

Ο κύκλος του Krebs

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι μια κυκλική αλληλουχία αντιδράσεων, στην οποία το τελικό προϊόν είναι αντιδρόν του αρχικού σταδίου. Στον κύκλο αυτό συμμετέχουν πολλά ένζυμα τα οποία λαμβάνουν μέρος σε μια πληθώρα αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη μιτοχονδριακή μήτρα. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος προσφέρει ενέργεια στα κύτταρα με άμεσο αλλά κυρίως με έμμεσο τρόπο, μέσω της παραγωγής NADH και FADH₂, τα οποία είναι φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και υδρογόνου. Τα NADH και FADH₂, θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σε πολλαπλές αντιδράσεις και μπορούν να μετατραπούν σε ATP κάτω από αερόβιες συνθήκες στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ή αναπνοής που λαμβάνει χώρα στις εσωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος, όπως και όλες οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό, πρέπει να ελέγχεται, ώστε τα προϊόντα του να βρίσκονται στη σωστή συγκέντρωση ανάλογα με τις ανάγκες. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται σε τέσσερα στάδια με την αναστολή ή τη διέγερση των ενζύμων αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού, συνθετάση του κιτρικού, αφυδρογονάση του ισοκιτρικού και α-κετογλουταρική αφυδρογονάση. Η σημασία του κύκλου του κιτρικού οξέος, η οποία επεκτείνεται πέρα από την παραγωγή CO₂ και ανηγμένων συνενζύμων καθώς οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες του κύκλου χρησιμεύουν και στη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού.

Περιεχόμενα

- Εισαγωγή
- Sir Hans Adolf Krebs
- Η πορεία προς τον κύκλο του κιτρικού οξέος
- Ενεργειακή απόδοση του κύκλου του κιτρικού οξέος
- Σημεία ελέγχου του κύκλου του κιτρικού οξέος
- Η σημασία του κύκλου του κιτρικού οξέος
- Ο πλήρης κύκλος του κιτρικού οξέος
- Οξειδωτική φωσφορυλίωση

- Συμπεράσματα
- Βιβλιογραφία

Εισαγωγή

Τον 19ο αιώνα οι βιολόγοι παρατήρησαν ότι υπό αναερόβιες συνθήκες τα κύτταρα παρήγαγαν γαλακτικό οξύ ή αιθανόλη, ενώ αντίθετα υπό αερόβιες συνθήκες κατανάλωναν οξυγόνο και παρήγαγαν διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Ακολούθησαν εντατικές μελέτες που αποσκοπούσαν στο να διαλευκάνουν τις οδούς του αερόβιου μεταβολισμού. Οι μελέτες αυτές τελικά επικεντρώθηκαν στην οξείδωση του πυροσταφυλικού και οδήγησαν στην ανακάλυψη του κύκλου του κιτρικού οξέος το 1937.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων ή κύκλος του Krebs, προς τιμήν του Hans Krebs, ο οποίος αποσαφήνισε όλη την διαδικασία, είναι το τρίτο στάδιο παραγωγής ενέργειας από την διάσπαση των τροφών.

Κατά το πρώτο στάδιο τα μακρομόρια της τροφής διασπώνται απελευθερώνοντας τις δομικές τους μονάδες. Οι πρωτεΐνες υδρολύονται στα αντίστοιχα είκοσι αμινοξέα, οι πολυσακχαρίτες διασπώνται σε απλά σάκχαρα, όπως η γλυκόζη και τα λίπη αποικοδομούνται σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Στη φάση αυτή δεν παράγεται ενέργεια που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση του ATP.

Κατά το δεύτερο στάδιο οι δομικές μονάδες των μακρομορίων της τροφής αποικοδομούνται σε απλούστερες μονάδες, από τις οποίες οι περισσότερες μετατρέπονται σε ακετυλο-συνένζυμο Α (για συντομία γράφεται ακετυλο-CoA). Το μόριο αυτό αποτελεί ένα κεντρικό μεταβολικό προϊόν, του οποίου η ακετυλομάδα συνδέεται μέσω ενός δεσμού πλούσιου σε ενέργεια, στο συνένζυμο Α. Έτσι το ακετυλο-CoA μεταφέρει μία ενεργοποιημένη ακετυλομάδα, όπως ακριβώς το ATP μεταφέρει μία ενεργοποιημένη φωσφορική ομάδα. Στο στάδιο αυτό παράγεται μία μικρή ποσότητα ATP σε σύγκριση με αυτήν που παράγεται στο τρίτο στάδιο.

Το τρίτο στάδιο αποτελείται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος και από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, που είναι οι τελικές κοινές πορείες της οξειδωσης των καύσιμων μορίων. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος επιτυγχάνεται μόνο σε αερόβιες συνθήκες, καθώς αν και στον κύκλο δεν συμμετέχει οξυγόνο, για να αναγεννηθεί το NAD^+ και το FAD και να εισέλθουν πάλι στον κύκλο, το οξυγόνο πρέπει να απαλλάξει το NADH και το FADH_2 από τα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Τα προϊόντα του κύκλου είναι CO_2 , μια μικρή ποσότητα ATP και άτομα υδρογόνου, εκ των οποίων τα μισά είναι συνδεδεμένα στα NAD^+ και FAD .

