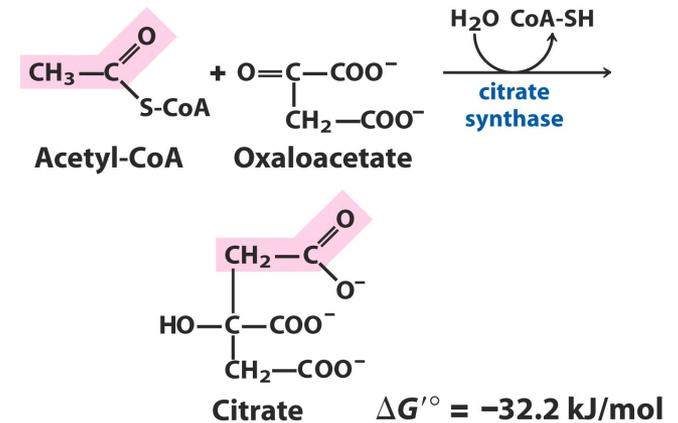


## 8. Ossidazione di malato a ossalacetato



$$\Delta G'^{\circ} = 29.7 \text{ kJ/mol}$$

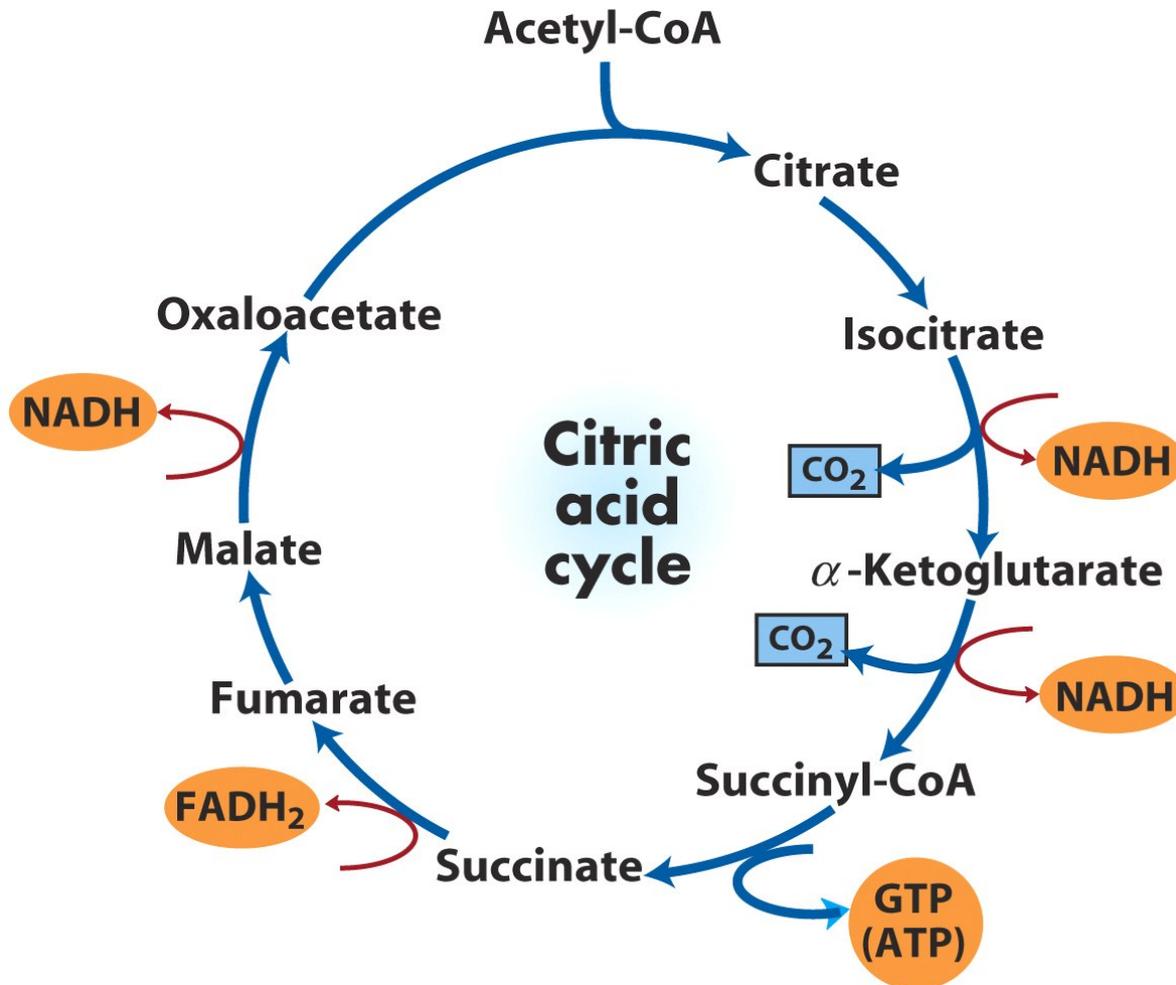
Nelle condizioni termodinamiche standard, l'equilibrio è molto spostato a sinistra. Nelle cellule, l'ossalacetato viene rimosso continuamente dalla reazione altamente esoergonica della citrato sintasi spingendo la reazione della malato deidrogenasi verso la formazione di ossalacetato



