



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Κύκλος του κιτρικού οξέος

Παναγιώτης Αδαμόπουλος

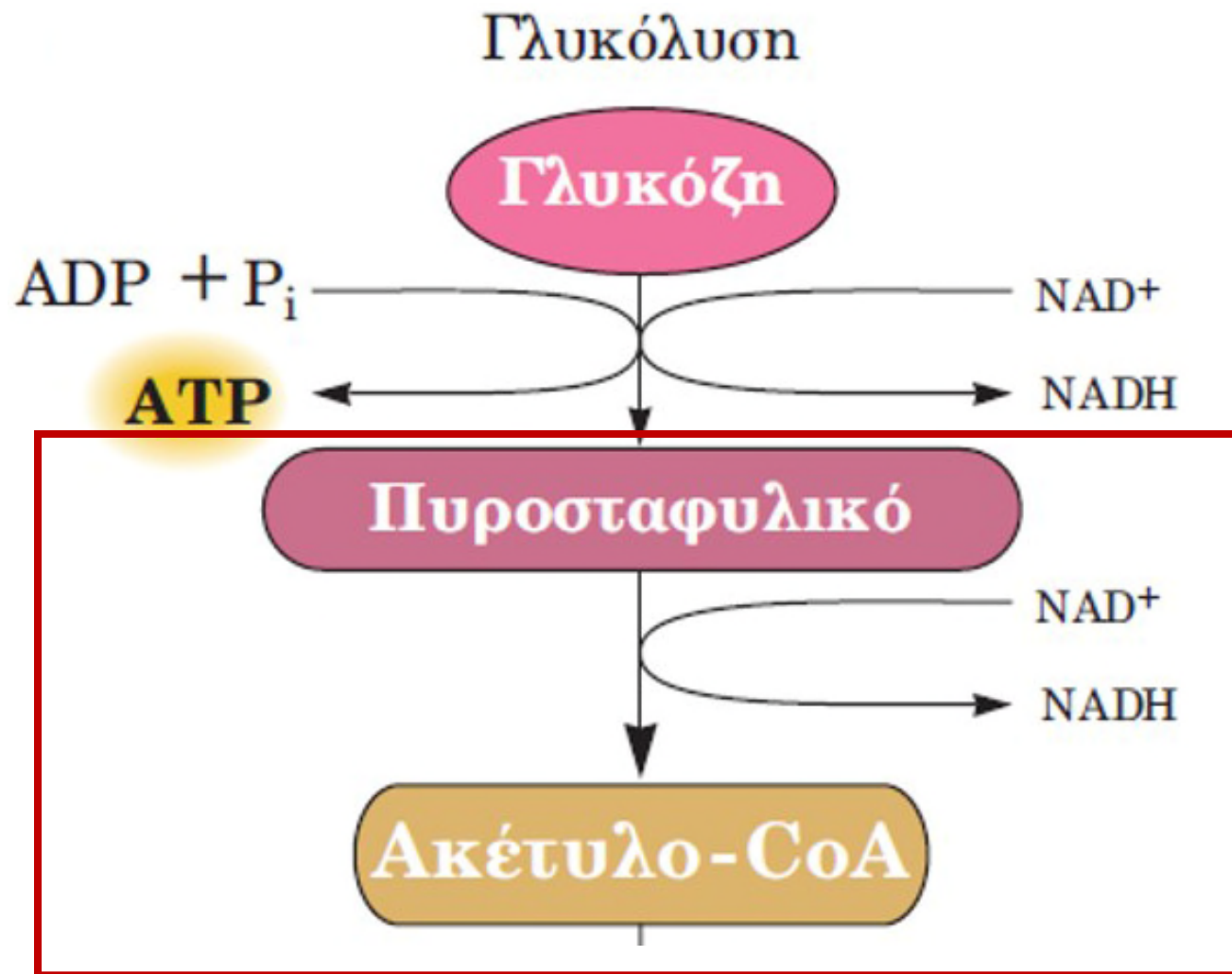
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος

- Η γλυκολυτική οδός μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό και παράγει **δύο μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης** — ένα μικρό μόνο μέρος της ενέργειας που μπορεί να είναι διαθέσιμη από τη γλυκόζη.
- Σε αναερόβιες συνθήκες, το **πυροσταφυλικό ανάγεται σε γαλακτικό στα ζώα** και **σε αιθανόλη στη μαγιά**, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας του μορίου της γλυκόζης παραμένει αναξιοποίητο.
- Παρουσία οξυγόνου όμως, μια πολύ πιο ενδιαφέρουσα και θερμοδυναμικά πλήρης ιστορία εκτυλίσσεται.
- Πώς το πυροσταφυλικό οξειδώνεται αερόβια σε CO_2 και ποια χημική λογική υπαγορεύει το πώς συμβαίνει αυτή διαδικασία;

Σε αερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό που παράγεται στη γλυκόλυση μετατρέπεται σε **ακέτυλο-CoA** και **οξειδώνεται σε CO_2** στον **κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (tricarboxylic acid cycle, TCA)** που ονομάζεται και **κύκλος του κιτρικού οξέος (citric acid cycle)**.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος



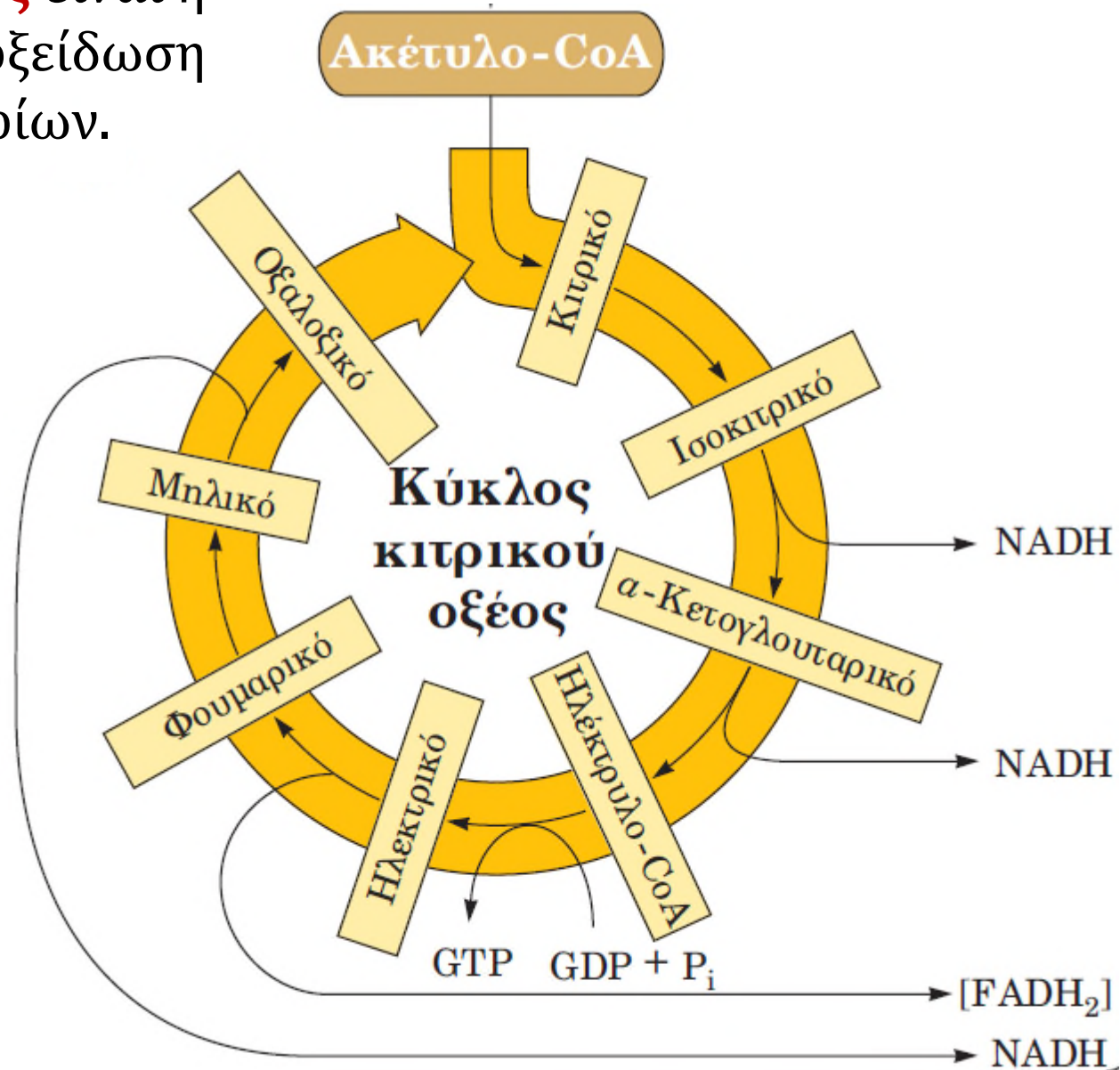
Το πυροσταφυλικό που παράγεται στη γλυκόλυση, κάτω από αερόβιες συνθήκες, μετασχηματίζεται σε ακέτυλο-CoA

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος

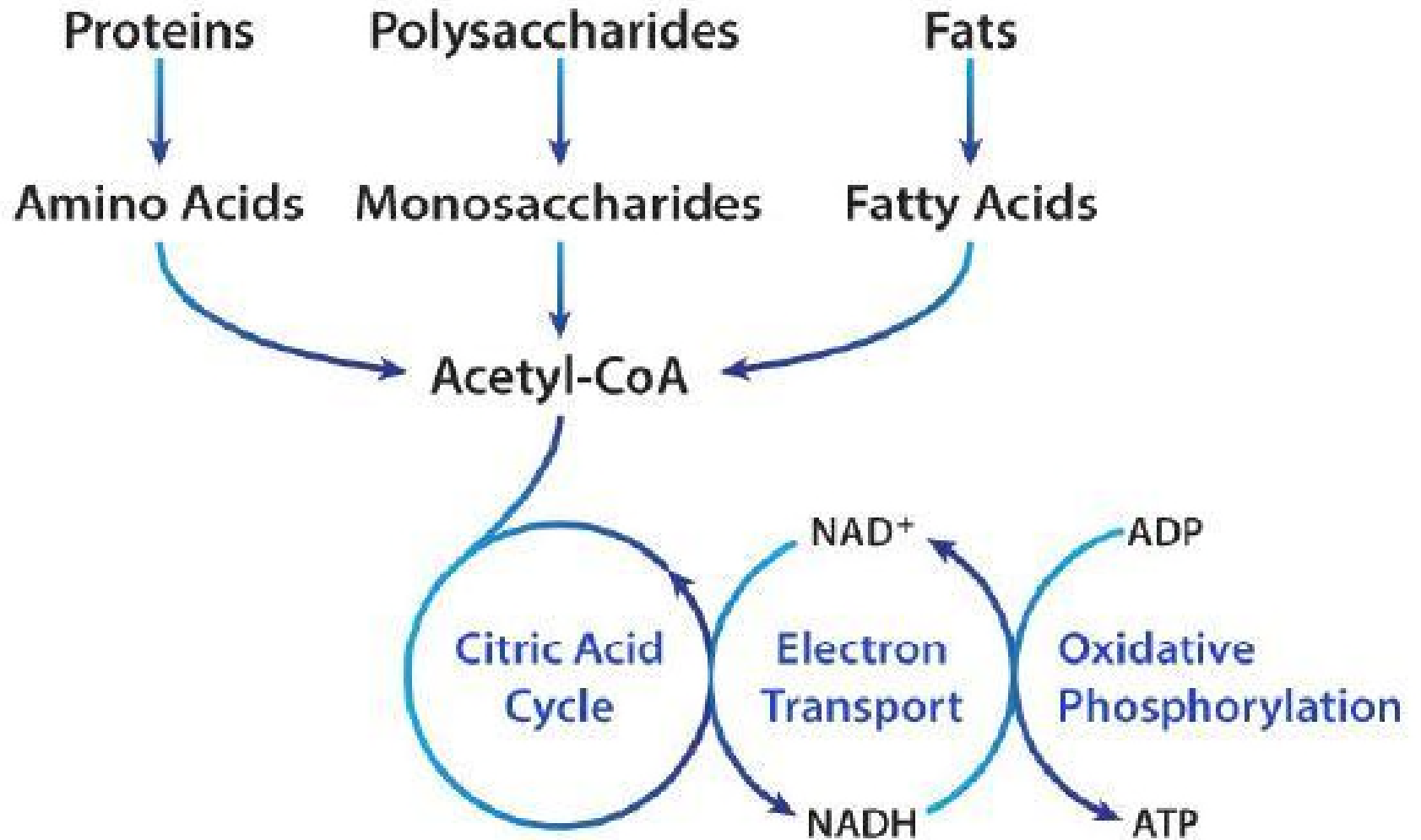
Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι η τελική κοινή πορεία για την οξείδωση των καύσιμων οργανικών μορίων.



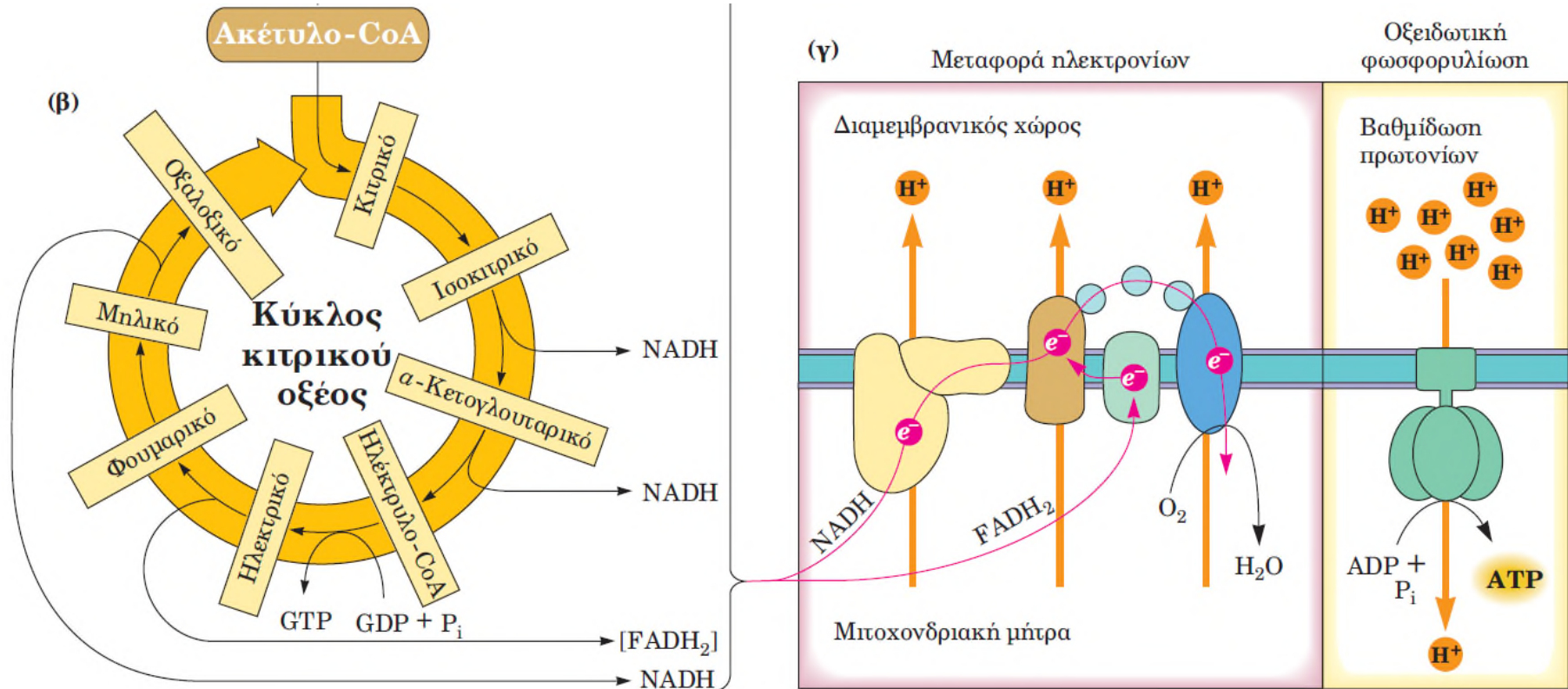
Hans Krebs, 1900–1981



Ο κύκλος του κιτρικού οξέος



Ο κύκλος του κιτρικού οξέος



Τα **ηλεκτρόνια** που απελευθερώνονται από αυτήν την οξειδωτική διαδικασία διοχετεύονται στα **NAD⁺** και **FAD** και μετά, μέσω ενός περίτεχνου μεμβρανοσυνδεδεμένου **μονοπατιού μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron-transport pathway)**, στο **O₂ που αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων**.

Η μεταφορά ηλεκτρονίων είναι συζευγμένη με τη δημιουργία μιας βαθμίδωσης πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Η βαθμίδωση αυτή αντιπροσωπεύει μια κατάσταση υψηλής ενέργειας και η αποθηκευμένη σε αυτήν τη βαθμίδωση ενέργεια χρησιμοποιείται για την προώθηση της σύνθεσης πολλών ισοδυνάμων του ATP.

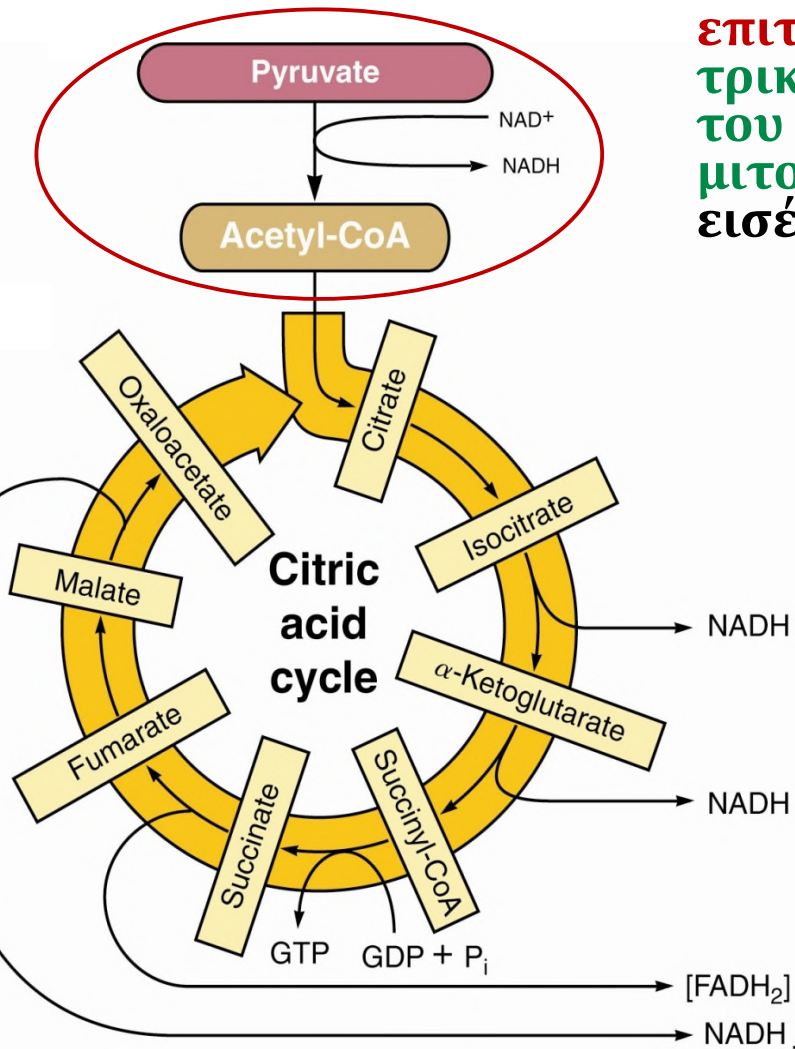
Η σύνθεση ATP, ως συνέπεια της μεταφοράς ηλεκτρονίων, ονομάζεται **οξειδωτική φωσφορυλίωση**

Σημαντικά ερωτήματα

- Πώς το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά προς ακέτυλο-CoA;
- Ποια είναι η **χημική λογική του κύκλου** του τρικαρβοξυλικού οξέος;
- Πώς παράγονται **δυο μόρια CO₂ από το ακέτυλο-CoA**;
- **Πώς αναγεννάται το οξαλοξικό** προκειμένου να ολοκληρωθεί ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος;
- Ποιες είναι οι **ενεργειακές συνέπειες του κύκλου**;
- Μπορεί ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος να παράγει ενδιάμεσες ενώσεις για βιοσυνθέσεις;
- Τι είναι οι **αναπληρωτικές αντιδράσεις**;
- **Πώς ρυθμίζεται ο κύκλος** του τρικαρβοξυλικού οξέος;
- Υπάρχουν οργανισμοί που χρησιμοποιούν το οξικό ως μοναδική πηγή άνθρακα;

Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-CoA αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος.

Επειδή στα ευκαρυωτικά κύτταρα, **η γλυκόλυση επιτελείται στο κυτταρόπλασμα**, ενώ **ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος και όλα τα επόμενα βήματα του αερόβιου μεταβολισμού λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια**, το πυροσταφυλικό πρέπει πρώτα να εισέλθει στα μιτοχόνδρια.





Η σύνθεση του ακετυλο-CoA από τη γλυκόζη είναι ένα **μη αντιστρεπτό καθοριστικό βήμα** στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

Για το λόγο αυτό **οι ζωικοί οργανισμοί δεν** είναι ικανοί να μετατρέψουν το ακετυλο-CoA ξανά σε γλυκόζη.

Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οδηγεί υποχρεωτικά τα άτομα άνθρακα της γλυκόζης σε δύο κατευθύνσεις:

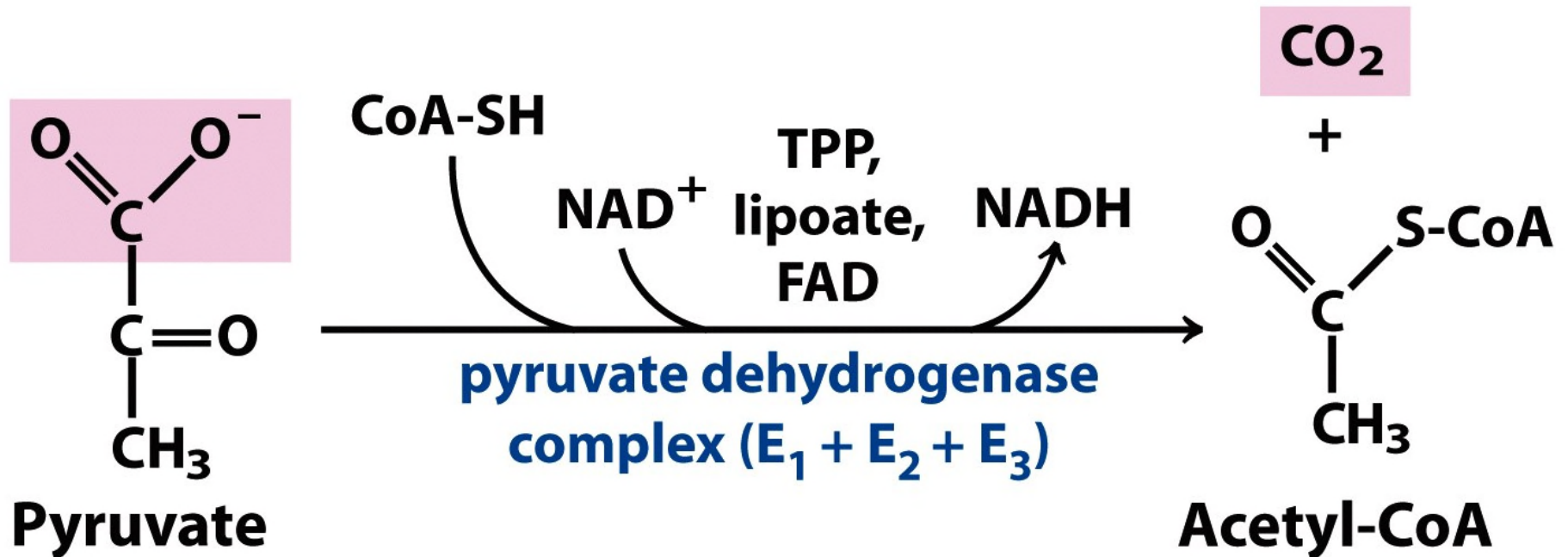
1. Οξείδωση σε CO₂ από τον κύκλο του κιτρικού οξέος, με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας

ή

2. Σύνθεση λιπών

Μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA

Κάτω από **αερόβιες συνθήκες**, το πυροσταφυλικό μεταφέρεται από τον φορέα του πυροσταφυλικού (έναν αντιμεταφορέα) μέσα στα μιτοχόνδρια σε ανταλλαγή με OH^- και μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA, μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που καταλύονται από το πολυενζυμικό σύμπλεγμα της **πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC)**. Η τελική αντίδραση της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης είναι:



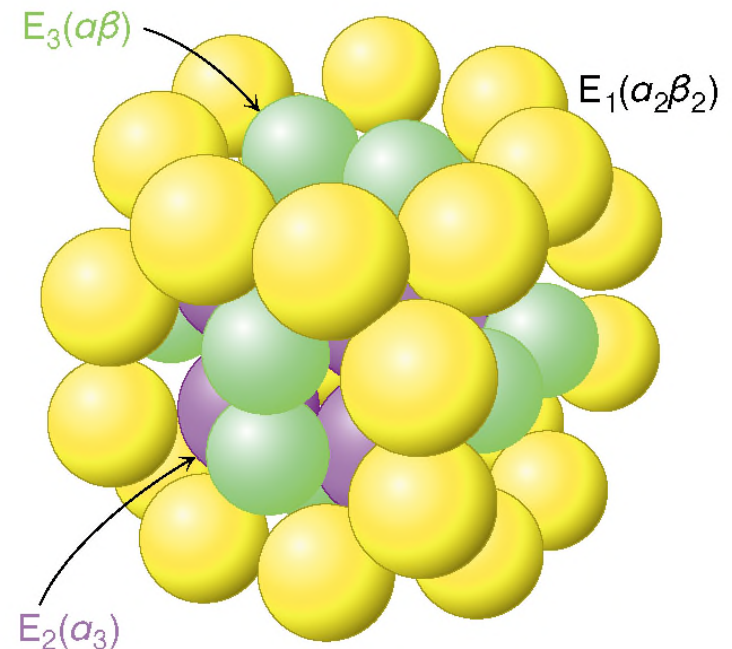
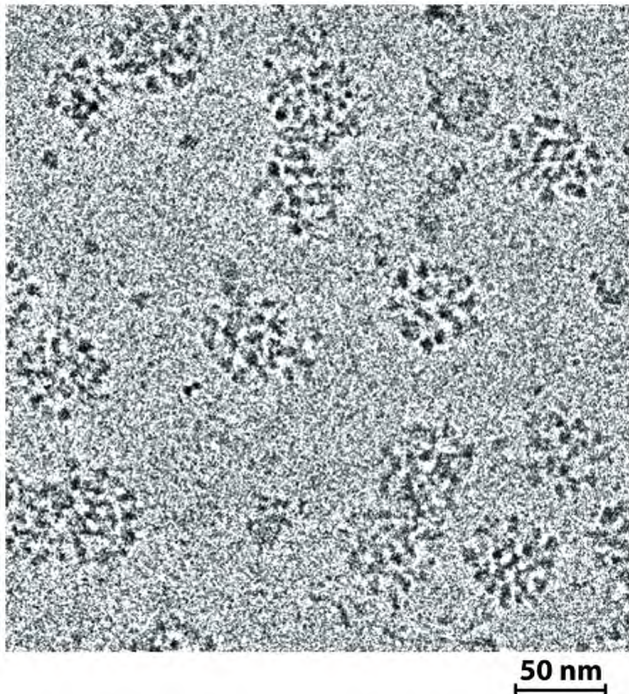
Πυροσταφυλική αφυδρογονάση

Η μη αντιστρεπτή αντίδραση μετατροπής του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA καταλύεται από ένα μεγάλο πολυενζυμικό σύμπλεγμα που περιέχει τρεις διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες:

1. Αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (E1)
2. Ακετυλοτρανσφεράση του διυδρολιποαμιδίου (E2)
3. Αφυδρογονάση του διυδρολιποαμιδίου (E3)

9,5 MDa

Κάθε μια ενεργότητα βρίσκεται μέσα στο σύμπλοκο σε συγκεκριμένη στοιχειομετρική αναλογία και απαιτεί για τη δράση της συγκεκριμένα συνένζυμα.



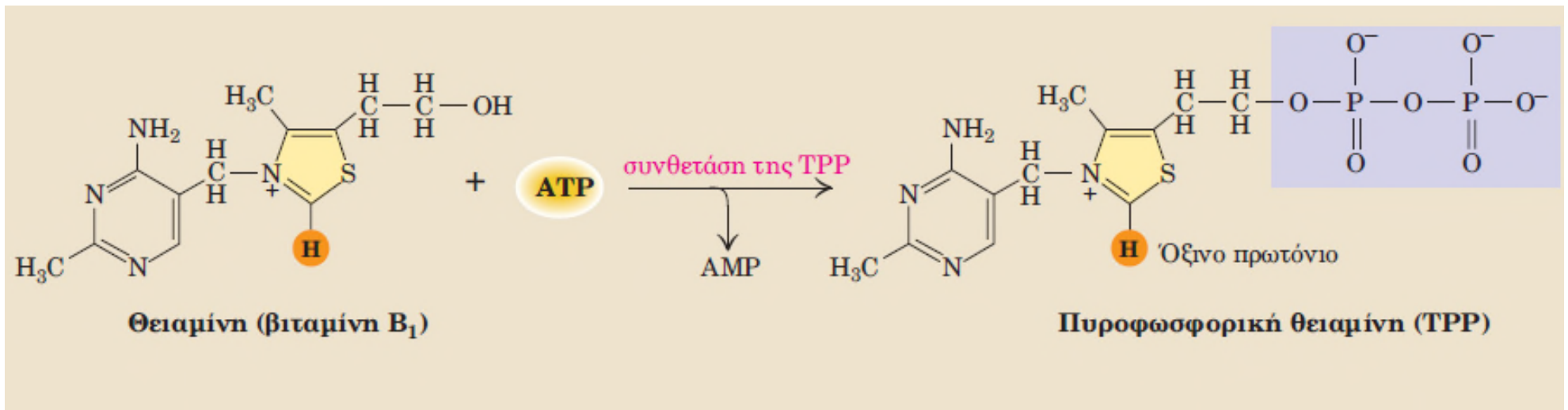
Πολυενζυμικό σύμπλεγμα πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης στο *E. coli*

Ενζυμική ενεργότητα	Λειτουργία	Αριθμός αντιγράφων ανά σύμπλοκο	Συνένζυμα
Πυροσταφυλική αφυδρογονάση (E1)	Αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού	24 (20 – 30)	TPP
Ακετυλοτρανσφεράση του διϋδρολιποαμιδίου (E2)	Καταλύει τη μεταφορά της ακετυλομάδας στο CoASH	24 (60)	Λιποϊκό οξύ, CoASH
Αφυδρογονάση του διϋδρολιποαμιδίου (E3)	Επανοξειδώνει το διϋδρολιποναμίδιο	12 (20 – 30)	NAD ⁺ , FAD

Συνολικά, χρησιμοποιούνται **πέντε συνένζυμα** στις αντιδράσεις της **αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού**.

Τα συνένζυμα του συμπλέγματος της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού

Πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP)

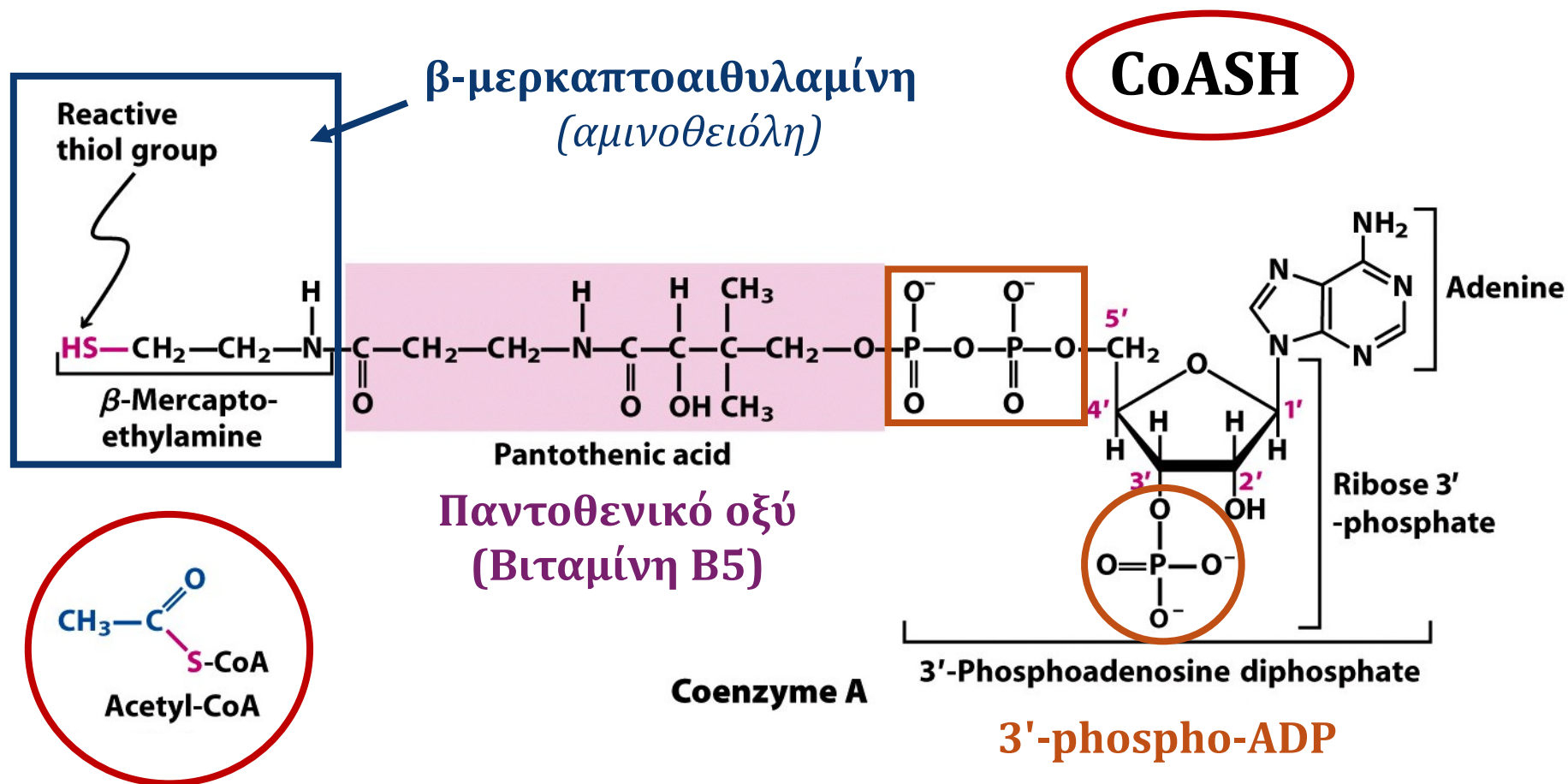


Η TPP συμμετέχει:

- στην αποκαρβοξυλίωση των α-κετοξέων (εδώ)
- στον σχηματισμό και τη διάσπαση των α-υδροξυκετονών (όπως στην αντίδραση της τρανσκετολάσης)

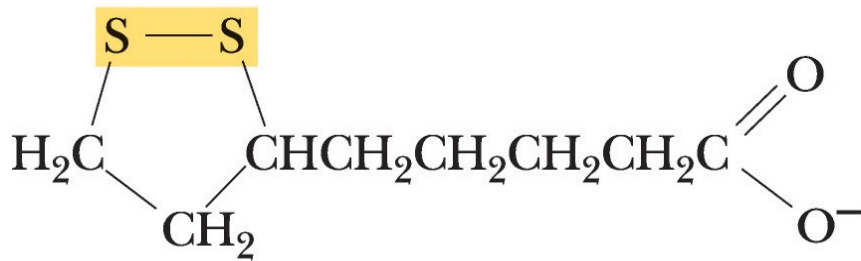
Ακέτυλο-coA

Η σουλφυδρυλική ομάδα του CoA σχηματίζει θειεστερικούς δεσμούς με τις ακυλομάδες.

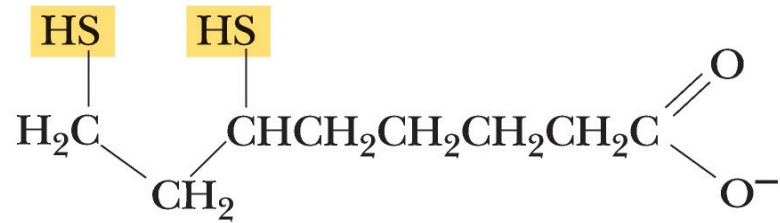


Λιποϊκό οξύ

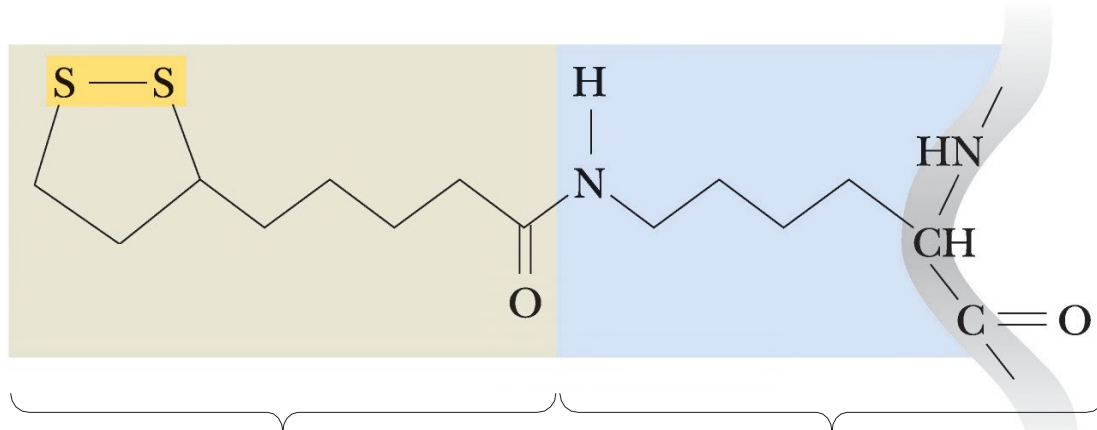
Δρα προκειμένου να επιτευχθεί η **σύζευξη της μεταφοράς ακυλομάδας με τη μεταφορά ηλεκτρονίων** κατά την οξείδωση και αποκαρβοξυλίωση των α-κετοξέων. Απαντάται στα συμπλέγματα της **αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού** και της **αφυδρογονάσης του α-κετογλουταρικού**.



Λιποϊκό οξύ, οξειδωμένη μορφή



Ανηγμένη μορφή



Λιποϊκό οξύ

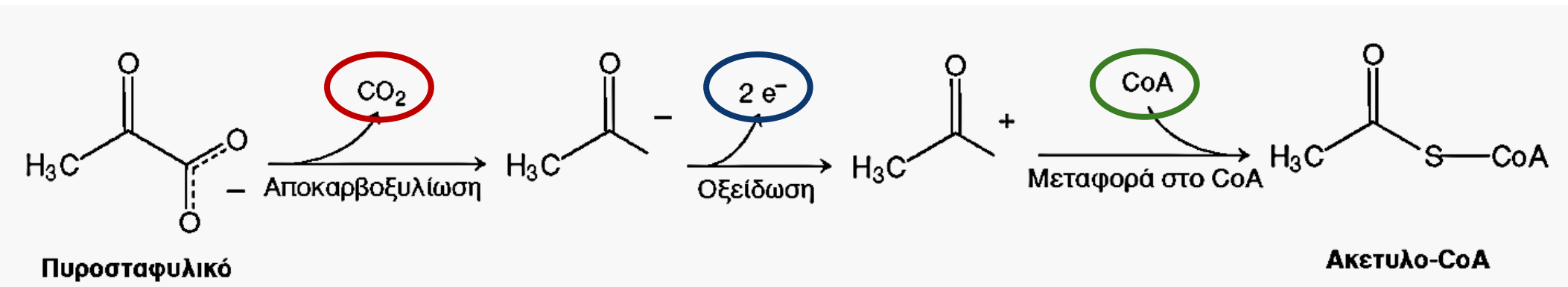
Λυσίνη του E2

Λιποϋλολυσίνη (Λιποαμίδιο)

Το λιποϊκό οξύ **συνδέεται ομοιοπολικά με τις υπομονάδες E2** των αντίστοιχων ενζύμων μέσω του σχηματισμού **αμιδικού δεσμού** με την ε-αμινομάδα ενός καταλοίπου **λυσίνης**.

Μετατροπή πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-coA

Η διεργασία μετατροπής του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA απαρτίζεται από **τρία βήματα**:



1. Αποκαρβοξυλίωση
2. Οξείδωση
3. Μεταφορά της προκύπτουσας ακετυλικής ομάδας στο CoA

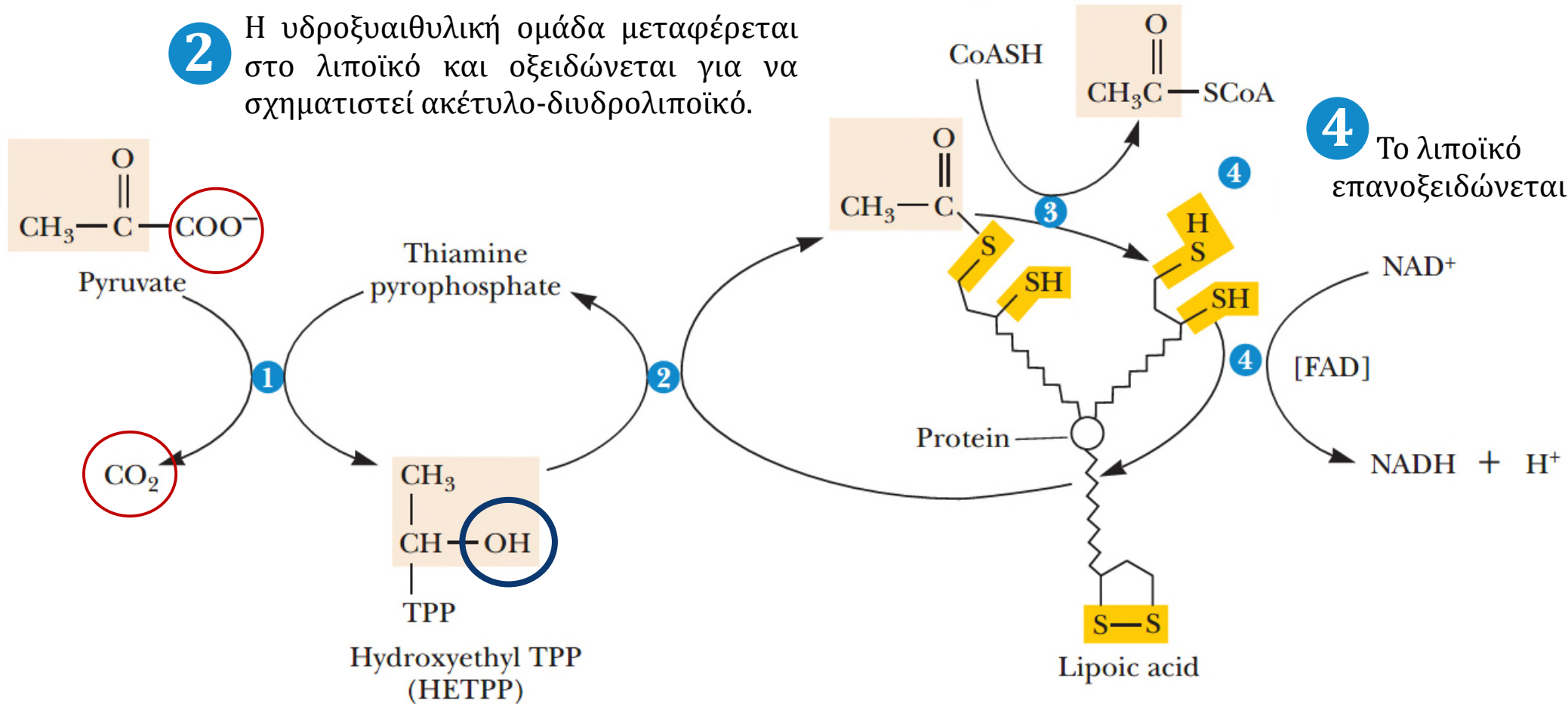
Ο μηχανισμός της αντίδρασης του συμπλέγματος της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού

1 Το πυροσταφυλικό χάνει CO_2 και σχηματίζεται **υδροξυαιθύλο-TPP**.