Το ακετυλο-CoA τροφοδοτεί τον κύκλο του κιτρικού οξέος, μέσω του οποίου η ακετυλομάδα του οξειδώνεται σε CO_2 και παράγονται ανηγμένα συνένζυμα NADH και FADH_2 . Επειδή το ακετυλο-CoA είναι ένα μικρό μόριο με μία μόνο λειτουργική ομάδα, οι δυνατότητες επιλογής μηχανισμών είναι περιορισμένες. Συνεπώς, η φύση επέλεξε μία κυκλική μεταβολική διαδικασία, κατά την οποία θα σχηματίζονται ενδιάμεσα με πολλαπλές λειτουργικές ομάδες, ώστε το εύρος των επιλογών για τις αντιδράσεις να διευρυνθεί σημαντικά. Εάν η φύση επέλεγε μία γραμμική μεταβολική οδό, όπως όταν αποικοδομείται ένα σχετικά μεγάλο μόριο, με πολλές λειτουργικές ομάδες, ίσως αυτή να μην ήταν εφικτή από ενεργειακή άποψη.

Στη συνέχεια καθώς τα ηλεκτρόνια των συνενζύμων αυτών ρέουν προς το οξυγόνο σχηματίζεται ATP, με μία διεργασία που ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση. Στο στάδιο αυτό σχηματίζεται και η μεγαλύτερη ποσότητα ATP που παράγεται από τη διάσπαση των τροφών.

Sir Hans Adolf Krebs

Γεννήθηκε στο Hildesheim της Γερμανίας στις 25 Αυγούστου 1900. Πατέρας του ήταν ο Georg Krebs χειρουργός ωτορινολαρυγγολόγος, και μητέρα του η Alma Davidson. Σπούδασε Ιατρική στα Πανεπιστήμια του Göttingen και στο Freiburg (1918-1923) και παρακολούθησε μαθήματα χημείας στο Βερολίνο για ένα έτος. Πήρε M.D. από το Αμβούργο το 1925. Διετέλεσε βοηθός του Otto Warburg στο Ινστιτούτο Βιολογίας Kaiser Wilhelm μέχρι το 1930 και καθηγητής στα Πανεπιστήμια του Βερολίνου, Freiburg. Μετανάστευσε στην Αγγλία το 1933 και έγινε καθηγητής στο Sheffield (1935-1954) και στην Οξφόρδη (1954-1967). Τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας το 1953, για την ανακάλυψή του σχετικά με τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Πέθανε στην Οξφόρδη στις 22 Νοεμβρίου 1981.

Η πορεία προς τον κύκλο του κιτρικού οξέος

Τα κύτταρα χρησιμοποιούν τρεις κύριες μεταβολικές οδούς για να μεταφέρουν στο μόριο του ATP την ενέργεια που παράγεται από την διάσπαση των καύσιμων υλικών. Οι τρεις αυτές οδοί είναι η γλυκόλυση, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Η γλυκόλυση είναι η οδός στην οποία καταβολίζονται οι υδατάνθρακες και κυρίως η γλυκόζη. Αποτελείται από δέκα ενζυμικές αντιδράσεις, οι οποίες μετατρέπουν ένα μόριο γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού ανιόντος. Από τις αντιδράσεις αυτές παράγονται δύο μόρια ATP, δύο υδρογονοκατιόντα και δύο NADH . Κατά την πορεία της γλυκόλυσης δεν απαιτείται οξυγόνο και οι αντιδράσεις επιτελούνται στο κυτοσόλιο.

Το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό ανιόν, το οποίο μπορεί σε αναερόβιες συνθήκες να μετατραπεί σε γαλακτικό, ενώ κάτω από αερόβιες συνθήκες εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος.

Ο πλήρης κύκλος του κιτρικού οξέος

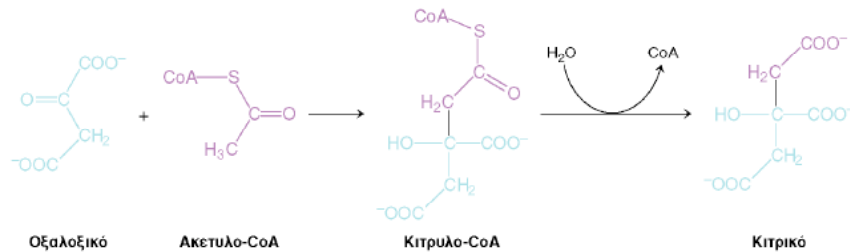
Ο κύκλος του κιτρικού οξέος μπορεί να περιγραφεί σε οκτώ βήματα τα οποία παρατίθενται αναλυτικά κατωτέρω:

Βήμα 1:

Προσθήκη στο οξαλοξικό ιόν:

Αρχικά, με τη δράση ενός ενζύμου, ένα πρωτόνιο αφαιρείται από την ομάδα CH_3 του ακετυλο-CoA.

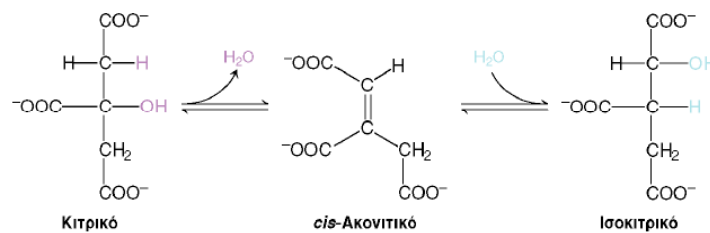
Το φορτισμένο αρνητικά CH₂ που σχηματίζεται, συνδέεται με το άτομο άνθρακα ενός καρβονυλίου του οξαλοξικού, σχηματίζοντας ένα κίτρυλο-CoA. Η προσθήκη αυτή καταλύεται από το ένζυμο κίτρινη συνθετάση. Στη συνέχεια το κίτρυλο-CoA υδρολύεται προς κίτρινο ιόν ελευθερώνοντας το συνένζυμο A (CoA). Από την υδρόλυση αυτή απελευθερώνεται σημαντική ποσότητα ελεύθερης ενέργειας που προωθεί ισχυρά την αντίδραση προς τα δεξιά.



