

# BIOCHEMIE des Stoffwechsels (772.113)

## 4. Einheit

### Glycolyse (1)

Wie werden nun Moleküle in der lebenden Zelle synthetisiert und abgebaut? Wie funktioniert der Intermediärstoffwechsel?

Der **Intermediärstoffwechsel** hat zwei Aufgaben:

- A. Energiegewinnung** für die Synthese von Makromolekülen und anderen energieabhängigen Prozessen.
- B. Versorgung dieser Prozesse mit den notwendigen Ausgangsstoffen:** Aminosäuren (Protein-Biosynthese), Fettsäuren (Lipid-Biosynthese), Nucleosidtriphosphate (Nucleinsäure-Synthese) und Zucker (Polysaccharid-Synthese)

Der Bedarf an Energie und Ausgangsstoffen variiert bei den verschiedenen biologischen Prozessen beträchtlich.

Lebewesen halten ein **Fließgleichgewicht** aufrecht. Die Konzentration an Schlüsselmetaboliten ist innerhalb verschiedener Zellkompartimente bemerkenswert stabil (**Homöostase**).

Die Bedürfnisse der verschiedenen Lebensformen sind zwar ähnlich. Sie benötigen Energie (**ATP**), Reduktionsäquivalente (z.B. **NADPH**) und Bausteine ("**Kohlenstoff-Quellen**") für Biosynthesen. Die Anforderungen erfüllen die verschiedenen Lebewesen aber auf sehr unterschiedliche Weise. Prinzipiell unterscheidet man

**(A) AUTOTROPHE ORGANISMEN:** Sie nutzen ihre anorganische Umwelt ohne Rückgriff auf Verbindungen, die von anderen Organismen stammen. Sie bauen ihre Kohlenstoffverbindungen aus  $\text{CO}_2$  oder Carbonat auf.

**Chemoautotrophe Organismen** gewinnen ATP und Reduktionsäquivalente aus der Oxidation anorganischer Materialien wie Wasserstoff ( $\text{H}_2$ ) oder reduzierten Schwefel ( $\text{H}_2\text{S}$ ) oder Stickstoffverbindungen ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) oder Metall-Ionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ). Dazu gehören nitrifizierende Bakterien und Wasserstoff-, Schwefel- oder Eisenbakterien.

**Photoautotrophe Organismen**

#### A) AUTOTROPHE ORGANISMEN

##### Chemoautotrophe Organismen

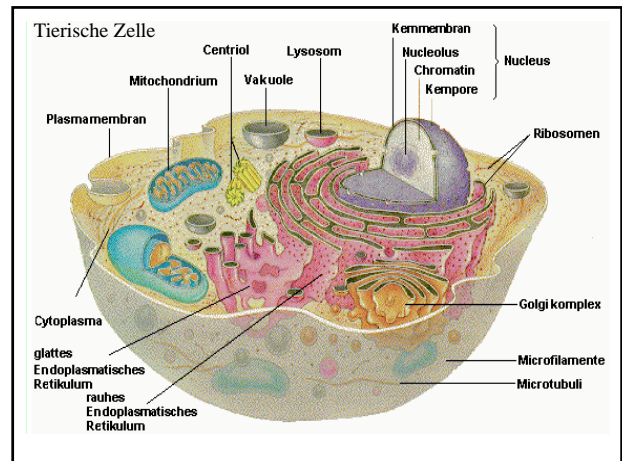
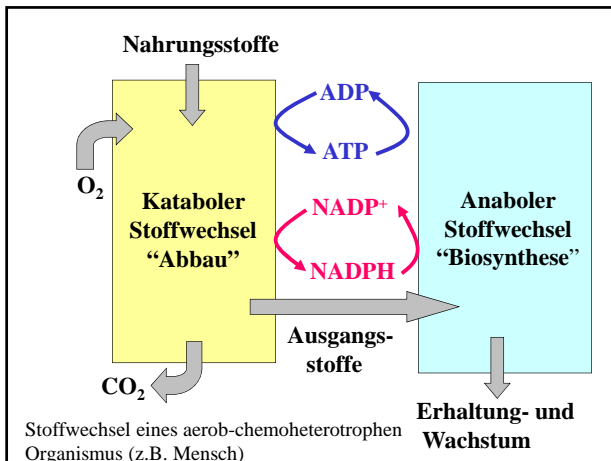
**Photoautotrophe Organismen** erhalten ihr ATP aus einer Phosphorylierung durch photochemisch getriebenen (cyclischen) Elektronentransport. **Oxygene photoautotrophe Organismen** (Pflanzen, Cyanobakterien) nutzen die Energie des Sonnenlichts um aus Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) Elektronen zu entziehen und setzen bei diesem Prozeß molekularen Sauerstoff frei. Andere photoautotrophe Organismen entziehen die Elektronen aus  $\text{H}_2\text{S}$  oder anderen anorganischen Verbindungen (**anoxigene phototrophe Bakterien**). Immer ist Sonnenlicht die Energiequelle, wodurch diese Organismen unabhängig von allen Kohlenstoff- (außer  $\text{CO}_2$ ) und Elektronenquellen sind (außer  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{H}_2\text{S}$  usw.).

**(B) HETEROTROPHE ORGANISMEN** sind abhängig von vorhandenen organischen Verbindungen für alle primären Erfordernisse. Die heterotrophe Zelle lebt auf Kosten von Verbindungen, die von anderen Zellen gebildet werden; sie ist zu keinem NETTOEINBAU von Kohlendioxid in organische Verbindungen in der Lage. Als Kohlenstoffquelle dienen organische Verbindungen der Nahrung.

**Chemoheterotrophe Organismen** (Mensch, Tiere, viele Mikroorganismen und nicht photosynthetisch aktives pflanzliches Gewebe). Sowohl ATP als auch NADPH werden durch Oxidation von organischen Verbindungen gewonnen.

**Photoheterotrophe Organismen** können ATP photochemisch regenerieren, aber sie können photochemisch keine Elektronen auf  $\text{NADP}^+$  übertragen. NADPH wird durch Oxidation von organischen Verbindungen gewonnen.

| Organismen-Typ    | Quelle von ATP                          | Quelle des NADPH                            | Quelle des Kohlenstoff  | Beispiele  |
|-------------------|---|---|-------------------------|--|
| CHEMO-AUTOTROPH   | Oxidation v. anorganischen Verbindungen | Oxidation v. anorganischen Verbindungen     | $\text{CO}_2$           | Wasserstoff, Schwefel, Eisen und denitrifizierende Bakterien |
| PHOTO-AUTOTROPH   | Sonnenlicht                             | $\text{H}_2\text{O}$ , $\text{H}_2\text{S}$ | $\text{CO}_2$           | Höhere Pflanzen, Cyanobakt., Schwefelpurpurbakt.             |
| PHOTO-HETEROTROPH | Sonnenlicht                             | Oxidation v. organischen Verbindungen       | Organische Verbindungen | Nicht-Schwefelpurpurbakt.                                    |
| CHEMO-HETEROTROPH | Oxidation v. organischen Verbindungen   | Oxidation v. organischen Verbindungen       | Organische Verbindungen | Mensch, höhere Tiere, nicht-photosynthet. Pflanzenzellen     |