## Valori di $\Delta G'^{\circ}$ delle reazioni del ciclo dell'acido citrico

Reazione	Enzima	$\Delta G'^{\circ}$ (kJmol <sup>-1</sup> )
1	Citrato Sintasi	-31.5
2	Aconitasi	+5
3	Isocitrato deidrogenasi	-21
4	Complesso $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi	-33
5	Succinil-CoA Sintetasi	-2.1
6	Succinato deidrogenasi	+6
7	Fumarasi	-3.4
8	Malato deidrogenasi	+29.7
<b>BILANCIO NETTO</b>		<b>-50.3</b>

# I prodotti di un giro del ciclo dell'acido citrico

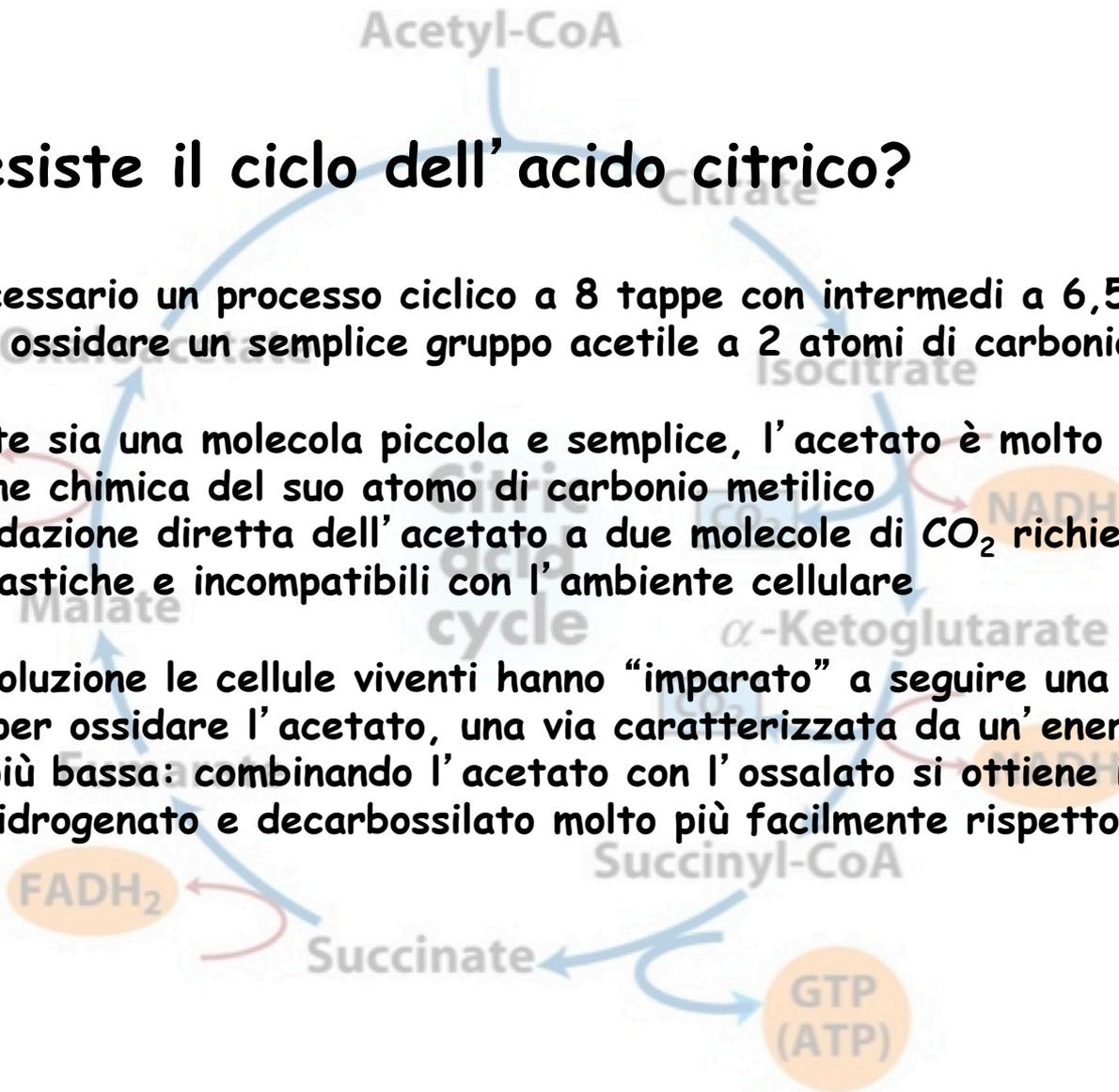


## Perché esiste il ciclo dell'acido citrico?

Perché è necessario un processo ciclico a 8 tappe con intermedi a 6,5,4 atomi di carbonio per ossidare un semplice gruppo acetile a 2 atomi di carbonio?

