

GIULIA LEVI (\*)

### Krebs e il ciclo dell'acido citrico (\*\*)

**Summary** - In this work H.A. Krebs and his studies are concerned, with particular regard to his contacts with Warburg and Szent-Gyorgyi.

In 1900 biochemistry had just risen up as a new science, and was asserting its importance in different way according to the country: in England it rapidly found its autonomy, while in Germany it was more difficult because of lacking of institutional basis.

Krebs worked in both of these countries and was influenced by both experiences.

The work of Szent-Gyorgyi on peroxidase marked out the way to understand the process of hydrogen transfer in biological systems; then the role of malic, fumaric, oxalacetic acids in muscles was acknowledged, as hydrogen carriers to cytochromes. The formulation by Krebs of the cycle of citric acid, as common pattern to carbohydrates, proteins and lipid metabolism, took to the development of modern biochemistry.

Il ciclo di Krebs costituisce un punto fermo nello svolgimento del programma di chimica della scuola superiore. Proprio questa «fissità» rischia di sclerotizzarlo in una dimensione atemporale, perciò è utile cercare di collocarlo storicamente e di sottolineare le tappe che hanno contribuito alla sua formulazione definitiva.

Hans Krebs nacque a Hildesheim, figlio di un illustre otorinolaringoiatra, George Krebs, e di Alma Davidson. Studiò medicina nelle Università di Gottingen, Freiberg e Berlino, dove dopo la laurea nel 1925, lavorò al Dipartimento di chimica dell'Istituto di Patologia, uno dei pochi dove emergessero le nuove tendenze di biochimica. La biochimica infatti era andata conquistandosi uno spazio autonomo — come studio chimico dei fenomeni biologici — a partire dal 1890, orientando il proprio interesse soprattutto (ma non soltanto) sulla dinamica delle reazioni chimiche che avvengono durante il metabolismo cellulare. Ma questo sviluppo intellettuale aveva dovuto confrontarsi con le opportunità istituzionali che ogni nazione offriva. Nelle Università tedesche, per esempio, lavoravano probabilmente le menti più acute per dar vita alla nuova disciplina, ma essi occupavano o cattedre di fisiologia in senso stretto o cattedre di chimica organica, perciò la biochimica stentava a trovare un proprio ruolo indipendente, a meno che non costituisse l'oggetto prin-

(\*) Dipartimento di Chimica Generale, Università di Torino.

(\*\*) Relazione presentata al IV Convegno Nazionale di «Storia e Fondamenti della Chimica» (Venezia, 7-9 novembre 1991).

cipale della ricerca di istituti parauniversitari, come il Kaiser Wilhelm Institut di Berlino dove dal 1918 operava Otto Warburg e a cui si unì Krebs dal 1926 al 1930.

Grazie alle ricerche di chimica fisiologica era stato chiarito, fin dagli anni 1880-1890 che il calore animale è prodotto dal metabolismo e che i diversi alimenti contribuiscono in maniera differenziata alla produzione di energia; era stato inoltre introdotto il concetto di metabolismo basale. Ma poiché l'ossidazione dei principi nutritivi ha luogo in maniera diversa all'esterno e all'interno dell'organismo, restavano da chiarire le modalità con cui l'ossigeno raggiunge il sito dell'ossidazione nei tessuti e i meccanismi chimici relativi alle reazioni metaboliche. Negli stessi anni, grazie anche ai lavori di Harden e Young, si era capito il meccanismo della conversione degli esosi a biossido di carbonio che ha luogo nei muscoli per mezzo di un processo anaerobico seguito da una conversione aerobica.

Successivamente Embden e Meyerhof avevano stabilito la sequenza nota come glicolisi (vedi Fig. 1).

I lavori di Wieland e di Thunberg, di Batelli e Stern, eseguiti nel periodo 1910-1920, avevano dimostrato che le sospensioni anaerobiche di tessuti animali triturati contenevano enzimi (deidrogenasi) capaci di trasferire atomi di idrogeno da certi acidi organici presenti nelle cellule — acidi succinico, fumarico, malico, citrico — al colorante blu di metilene per produrre la forma ridotta incolore (vedi Fig. 2). La riduzione del blu di metilene richiedeva la presenza di un donatore di idrogeno e di un enzima, perciò l'ossidazione dell'acido organico non richiedeva necessariamente la combinazione con l'ossigeno.



Fig. 1 - Sequenza glicolitica secondo lo schema di Embden-Meyerhof (1932).

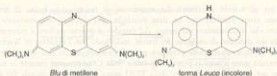


Fig. 2 - Riduzione del *Blu di Metilene* ad opera di acidi organici (Wieland - 1920).