**Kompartimentierung/Stoffwechselfunktion tierischer Organellen**

| Kompartiment  | Funktion   |
|---------------|--|
| Mitochondrium | Citronensäure-Cyclus, oxidative Phosphorylierung, Fettsäureoxidation, Aminosäureabbau                          |
| Cytosol       | Glycolyse, Pentosephosphatweg, Fettsäurebiosynthese, viele Reaktionen der Gluconeogenese, Glycogenstoffwechsel |
| Lysosomen     | Enzymatische Verdauung von Zellkomponenten und aufgenommenen Stoffen   |

|   |  |
|---|--|
| Zellkern                                  | DNA-Replikation und Transkription, RNA-Processing  |
| Golgi-Apparat                             | Posttranslationale Modifikation von Membran- und sekretorischen Proteinen; Bildung von Plasmamembranen und sekretorischen Vesikeln |
| Raues Endoplasmatisches Retikulum         | Synthese von membrangebundenen und sekretorischen Proteinen  |
| Glattes Endoplasmatisches Retikulum       | Lipid- und Steroidbiosynthese  |
| Peroxisomen<br>(bei Pflanzen Glyoxisomen) | Aminosäure-Abbau und Fettsäure-Oxidation<br>(bei Pflanzen Reaktionen des Glyoxylatzyklus)  |

Historische Perspektive

**Louis Pasteur:** Die enzymatische Umsetzung von Glucose zu Ethanol wird durch Mikroorganismen verursacht (1854-1864).

**Eduard Buchner:** Umsetzung erfolgt auch in zellfreien Extrakten (1897).

**Arthur Harden und William Young:** Im Jahre 1905 beobachteten A. HARDEN und W. YOUNG, dass der Glucoseabbau zum Erliegen kommt, sofern nicht ausreichende Mengen an anorganischem Phosphat angeboten werden. Es wird letztlich dazu benötigt, Zucker zu phosphorylieren. Sie isolierten ein Hexosebisphosphat, das später als Fructose-1,6-bisphosphat identifiziert wurde, und zeigten, dass es sich dabei um ein Zwischenprodukt des Glucoseabbaus handelt.

Louis Pasteur

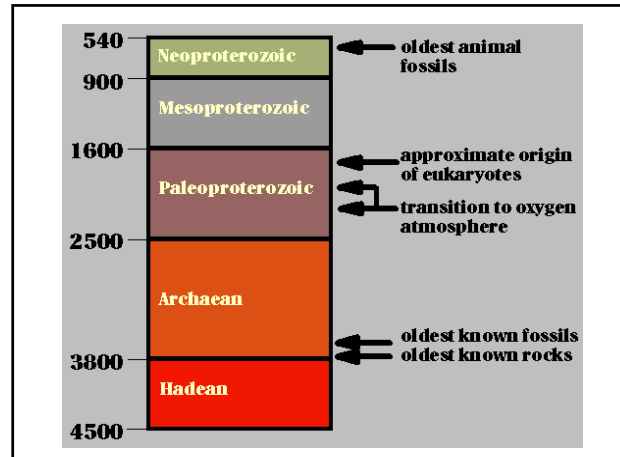
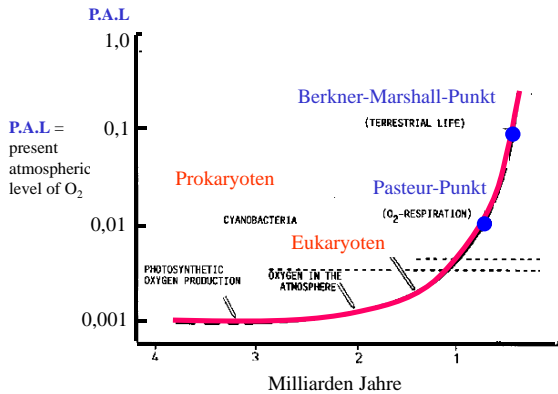
**Arthur Harden und William Young:** Ein zellfreier Extrakt kann durch Dialyse in zwei Fraktionen zerlegt werden: Nicht dialysierbare, wärmlabile Fraktion („Zymase“, später Enzyme genannt) und dialysierbare, wärmostabile Fraktion („Cozymase“, später Coenzyme oder Cofaktoren genannt) (1910).

1940: Der gesamte Stoffwechselweg der Glycolyse (griech.: γλυκος, glykos, süß; λυσις, lysis, Auflösung) ist aufgeklärt.

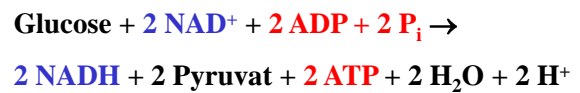
**Gustav Embden, Otto Meyerhof, Jacob Parnas (EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS-WEG),** Carl Cori, Gerti Cori, Carl Neuberg, Robert Robinson und Otto Warburg.

Die Reaktionsfolge der Umsetzung von Glucose in Pyruvat (= Glycolyse oder Fructose-1,6-bisphosphat-Weg) ist in allen Lebewesen sehr ähnlich. Der Prozeß ist evolutionsgeschichtlich sehr alt und wahrscheinlich in anaerober Umgebung entstanden. Keiner der Reaktionsschritte benötigt Sauerstoff.

Glycolyse ist ein prinzipiell anaerober Vorgang (keiner der 10 Reaktionsschritte ist auf die Anwesenheit von O<sub>2</sub> angewiesen)

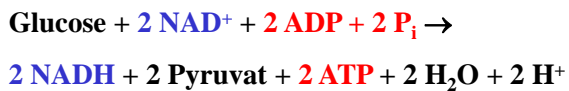


Sämtliche glycolytischen Enzyme sind im **Cytosol** lokalisiert. Alle sind lösliche Enzyme. Die Zwischenprodukte gelangen durch freie Diffusion zum Folgeenzym.