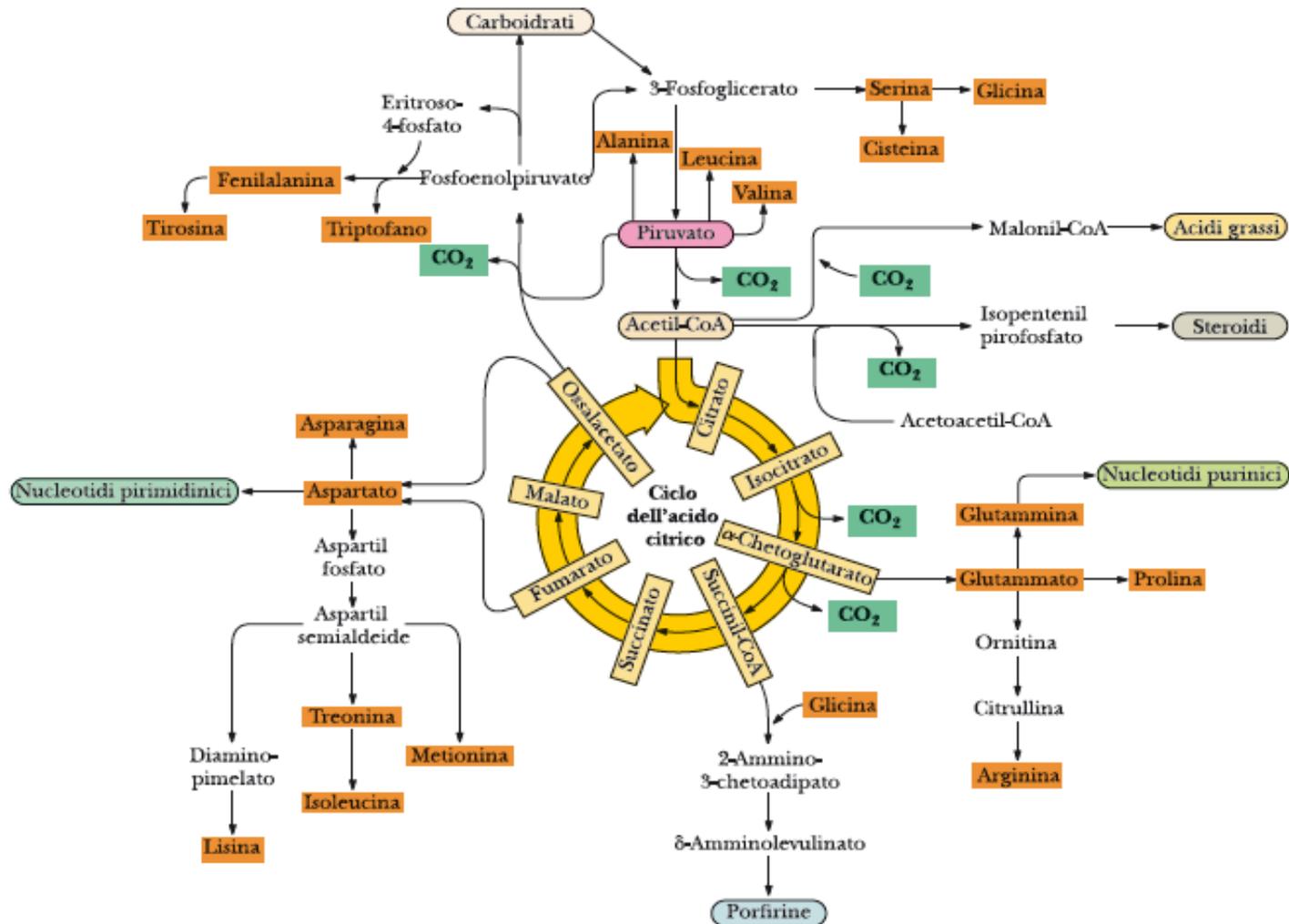
1. Nonostante sia una molecola piccola e semplice, l'acetato è molto resistente all'ossidazione chimica del suo atomo di carbonio metilico. Quindi l'ossidazione diretta dell'acetato a due molecole di  $\text{CO}_2$  richiede condizioni drastiche e incompatibili con l'ambiente cellulare.