2 Η υδροξυαιθυλική ομάδα μεταφέρεται στο λιποϊκό και οξειδώνεται για να σχηματιστεί **ακέτυλο-διυδρολιποϊκό**.

3 Η ακετυλομάδα μεταφέρεται στο CoA

4 Το λιποϊκό επανοξειδώνεται



Αφυδρογονάση του
πυροσταφυλικού

Ακετυλοτρανσφεράση του
διυδρολιποαμιδίου

Αφυδρογονάση του
διυδρολιποαμιδίου

Ρύθμιση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης

- Ο σχηματισμός του ακέτυλο-CoA από το πυροσταφυλικό αποτελεί σημείο «κλειδί» στα στάδια του διάμεσου μεταβολισμού.
- Για το λόγο αυτό, η ενεργότητα της **πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης** βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο, ο οποίος επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους:

1. Αναστολή από τα προϊόντα της αντίδρασης

Τόσο το **ακέτυλο-CoA**, όσο και το **NADH** αναστέλλουν το πολυενζυμικό σύμπλεγμα.

- ✓ Το **ακέτυλο-CoA** αναστέλλει την **τρανσακετυλάση (E₂)**
- ✓ Το **NADH** αναστέλλει την **αφυδρογονάση του διϋδρολιπονοαμιδίου (E₃)**

2. Ανάδρομη ρύθμιση μέσω νουκλεοτιδίων

Η **αφυδρογονάση (E₁)** αναστέλλεται από το **GTP** και ενεργοποιείται από το **AMP**.

Τα **υψηλά επίπεδα AMP** είναι ένα **σημάδι χαμηλού ενεργειακού δυναμικού** του κυττάρου. Και συνεπώς η **ενεργοποίηση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης** κάτω από αυτές τις συνθήκες πυροδοτεί την παραγωγή ενέργειας από το πυροσταφυλικό.

Ρύθμιση μέσω ομοιοπολικών τροποποιήσεων

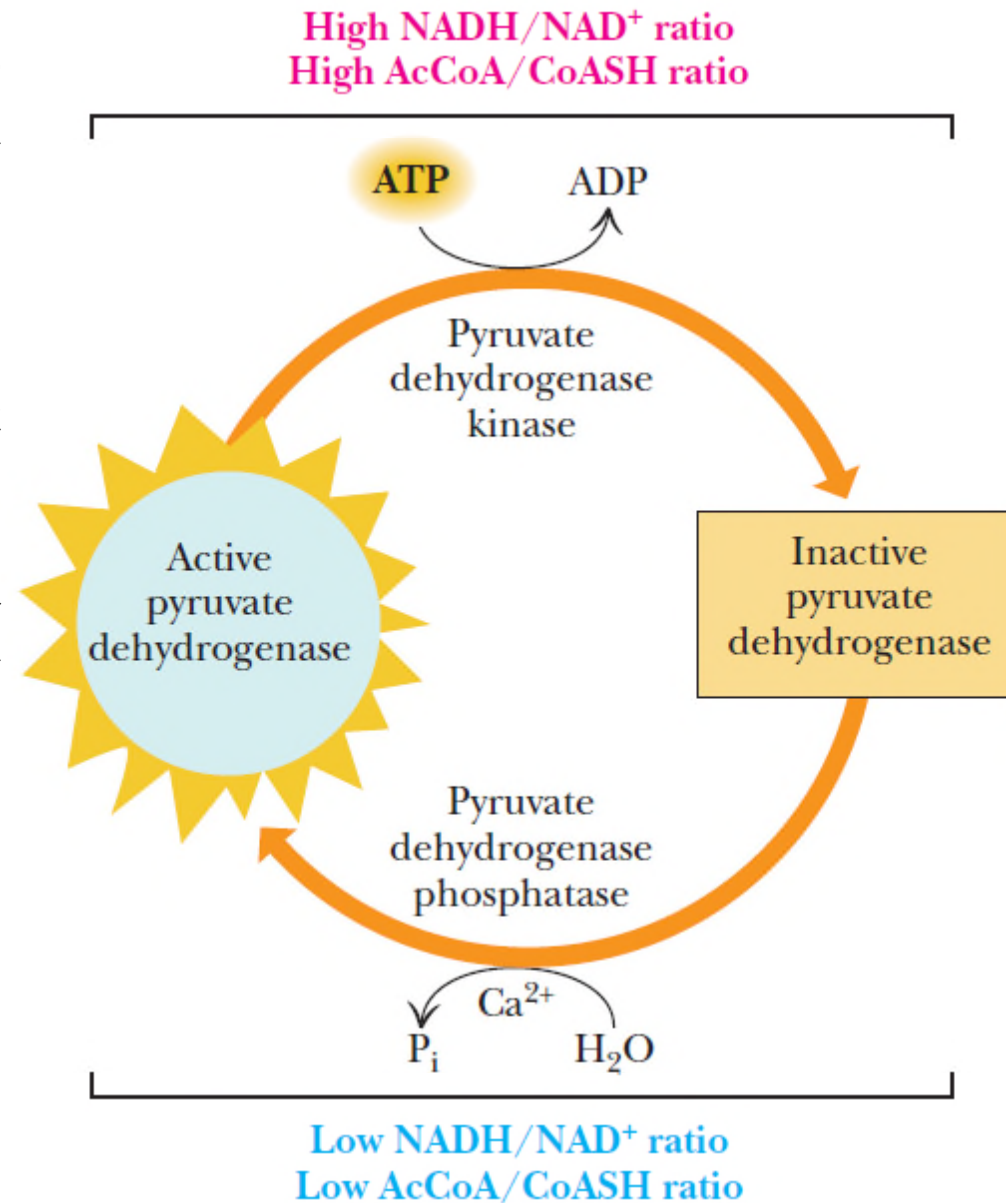
3. Ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης

➤ Η δράση του πολυενζυμικού συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης στα θηλαστικά αναστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης της υπομονάδας E_1 από το ένζυμο **κινάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού**.

➤ Η κινάση αυτή ενεργοποιείται αλλοστερικά από το **NADH** και το **ακετυλο-CoA**.

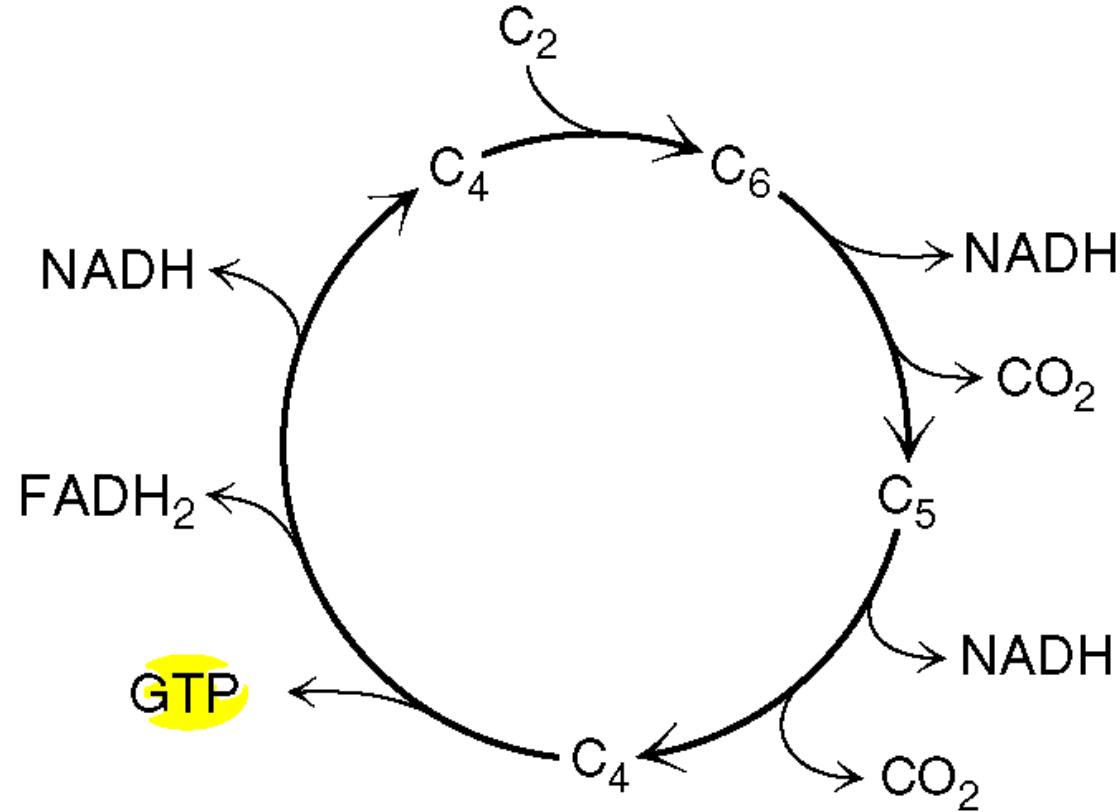
➤ Η επανενεργοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνεται με απομάκρυνση της φωσφορικής ομάδας από μια **ειδική φωσφατάση** εξαρτώμενη από Ca^{2+} , της οποίας η δράση εξασφαλίζεται όταν τα επίπεδα του **NADH** και του **ακετυλο-CoA** είναι χαμηλά.

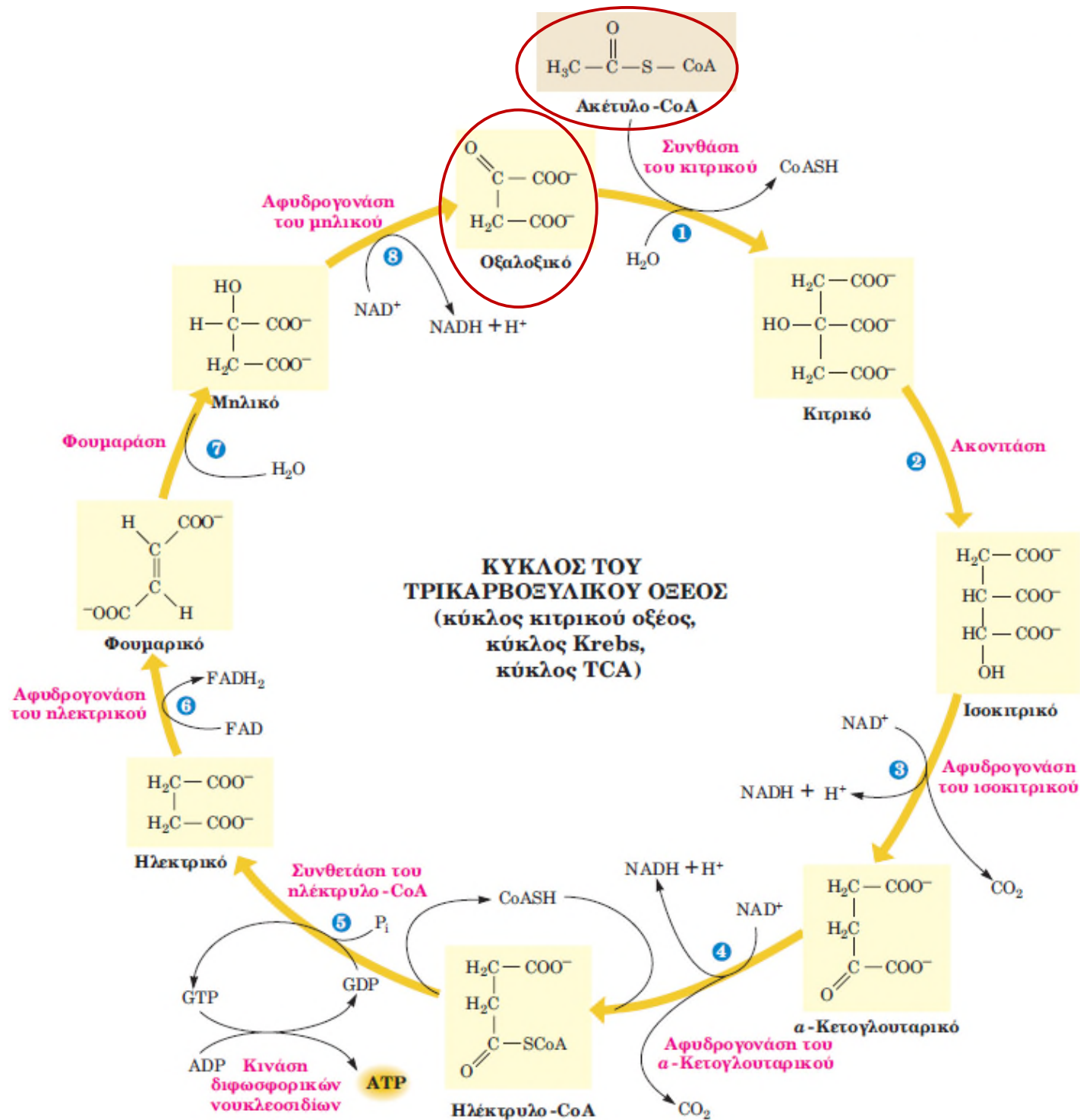
➤ Επιπλέον, η **ινσουλίνη** ενεργοποιεί την αποφωσφορυλίωση και το **πυροσταφυλικό** αναστέλλει την αντίδραση φωσφορυλίωσης.



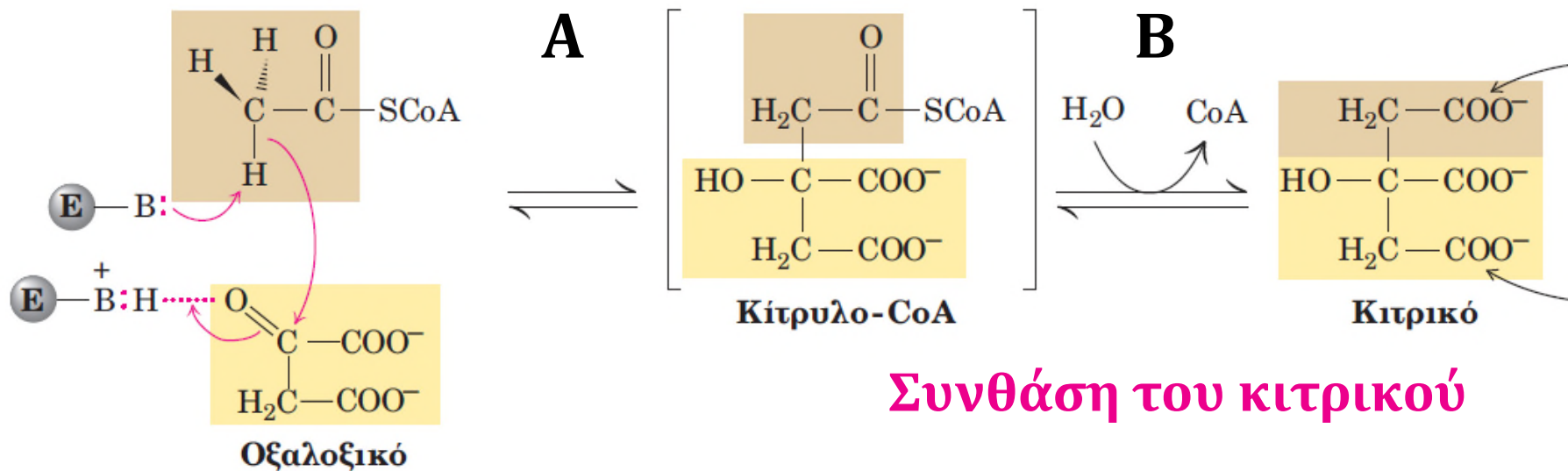
Ο κύκλος του κιτρικού οξέος

1. Οξειδώνει μονάδες δύο ατόμων άνθρακα, παράγοντας CO_2 , ένα μόριο **GTP** και **ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας** στη μορφή του **NADH** και του **FADH₂**.
2. Είναι κομβικό μεταβολικό σημείο του κυττάρου, αφού αποτελεί την **πύλη εισόδου** στον αερόβιο μεταβολισμό οποιουδήποτε μορίου μπορεί να μετασχηματιστεί σε ακετυλομάδες.
3. Παράλληλα αποτελεί **πηγή πρόδρομων δομικών μονάδων** που απαιτούνται για τη σύνθεση άλλων σημαντικών για το κύτταρο μορίων, όπως αμινοξέα, βάσεις νουκλεοτιδίων, χοληστερόλης, αίμης κ.α.





1^ο Βήμα: Συμπύκνωση του οξαλοξικού με το ακετυλο-CoA



Το ακέτυλο-CoA αντιδρά με το οξαλοξικό με μια **συμπύκνωση Perkin** (Perkin condensation).

Πραγματοποιείται **πυρηνόφιλη προσβολή** του καρβονυλικού άνθρακα του οξαλοξικού από το **καρβανιόν** του ακέτυλο-coA.

Τύπος αντίδρασης:

A. Αλδολική συμπύκνωση

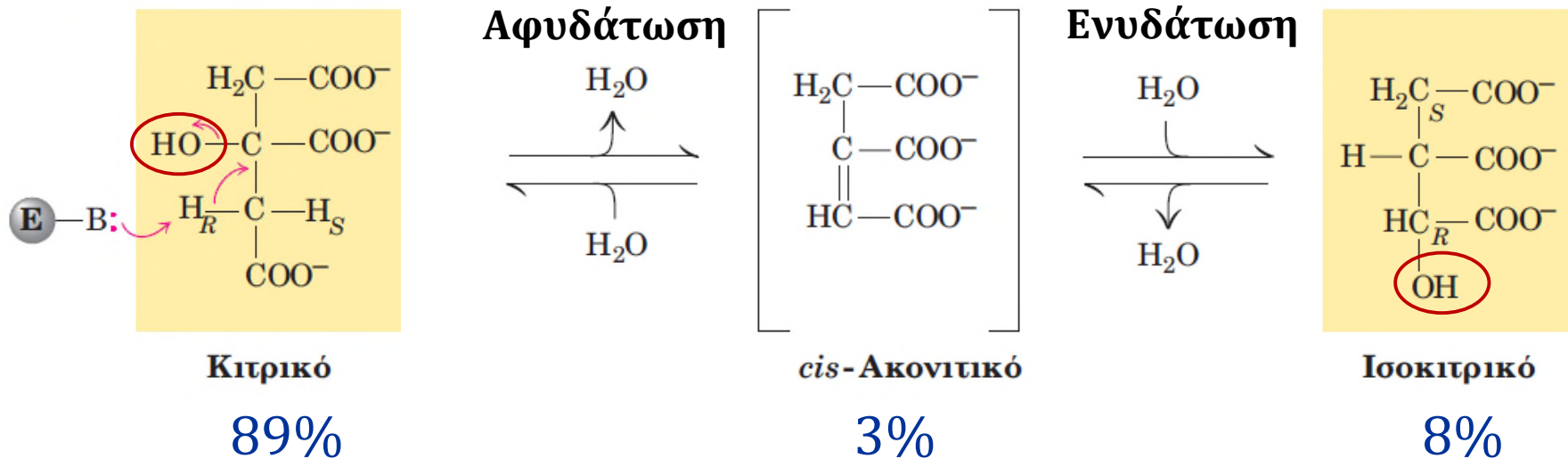
B. Υδρόλυση

Η υδρόλυση του **κιτρυλο-CoA**, ενός ενδιάμεσου **θειεστέρα υψηλής ενέργειας**, μετατοπίζει ουσιαστικά την όλη αντίδραση στην κατεύθυνση σύνθεσης του κιτρικού, χωρίς την άμεση συμμετοχή του ATP.

Η ολική ΔG° είναι **-31,4 kJ/mol** και κάτω από πρότυπες συνθήκες, η αντίδραση είναι ουσιαστικά μη αντιστρεπτή.

2^ο Βήμα: Το κιτρικό ισομεριώνεται σε ισοκιτρικό

Το κιτρικό θέτει από μόνο του ένα πρόβλημα: Δεν είναι εύκολο να οξειδωθεί γιατί διαθέτει ένα τριτοταγές αλκοολικό υδροξύλιο, το οποίο θα μπορούσε να οξειδωθεί μόνο μετά από διάσπαση δεσμού άνθρακα-άνθρακα.