Chemische Strategie:

1. Addition von Phosphorylgruppen an Glucose
2. Chemische Umwandlung der phosphorylierten Zwischenprodukte in Verbindungen mit hohen Gruppenübertragungspotentialen
3. Chemische Kopplung der Hydrolyse von Intermediaten mit hohem Phosphorylierungspotential an die ATP-Synthese (Substratkettenphosphorylierung)

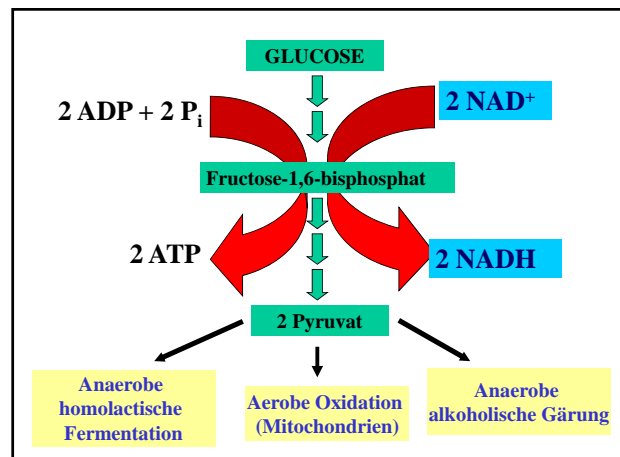


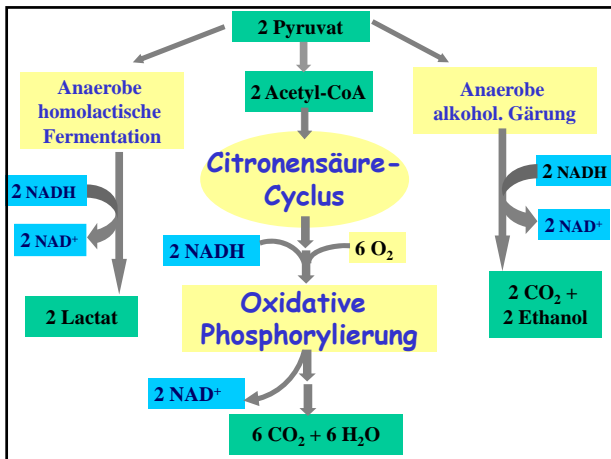
10 Reaktionen:

**Reaktion 1-5:** Vorbereitende Phase. Überführung von Glucose in zwei Moleküle Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Investition von Energie (Verbrauch von 2 ATP-Molekülen pro Glucose)

**Reaktion 6-10:** Überführung der 2 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Moleküle in Pyruvat (Bildung von 4 ATP Molekülen pro Glucose).

Umwandlung von Glucose (C<sub>6</sub>-Körper) in zwei Pyruvat (C<sub>3</sub>-Körper) mit niedrigerer Freier Enthalpie. Nettogewinn von 2 ATP pro Glucose





### Regeneration des NAD<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup> ist das Hauptoxidationsmittel der Glycolyse. Das gebildete NADH muss kontinuierlich reoxidiert werden.

3 Wege:

1. Muskel: Regeneration von NAD<sup>+</sup> unter anaeroben Bedingungen. Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch NADH.  
**HOMOLACTISCHE GÄRUNG**
2. Hefe: Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd unter anaeroben Bedingungen. Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol durch NADH.  
**ALKOHOLISCHE GÄRUNG**
3. Mitochondrien: Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Oxidation von NADH in der Atmungskette unter Bildung von 2,5 bis 3 ATP pro NADH  
**OXIDATIVE PHOSPHORYLIERUNG**

### Inhaltsverzeichnis Glycolyse

1. Glucosetransport
2. Abfolge der chemischen Umwandlungen der Glucose in Pyruvat (10 Reaktionen)
3. Mechanismen der einzelnen Reaktionen
4. Thermodynamik und Regulation
5. Anaerobe homolactische Fermentation und anaerobe alkoholische Gärung
6. Einschleusen von Galactose, Mannose, Fructose und Glycerin in die Glykolyse

### Inhaltsverzeichnis Glycolyse

#### 1. Glucosetransport

Warum ist Glucose ein wichtiger und weit verbreiteter Brennstoff?

In Säugern ist Glucose der einzige Brennstoff für das Gehirn (abgesehen vom Hungerzustand) und von Erythrocyten. Gründe?

Glucose kann unter präbiotischen Bedingungen aus Formaldehyd entstehen.

Hohe Stabilität: alle Hydroxylgruppen in der Ringkonformation der  $\beta$ -D-Glucose liegen äquatorial.

Glucose hat geringe Tendenz Proteine zu glycosylieren und reagiert nicht mit Aminogruppen von Proteinen, da Ringbildung dominiert.

Die meisten eukaryotischen Zellen nehmen **D-Glucose** schnell, L-Glucose jedoch überhaupt nicht auf (hohe Spezifität biologischer Transportsysteme).

Der Glucosetransport über die Plasmamembran wird durch erleichterte Diffusion mit einem speziellen Transportsystem katalysiert. Bei **erleichterter Diffusion** folgt der Nettofluss prinzipiell dem Konzentrationsgradienten.

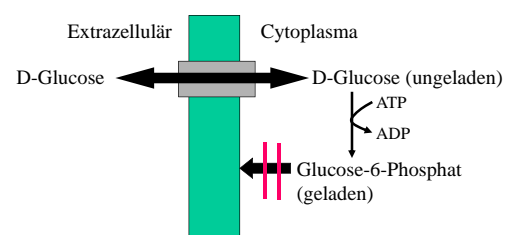
Muskelzellen übernehmen Glucose dennoch ständig aus dem Blut, weil die von der Zelle aufgenommene Glucose in einer schnellen Stoffwechselreaktion (1. Reaktion der Glycolyse) sofort in nicht mehr permeables **Glucose-6-Phosphat (G6P)** umgewandelt wird. Dadurch wird erreicht, dass

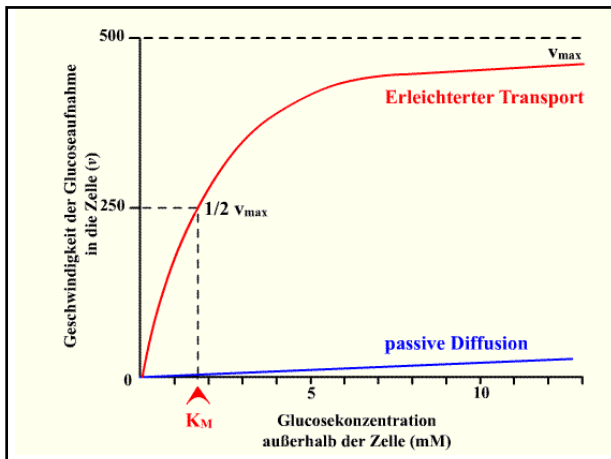
1. die geladene Form in der Zelle bleibt (Membran impermeabel für G6P) und die
2. intrazelluläre Konzentration von Glucose gering ist und dadurch die Diffusion in die Zelle begünstigt wird

Allgemein gilt, dass bei einem ungeladenen Stoff die Änderung der Freien Enthalpie bei der Bewegung dieses Moleküls vom Kompartiment 1, indem es in der Konzentration  $c_1$  vorliegt, in ein Kompartiment mit der Konzentration  $c_2$  folgendermaßen ist:

$$\Delta G_{1 \rightarrow 2} = RT \ln(c_2/c_1) = 2,3RT \log(c_2/c_1)$$

Der Nettofluss endet, wenn  $c_2 = c_1$ .