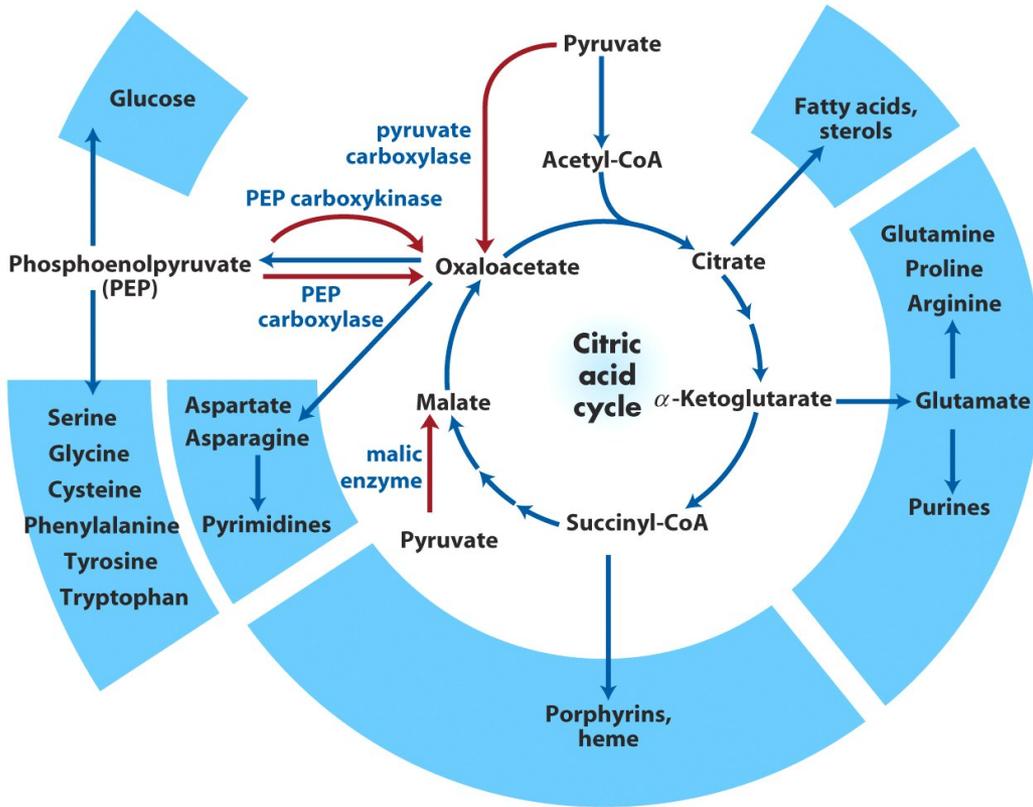
Durante l'evoluzione le cellule viventi hanno "imparato" a seguire una via lunga, ma "facile" per ossidare l'acetato, una via caratterizzata da un'energia di attivazione più bassa: combinando l'acetato con l'ossalato si ottiene il citrato che viene deidrogenato e decarbossilato molto più facilmente rispetto all'acetato.