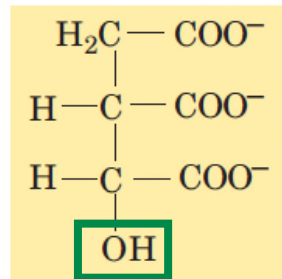
- Μια προφανής λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι να **ισομεριωθεί η τριτοταγής αλκοόλη σε δευτεροταγή** και αυτό ακριβώς συμβαίνει στο δεύτερο βήμα του κύκλου.
- Το **κιτρικό ισομεριώνεται σε ισοκιτρικό** από την **ακονιτάση** με μια διαδικασία δύο βημάτων που περιλαμβάνει το ακονιτικό ως ενδιάμεσο.
- Η **ακονιτάση**, είναι μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου που παρουσιάζει αυστηρή στερεοεξειδίκευση.
- Το καθαρό αποτέλεσμα είναι η μετατροπή μιας τριτοταγούς αλκοόλης (κιτρικό) σε δευτεροταγή (ισοκιτρικό).
- Η οξείδωση του ισοκιτρικού περιλαμβάνει τη **διάσπαση ενός δεσμού C-H**, αντίδραση απλούστερη από τη διάσπαση C-C που θα απαιτούσε η οξείδωση του κιτρικού.

3^ο Βήμα: Το ισοκιτρικό οξειδώνεται και αποκαρβοξυλιώνεται σε α-κετογλουταρικό

Τύπος αντίδρασης:

A. Οξείδωση

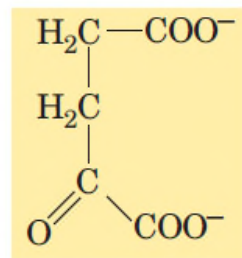
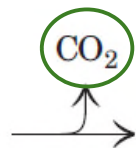
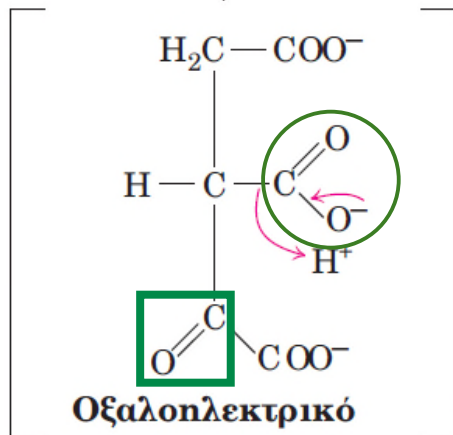
B. Αποκαρβοξυλίωση



NAD⁺

Αφυδρογονάση
του ισοκιτρικού

NADH
+ H⁺



α-Κετογλουταρικό

Το ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης είναι ένα ασταθές κετοξύ (οξαλοηλεκτρικό), το οποίο ενώ είναι προσδεδεμένο στο ένζυμο, χάνει ένα CO₂ για να σχηματιστεί το α-κετογλουταρικό.

Η αντίδραση έχει μια καθαρή $\Delta G^{\circ} = -8,4 \text{ kJ/mol}$ και είναι αρκετά εξεργονική, ώστε να ωθήσει την αντίδραση της ακονιτάσης προς τα μπρος.

Η **αφυδρογονάση του ισοκιτρικού** παρέχει την πρώτη σύνδεση του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος με την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω της **παραγωγής NADH**.

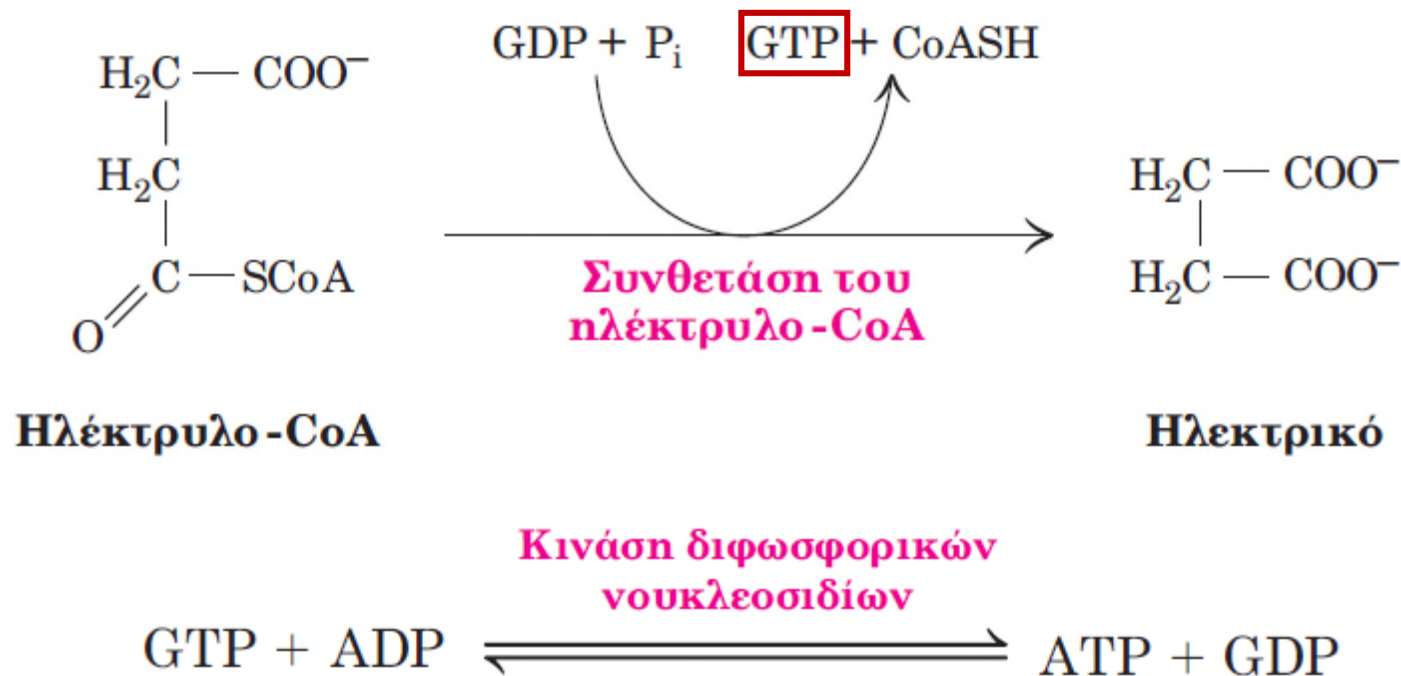
Το α-κετογλουταρικό είναι ένα σημαντικό α-κετοξύ για τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης και συνδέει τον κύκλο Krebs με τον μεταβολισμό του αζώτου.

4^ο Βήμα: Σχηματισμός ηλέκτρυλο-CoA από μια δεύτερη αντίδραση οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης



5^ο Βήμα: Πώς αναγεννάται το οξαλοξικό για να ολοκληρωθεί ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος;

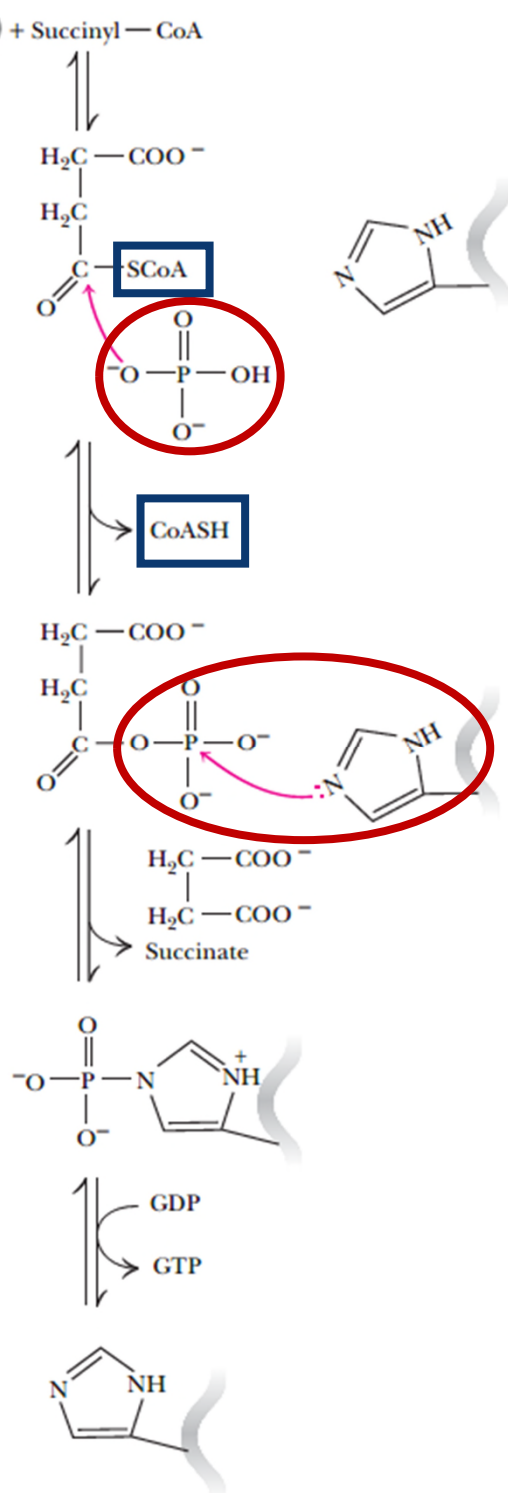
Η **συνθετάση του ηλεκτρυλο-CoA** καταλύει μια φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Η διάσπαση του θειεστερικού δεσμού υψηλής ενέργειας του ηλεκτρυλο-CoA είναι **συζευγμένη με τη φωσφορυλίωση του GDP**.



Εάν δεν υπάρχει αρκετό ADP αθροίζεται GTP και κατά συνέπεια ηλεκτρυλο-CoA, το οποίο αναστέλλει τον κύκλο του κιτρικού οξέος.

- **Συμπύκνωση**: Αντίδραση μεταξύ δύο ή περισσοτέρων μορίων που οδηγεί στο σχηματισμό ενός μεγαλύτερου μορίου, με εξάλειψη ενός απλούστερου μορίου, όπως το νερό.
- **Συνθάση**: Ένζυμο που καταλύει μια αντίδραση συμπύκνωσης, η οποία **δεν απαιτεί τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο ως πηγή ενέργειας**.
- **Συνθετάση**: Ένζυμο που καταλύει μια αντίδραση συμπύκνωσης, η οποία **απαιτεί ένα τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (συνά ATP) ως πηγή ενέργειας**.

Μηχανισμός αντίδρασης συνθετάσης του ηλεκτυλο-CoA



1. Ο μηχανισμός της **συνθετάσης του ηλεκτυλο-CoA** αρχικά περιλαμβάνει την **αντικατάσταση του CoA από φωσφορικό**, σχηματίζοντας ηλεκτυλοφωσφορικό στο ενεργό κέντρο της α-υπομονάδας του ενζύμου.
2. Στη συνέχεια, η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται σε μια **ιστιδίνη** του ενεργού κέντρου (σχηματίζοντας ένα **ενδιάμεσο φωσφοϊστιδίνης**) και **απελευθερώνεται το ηλεκτρικό**.
3. Τέλος, η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται στο **GDP** που είναι προσδεδμένο στη β-υπομονάδα του ενζύμου για να σχηματιστεί **GTP** και να αναγεννηθεί η α-υπομονάδα του ενζύμου.

6^ο Βήμα: Οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό

Περιλαμβάνει την απομάκρυνση ατόμων H από δεσμό C — C και την παραγωγή του trans-ακόρεστου φουμαρικού.

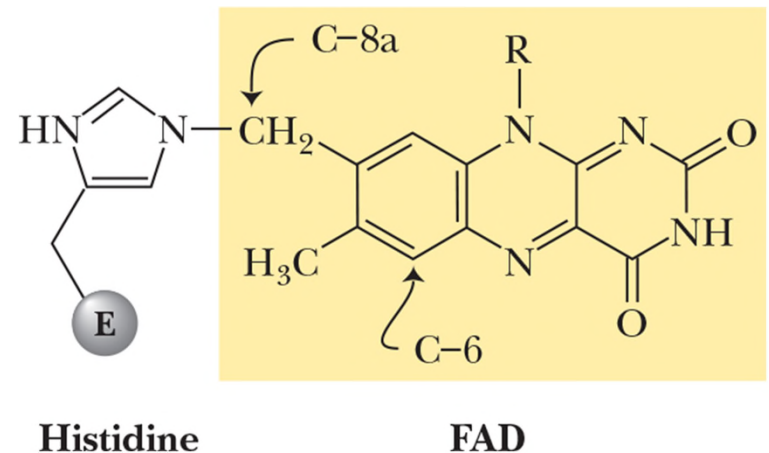


- Τα συνένζυμα φλαβίνης μπορούν να μεταφέρουν ένα ή δύο ηλεκτρόνια.
- Η συγκεκριμένη αντίδραση είναι μια καθαρή αναγωγή του FAD με δύο ηλεκτρόνια.

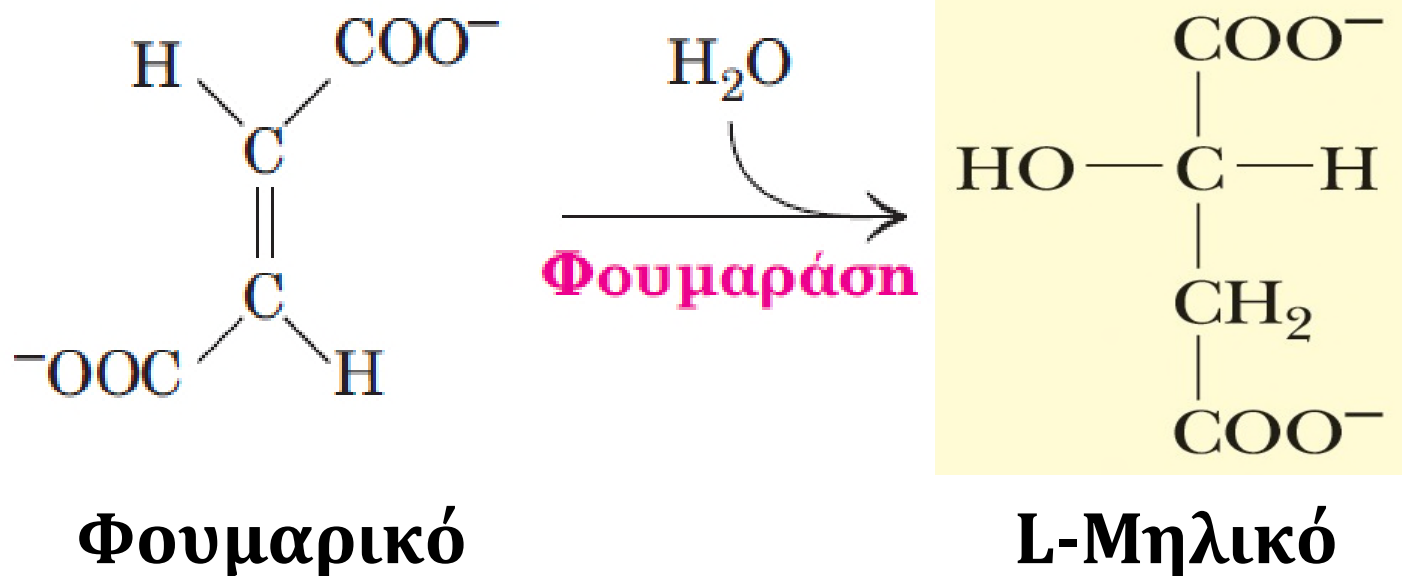
Αυτή η αντίδραση (η οξείδωση ενός αλκανίου σε αλκένιο) δεν είναι αρκετά εξεργονική ώστε να ανάγει το NAD^+ , απελευθερώνει όμως αρκετή ενέργεια ώστε να ανάγει το $[\text{FAD}]$.

Η **αφυδρογονάση του ηλεκτρικού** είναι μια διαμεμβρανική διμερής σιδηροπρωτεΐνη στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου (στην πραγματικότητα είναι μέρος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων).

Το FAD είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά στη μεγαλύτερη υπομονάδα της.



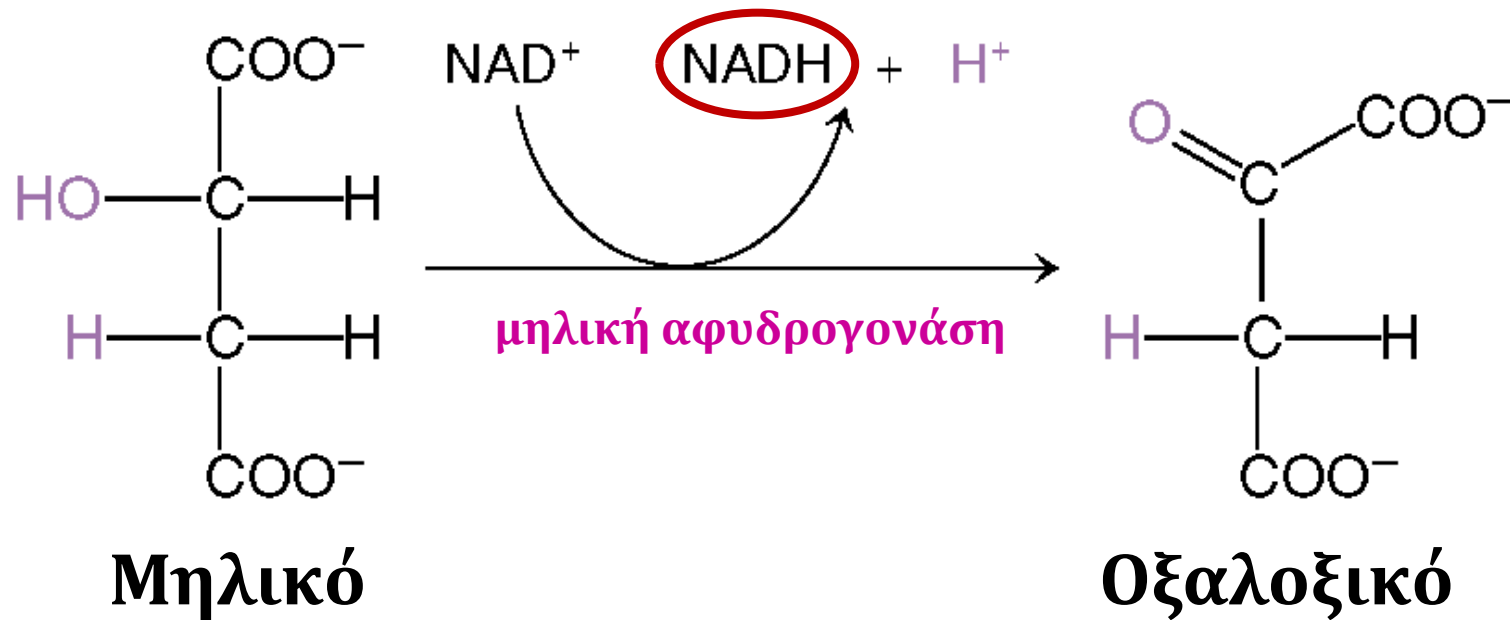
7^ο Βήμα: Μετατροπή φουμαρικού σε μηλικό



Τύπος αντίδρασης: Ενυδάτωση

Στερεοειδική trans-προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου και μιας υδροξυλομάδας, οπότε σχηματίζεται μόνο το L-μηλικό.

8^ο Βήμα: Το L-μηλικό οξειδώνεται σε οξαλοξικό



Επισημαίνεται ότι η τιμή πρότυπης ελεύθερης ενέργειας αυτής της αντίδρασης είναι σημαντικά θετική (+30 kJ/mol) και συνεπώς η συγκέντρωση του οξαλοξικού στη μιτοχονδριακή μήτρα είναι πολύ χαμηλή.

Ωστόσο, η αντίδραση προωθείται από την άμεση αξιοποίηση των προϊόντων της – το οξαλοξικό από την κιτρική συνθάση και το NADH από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Ένζυμα και αντιδράσεις του κύκλου Krebs

Αντιδράσεις	Ένζυμα	ΔG° (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
1. Ακέτυλο-coA + οξαλοξικό + H ₂ O → CoASH + κιτρικό	Συνθάση του κιτρικού	-31.4	-53.9
2. Κιτρικό $\rightleftharpoons$ ισοκιτρικό	Ακονιτάση	+6.7	+0.8
3. Ισοκιτρικό + NAD ⁺ → α-κετογλουταρικό + NADH + CO ₂	Αφυδρογονάση του ισοκιτρικού	-8.4	-17.5
4. α-κετογλουταρικό + CoASH + NAD ⁺ → ηλέκτρυλο-coA + NADH + CO ₂	Σύμπλεγμα αφυδρογονάσης-κετογλουταρικού	-30	-43.9
5. Ηλέκτρυλο-coA + GDP + P _i $\rightleftharpoons$ ηλεκτρικό + GTP + CoASH	Συνθετάση του ηλέκτρυλο-CoA	-3.3	≈0
6. Ηλεκτρικό + [FAD] $\rightleftharpoons$ φουμαρικό + [FADH₂]	Αφυδρογονάση του ηλεκτρικού	+0.4	≠0
7. Φουμαρικό + H ₂ O $\rightleftharpoons$ L-μηλικό	Φουμαράση	-3.8	≈0
8. L-μηλικό + NAD ⁺ $\rightleftharpoons$ οξαλοξικό + NADH + H ⁺	Αφυδρογονάση του μηλικού	+29.7	≈0

Ανασκόπηση του κύκλου του κιτρικού οξέος

- 1. Δύο άτομα άνθρακα εισέρχονται στον κύκλο κατά τη συμπύκνωση της ακετυλομάδας με το οξαλοξικό.**
- 2. Δύο άτομα άνθρακα τον εγκαταλείπουν με τη μορφή CO_2 , κατά τις αντιδράσεις που καταλύονται από την αφυδρογονάση του ισοκιτρικού και την αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού.**
- 3. Τα δύο άτομα άνθρακα που φεύγουν είναι διαφορετικά από εκείνα που εισέρχονται στον κύκλο.**
4. Τέσσερα ζεύγη ατόμων υδρογόνου αφήνουν τον κύκλο στις τέσσερες οξειδωτικές αντιδράσεις:
 - Δύο μόρια NAD^+ ανάγονται σε NADH κατά τις οξειδωτικές αποκαρβοξυλιώσεις του ισοκιτρικού και του α-κετογλουταρικού.
 - Ένα FAD ανάγεται σε FADH_2 κατά την οξείδωση του ηλεκτρικού.
 - Ένα NAD^+ ανάγεται σε NADH κατά την οξείδωση του μηλικού.