Βήμα 2:

Ισομερίωση κίτρικου ιόντος:

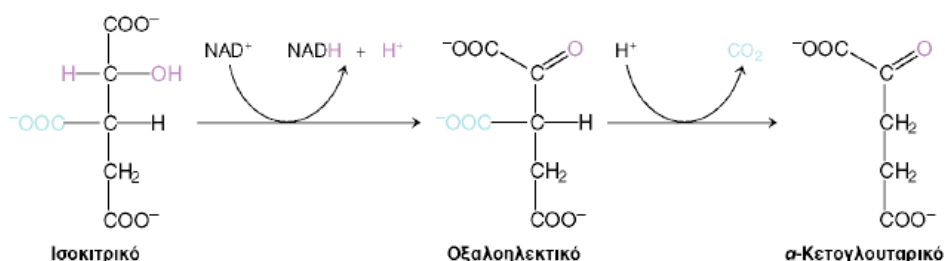
Το κίτρινο ιόν που σχηματίστηκε μετατρέπεται στο ισομερές ισοκίτρινο, το οποίο μπορεί να οξειδωθεί. Είναι μια αντίδραση ισομερίωσης, στην οποία αρχικά αφαιρείται και κατόπιν επαναπροστίθεται νερό. Η υδροξυλομάδα μετακινείται από ένα άτομο άνθρακα στο γειτονικό άτομο. Ο διπλός δεσμός σχηματίζεται εκλεκτικά προς την αντίθετη πλευρά στην οποία έγινε η προσθήκη του ακετυλο-CoA στο οξαλοξικό ιόν, κατά την αφυδάτωση του κίτρικου ιόντος.



Βήμα 3:

Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση:

Στο πρώτο από τα τέσσερα βήματα οξείδωσης του κύκλου, το άτομο άνθρακα που έχει την υδροξυλομάδα οξειδώνεται από το NAD⁺ προς ένα κετονικό ενδιάμεσο, το οξαλοηλεκτρικό, το οποίο είναι ασταθές και χάνει το CO₂, σχηματίζοντας α-κετογλουταρικό ιόν. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ισοκίτρινη αφυδρογονάση. Αυτή η οξείδωση δημιουργεί NADH.

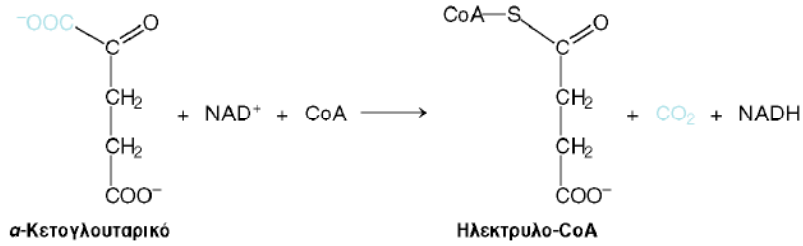


Βήμα 4:

Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση:

Το ενζυμικό σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του α-κετογλουταρικού μοιάζει πολύ με το μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο που μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε ακετυλο-CoA

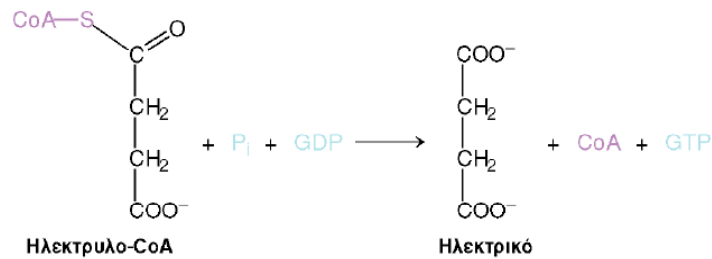
(αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού). Κατ' αναλογία επίσης καταλύει μια οξειδωση που παράγει NADH, CO₂, και ένα θειολεστερικό δεσμό υψηλής ενέργειας με το συνένζυμο A (CoA).



Βήμα 5:

Υδρόλυση του ηλεκτρυλο-CoA:

Ένα μόριο φωσφορικού από το διάλυμα εκτοπίζει το CoA, σχηματίζοντας έναν φωσφορικό δεσμό υψηλής ενέργειας με το ηλεκτρικό (σουκκινικό). Κατόπιν το φωσφορικό αυτό μεταφέρεται από το ηλεκτρικό στο GDP, οπότε σχηματίζεται GTP. (Στα βακτήρια και τα φυτά, αντί για GTP σχηματίζεται ATP). Η αντίδραση καταλύεται από την συνθετάση του ηλεκτρυλο-CoA. Ο μηχανισμός είναι ένα σαφές παράδειγμα μετασχηματισμού ενέργειας καθώς σε όλα τα βήματα συμμετέχουν ενώσεις υψηλής ενέργειας.