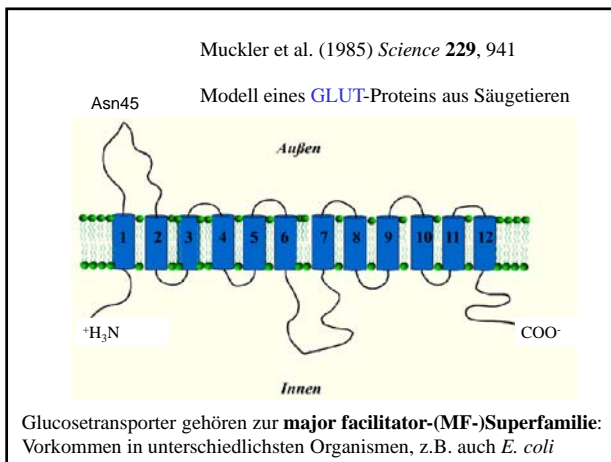


Die thermodynamisch begünstigte Bewegung von Glucose durch die Plasmamembran tierischer Zellen wird durch mehrere **Glucosetransportproteine** vermittelt. Bezeichnung der Mitglieder dieser Proteinfamilie mit **GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4** und **GLUT5.....GLUT10 (Isoformen mit funktioneller Spezialisierung)**.

Typisches Strukturmotif: Integrale Membranproteine mit zwölf Transmembransegmenten ( $\alpha$ -Helices).

Transport des Zuckermoleküls durch Konformationsänderung innerhalb des Transportproteins. Noch keine 3-D-Struktur bekannt.

Die verschiedenen Mitglieder unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation (Gewebe, Organ), der Kinetik des Glucose-Transports ( $K_M$ ), der Regulation, und des Expressionsmusters.



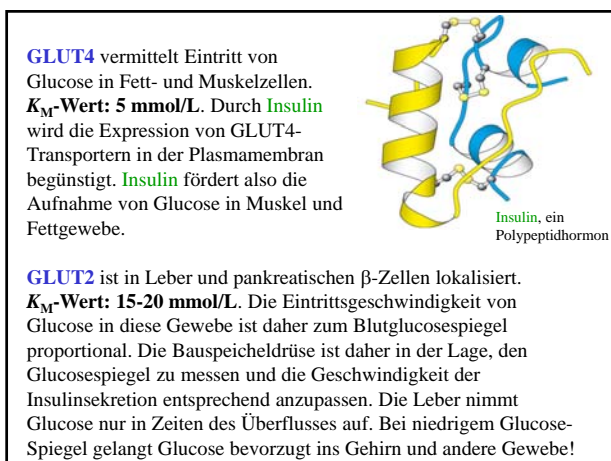
Typischer Serumglucosespiegel: 4-8 mmol/L

Dünndarm: Resorption von Glucose aus dem Darm durch **Symport: Na<sup>+</sup>-Glucose Symporter**. Pumpt Glucose aus dem Dünndarm in die Darmepithelzellen.

**GLUT5**: Expression in Dünndarm und Niere. Entläßt Glucose aus den Darmepithelzellen in den Blutstrom durch **erleichterte Diffusion**. Auch Fructosetransporter.

**GLUT1** und **GLUT3** werden in Erythrocyten, Gehirn und Plazenta exprimiert und stellen in diesen Organen die Grundversorgung mit Glucose sicher. Transportieren ständig Glucose mit mehr oder weniger konstanter Geschwindigkeit.  $K_M$ -Wert: **1 mmol/L**. Transport durch **erleichterte Diffusion**.

**GLUT4**: Expression in Skelettmuskel, Fettzellen und Herz.  $K_M$ -Wert: **5 mmol/L**. Durch **Insulin** wird die Expression und Einbau von GLUT4-Transportern in der Plasmamembran begünstigt. **Insulin** fördert also die Aufnahme von Glucose in Muskel und Fettgewebe.



| Transporter                                    | Expressionsort   | $K_M$ -Wert          |
|--|--|----------------------|
| GluT-1 (human erythrocyte glucose transporter) | ubiquitär; Perineurium, Erythrocyten, Keimzentren u.a. GluT-1+ Tumoren. Spezifischer Marker des Perineuriums in peripheren Nerven und neurotrophen Tumoren. Gilt als spezifischer Marker unreifer Endothelien. | 6,9                  |
| GluT-2   | Leber, Niere, Darmepithel und $\beta$ -Zellen des Pankreas   | 11,2                 |
| GluT-3   | Gehirn, Plazenta   | 1,4                  |
| GluT-4   | Skelettmuskel, Fettzellen, Herz  | 4,6                  |
| GluT-5   | Dünndarm, Spermatozoen, Niere  | 6                    |
| GluT-8   | Hoden, Skelettmuskel, Gehirn   | 2,4                  |
| GluT-9-1                                       | Niere, Leber   | bisher nicht bekannt |
| GluT-9-2                                       | Gehirn, Milz, Leukocyten   | bisher nicht bekannt |
| GluT-10-1                                      | Leber, Pankreas  | bisher nicht bekannt |
| GluT-10-2                                      | bisher nicht bekannt   | bisher nicht bekannt |
| SGLT-1 (aktiver Glucose-Transport)             | Dünndarm, Niere  | 0,1 bis 0,8          |
| SGLT-2 (aktiver Glucose-Transport)             | Niere  | 1,5 bis 6            |

Diese Tabelle soll nur die Komplexität bezüglich Verteilung und Funktionalität von Isoformen von Proteinen in höheren Organismen unterstreichen.

## Inhaltsverzeichnis Glycolyse

1. Glucosetransport
2. Abfolge der chemischen Umwandlungen der Glucose in Pyruvat (10 Reaktionen)

## Reaktionen und Thermodynamik der Glycolyse

| Reaktion   | Enzym                     | $\Delta G^{\ominus'}$<br>kJ/mol | $K_{eq}$<br>25°C     | $\Delta G^+$<br>kJ/mol |
|--|---------------------------|---------------------------------|----------------------|------------------------|
| $\alpha$ -D-Glucose + ATP <sup>4-</sup> $\rightleftharpoons$ Glucose-6-Phosphat + ADP <sup>3-</sup> + H <sup>+</sup>       | Hexokinase                | -16,7                           | 850                  | -33,9                  |
| Glucose-6-Phosphat $\rightleftharpoons$ Fructose-6-Phosphat  | Glucosephosphat Isomerase | +1,67                           | 0,51                 | -2,92                  |
| Fructose-6-Phosphat + ATP <sup>4-</sup> $\rightleftharpoons$ Fructose-1,6-Bisphosphat + ADP <sup>3-</sup> + H <sup>+</sup> | Phosphofruktokinase       | -14,2                           | 310                  | -18,8                  |
| Fructose-1,6-bisphosphat $\rightleftharpoons$ Dihydroxyacetonphosphat + Glycerinaldehyd-3-P                                | Aldolase                  | +23,9                           | $6,4 \times 10^{-5}$ | -0,23                  |