2. Il ciclo dell'acido citrico fornisce gli intermedi per numerosi processi biosintetici cellulari.

Negli organismi aerobici, il ciclo dell'acido citrico è una via **anfibolica**, cioè serve sia ai processi anabolici che a quelli catabolici





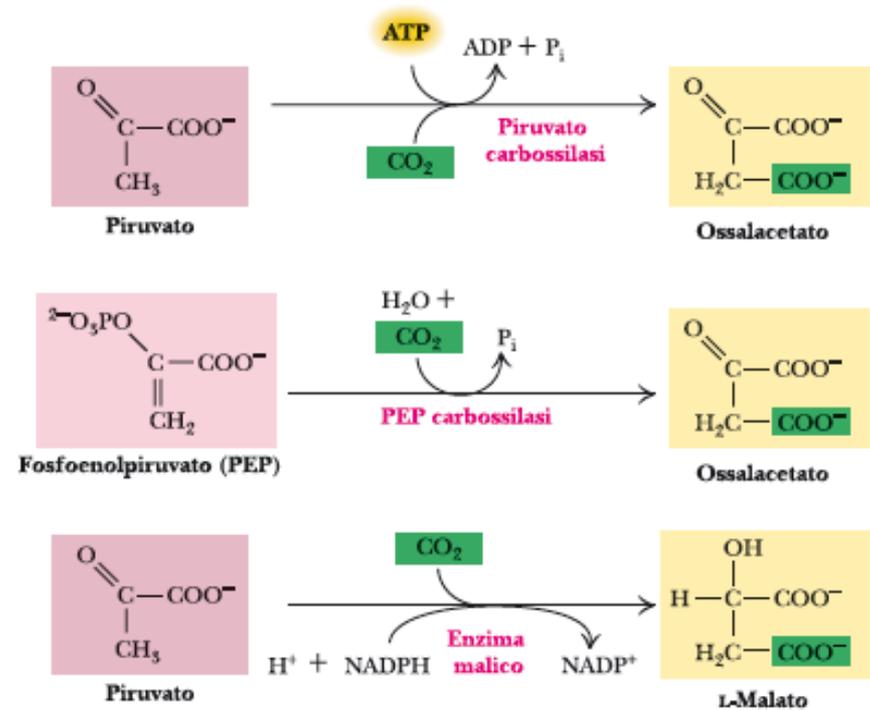
## Le reazioni anaplerotiche: la necessità di rimpiazzare gli intermedi del ciclo impiegati nelle reazioni biosintetiche