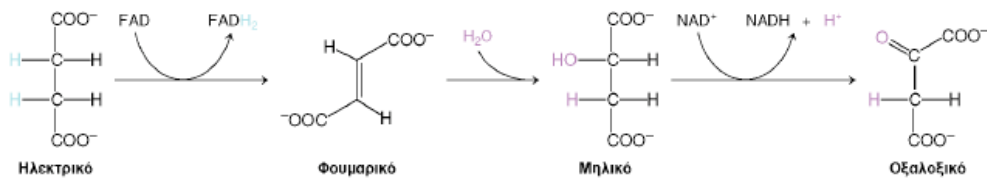


Βήμα 6:

Αφυδρογόνωση του ηλεκτρικού:

Στο τρίτο βήμα οξειδωσης του κύκλου, το FAD αφαιρεί δύο άτομα υδρογόνου από το ηλεκτρικό. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η ηλεκτρική αφυδρογονάση.

Ο δέκτης του υδρογόνου είναι το FAD και όχι το NAD⁺ το οποίο χρησιμοποιείται στις υπόλοιπες τρεις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του κύκλου. Αυτό συμβαίνει διότι η αλλαγή ελεύθερης ενέργειας είναι ανεπαρκής για να αναγάγει το NAD⁺. Το FAD είναι σχεδόν πάντοτε ο δέκτης ηλεκτρονίων σε οξειδώσεις κατά τις οποίες αποσπώνται δύο άτομα υδρογόνου από το υπόστρωμα.



Βήμα 7:

Προσθήκη νερού στο φουμαρικό:

Η προσθήκη νερού στο φουμαρικό τοποθετεί μια υδροξυλομάδα δίπλα στο άτομο του άνθρακα ενός καρβονυλίου. Καταλύεται από το ένζυμο φουμαράση και οδηγεί στο σχηματισμό μηλικού ιόντος, μία αντίδραση παρόμοια με εκείνη του δεύτερου σταδίου της β-

οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Η φουμαράση καταλύει την στερεοειδική trans-προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου και μιάς υδροξυλικής ομάδας. Σχηματίζεται μόνο το L-ισομερές του μηλικού καθώς η υδροξυλική ομάδα προστίθεται μόνο στη μία πλευρά του διπλού δεσμού του φουμαρικού.

Βήμα 8:

Αναγέννηση του οξαλοξικού:

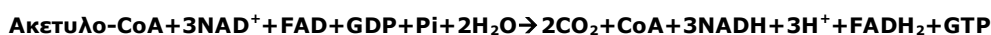
Στο τελευταίο από τα τέσσερα βήματα οξειδωσης του κύκλου, το άτομο του άνθρακα που έχει την υδροξυλομάδα μετατρέπεται σε μια ομάδα καρβονυλίου. Με τον τρόπο αυτό αναγεννάται το οξαλοξικό που χρειάζεται για το βήμα 1.

Η αντίδραση καταλύεται από τη μηλική αφυδρογονάση. Ο δέκτης του υδρογόνου είναι και πάλι το NAD^+ . Ο κύκλος του κιτρικού οξέως επιστρέφει τότε στο σημείο εκκίνησης έτοιμος να αρχίσει πάλι από την αρχή. Παρατηρούμε ότι αναλώνονται δύο μόρια νερού, το ένα στη σύνθεση του κιτρικού κατά την υδρόλυση του κίτρυλο-CoA και το δεύτερο κατά την ενυδάτωση του φουμαρικού.

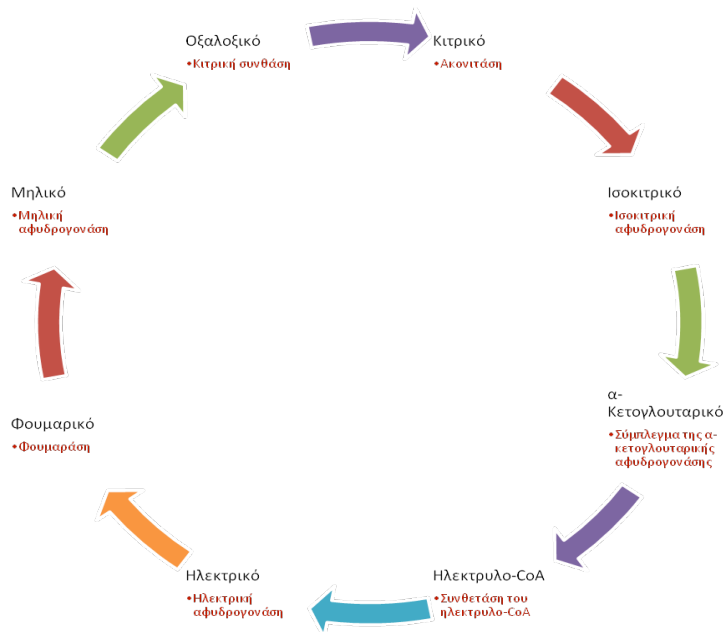
Ακολουθεί σύντομη απεικόνιση των ανωτέρω βημάτων:

Βήμα	Αντίδραση	Ένζυμο	Τύπος αντίδρασης
1	$\text{Ακετυλο-CoA} + \text{οξαλικό} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{κιτρικό} + \text{CoA} + \text{H}^+$	Κιτρική συνθάση	συμπύκνωση
2α	$\text{Κιτρικό} \rightarrow \text{cis-ακονιτικό} + \text{H}_2\text{O}$	Ακοτινάση	αφυδάτωση
2β	$\text{Cis-Ακονιτικό} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ισοκιτρικό}$	Ακοτινάση	ενυδάτωση
3	$\text{Ισοκιτρικό} + \text{NAD}^+ \rightarrow \alpha\text{-κετογλουταρικό} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$	Ισοκιτρική Αφυδρογονάση	αποκαρβοξυλίωση + οξείδωση
4	$\alpha\text{-Κετογλουταρικό} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} \rightarrow \text{ηλεκτρυλο-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$	Σύμπλεγμα της $\alpha\text{-κετογλουταρικής}$ αφυδρογονάσης	αποκαρβοξυλίωση + οξείδωση
5	$\text{Ηλεκτρυλο-CoA} + \text{P}_i + \text{GDP} \rightarrow \text{ηλεκτρικό} + \text{GTP} + \text{CoA}$	Συνθετάση του ηλεκτρυλο-CoA	φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος
6	$\text{Ηλεκτρικό} + \text{FAD}$ (ενωμένο με το ένζυμο) $\rightarrow \text{Φουμαρικό} + \text{FADH}_2$ (ενωμένο με το ένζυμο)	Ηλεκτρική αφυδρογονάση	Οξείδωση
7	$\text{Φουμαρικό} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{L-μηλικό}$	Φουμαράση	Ενυδάτωση
8	$\text{L-μηλικό} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{οξαλικό} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Μηλική αφυδρογονάση	Οξείδωση

Συνολική αντίδραση:



Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι μία σειρά από αντιδράσεις, που ολοκληρώνεται σε οκτώ στάδια, και οδηγεί σε μετατροπή μιας ακετυλο ομάδας σε δύο μόρια διοξειδίου του άνθρακα και σε ανηγμένα συνένζυμα.



Με μαύρα γράμματα αναγράφονται τα προϊόντα του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Με κόκκινα γράμματα αναγράφονται τα ένζυμα.

Μετά από πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε σήμανση με ραδιοϊσότοπα απεκαλύφθη ότι τα δύο άτομα του άνθρακα που εισέρχονται στον κύκλο δεν είναι εκείνα που τελικά τον εγκαταλείπουν. Το μόριο που κατά κύριο λόγο εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος είναι το ακετυλο-CoA. Το συνένζυμο A είναι παράγωγο του παντοθενικού οξέος και η κύρια λειτουργία του είναι να μεταφέρει ακετυλομάδες με δύο άτομα άνθρακα από ένα μόριο σε ένα άλλο. Οι ακετυλομάδες αυτές προέρχονται είτε από το πυροσταφυλικό που αποτελεί το τελικό προϊόν της αερόβιας γλυκόλυσης είτε από τη διάσπαση των λιπαρών οξέων και ορισμένων αμινοξέων.

Το πυροσταφυλικό μετά τη μεταβίβασή του από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA. Στο στάδιο αυτό δεν υπάρχει άμεσο ενεργειακό κέρδος ενώ το έμμεσο ενεργειακό κέρδος είναι ένα μόριο NADH και ένα μόριο ακετυλο-CoA, από κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος.

Με τη μεταφορά της ακετυλομάδας του στο οξαλοξικό ξεκινά ο κύκλος του κιτρικού οξέος όπως αναφέρεται παραπάνω.

Ενεργειακή απόδοση του κύκλου του κιτρικού οξέος

Από τον κύκλο του Krebs παράγονται 3NADH, 1FADH₂, 3H⁺ και μόλις 1GTP, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόδοση ενέργειας σε διάφορες κυτταρικές αντιδράσεις μετά την υδρόλυσή του σε ATP.

Συνεπώς, παράγεται μόνο ένα μόριο τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου υψηλής ενέργειας. Όμως στα NADH και FADH₂, τα οποία μεταφέρονται εύκολα, υπάρχει ενέργεια αποθηκευμένη στα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Ακόμη είναι φορείς υδρογόνου.

Η ενέργεια των NADH και FADH₂ θα χρησιμοποιηθεί αργότερα για τη σύνθεση ATP, μέσω της διεργασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης όπου με τη συμμετοχή O₂ το NADH θα απαλλαγεί από τα ηλεκτρόνια του και θα αναγεννηθεί το NAD⁺, το οποίο είναι απαραίτητο για τη συνέχιση του κύκλου. Τα NADH και FADH₂ μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια τους στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Εκεί μετά από μια πληθώρα διεργασιών κατά μήκος της μακριάς αλυσίδας δημιουργείται μια βαθμίδωση ιόντων H⁺, η οποία λειτουργεί ως πηγή ενέργειας και προωθεί ποικίλες αντιδράσεις που απαιτούν ενέργεια. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε, ότι τα NADH

και FADH_2 τα οποία παράγονται στο κύκλο, θα παράγουν στην συνέχεια, καθώς θα εισέλθουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, 10 μόρια ATP. Η πιο σημαντική αντίδραση που προωθείται είναι η δημιουργία ATP από τη φωσφορυλίωση του ADP.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και είναι στενά συνδεδεμένος με την αναπνευστική αλυσίδα, σκοπός της οποίας είναι η επανοξείδωση των ανηγμένων συνενζύμων NADH και FADH_2 . Καθώς τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τα συνένζυμα αυτά στον τελικό αποδέκτη, που είναι το O_2 , παράγεται ATP.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος πραγματοποιούνται μέσα στα μιτοχόνδρια, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις της γλυκόλυσης, οι οποίες επιτελούνται στο κυτταρόπλασμα.