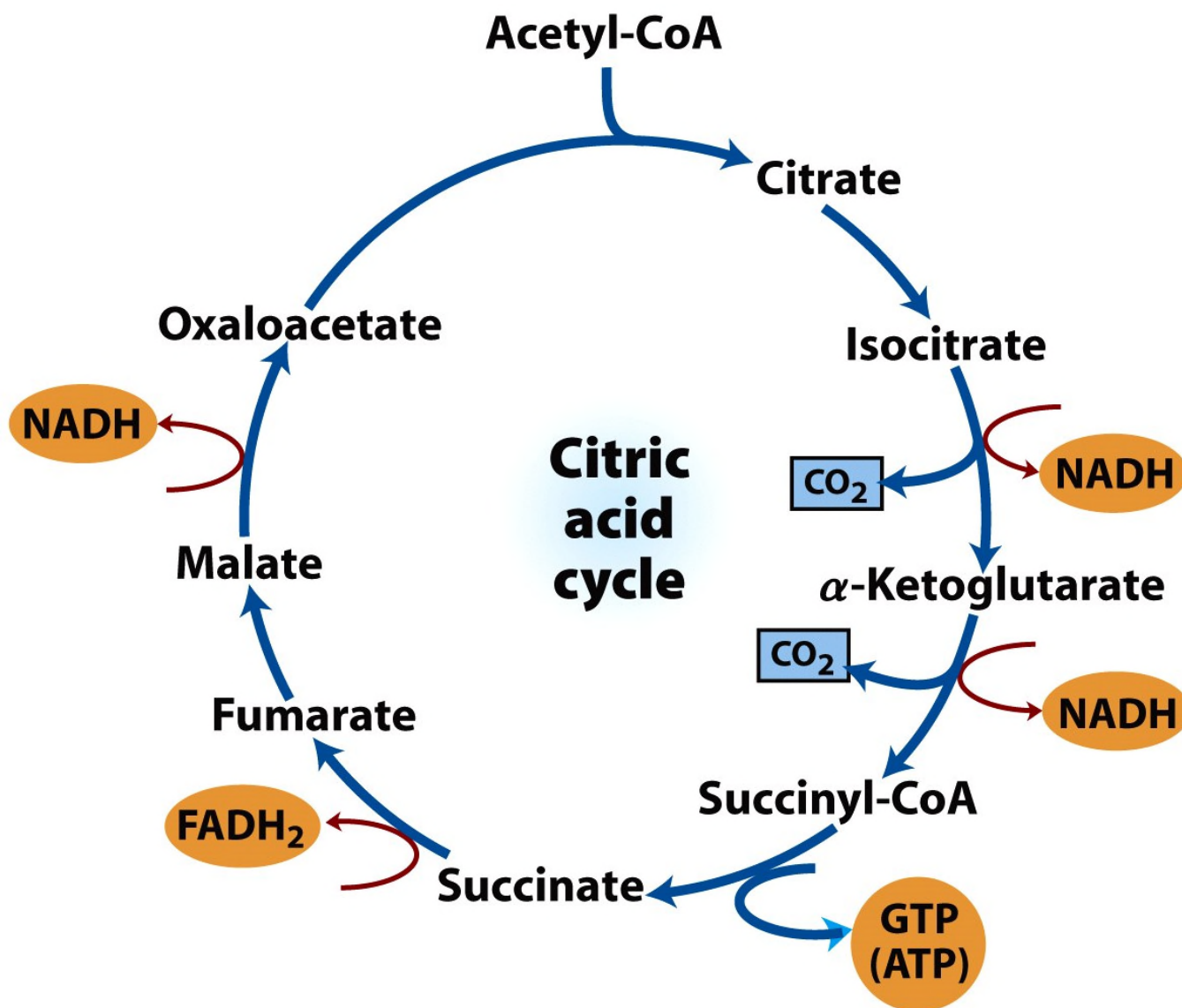
Ανασκόπηση του κύκλου του κιτρικού οξέος

4. Ένας δεσμός υψηλής ενέργειας (υπό τη μορφή του GTP) δημιουργείται από τη φωσφορική διάσπαση του πλούσιου σε ενέργεια θειοεστέρα του ηλέκτρυλο-CoA.
5. Δύο μόρια νερού καταναλώνονται:
 - ένα κατά την αντίδραση σύνθεσης του κιτρικού και συγκεκριμένα κατά την υδρόλυση του κιτρύλο-CoA
 - ένα κατά την ενυδάτωση του φουμαρικού.

Ο συνδυασμός γλυκόλυσης και κύκλου Krebs είναι η παρακάτω τελική αντίδραση



Ενεργειακή απόδοση του κύκλου του κιτρικού οξέος



Για κάθε ακέτυλο-coA:

$$3 \text{ NADH} \times 2.5 = 7.5 \text{ ATP}$$

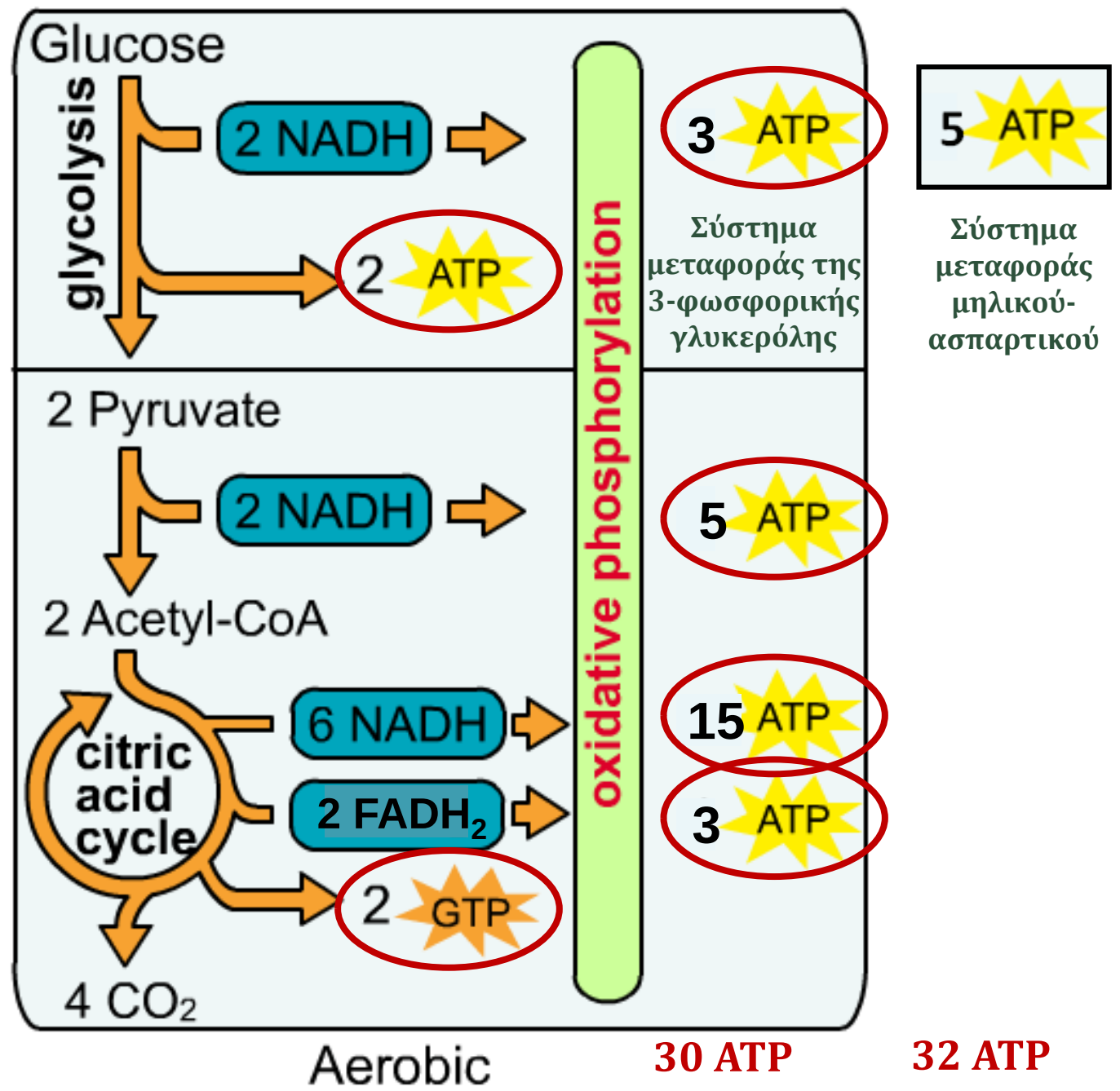
$$1 \text{ FADH}_2 \times 1.5 = 1.5 \text{ ATP}$$

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

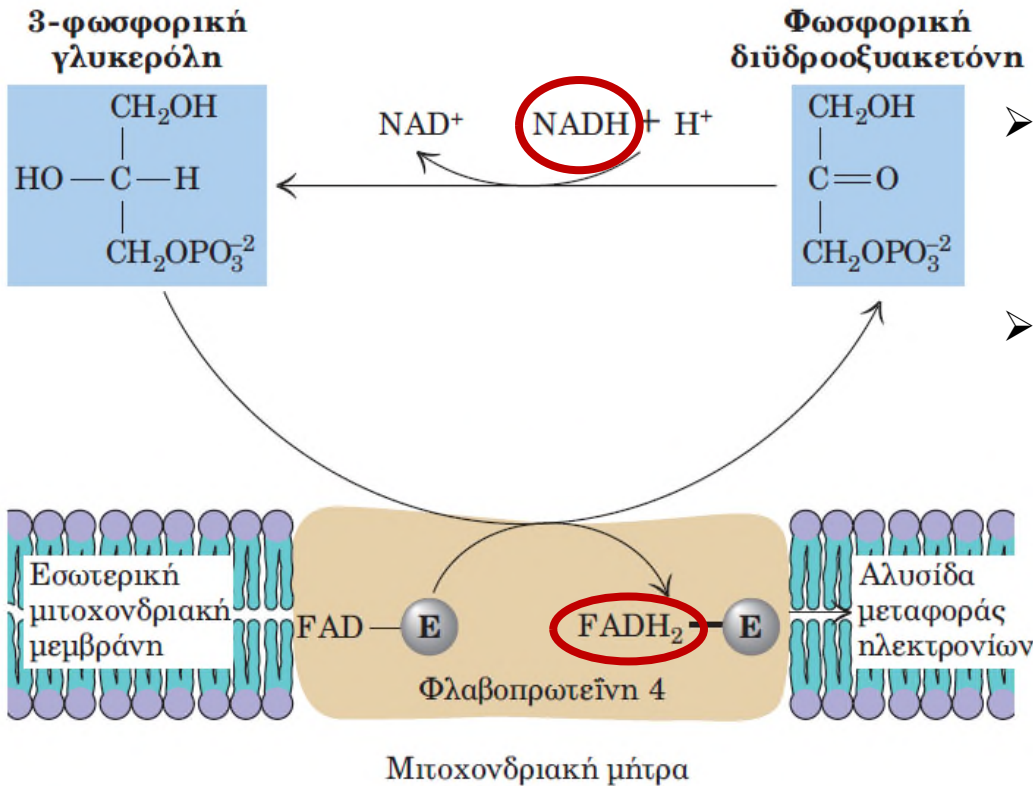
ΣΥΝΟΛΟ 10 ATP

Ενεργειακός υπολογισμός πλήρους οξείδωσης της γλυκόζης

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα συνδυασμένα μονοπάτια της γλυκόλυσης, του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος, της μεταφοράς ηλεκτρονίων, και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποδίδουν περίπου **30 έως 32 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης** που οξειδώνεται, ανάλογα με την οδό μεταφοράς ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται.



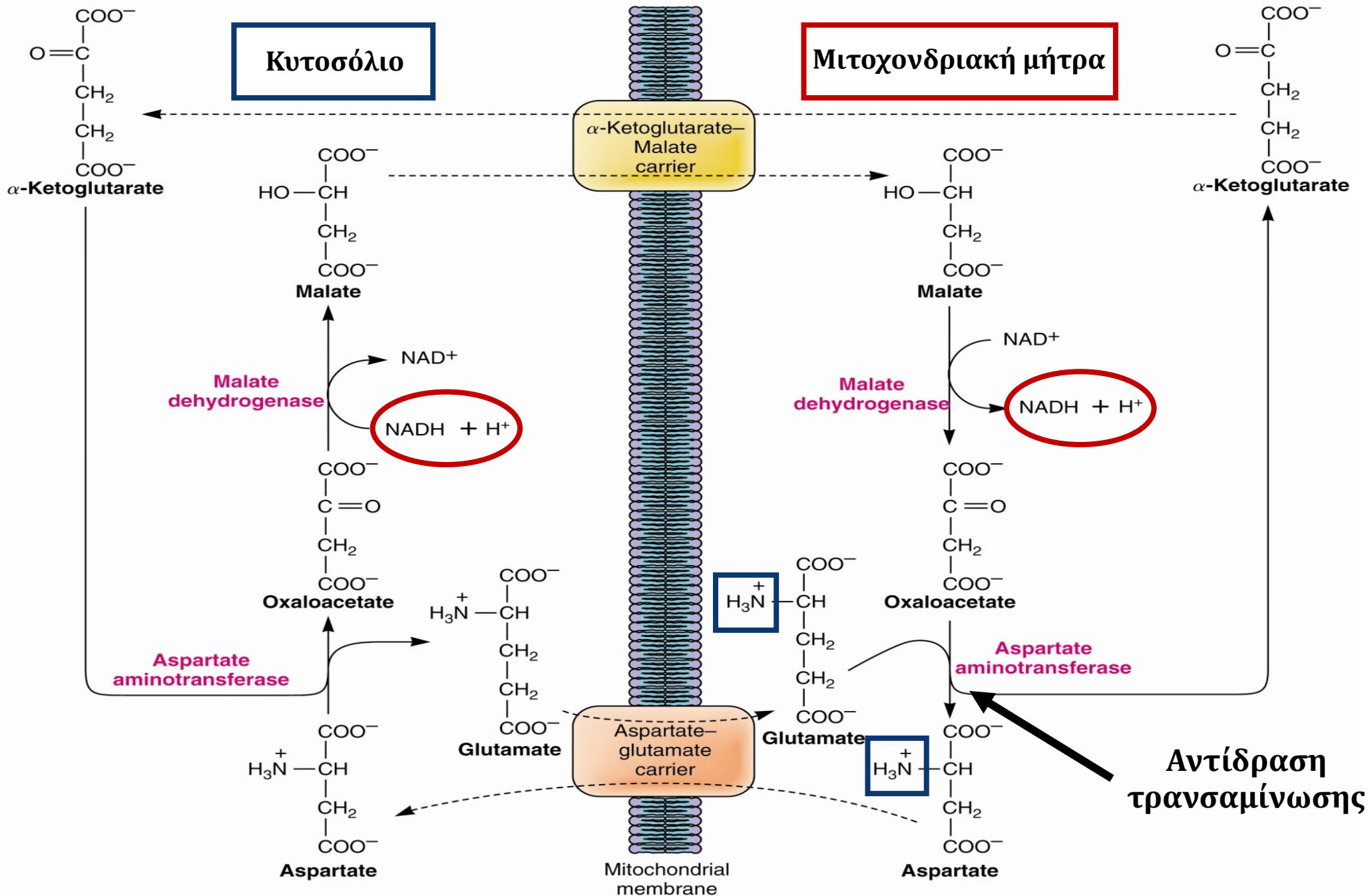
Σύστημα μεταφοράς γλυκεροφωσφορικού (3P-γλυκερόλης) Glycerol-3-phosphate shuttle



- Το **NADH** που παράγεται στο κυτταροδιάλυμα μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη **φωσφορική διϋδροοξυακετόνη**, ανάγοντάς την σε 3P-γλυκερόλη.
- Δύο διαφορετικές **αφυδρογονάσες του γλυκεροφωσφορικού**, μια στο κυτταρόπλασμα και μια στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, συνεργάζονται για να μεταφέρουν ηλεκτρόνια στη μιτοχονδριακή μήτρα.

- Ως αποτέλεσμα, το NADH του κυτταροδιαλύματος που οξειδώνεται μέσω αυτής της πορείας μεταφοράς αποδίδει μόνο **1,5 μόρια ATP**.
- Το κύτταρο “πληρώνει” με ένα δυνητικό μόριο ATP για να μπορέσει να εισάγει το NADH του κυτταροδιαλύματος μέσα στα μιτοχόνδρια.
- Παρότι αυτό μπορεί να φαίνεται σπατάλη, υπάρχει μια σημαντική ανταμοιβή. Η μεταφορά του γλυκεροφωσφορικού είναι ουσιαστικά μη αντιστρεπτή και συνεπώς ο κύκλος λειτουργεί αποτελεσματικά ακόμη και όταν τα επίπεδα του NADH είναι πολύ χαμηλά σε σχέση με αυτά του NAD^+ .

Σύστημα μεταφοράς μηλικού-ασπαρτικού



Το σύστημα μεταφοράς μηλικού-ασπαρτικού

Το οξαλοξικό ανάγεται στο κυτταροδιάλυμα λαμβάνοντας τα ηλεκτρόνια από το NADH (που οξειδώνεται σε NAD^+).

Το μηλικό μεταφέρεται διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης στη μήτρα όπου οξειδώνεται και πάλι, μετατρέποντας το NAD^+ σε NADH το οποίο εισέρχεται εύκολα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Το **οξαλοξικό** που παράγεται σε αυτή την αντίδραση δεν μπορεί να διαπεράσει την εσωτερική μεμβράνη και χρειάζεται μια **αντίδραση τρανσαμίνωσης για να σχηματίσει ασπαρτικό**, που μπορεί τότε να μεταφερθεί διαμέσου της μεμβράνης στην πλευρά του κυτταροδιαλύματος. Η τρανσαμίνωση στο κυτταροδιάλυμα ανακυκλώνει το ασπαρτικό πάλι σε οξαλοξικό.

Σε αντίθεση με το σύστημα μεταφοράς της 3P-γλυκερόλης:

- ο κύκλος μηλικού-ασπαρτικού είναι **αντιστρεπτός**
- λειτουργεί μόνο όταν ο λόγος NADH/NAD^+ στο κυτταροδιάλυμα είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο λόγο στη μήτρα.

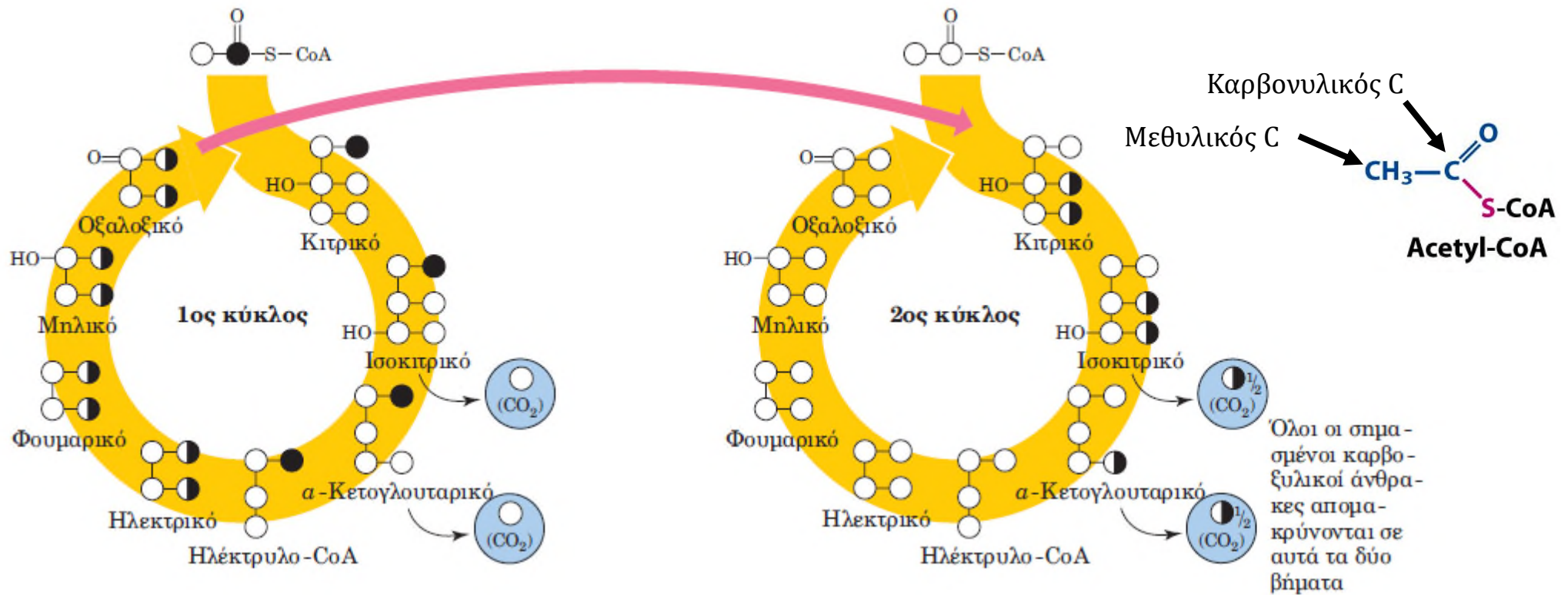
Επειδή αυτός ο μεταφορέας παράγει NADH στη μήτρα, αποδίδεται το σύνολο των 2,5 μορίων ATP ανά NADH.