| Reaktion  | Enzym                             | $\Delta G^{\ominus'}$<br>kJ/mol | $K_{eq}$           | $\Delta G^+$<br>kJ/mol |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|
| Dihydroxyacetonphosphat $\rightleftharpoons$ Glycerinaldehyd-3-P  | Triosephosphat-Isomerase          | 7,56                            | 0,0472             | 2,41                   |
| Glycerinaldehyd-3-P + P <sub>i</sub> + NAD <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ 1,3-Bisphosphoglycerat + NADH + H <sup>+</sup> | Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase | +6,3                            | 0,0786             | -1,29                  |
| 1,3-Bisphosphoglycerat + ADP <sup>3-</sup> $\rightleftharpoons$ 3-Phosphoglycerat + ATP <sup>4-</sup>                       | Phosphoglycerat-Kinase            | -18,9                           | 2060               | +0,1                   |
| 3-Phosphoglycerat $\rightleftharpoons$ 2-Phosphoglycerat  | Phosphoglycerat-Mutase            | +4,4                            | 0,169              | +0,83                  |
| 2-Phosphoglycerat $\rightleftharpoons$ Phosphoenolpyruvat + H <sub>2</sub> O  | Enolase                           | +1,8                            | 0,483              | +1,1                   |
| Phosphoenolpyruvat + ADP <sup>3-</sup> + H <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ Pyruvat + ATP <sup>4-</sup>                    | Pyruvatkinase                     | -31,7                           | $3,63 \times 10^5$ | -23                    |
| Pyruvat + NADH + H <sup>+</sup> $\rightleftharpoons$ Lactat + NAD <sup>+</sup>  | Lactat-Dehydrogenase              | -25,2                           | $2,63 \times 10^4$ | -14,8                  |

## Typische Konzentrationen von Intermediaten der Glycolyse in Erythrocyten

| Metabolit                  | mM    |
|----------------------------|-------|
| Glucose-6-phosphat         | 0,083 |
| Fructose-6-phosphat        | 0,014 |
| Fructose-1,6-bisphosphat   | 0,031 |
| Dihydroxyacetonphosphat    | 0,14  |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat | 0,019 |
| 1,3-Bisphosphoglycerat     | 0,001 |
| 2,3-Bisphosphoglycerat     | 4,0   |
| 3-Phosphoglycerat          | 0,12  |
| 2-Phosphoglycerat          | 0,030 |
| Phosphoenolpyruvat         | 0,023 |
| Pyruvat                    | 0,051 |
| Lactat                     | 2,9   |
| ATP                        | 1,85  |
| ADP                        | 0,14  |
| P <sub>i</sub>             | 1,0   |

### Energetik der Umwandlung von Glucose in Lactat:

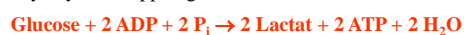


Es findet keine Netto-Oxidation oder -Reduktion bei der Umwandlung von Glucose in Lactat statt (d.h. Oxidations- und Reduktionsreaktionen kompensieren sich). Bindungen lagern sich um, jedoch werden Elektronen weder gewonnen noch gehen sie verloren.

Nur ein Teil der Energie, die in Glucose steckt, wird in Form von 2 ATP gewonnen:



Glycolyse = Kopplung der Reaktionen:



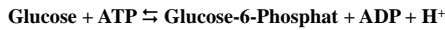
$\Delta G^{\ominus'} = -183,6 + 61 = -122,6 \text{ kJ/mol}$  (33% Wirkungsgrad; Realität: 50%)

## Inhaltsverzeichnis Glycolyse

1. Glucosetransport
2. Abfolge der chemischen Umwandlungen der Glucose in Pyruvat (10 Reaktionen)
3. Mechanismen der einzelnen Reaktionen



## Glycolyse 1. Reaktion: Hexokinase, Glucokinase



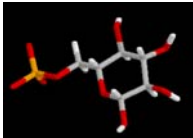
**Enzyme:** D-Hexose-6-Phosphotransferase (E.C. 2.7.1.1)

**Hexokinase**

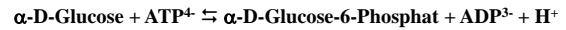
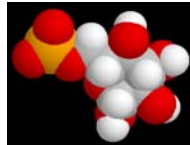
**Glucokinase**

**Cofaktoren:** Magnesiumionen ( $\text{Mg}^{2+}$ )

Glucose-6-Phosphat



Glucose-6-Phosphat



Phosphorylierung von Glucose: + 13,8 kJ/mol

Hydrolyse von ATP: - 30,5 kJ/mol

$$\Delta G^{\ominus} = -16,7 \text{ kJ/mol} \quad (K_{\text{eq}} = 850)$$

Standardbedingungen  
(Konzentrationen = 1 mol/l)

Realität (Erythrocyten): [Glu] = 5 mM, [ATP] = 1,85 mM,  
[G-6-P] = 0,083 mM,  
[ADP] = 0,14 mM.

$$\Delta G' = \Delta G^{\ominus} + RT \ln \left\{ \frac{[\text{G-6-P}][\text{ADP}]}{[\text{Glu}][\text{ATP}]} \right\} =$$

$$\Delta G' = -16,7 \text{ kJ/mol} + (8,314 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(310\text{K}) \ln \left\{ \frac{[0,083][0,14]}{[5,0][1,85]} \right\} =$$

$$\Delta G' = -33,9 \text{ kJ/mol}$$

D-Glucose wird also im Cytoplasma phosphoryliert, wobei die Phosphorylgruppe aus ATP stammt. Enzyme, die Phosphorylgruppen übertragen heißen **Kinasen**. Im enzymatischen Namen scheint auch das Akzeptormolekül auf. Im Menschen sind zwei Enzyme für die Umwandlung von Glucose in Glucose-6-Phosphat zuständig:

**Hexokinase:** Überträgt Phosphorylgruppe auf Hexosen, ist also **unspezifisch** hinsichtlich des Akzeptors. Substrate sind D-Glucose, D-Mannose und D-Fruktose.

$K_M$  (Glucose) = **0,1 mM**;

**Vorkommen:** ubiquitär; verschiedene gewebsspezifische **Isoenzyme** mit unterschiedl. kinetischen Eigenschaften. Humane **Hexokinase** ist Monomer mit etwa 100 kDa.

**Regulation:** Allosterische Hemmung durch Glucose-6-Phosphat (G6P) (Produktthemmung)

**Glucokinase:** Überträgt Phosphorylgruppe spezifisch nur auf D-Glucose.  $K_M$  (Glucose) = **10 mM**;

**Vorkommen:** nur in der Leber

Humane **Glucokinase** ist Monomer mit etwa 50 kDa.

**Glucokinase** wird im Gegensatz zur **Hexokinase** nicht durch das Reaktionsprodukt G6P inhibiert. Seine Expression wird jedoch durch Insulin induziert. **Glucokinase** ist an der Regulation des Blutglucose-Spiegels beteiligt.

Die Aufgabe der **Glucokinase** besteht darin, Glucose-6-Phosphat für die Synthese von Glycogen (Glucose-Speicherform) in der Leber zu liefern.

Der hohe  $K_M$ -Wert der **Glucokinase** garantiert die Glucose-Grundversorgung des Gehirns und der Muskulatur.