Ma gli studi compiuti da Warburg tra il 1913 e il 1930 sui meccanismi della respirazione cellulare l'avevano portato ad affermare nel 1924 che tutte le ossidazioni cellulari sono realizzate da un unico fermento respiratorio (Atmungsferment), la cui parte attiva è simile all'eme dell'emoglobina, in quanto si tratta di un gruppo contenente ferro bivalente in grado di reagire con l'ossigeno molecolare trasformandosi in ferro a maggior stato di ossidazione, il quale a sua volta può reagire con la sostanza organica, rigenerando il ferro bivalente. Gli anni Venti videro pertanto un'accesa contrapposizione teorica tra Wieland e Warburg, il quale non volle recedere dalla sua teoria nemmeno quando Keilin nel 1926 identificò i citocromi nei tessuti muscolari e ipotizzò che essi costituissero lo stadio intermedio fra le reazioni di idrogenazione e l'azione dell'Atmungsferment. Anche Hopkins, pioniere della biochimica a Cambridge, al Congresso di Fisiologia di Stoccolma del 1926, lamentò l'eccesso di dogmatismo delle due parti, constatando che le due teorie non erano poi del tutto incompatibili, ma anzi avevano dei punti in comune, prima di tutto l'idea di una catena lineare di reazioni, con l'attivazione di ogni singolo passaggio per mezzo di enzimi specifici.

Negli anni Trenta Albert Szent-Gyorgyi avanzò l'idea che potessero essere validi entrambi i meccanismi proposti sia da Wieland che da Warburg, se si fosse considerato il metabolismo come un processo in cui non solo avvengono trasformazioni enzimatiche, ma in cui viene svolto un ruolo decisivo dai trasportatori dell'idrogeno. Egli elaborò così nel 1936 la teoria dell'acido fumarico, in cui la respirazione è considerata come un'ossidazione di triosi da parte dell'acido ossalacetico. In quest'ottica respirazione e fermentazione erano processi identici, con la differenza che nella fermentazione l'accettore di idrogeno è il piruvato, mentre nella respirazione l'accettore di idrogeno è l'ossalacetato. Szent-Gyorgyi aveva condotto esperimenti sulla respirazione del muscolo pettorale triturato di piccione, importante per l'alta velocità di respirazione.

Questa tecnica delle fettine d'organo, essenziale per lo studio del metabolismo intermedio era stata introdotta da Warburg nel 1920 e si era dimostrata subito estremamente valida, perché non era una tecnica distruttiva; prova ne sia che rimase per almeno trent'anni la tecnica all'avanguardia nei laboratori di biochimica. Essa consisteva nello sminuzzare i tessuti compatti, in modo che la maggior parte delle cellule rimanesse intatta, così dal mezzo acquoso in cui erano sospese, l'ossigeno poteva diffondere in esse con una certa velocità e anche i metaboliti potevano entrare e uscire dalle cellule senza che questo passaggio costituisse la tappa limi-

tante per gli scambi metabolici. Le sospensioni di tessuti sotto forma di fettine potevano essere incubate con un dato metabolita per studiare la conversione nel prodotto che si accumulava nel mezzo. Ad esempio si poteva studiare e misurare la velocità del consumo di ossigeno dei tessuti, misurando con l'apparato di Warburg-Barcroft la diminuzione della pressione parziale dell'ossigeno in una sospensione e mantenendo quasi a zero la pressione parziale della  $CO_2$  formatasi durante la respirazione per assorbimento da parte della KOH posta nel pozzetto centrale del recipiente (vedi Fig. 3).

In questi esperimenti Szent-Gyorgyi osservò che mentre la velocità di consumo di ossigeno nel tempo diminuisce, la velocità originale può essere ripristinata per aggiunta di sali di acido succinico, fumarico, malico o ossalacetico. Egli scoprì cioè il ruolo catalitico degli acidi bicarbonilici a quattro atomi di carbonio nell'ossidazione cellulare e suggerì che il sistema malico/ossalacetico potesse agire come uno dei trasportatori di idrogeno tra i prodotti di degradazione dei carboidrati e l'ossigeno molecolare (vedi Fig. 4).

Questo spiegava anche l'effetto Pasteur, secondo cui in coincidenza con l'inizio della respirazione cellulare l'accumulo di lattato è ridotto a zero e diminuisce drasticamente la velocità di consumo del glucosio. Infatti se piruvato e ossalacetato competono fra di loro per accettare l'idrogeno, in anaerobiosi non si produce ossa-

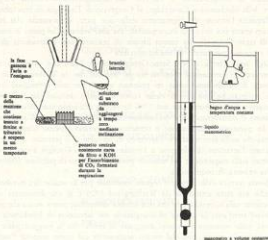


Fig. 3 - Apparato di Warburg.