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος λειτουργεί αποκλειστικά κάτω από αερόβιες συνθήκες

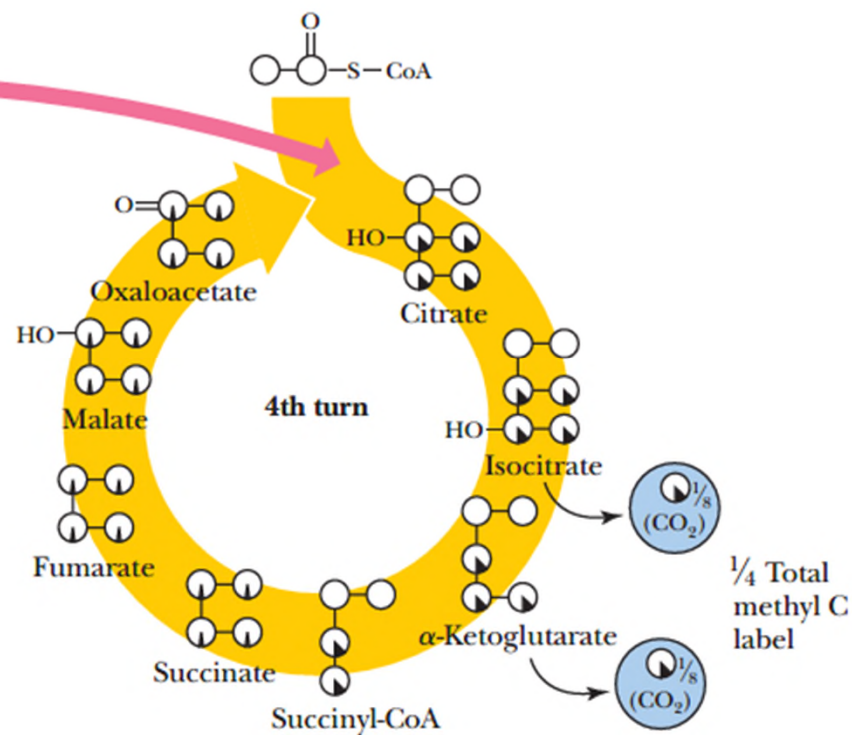
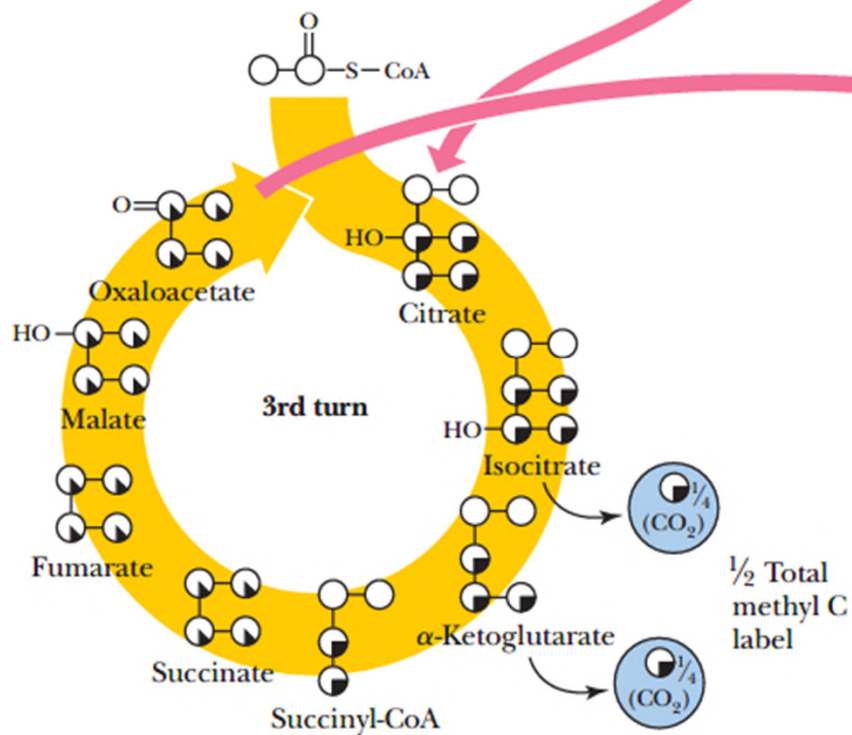
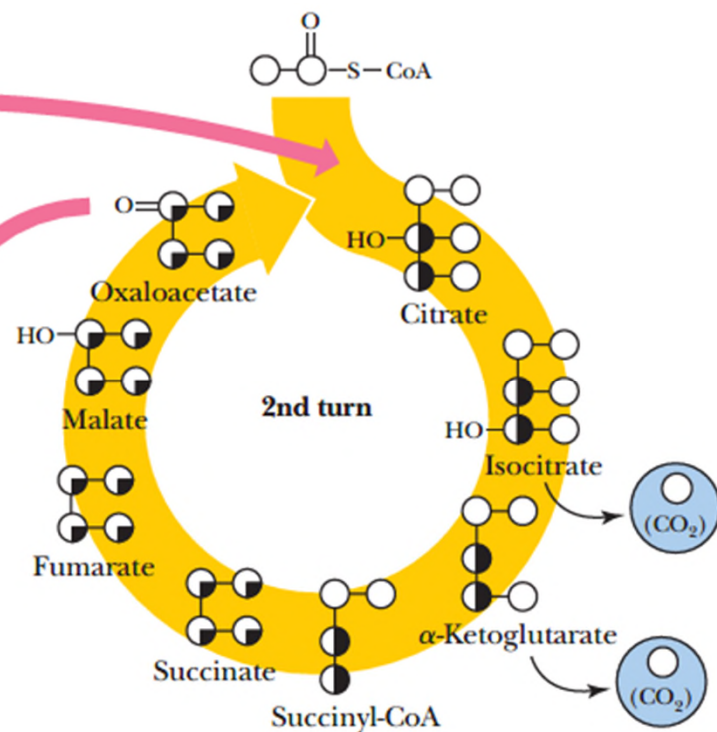
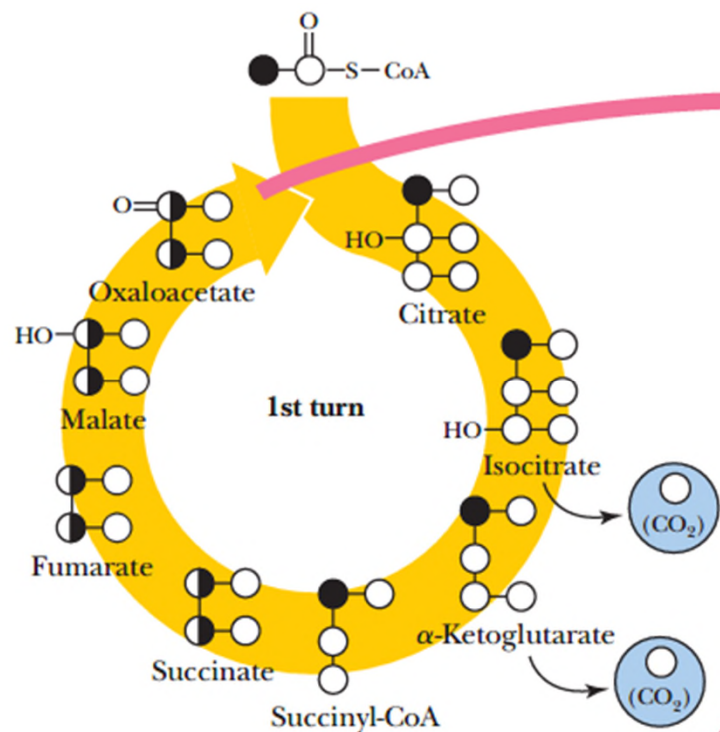
Το μοριακό οξυγόνο δε συμμετέχει απευθείας στον κύκλο του κιτρικού. Παρ' όλα αυτά, ο κύκλος αυτός λειτουργεί μόνο κάτω από αερόβιες συνθήκες διότι τα ανηγμένα συνένζυμα NADH και FADH_2 που σχηματίζονται είναι δυνατό να αναγεννηθούν στο μιτοχόνδριο μόνο με τη μεταφορά των ηλεκτρονίων τους στο μοριακό οξυγόνο.

Η γλυκόλυση έχει και αερόβιο και αναερόβιο μηχανισμό λειτουργίας, αφού κάτω από αναερόβιες συνθήκες το NADH αναγεννάται κατά τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ.

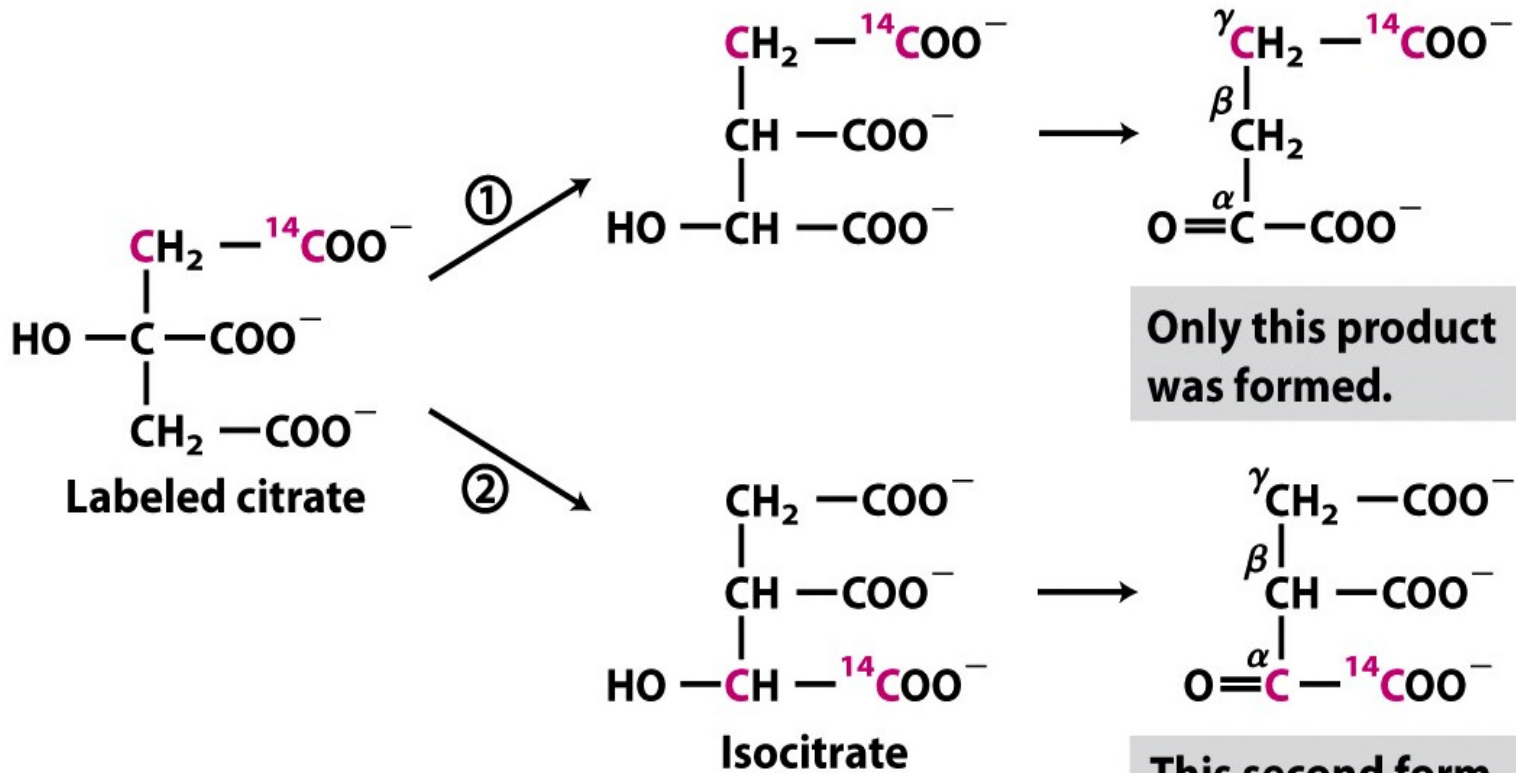
Η τύχη των ατόμων άνθρακα του οξικού σε διαδοχικούς κύκλους τρικαρβοξυλικού οξέος



1. Ο **καρβονυλικός άνθρακας** του ακετύλο-CoA διατηρείται πλήρως κατά τη διάρκεια μιας στροφής του κύκλου, αλλά χάνεται κατά τη διάρκεια της επόμενης στροφής.
2. Ο **μεθυλικός άνθρακας** διατηρείται για δύο πλήρεις στροφές, αλλά ισοκατανέμεται στους τέσσερις άνθρακες του οξαλοξικού στο τέλος της δεύτερης στροφής.



Συμμετρικά μόρια μπορούν να αντιδράσουν ασύμμετρα



Το CO₂ που παράγεται σε κάθε στροφή του κύκλου προέρχεται από τις καρβοξυλικές ομάδες του οξαλοξικού που είχε παραχθεί από τον προηγούμενο κύκλο, και όχι από το εισερχόμενο ακέτυλο-coA

Πώς ρυθμίζεται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος;

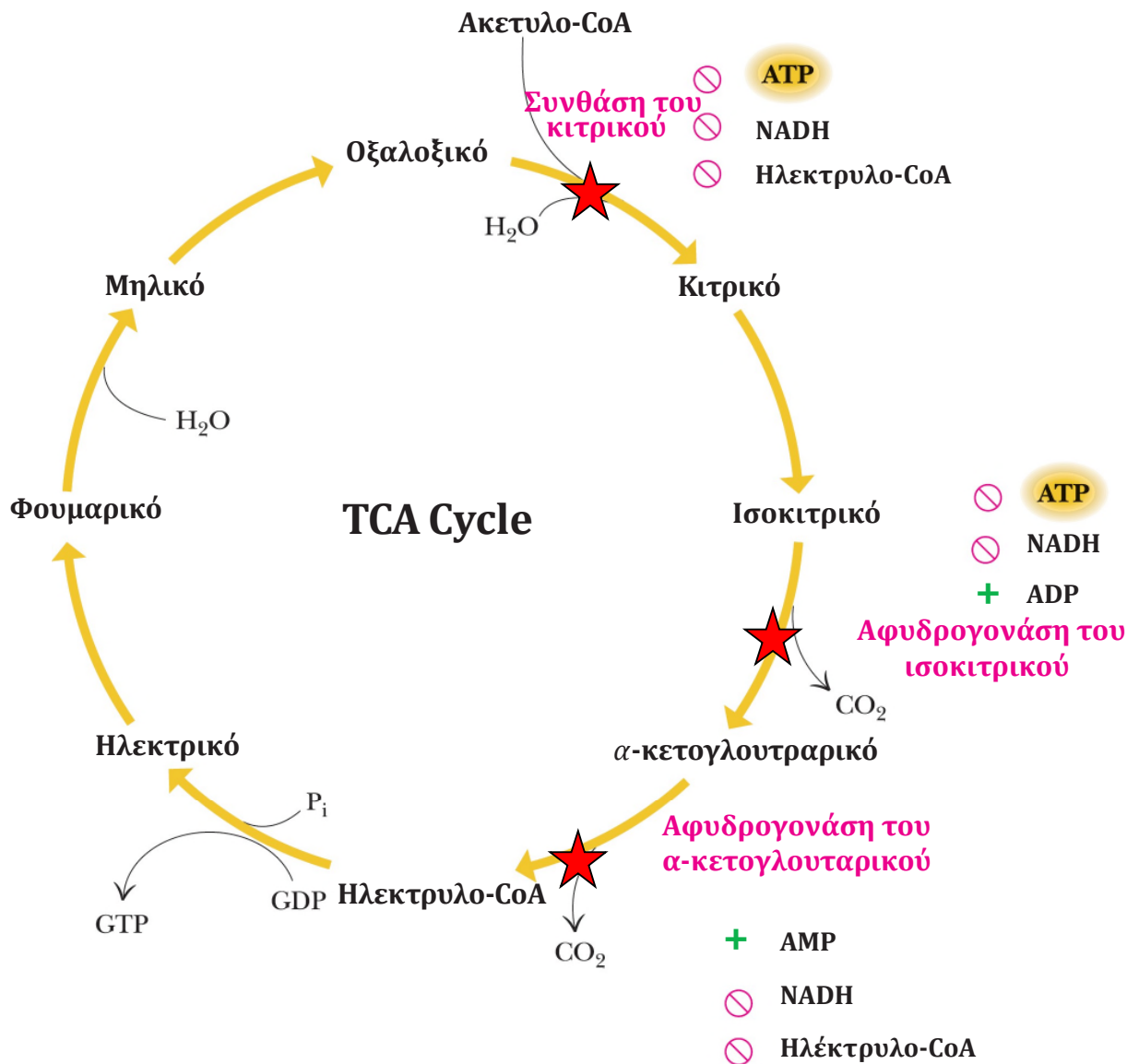
- Αν επιτρεπόταν στον κύκλο να λειτουργεί ανεξέλεγκτα, μεγάλα ποσά μεταβολικής ενέργειας θα χάνονταν στην υπερπαραγωγή ανηγμένων συνενζύμων και ATP.
- Αντίθετα, αν λειτουργούσε πολύ αργά, το ATP δεν θα παραγόταν αρκετά γρήγορα ώστε να ικανοποιεί τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου.

Πώς ρυθμίζεται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος;

Αντιδράσεις	Ένζυμα	ΔG° (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
1. Ακέτυλο-coA + οξαλοξικό + H ₂ O → CoASH + κιτρικό	Συνθάση του κιτρικού	-31.4	-53.9
2. Κιτρικό $\rightleftharpoons$ ισοκιτρικό	Ακονιτάση	+6.7	+0.8
3. Ισοκιτρικό + NAD ⁺ → α-κετογλουταρικό + NADH + CO ₂	Αφυδρογονάση του ισοκιτρικού	-8.4	-17.5
4. α-κετογλουταρικό + CoASH + NAD ⁺ → ηλέκτρυλο-coA + NADH + CO ₂	Αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού	-30	-43.9
5. Ηλέκτρυλο-coA + GDP + P _i $\rightleftharpoons$ ηλεκτρικό + GTP + CoASH	Συνθετάση του ηλέκτρυλο-CoA	-3.3	≈0
6. Ηλεκτρικό + [FAD] $\rightleftharpoons$ φουμαρικό + [FADH ₂]	Αφυδρογονάση του ηλεκτρικού	+0.4	≠0
7. Φουμαρικό + H ₂ O $\rightleftharpoons$ L-μηλικό	Φουμαράση	-3.8	≈0
8. L-μηλικό + NAD ⁺ $\rightleftharpoons$ οξαλοξικό + NADH + H ⁺	Αφυδρογονάση του μηλικού	+29.7	≈0

Οι τρεις αντιδράσεις που καταλύονται από τη **συνθάση του κιτρικού**, την **αφυδρογονάση του ισοκιτρικού** και την **αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού** λειτουργούν με μεγάλες αρνητικές τιμές ΔG στις μιτοχονδριακές συνθήκες κι έτσι αποτελούν τα πρωταρχικά σημεία ρύθμισης.

Σημεία ελέγχου του κύκλου του κιτρικού οξέος



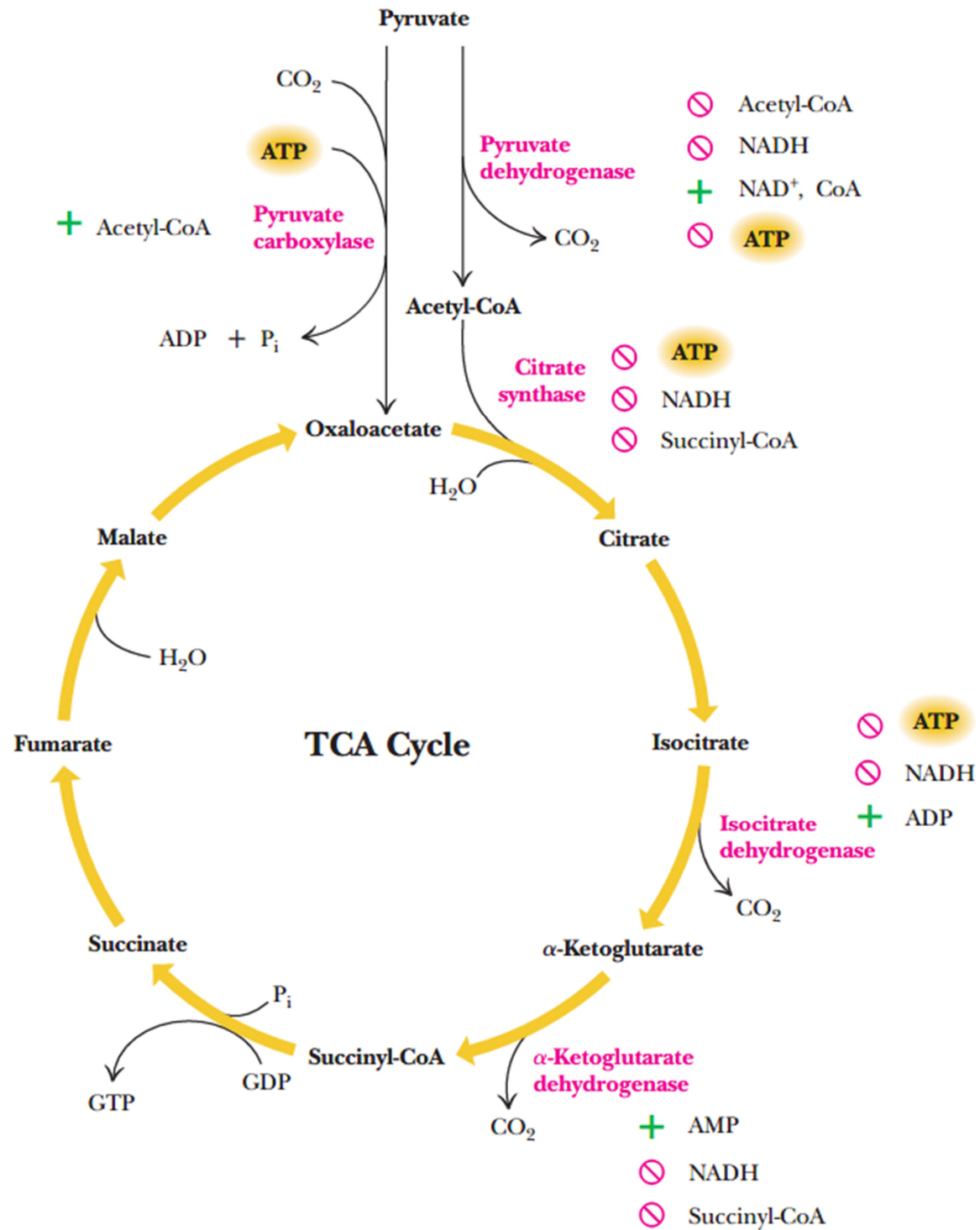
Η συνθάση του κιτρικού, η αφυδρογονάση του ισοκιτρικού και η αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού **αναστέλλονται** από το **NADH**.