**Frage:** Warum überträgt die *Kinase* die Phosphorylgruppe so spezifisch auf Glucose und nicht auf Wasser (unter Bildung von ADP und P<sub>i</sub>; ATPase-Aktivität)?

Wasserkonzentration: 55 mol/l.

Wasser klein genug für Bindungsstelle der *Kinase*

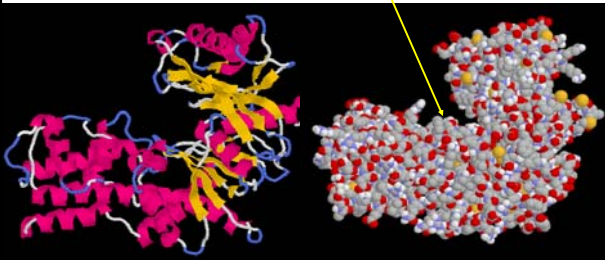
Phosphorylgruppenübertragung des ATP auf Wasser ist stärker exergonisch als Übertragung auf Glucose.

**Realität:** Die *Hexokinase* katalysiert die Übertragung auf Glucose 40 000mal schneller als auf Wasser

**Ursache:** Reaktionsmechanismus: Random-Bi-Bi-Mechanismus mit tiefgreifender Konformationsänderung

Hexokinase (Mensch)

Spalt: Aktives Zentrum

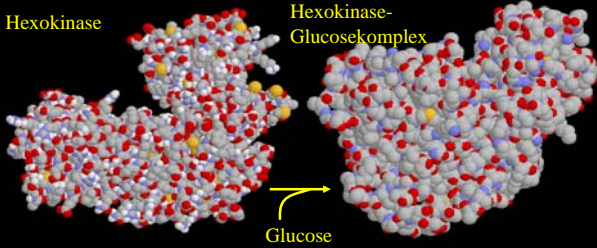


Binden von Glucose: tiefgreifende Konformationsänderung. Die beiden „Lappen“ bewegen sich bis zu 8 Å aufeinander zu und umschließen das Substrat Glucose (*induced fit*).

Hexokinase

Hexokinase-Glucosekomplex

Glucose



**Katalyse durch Annäherungseffekte.** Binden von Glucose bewirkt Schließung der Enzymklappen und bringt die 5-Hydroxymethylgruppe der D-Glucose in unmittelbare Nachbarschaft von bereits gebundenem ATP-Mg<sup>2+</sup>.

Substratinduzierte Konformationsänderung des Enzyms.

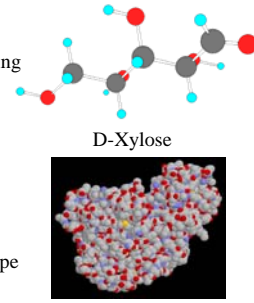
Ausschluß von Wasser: Reduktion der Polarität des aktiven Zentrums, nucleophiler Reaktionsprozeß wird beschleunigt.

**Beweis des Reaktionsmechanismus:**

Reaktion mit Pseudosubstrat  $\alpha$ -D-Xylose. Die  $\alpha$ -D-Xylose unterscheidet sich von der D-Glucose durch das Fehlen der 5-Hydroxymethylgruppe.

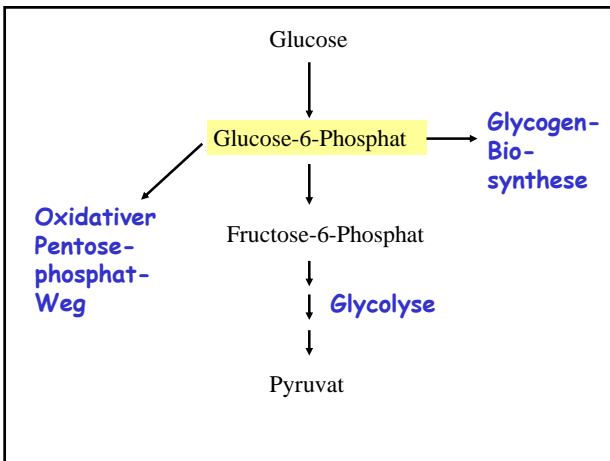
Hexokinase bindet  $\alpha$ -D-Xylose; es wird die idente Konformationsänderung durchgeführt (*induced fit*), jedoch überwiegt die ATPase-Aktivität der Hexokinase.

Ursache: In der fehlenden 5-Hydroxymethylgruppen-Position ist Platz für ein Wassermolekül, das nun als Akzeptor der Phosphorylgruppe fungiert.



D-Xylose

Induced fit durch Xylose



**Glycolyse 2. Reaktion: Glucosephosphat-Isomerase**

Glucose-6-Phosphat  $\rightleftharpoons$  Fructose-6-Phosphat

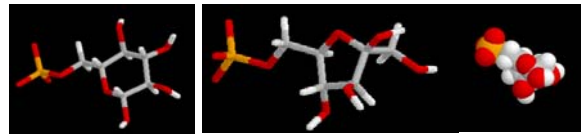
Enzym: Isomerase (E.C. 5.3.1.x)