Σημεία ελέγχου του κύκλου του κιτρικού οξέος

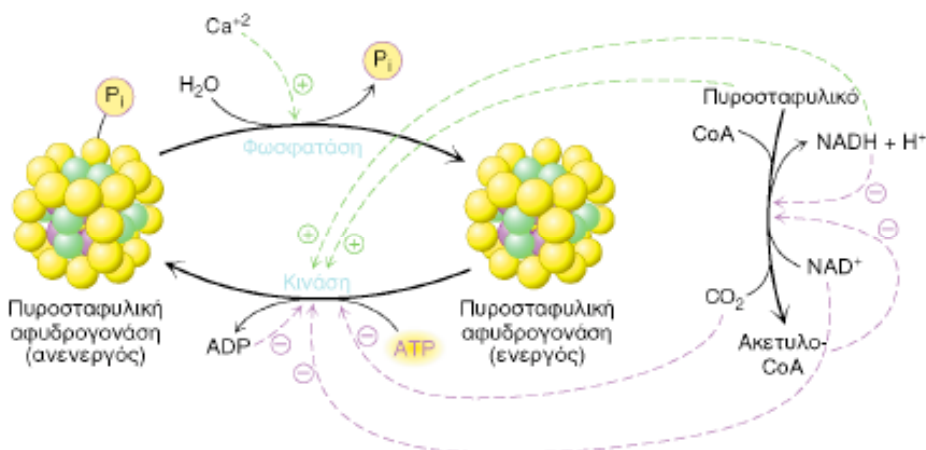
Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ελέγχεται από τα κύτταρα με τρεις μηχανισμούς, οι οποίοι περιορίζουν τη ροή υποστρωμάτων μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέως:

- τη διαθεσιμότητα υποστρωμάτων,
- τη συσσώρευση προϊόντων και
- την ανατροφοδοτική παλίνδρομη αναστολή ενζύμων κλειδιών.

Στα σημεία εισόδου η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού και η συνθετάση του κιτρικού είναι τα σημαντικότερα ένζυμα, που συμμετέχουν στη ρύθμιση.

Η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού αναστέλλεται αλλοστερικά από τα NADH και ακέτυλο CoA που είναι τα άμεσα προϊόντα της, καθώς και από το ATP, το οποίο είναι καθοδικό προϊόν.

Συνεπώς, η δραστηριότητα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης αναστέλλεται όταν τα προϊόντα της υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το σύμπλεγμα διεγείρεται από τους αδρενεργικούς ανταγωνιστές ($\alpha 1$), κάποιες ορμόνες και την ινσουλίνη.



Η συνθετάση του κιτρικού αναστέλλεται από ένα καθοδικό προϊόν, την ATP. Η αντίδραση αυτή παράγει κιτρικό το οποίο αναστέλλει παλίνδρομα τη φωσφοφρουκτοκινάση, καθώς συζεύγει τη γλυκόλυση και τον οξειδωτικό μεταβολισμό.

Υπό τις κατάλληλες συνθήκες, στον έλεγχο του κύκλου του κιτρικού οξέως συμμετέχουν και άλλα δύο ένζυμα, η αφυδρογονάση του ισοκιτρικού και η α -κετογλουταρική αφυδρογονάση.

Η ισοκιτρική αφυδρογονάση αναστέλλεται από το NADH , το οποίο υποκαθιστά το NAD^+ . Αντίθετα τα NAD^+ , Mg^{+2} , ADP και ισοκιτρικό δεν αναστέλλουν το ένζυμο αυτό. Ακόμη το ADP διεγείρει την ισοκιτρική αφυδρογονάση, αφού αυξάνει τη συγγένεια του ενζύμου για τα υποστρώματα.

Η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση αναστέλλεται από το ηλεκτρυλο-CoA και το NADH, δηλαδή τα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύει. Ακόμη όταν το κύτταρο έχει υψηλά επίπεδα ATP, δηλαδή υψηλό ενεργειακό φορτίο, η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση αναστέλλεται. Παρατηρούμε ότι το ένζυμο αυτό ελέγχεται σε κάποια σημεία με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο ελέγχεται το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, γεγονός αναμενόμενο λόγω της ομοιότητας τους στη δομή.



Συμπεραίνουμε λοιπόν, πως ο κύκλος του κιτρικού οξέος ελέγχεται σε τέσσερα σημεία.

Τέλος η ανάγκη για ATP των κυττάρων ρυθμίζει την ταχύτητα του κύκλου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι με την κατάλληλη διεύθυνση των ενζύμων που απαρτίζουν τον κύκλο του κιτρικού οξέος, η ικανότητά του μπορεί να αυξηθεί. Υποστηρίζεται ότι τα ένζυμα είναι φυσικώς συνδεδεμένα μεταξύ τους, με στόχο την ευκολότερη διοχέτευση των υποστρωμάτων μεταξύ των ενεργών κέντρων. Για τέτοιου τύπου πολυενζυμικά σύμπλοκα έχει προταθεί η ονομασία «μετάβολον».

Η Σημασία του κύκλου του κιτρικού οξέος

Κατά τη γλυκολυτική πορεία η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Κάτω από αερόβιες συνθήκες το επόμενο βήμα στην πορεία της πλήρους διάσπασης της γλυκόζης είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA.