Συνεπώς, όταν το κύτταρο έχει υψηλά επίπεδα NADH που του είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ATP, ο κύκλος σταματά.

Για παρόμοιους λόγους, το **ATP** είναι **αναστολέας** της συνθάσης του κιτρικού και της αφυδρογονάσης του ισοκιτρικού.

Ο κύκλος επάγεται όταν ο λόγος **ADP/ATP είναι υψηλός**, ένδειξη ότι το κύτταρο έχει μικρά ενεργειακά αποθέματα.

Εκτός της ρύθμισης του κύκλου από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, το **ηλεκτρυλο-CoA** αποτελεί έναν εσωτερικό ρυθμιστή του κύκλου, **αναστέλλοντας** τη συνθάση του κιτρικού και την αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού.

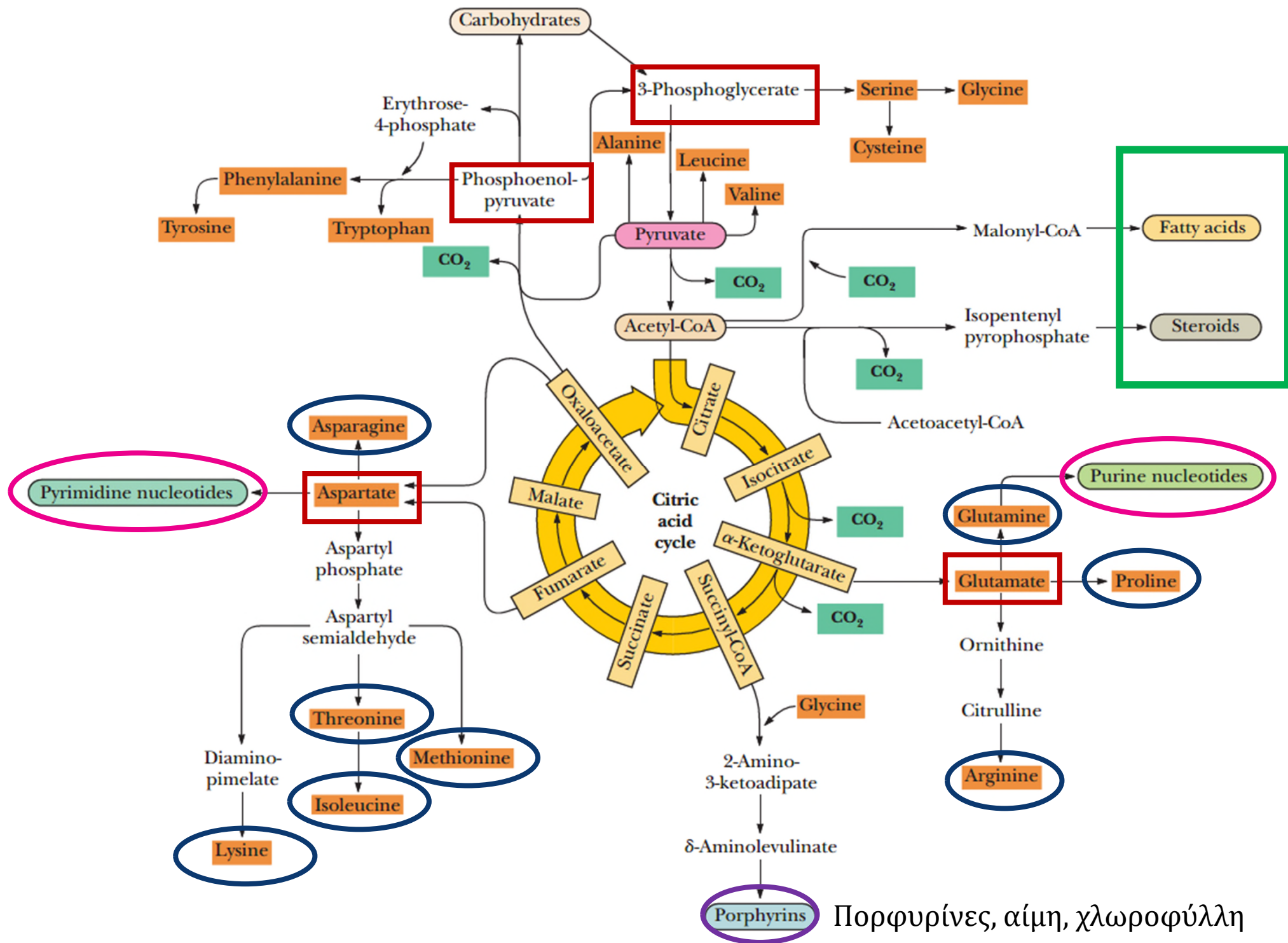


Μπορεί ο κύκλος Krebs να παρέχει ενδιάμεσους μεταβολίτες για βιοσυνθέσεις;

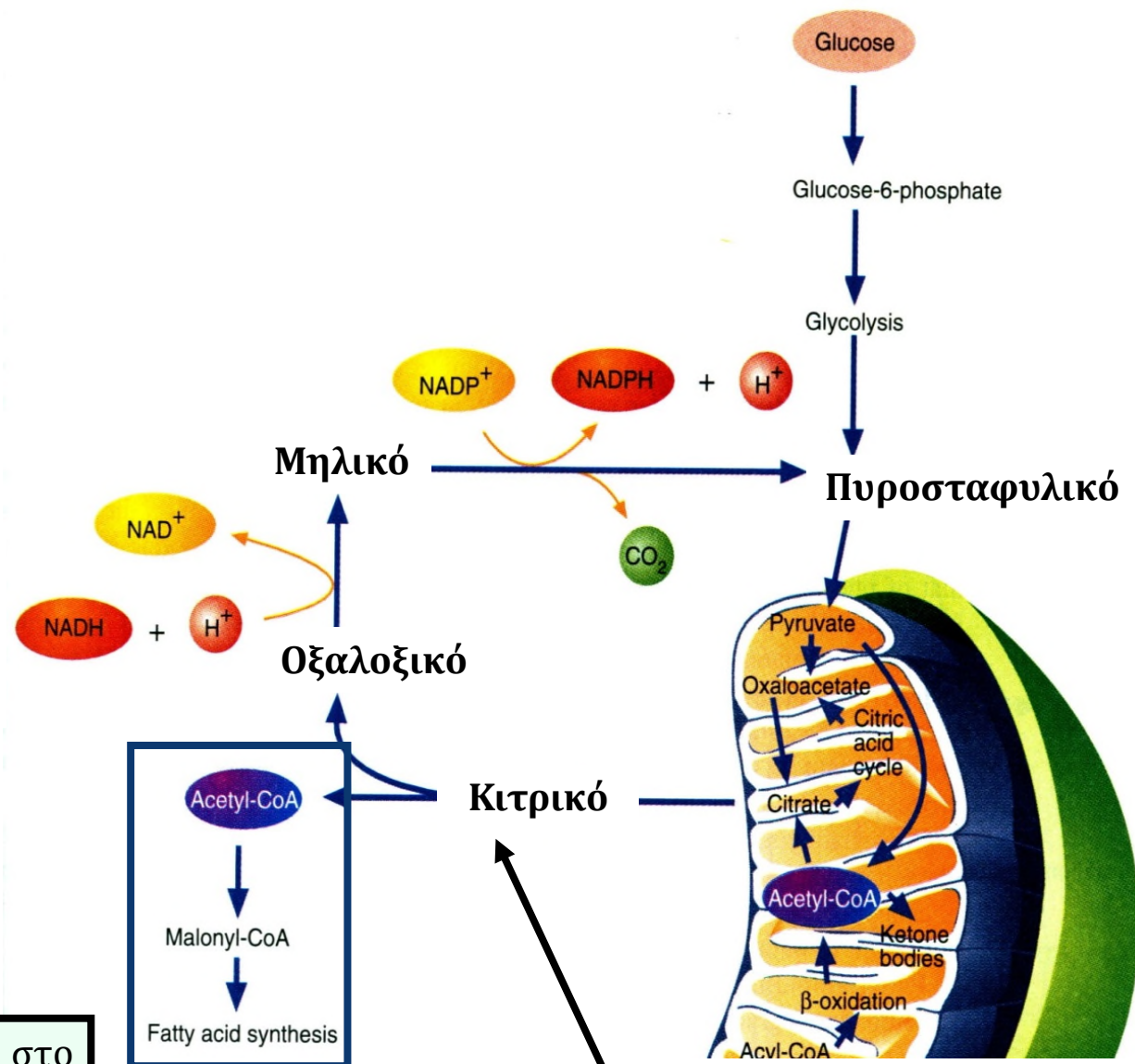
Η σημασία του κύκλου του κιτρικού οξέος δεν εξαντλείται στην παραγωγή του ATP.

Ως το μείζον κομβικό μεταβολικό σημείο του κυττάρου, ο κύκλος αυτός αποτελεί σημαντική πηγή προμήθειας ενδιάμεσων ενώσεων που χρησιμοποιούνται σε βιοσυνθετικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, αποτελεί δεξαμενή υλικών για τη βιοσύνθεση:

- A. Αμινοξέων
- B. λιπαρών οξέων, στερολών ...
- C. γλυκόζης,
- D. πορφυρινών, αίμης, χλωροφύλλης ...
- E. πουρινών και πυριμιδινών



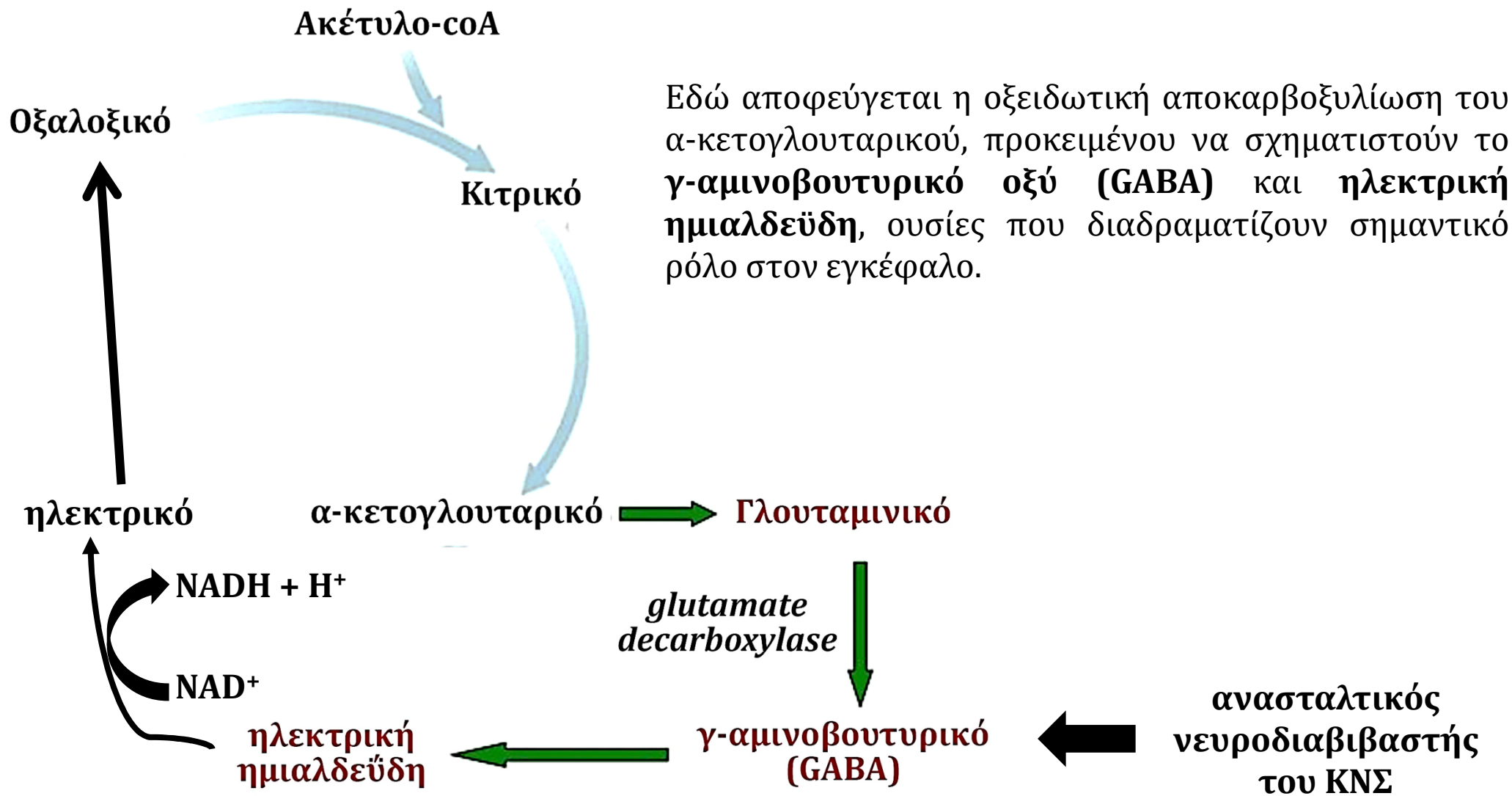
Πορφυρίνες, αίμη, χλωροφύλλη



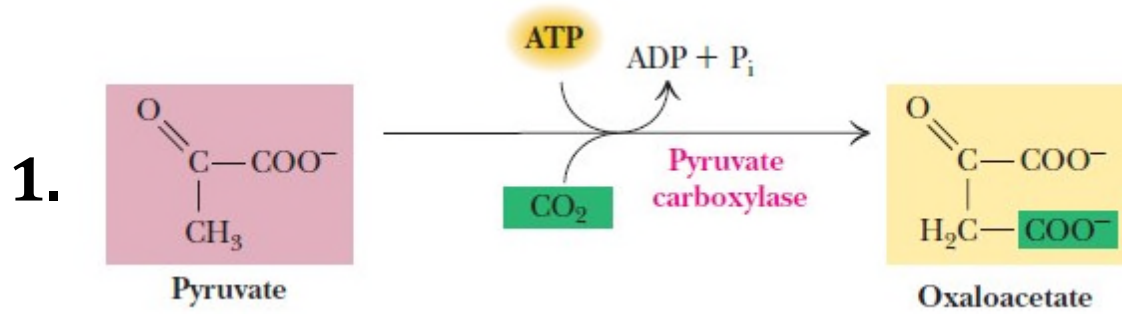
Το **ακετυλο-CoA** που σχηματίζεται στο μιτοχόνδριο από τη διάσπαση της περίσσειας των υδατανθράκων **εξέρχεται μέσω κιτρικού** στο κυτταρόπλασμα και σηματοδοτεί τη σύνθεση των λιπαρών οξέων.

ΑΤΡ-κιτρική λυάση

Η τρανσαμίνωση σε γλουταμινικό αποτελεί αντίδραση κλειδί σχετικά με το μεταβολισμό του γ-αμινοβουτυρικού που αποτελεί ιδιομορφία του μεταβολισμού του εγκεφάλου.



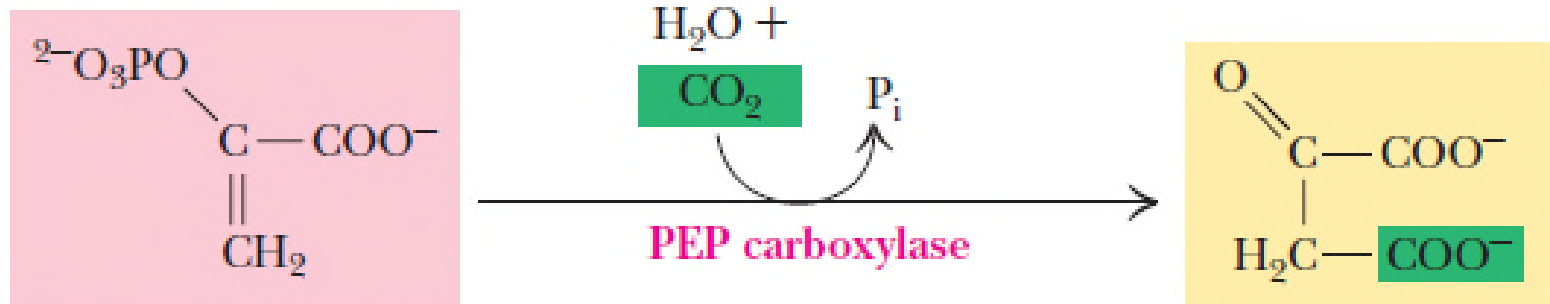
Αναπληρωτικές αντιδράσεις



2. Αντιδράσεις αποδομής των αμινοξέων.

Αναπληρωτικές αντιδράσεις

3.

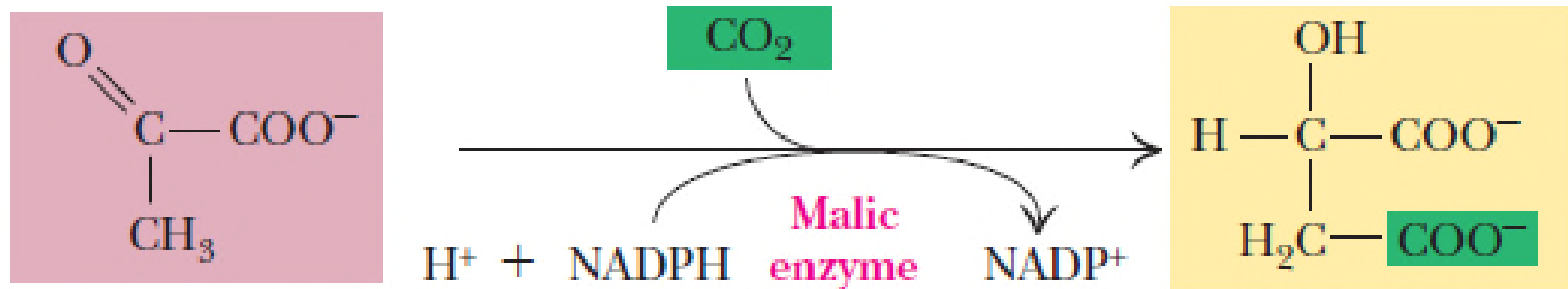


Φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP)

Οξαλοξικό

Η **PEP καρβοξυλάση** εκφράζεται σε ζυμομύκητες, βακτήρια και ανώτερα φυτά, αλλά **όχι σε ζώα**. Το ένζυμο **αναστέλλεται ειδικά από το ασπαρτικό**, το οποίο παράγεται με τρανσαμίνωση από το οξαλοξικό.