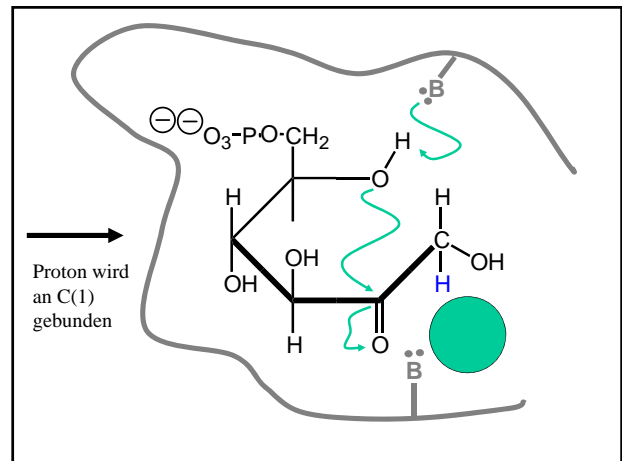
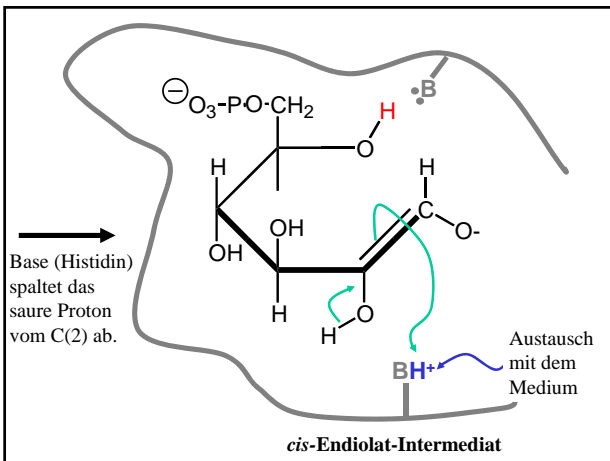
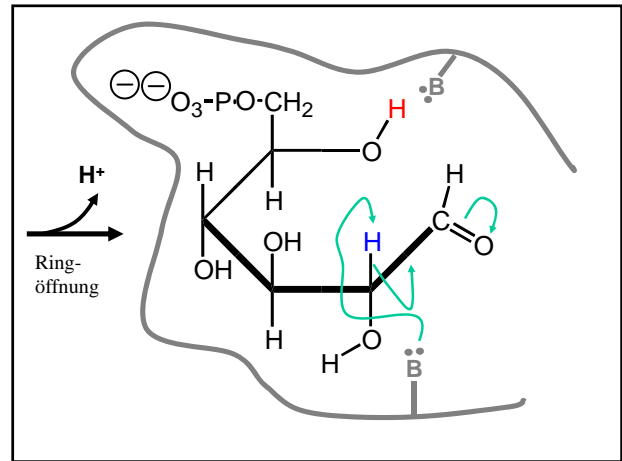
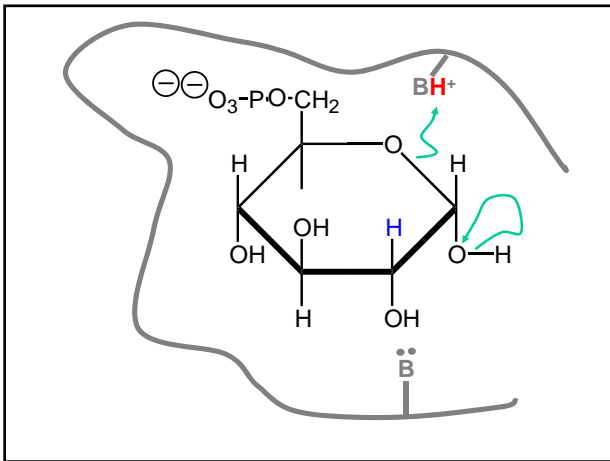
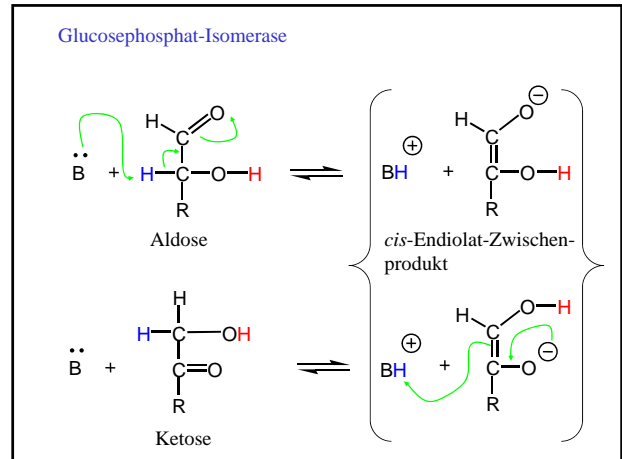
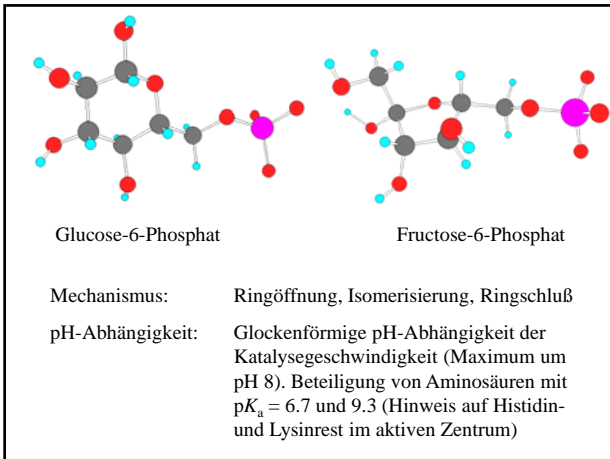
Glucosephosphat-Isomerase (Phosphoglucosomerase)

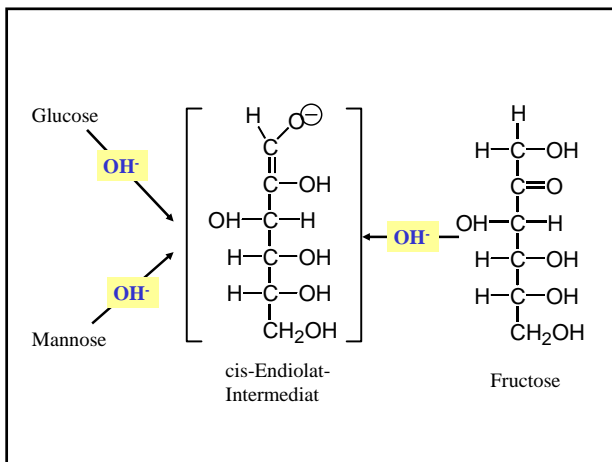
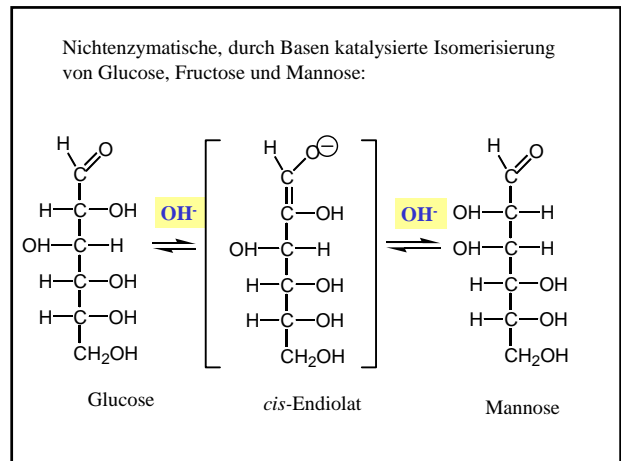
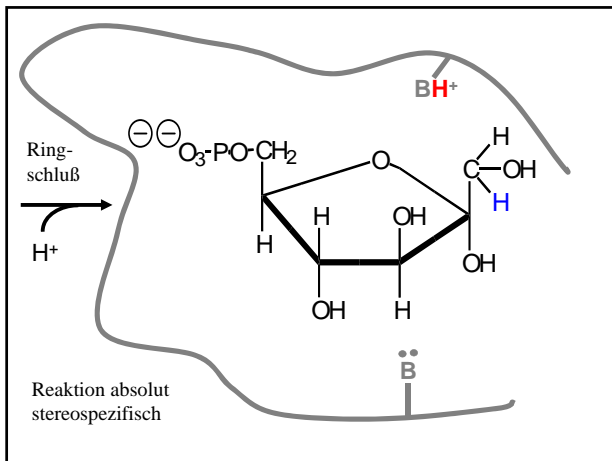
Dimer, 2  $\times$  61 kDa (Kaninchenmuskel)

Glucose-6-Phosphat

Fructose-6-Phosphat







**Glycolyse 3. Reaktion: Phosphofruktokinase**

**Fructose-6-Phosphat + ATP  $\rightleftharpoons$  Fructose-1,6-bisphosphat + ADP + H<sup>+</sup>**

Enzym: **Phosphotransferase**  
**Phosphofruktokinase (E.C. 2.7.1.11)**  
 Tetramer 4x78 kDa (Kaninchenmuskel)

Fructose-6-Phosphat      Fructose-1,6-bisphosphat

Fructose-6-Phosphat      Fructose-1,6-bisphosphat

ATP  $\xrightarrow{\text{PFK, Mg}^{2+}}$  ADP + H<sup>+</sup>

Mechanismus:  
 Wie bei der Hexokinase-Reaktion. Nucleophiler Angriff der C(1)-OH-Gruppe von Fructose-6-Phosphat am elektrophilen  $\gamma$ -Phosphoratom des Mg<sup>2+</sup>-ATP-Komplexes.  
 Katalyse durch Annäherungseffekte. Substratinduzierte Konformationsänderung des Enzyms (*induced fit*).