Con le reazioni anaplerotiche (dal termine greco che significa “riempimento”) si riesce a mantenere un bilancio quasi perfetto tra le reazioni che rimuovono intermedi dal ciclo e quelle che lo riforniscono; la concentrazione di tali intermedi rimane in tal modo pressochè costante

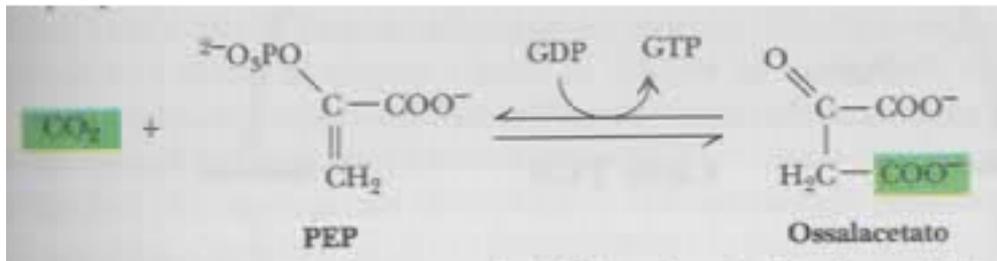
**TABLE 16-2** Anaplerotic Reactions

Reaction	Tissue(s)/organism(s)
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{pyruvate carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i$	Liver, kidney
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxykinase}} \text{oxaloacetate} + \text{GTP}$	Heart, skeletal muscle
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{HCO}_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{P}_i$	Higher plants, yeast, bacteria
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightleftharpoons{\text{malic enzyme}} \text{malate} + \text{NAD(P)}^+$	Widely distributed in eukaryotes and prokaryotes

Nei tessuti animali, in particolare fegato e rene, la reazione catalizzata dalla **piruvato carbossilasi** biotina-dipendente è la più importante reazione anaplerotica. L'enzima è attivato allostericamente da acetil-CoA



Anche se in teoria la reazione catalizzata dalla **PEP carbossichinasi** potrebbe funzionare da reazione anaplerotica, nella cellula è favorita la formazione di PEP da ossalacetato a causa della notevole affinità dell'enzima per l'ossalacetato rispetto a quella per la CO<sub>2</sub>.



# **Il beriberi provoca un'alterazione del metabolismo del piruvato**

**Il beriberi, causato da una carenza nutrizionale di tiamina (Vit B1), precursore di TPP, colpisce principalmente il sistema nervoso.**

**Quali processi biochimici sono alterati dalla carenza di tiamina?**

**TPP è il gruppo prostetico di tre importanti enzimi:**

**piruvato deidrogenasi**

**$\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi**

**transchetolasi**

**Nel beriberi si riscontrano**

**alti livelli di piruvato e  $\alpha$ -chetoglutarato**

**bassi livelli di piruvato deidrogenasi,  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi e transchetolasi**

La sintomatologia del beriberi è soprattutto di tipo neurologico.....

Precedentemente agli studi di Funk (inizi del '900) la malattia è stata descritta per la prima volta nel 1630 da Jacob Bonitus, un medico olandese che operava a Giava:

*“ Una certa malattia molto debilitante, che attacca gli uomini, è chiamata dagli abitanti beriberi (che significa pecora). Penso che la chiamino così perchè gli individui attaccati da questa malattia, camminando con le ginocchia tremanti e le gambe malferme, hanno un'andatura simile a quella delle pecore. E' una sorta di paralisi o piuttosto di tremore: interessa la motilità e la sensibilità delle mani e dei piedi e talvolta dell'intero corpo.”*