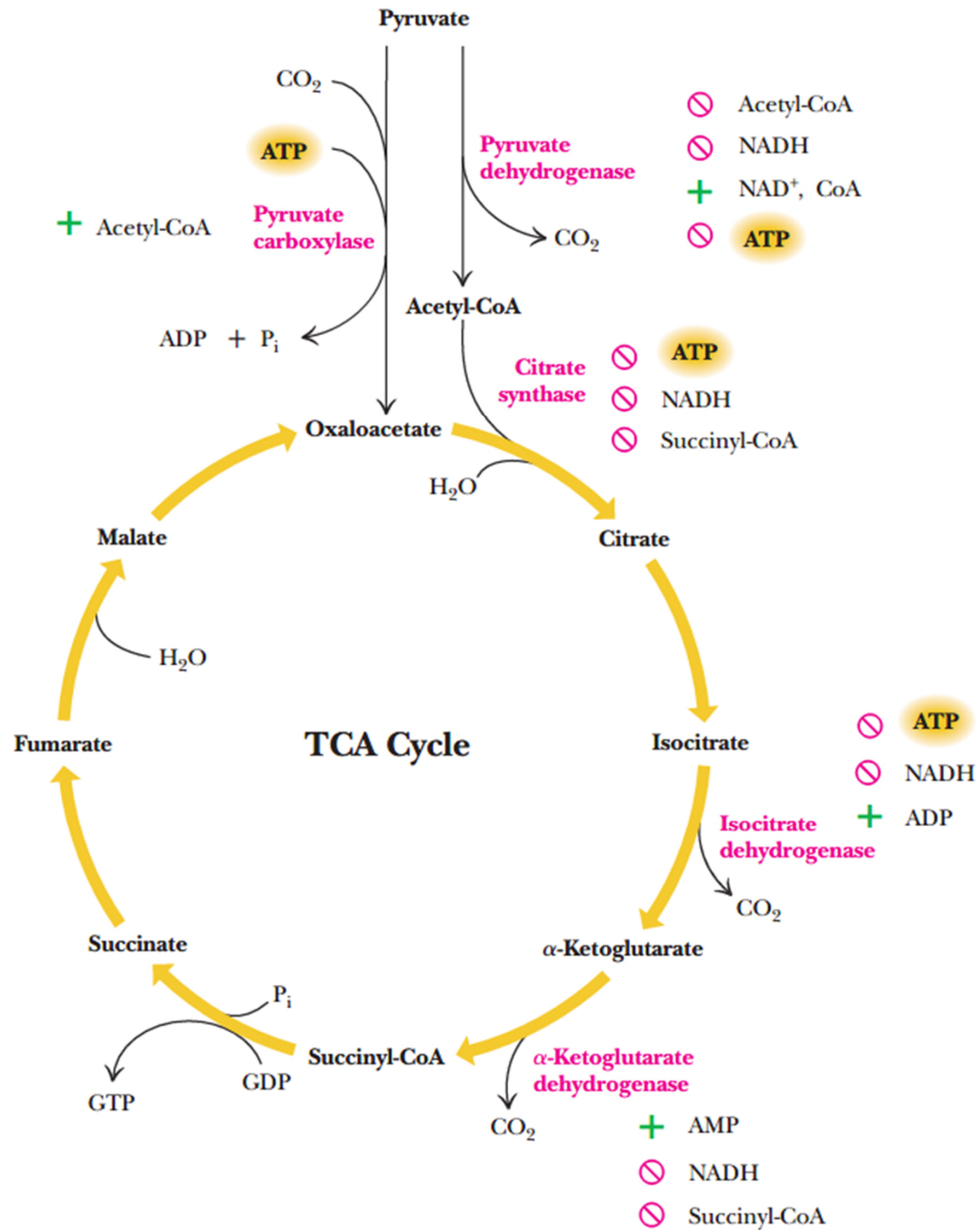
4.



Πυροσταφυλικό

L-Μηλικό

Το **μηλικό ένζυμο** βρίσκεται στο κυτοσόλιο ή τα μιτοχόνδρια πολλών ζωικών και φυτικών κυττάρων και είναι ένα **ένζυμο εξαρτώμενο από NADPH**.



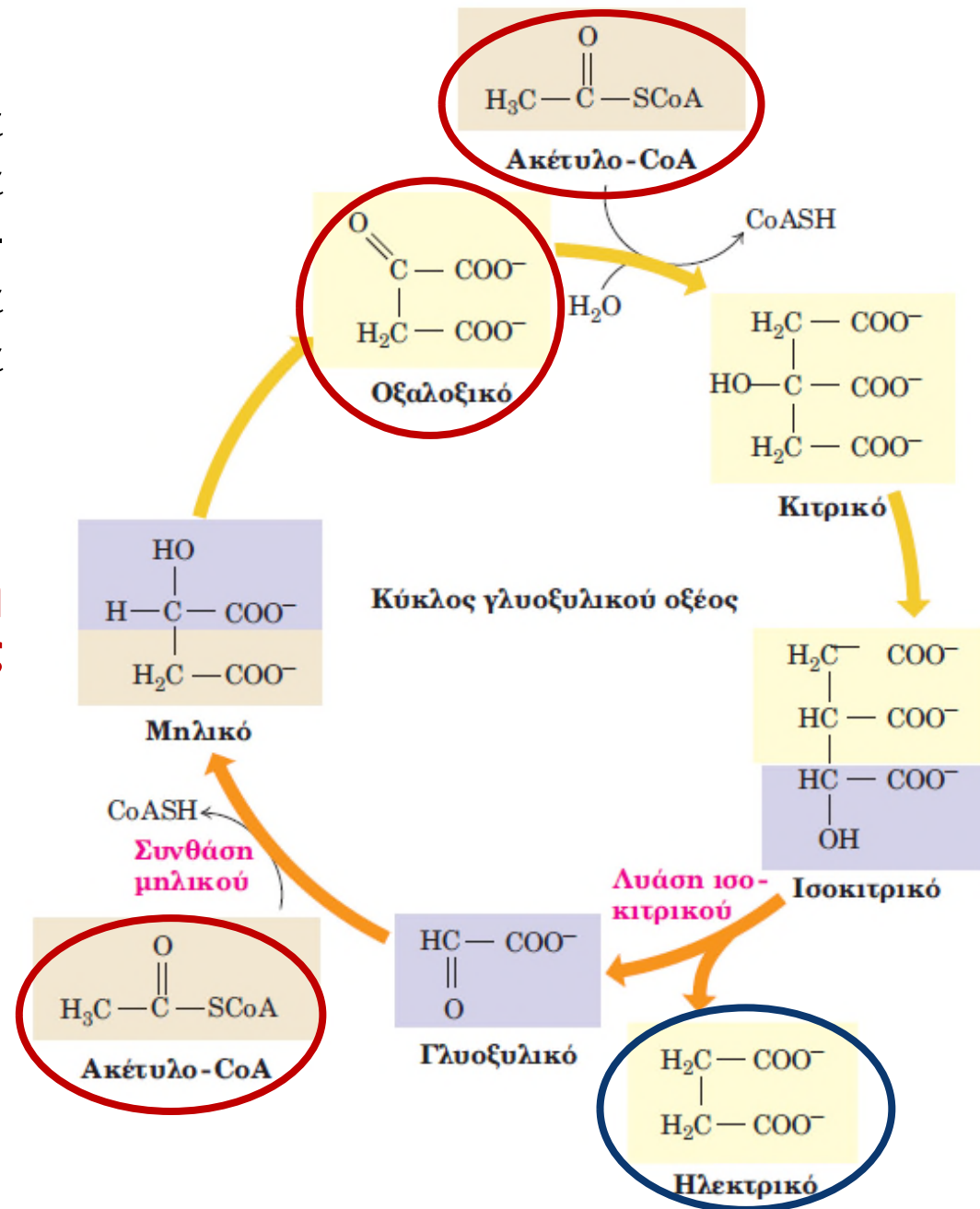
Ο κύκλος του γλυοξυλικού

Επιτρέπει στα **φυτά** και σε πολλά **βακτήρια** να αναπτύσσονται παρουσία οξικού ή ενώσεων που παράγουν ακετυλο-CoA (π.χ. λιπαρά οξέα) και να πραγματοποιούν γλυκονεογένεση από τα καύσιμα αυτά υλικά.

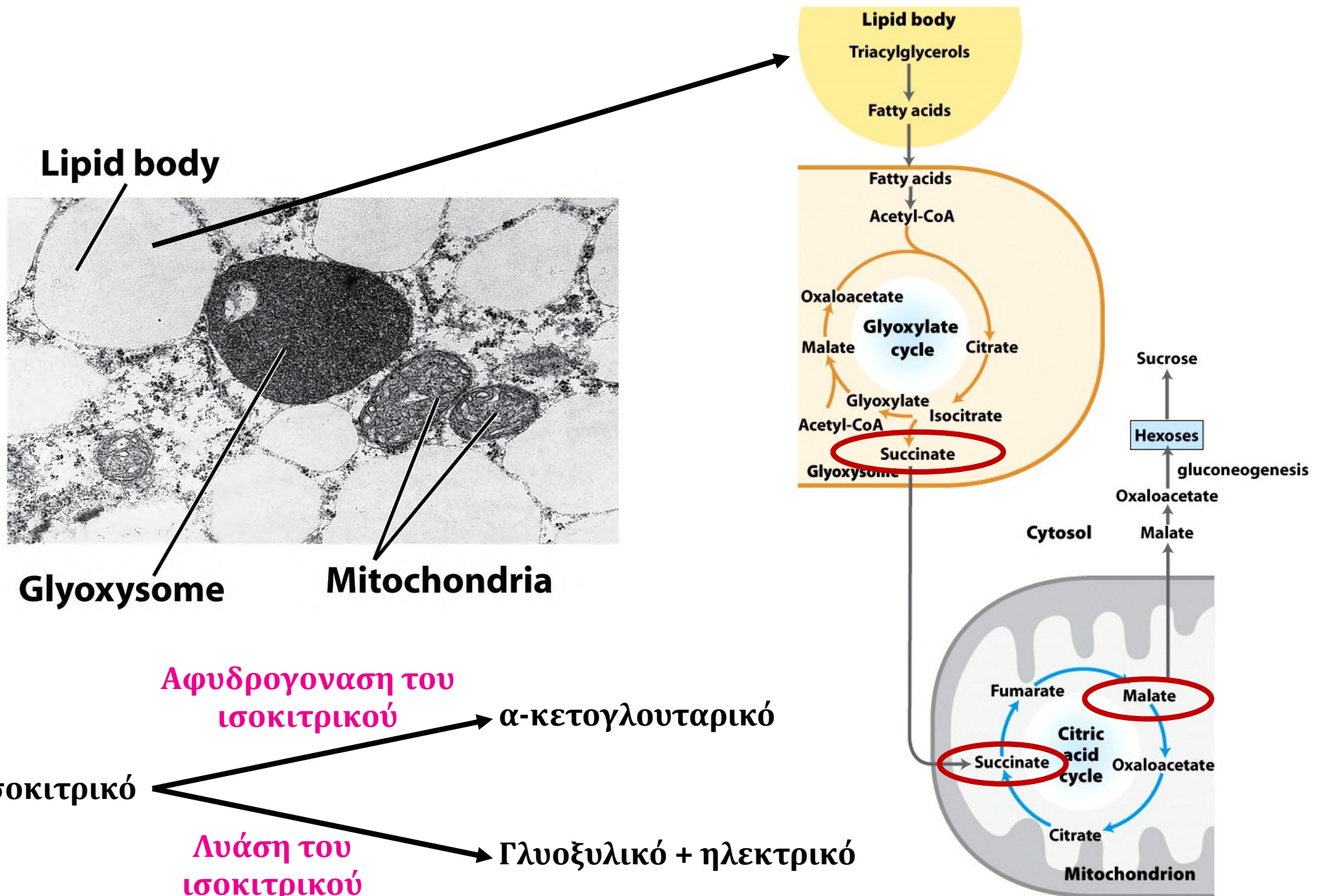
Αυτό κατορθώνεται με την **παράκαμψη των δύο βημάτων αποκαρβοξυλίωσης** του κύκλου του κιτρικού οξέος

οπότε

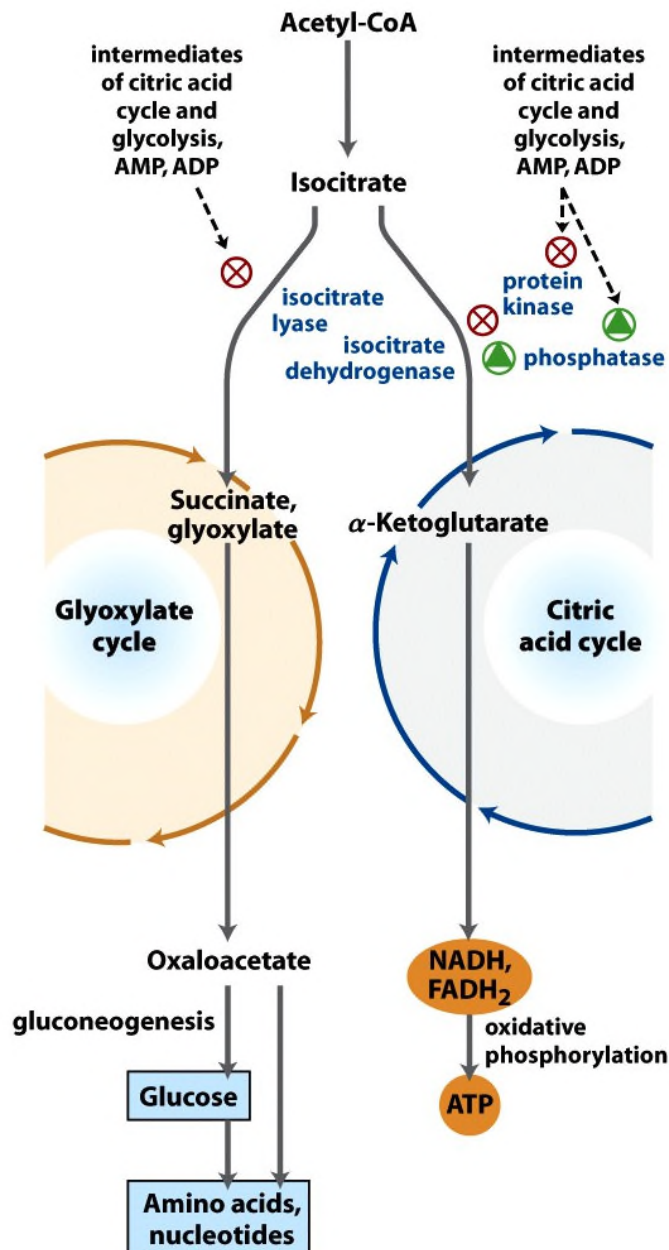
από δύο μόρια ακετυλο-CoA παράγεται ένα μόριο ηλεκτρικού οξέος



Σχέση κύκλου γλυοξυλικού και κιτρικού οξέος



Συντονισμένη ρύθμιση των κύκλων γλυοξυλικού και κιτρικού οξέος στο E. coli.



Το ισοκιτρικό είναι ένα κρίσιμο ενδιάμεσο, στο σημείο διακλάδωσης μεταξύ των κύκλων γλυοξυλικού και κιτρικού οξέος.

Η **ισοκιτρική αφυδρογονάση** ρυθμίζεται με **ομοιοπολική τροποποίηση** μέσω μιας διλειτουργικής πρωτεΐνης με ενεργότητες κινάσης και φωσφατάσης.

➤ Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού και της γλυκόλυσης, καθώς και **σε συνθήκες χαμηλού ενεργειακού φορτίου**:

1. **η ισοκιτρική λυάση αναστέλλεται αλλοστερικά**
2. **η ισοκιτρική αφυδρογονάση ενεργοποιείται με αποφωσφορυλίωση** (από μια ειδική φωσφατάση), οπότε το ισοκιτρικό εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και παράγεται ATP.

➤ Όταν το ενεργειακό φορτίο είναι υψηλό και οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων χαμηλές, **η ισοκιτρική αφυδρογονάση απενεργοποιείται με φωσφορυλίωση** (από μια συγκεκριμένη πρωτεϊνική κινάση), και το ισοκιτρικό κατευθύνεται μέσω του γλυοξυλικού κύκλου προς βιοσύνθεση υδατανθράκων, αμινοξέων και άλλων κυτταρικών συστατικών.

Σύγκριση κύκλων TCA και γλυοξυλικού.

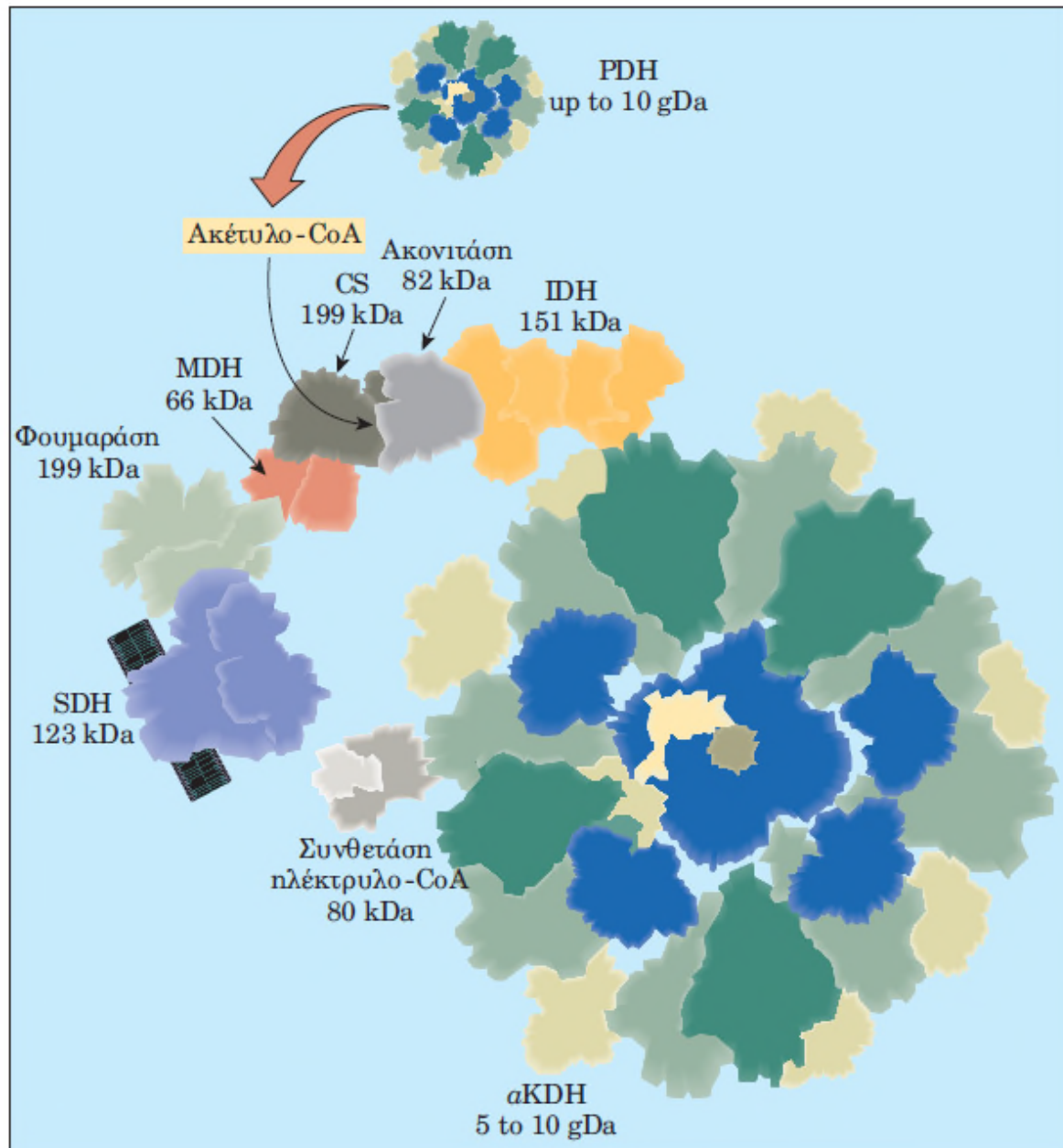
Σε σύγκριση με τον κύκλο Krebs, ο κύκλος του γλυοξυλικού:

1. Περιέχει μόνο **5 βήματα** (σε αντίθεση με 8 βήματα του κύκλου Krebs).
2. Χαρακτηρίζεται από **απουσία αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης**.
3. Κάθε κύκλος του **καταναλώνει 2 μόρια ακέτυλο-coA**.
4. Οδηγεί στην **παραγωγή τεσσάρων μονάδων ατόμων άνθρακα (οξαλοξικό)**, σε αντίθεση με τις μονάδες ενός ατόμου άνθρακα.

Ο κύκλος Krebs λειτουργεί ως ένα μεταβολόνιο

Τα ένζυμα του κύκλου του Krebs συνδέονται μεταξύ τους σε ένα μεταβολόνιο (metabolon).

Η αυτό-συγκρότηση των ενζύμων αυτών σε ένα **υπερσύμπλοκο** επιτρέπει την άμεση μεταφορά των υποστρωμάτων από το ένα ένζυμο στο άλλο, επιτυγχάνοντας έτσι πολύ υψηλότερες μεταβολικές ροές σε σύγκριση με την περίπτωση κατά την οποία τα ένζυμα θα ήταν διασκορπισμένα στη μιτοχονδριακή μήτρα.



Η εργασία που πρότεινε τον κύκλο του κιτρικού οξέος υποβλήθηκε για δημοσίευση στο περιοδικό *Nature* αλλά απορρίφθηκε. Στη συνέχεια δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Enzymologia*. Ο Dr. H.A. Krebs έδειχνε με υπερηφάνεια το γράμμα της απόρριψης σε όλη τη διάρκεια της καριέρας του ως ενθάρρυνση για τους νέους ερευνητές.

“Ιούνιος 1937

Ο εκδότης του *NATURE* εκφράζει τις φιλοφρονήσεις του στον Dr. Krebs και λυπάται διότι, καθώς έχει ήδη αρκετές επιστολές για να καλύψει τις στήλες αλληλογραφίας του *NATURE* για τις επόμενες επτά ή οκτώ εβδομάδες, δεν επιθυμεί να δεχθεί άλλες επιστολές επί του παρόντος, λόγω της καθυστέρησης η οποία θα παρατηρηθεί στη δημοσίευσή τους.

Εάν ο Dr. Krebs δεν έχει πρόβλημα με τη μεγάλη καθυστέρηση, ο εκδότης είναι έτοιμος να φυλάξει το άρθρο έως ότου υπάρξει αποσυμφόρηση, με την ελπίδα να το χρησιμοποιήσει.

Για την ώρα το επιστρέφει, σε περίπτωση που ο Dr. Krebs προτιμά να το υποβάλει για γρήγορη δημοσίευση σε ένα άλλο περιοδικό.”



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1953

"for his discovery of the citric acid cycle"

"for his discovery of co-enzyme A and its importance for intermediary metabolism"



Hans Adolf Krebs

1/2 of the prize

United Kingdom

Sheffield University
Sheffield, United
Kingdom

b. 1900
(in Hildesheim,
Germany)
d. 1981



Fritz Albert Lipmann

1/2 of the prize

USA

Harvard Medical School;
Massachusetts General
Hospital
Boston, MA, USA

b. 1899
(in Koenigsberg, then
Germany)
d. 1986