Αυτή η ενεργοποιημένη ακετυλο-ομάδα οξειδώνεται πλήρως σε CO₂ μέσω μίας σειράς αντιδράσεων, που είναι γνωστή με το όνομα κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs.

Εκτός από τα τελικά προϊόντα της διάσπασης των υδατανθράκων (πυροσταφυλικό) και τα προϊόντα του μεταβολισμού των λιπών και των αμινοξέων οξειδώνονται, στον κύκλο του κιτρικού οξέος, σε CO₂. Έτσι, ο κιτρικός κύκλος είναι ο κοινός τελικός δρόμος για την αποικοδόμηση όλων των θρεπτικών ουσιών.

Τα τελικά προϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού είναι, όπως ξέρουμε, CO₂ και H₂O. Πρόκειται για τα ίδια προϊόντα που παράγονται και κατά τη χημική καύση. Το H₂O παράγεται στην αναπνευστική αλυσίδα από φορτωμένα με υδρογόνο συνένζυμα NADH και FADH₂, τα οποία επανοξειδώνονται παρέχοντας μέρος της ενέργειας που περιέχουν για τη σύνθεση του ATP.

Η σημασία του κύκλου του κιτρικού οξέος δεν εξαντλείται με την παραγωγή CO₂ και τη δημιουργία ανηγμένων συνενζύμων, τα οποία τροφοδοτούν την αναπνευστική αλυσίδα για την παραγωγή ενέργειας. Οι μεταβολίτες του κιτρικού κύκλου αποτελούν συγχρόνως μία μεγάλη δεξαμενή ενδιάμεσων προϊόντων, καθώς προμηθεύουν ενδιάμεσες ενώσεις για τις βιοσυνθέσεις. Πολλά από τα αμινοξέα παράγονται από το α-κετογλουταρικό και το οξαλοξικό, τα οποία είναι επίσης ενδιάμεσα παράγωγα του κύκλου του κιτρικού οξέος. Ακόμη, τα περισσότερα άτομα άνθρακα στις πορφυρίνες προέρχονται από το ηλεκτρυλο-CoA, καθώς και πρόδρομες ουσίες που απαιτούνται για τη σύνθεση της αίμης αλλά και της

χλωροφύλλης. Από το κιτρικό παράγονται ουσίες που συμμετέχουν στη σύνθεση χοληστερόλης και λιπαρών οξέων. Το οξαλοξικό επίσης δίνει πρόδρομες ουσίες για την παραγωγή πουρινών και πυριμιδίνων. Τέλος, το α-κετογλουταρικό δίνει εκτός των άλλων και προϊόντα που παίρνουν μέρος στη δημιουργία πουρινών.



Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Αναφέρομαι αναλυτικά στην οξειδωτική φωσφορυλίωση με σκοπό να γίνει καλύτερα κατανοητή η αναφορά στον κύκλο του κιτρικού οξέος ως «αερόβια διαδικασία» και «στην έμμεση προσφορά του σε ενέργεια».

Η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης γίνεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων καθώς και στο χώρο μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης. Στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων βρίσκονται μεταφορείς ηλεκτρονίων που μεταβιβάζουν ηλεκτρόνια από τα NADH και τα FADH₂ στο οξυγόνο.

Οι μεταφορείς αποτελούνται από 3 βασικά ενζυμικά σύμπλοκα που βρίσκονται εμφυτευμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

- Το πρώτο σύμπλοκο ονομάζεται NADH-αφυδρογονάση που περιέχει την προσθετική ομάδα FMN. Τα ηλεκτρόνια μεταβιβάζονται πρώτα στην FMN και μετά σε μια χημική ένωση που ονομάζεται ουμπικινόνη που είναι ένας κινητός μεταφορέας που τα μεταφέρει σε ένα δεύτερο σύμπλοκο το οποίο περιέχει το κυτταρόχρωμα b.
- Έπειτα, τα ηλεκτρόνια παραλαμβάνονται από το κυτταρόχρωμα c, που είναι ένας δευτερός κινητός μεταφορέας, και τελικά μεταφέρονται στο ενζυμικό σύμπλοκο III της κυτταροχρωμικής οξειδάσης που μεταξύ άλλων περιέχει το κυτταρόχρωμα a.
- Αυτή η σειρά από μεταφορείς ηλεκτρονίων και ενζυμικά σύμπλοκα ονομάζεται αναπνευστική αλυσίδα και επαναλαμβάνεται πολλές φορές κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης.
- Το NADH που βρίσκεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου οξειδώνεται και χάνει το υδρογόνο του. Δύο ηλεκτρόνια (ένα από το υδρογόνο και το άλλο από το NAD) δεσμεύονται και μεταφέρονται από τους μεταφορείς στην κυτταροχρωμική οξειδάση. Κατά τη μεταφορά χάνουν ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται από τα σύμπλοκα. Τα πρωτόνια, λόγω της μεγάλης συγκέντρωσής τους στο μεσομεμβρανικό χώρο σε σχέση με το εσωτερικό του μιτοχονδρίου, επιστρέφουν παθητικά στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου μέσω του καναλιού της ATP-συνθετάσης που είναι μια άλλη πρωτεΐνη-ένζυμο της εσωτερικής μεμβράνης.

Καθώς τα πρωτόνια διέρχονται από το κανάλι, σχηματίζεται ATP, δηλαδή, διερχόμενα τα πρωτόνια από περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης, δίνουν την απαιτούμενη ενέργεια που χρειάζεται ένα μόριο ADP για να ενωθεί με φωσφορική ομάδα προς σχηματισμό ATP (οξειδωτική φωσφορυλίωση με χημειοσμωτικό μηχανισμό).