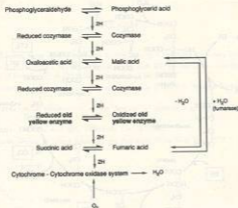


Fig. 4 - Schema di Szent-Gyorgyi.

lacetato e il carboidrato può essere metabolizzato solo per fermentazione, mentre in aerobiosi vi è produzione di ossalacetato che compete col piruvato.

Il contributo decisivo alla comprensione della respirazione cellulare fu dato nel 1937 da Krebs, il quale già da qualche anno si trovava in Inghilterra, accolto dai biochimici di Cambridge per l'amichevole interessamento di Szent-Gyorgyi, che l'aveva aiutato a sfuggire all'antisemitismo nazista. Krebs insieme con Johnson scoprì la formazione del citrato da ossalacetato e piruvato e scoprì anche che il citrato esercita sulla respirazione del muscolo pettorale di piccione un effetto catalitico dello stesso ordine di grandezza di quello del succinato osservato da Szent Gyorgyi. Allo stesso modo sono velocemente ossidati anche isocitrato, cis-acconitato e alfa-chetoglutarato, come avevano già mostrato Batelli e Stern nel 1911 lavorando sul muscolo della rana.

La teoria di Szent-Gyorgyi non spiegava invece la formazione aerobica del succinato dall'ossalacetato e dal fumarato in presenza di malonato. Krebs dimostrò che esistono due strade per arrivare al succinato dall'ossalacetato e dal fumarato: o la riduzione diretta o, se questa è impedita da qualche inibitore come il malonato, la reazione ossidativa, purché sia presente ossigeno.

Il ciclo dell'acido citrico fu così ottenuto combinando la parte ciclica dello schema di Szent-Gyorgyi con il percorso di conversione del citrato a succinato già scoperto da Martius nel 1937. Non tutti i biochimici dell'epoca però furono subito concordi con le affermazioni di Krebs: Barron e Stern ad esempio contestavano la possibilità della trasformazione ossidativa di fumarato in succinato. Altri invece come Breesch e Thomas ammettevano la realtà del ciclo dell'acido citrico, ma lo

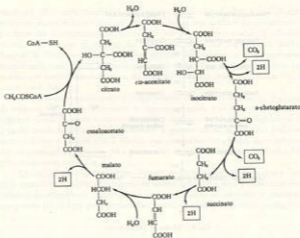


Fig. 5 - Ciclo di Krebs.

consideravano solo una reazione collaterale nel quadro delle ossidazioni biologiche. In pratica la funzione catalitica degli acidi bicarbossilici a quattro atomi di carbonio già spiegata da Szent-Gyorgyi sembrava loro un'interpretazione sufficiente.

Krebs condusse allora altri esperimenti decisivi e nel 1940 propose un ciclo più completo che comprendeva la decarbossilazione dell'acido piruvico e la sequenza di deidrogenazioni e decarbossilazioni come oggi conosciamo (vedi Fig. 5).

Più tardi furono condotte analisi di tipo isotopico con acido acetico marcato e furono isolati vari intermedi. Fra questi fu isolato l'acido alfa-chetoglutarico marcato in posizione gamma. Questo fatto mise in dubbio che il primo intermedio del ciclo fosse l'acido citrico, in quanto la molecola dell'acido citrico è simmetrica e la marcatura isotopica avrebbe dovuto porsi sull'atomo di carbonio centrale. Si pensò perciò che il primo intermedio fosse l'acido isocitrico e si parlò più genericamente di ciclo degli acidi tricarbossilici. Nel 1948 invece Ogston dimostrò che si forma proprio acido citrico come primo intermedio e che esso, pur avendo una molecola simmetrica, può reagire asimmetricamente con la sostanza marcata. Il ciclo di Krebs è inoltre una via anfibolica, cioè non ha soltanto attività catabolica, ma partecipa anche alla formazione di precursori per le vie anaboliche (per esempio parecchi aminoacidi si possono far derivare dagli intermedi del ciclo).

Ora possiamo spiegarci il carattere di punto fermo, di pietra miliare che il ciclo di Krebs ha assunto nella storia della biochimica.

BIBLIOGRAFIA

- ROBERT E. KOHLER, *From medical chemistry to biochemistry*, Cambridge University Press 1982.
- M. FLOIDIN, E.H. STOLTZ, *A History of Biochemistry*, part III: *History of the clarification of the Sources of Free Energy in Organism*, Amsterdam, Elsevier 1975.
- DAVID NACHMANSOHN, *German-Jewish Pioneers in Science 1900-1933*, Springer-Verlag New York 1979.
- ALBERT SZENT-GYORGYI, *Observations on the function of peroxidase system*, «*Biochem. J.*», 22 (1928).
- HANS A. KREBS, *The citric acid cycle*, «*Biochem. J.*», 34 (1940).
- HANS A. KREBS, *Tribute to Albert Szent-Gyorgyi*, Academic Press New York 1977.