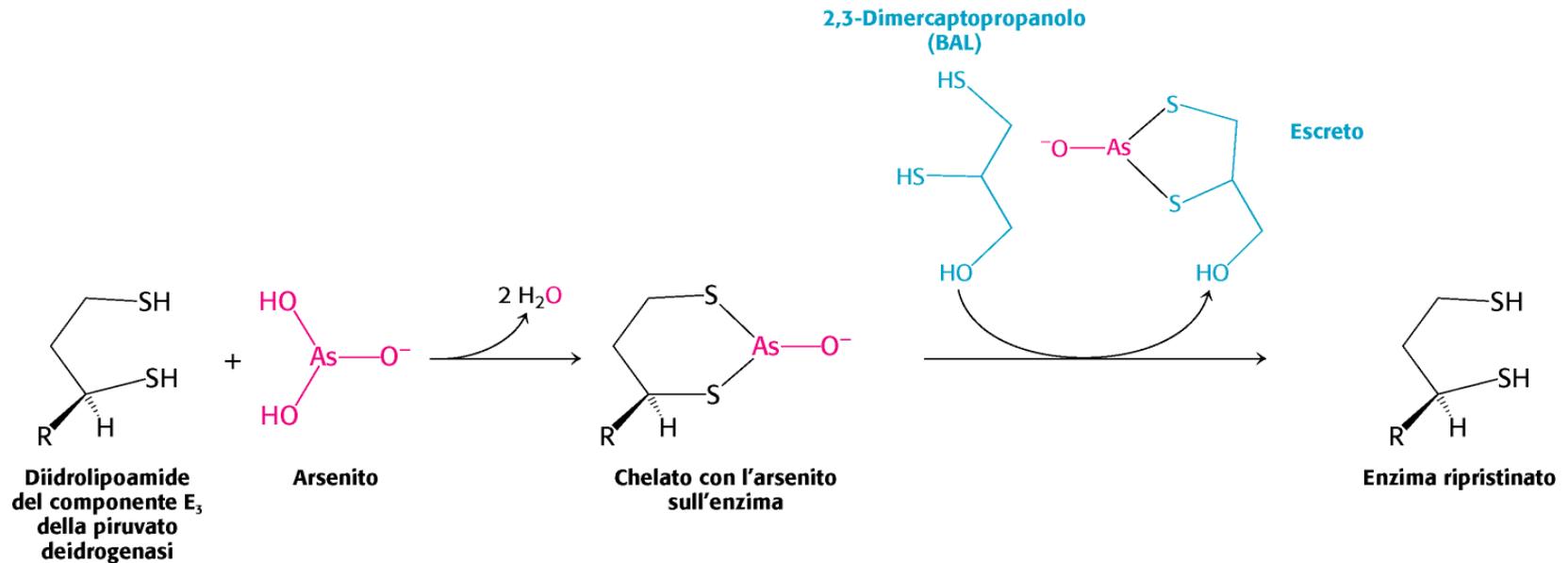
.....perché il SNC dipende quasi esclusivamente dal glucosio come fonte di energia.

L'inattivazione della piruvato deidrogenasi impedisce l'ingresso del piruvato nel ciclo dell'acido citrico

Gli altri tessuti possono utilizzare i grassi come fonti di energia e sorgenti di acetil-CoA per alimentare il ciclo dell'acido citrico

Sintomi simili a quelli del beriberi si manifestano in soggetti esposti al mercurio o all'arsenico

Entrambi inibiscono il complesso della piruvato deidrogenasi inattivando la diidrolipoamide



Alcuni reagenti sulfidrilici, come 2,3-dimercaptopropanololo, attenuano l'inibizione formando con l'arsenito un complesso che può venire escreto. 2,3-dimercaptopropanololo veniva utilizzato durante la prima guerra mondiale come antidoto contro la LEWISITE, un'arma chimica a base di arsenico