Το FADH₂ μεταφέρει λιγότερη ενέργεια και έτσι μπαίνει αργότερα στην αναπνευστική αλυσίδα. Πρέπει να τονιστεί ότι τα ηλεκτρόνια που δίνονται από κάθε NADH του μιτοχονδρίου ενεργοποιούν τρεις αντλίες πρωτονίων, ενώ τα ηλεκτρόνια που δίνονται από κάθε FADH₂ ενεργοποιούν μόνο δύο αντλίες πρωτονίων. Έτσι από την οξειδωτική

φωσφορυλίωση ενός NADH παράγονται 3ATP, ενώ από την οξειδωτική φωσφορυλίωση ενός FADH₂ παράγονται 2ATP.

Συνοπτικά

- Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι το τρίτο και τελευταίο στάδιο του μεταβολισμού. Οι υδατάνθρακες, τα λίπη και οι πρωτεΐνες μετά τη διάσπασή τους μπορούν να εισέλθουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος μέσω κάποιου ενδιάμεσου μεταβολίτη. Αυτό το γεγονός, μας βοηθά να κατανοήσουμε, πως και οι τρεις βασικές κατηγορίες οργανικών ενώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας για τη σύνθεση ATP.
- Ο Hans Adolf Krebs κατέληξε σε μια πειστική εικόνα των περίπλοκων μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στην οξείδωση των τροφών χωρίς τη βοήθεια αντιδραστηρίων τα οποία για τους σύγχρονους βιοχημικούς θεωρούνται απαραίτητα, όπως η φασματομετρία μαζών που επιτρέπει την ταχεία αναγνώριση των διάφορων χημικών ενδιάμεσων μίας βιοχημικής οδού ή οι ραδιενεργοί δείκτες οι οποίοι επιτρέπουν την παρακολούθηση της πορείας ιχνηθετημένων ενώσεων κατά μήκος των μεταβολικών οδών.
- Επίσης ο Hans Adolf Krebs συνειδητοποίησε ότι οι σχετικές αντιδράσεις εξελίσσονται κυκλικά και όχι γραμμικά, μέσω μίας πολύ βραδείας εξελικτικής διεργασίας που κράτησε πέντε χρόνια. Συνδύασε τη διαίσθηση και τη λογική με τον προσεκτικό πειραματισμό και κατόρθωσε να ανακαλύψει μία από τις κεντρικές οδούς του ενεργειακού μεταβολισμού στα κύτταρα.
- Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για τον επανασχηματισμό των μη υδρογονωμένων μορφών των συνενζύμων (FAD και NAD⁺). Άρα, ο κύκλος του κιτρικού οξέος μπορεί να λειτουργήσει μόνο κάτω από αερόβιες συνθήκες. Συνεπώς σε αναερόβιες συνθήκες δεν υπάρχει βιοχημική οδός στα μιτοχόνδρια που να μπορεί να αναγεννήσει τα συνένζυμα.
- Ο κύκλος του κιτρικού οξέος βασίζεται στην διαθεσιμότητα του οξυγόνου και στη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας.
- Ο κύκλος του κιτρικού οξέος έχει ως κύρια λειτουργία τη συγκομιδή ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας από τις πηγές των οργανικών καύσιμων μορίων και την τροφοδότηση της οδού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης με αυτά, όμως ορισμένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα του μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση οργανικών μορίων.
- Εκτός από τη γλυκόζη υπάρχουν και άλλες ουσίες που μπορούν να προμηθεύσουν τους οργανισμούς με ενέργεια, όταν διασπαστούν, και να χρησιμοποιηθούν ως αναπνευστικά υποστρώματα. Οι ουσίες αυτές (π.χ. λιπαρές ουσίες, άλλοι υδατάνθρακες, αμινοξέα κ.ά) για να χρησιμοποιηθούν από τον οργανισμό μετατρέπονται πρώτα σε κάποιο από τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης ή της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος ή του κύκλου του κιτρικού οξέος.
- Από τη διάσπαση ενός μορίου γλυκόζης (μόριο με 6C) παράγονται 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος (μόρια με 3C) και από κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος ένα μόριο ακετυλο-CoA (με 2C στην ακετυλική ρίζα). Συνεπώς, για κάθε μόριο γλυκόζης χρειάζονται 2 κύκλοι του κιτρικού οξέος, άρα το κέρδος είναι διπλάσιο. Τελικά τα ηλεκτρόνια τα οποία μεταφέρονται από τα NADH και FADH₂ θα απελευθερωθούν για να λάβουν μέρος στην τελική οξείδωση.
- Ο κύκλος του κιτρικού οξέος σε συνδυασμό με την οξειδωτική φωσφορυλίωση προμηθεύουν τη μεγάλη πλειονότητα της ενέργειας που χρησιμοποιείται από τα αερόβια κύτταρα. (Στον άνθρωπο η ενέργεια αυτή είναι μεγαλύτερη από 95%).

Το παραπάνω κείμενο βασίστηκε σε εργασία της Σοφία Κοκκαλιάρη Τμήμα Φαρμακευτικής, ελέγχθηκε και βελτιώθηκε από τον Καθηγητή Δρ. Κ. Ε. Βοργιά

Αθήνα 2010