ATP + Fructose-6-P  $\rightleftharpoons$  Fructose-1,6-bisphosphat + ADP + H<sup>+</sup>

Gekoppelte Reaktion:  
 Fructose-6-P + P<sub>i</sub>  $\rightarrow$  Fructose-1,6-bisphosphat  $\Delta G^{\ominus'}$  = 16,3 kJ/mol  
 Hydrolyse von ATP  $\Delta G^{\ominus'}$  = - 30,5 kJ/mol

**Gekoppelte Reaktion  $\Delta G^{\ominus'}$  = - 14,2 kJ/mol**

### Glycolyse 4. Reaktion: Aldolase

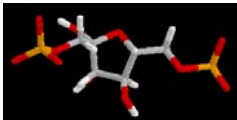
Fructose-1,6-bisphosphat  $\rightleftharpoons$  Glycerinaldehyd-3-P + Dihydroxyacetonphosphat

Enzym: Lyase

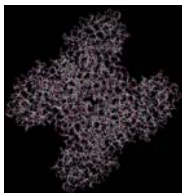
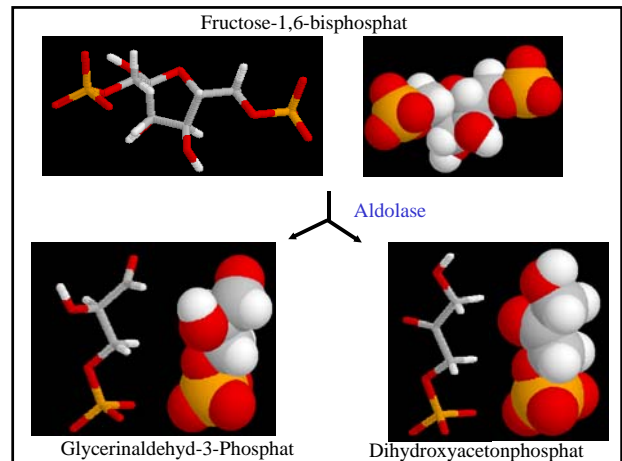
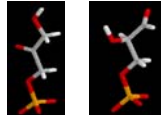
**Aldolase** (E.C. 4.1.2.13)

Tetramer 4  $\times$  40 kDa (Kaninchenmuskel)

Fructose-1,6-bisphosphat

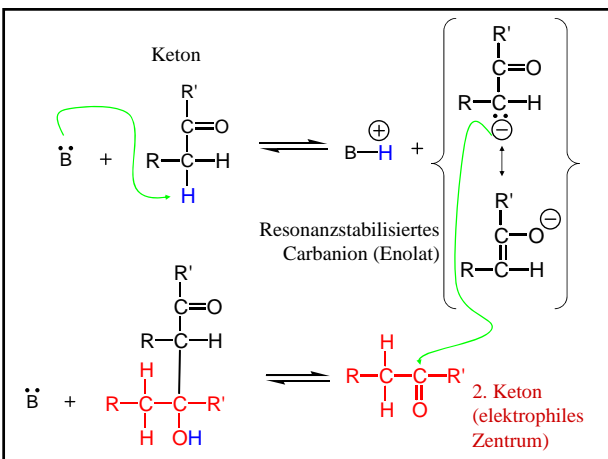
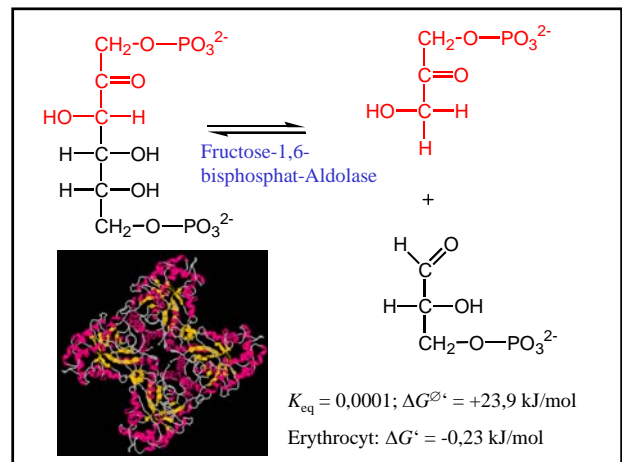
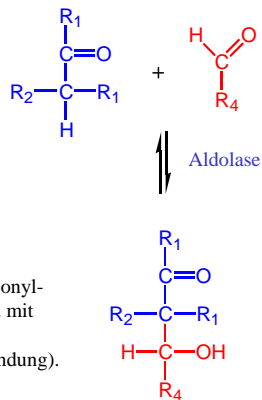


Dihydroxyacetonphosphat,  
Glycerinaldehyd-3-P



Aldolase (Tetramer)

**Aldolkondensation** ist die Verknüpfung von zwei Carbonylverbindungen (z.B. Aldehyd mit Keton) zu einem Aldol (=  $\beta$ -Hydroxycarbonylverbindung).



Nach der Art des Reaktionsmechanismus werden 2 Klassen von Aldolasen unterschieden:

**Klasse-I-Aldolasen:** Bildung einer **Schiff'schen Base** zwischen einem Lysinrest im aktiven Zentrum und der Carbonylgruppe des Substrates.

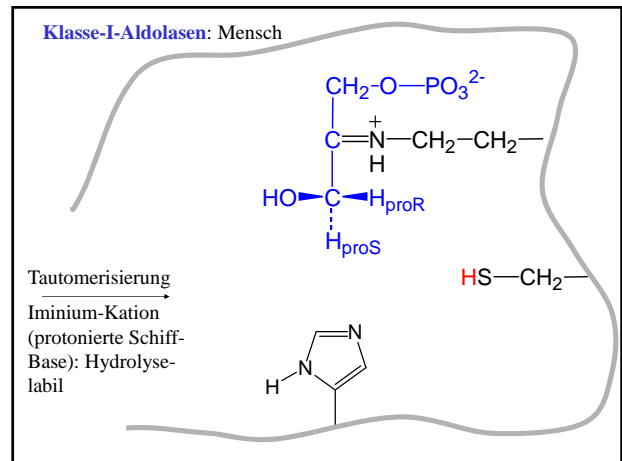
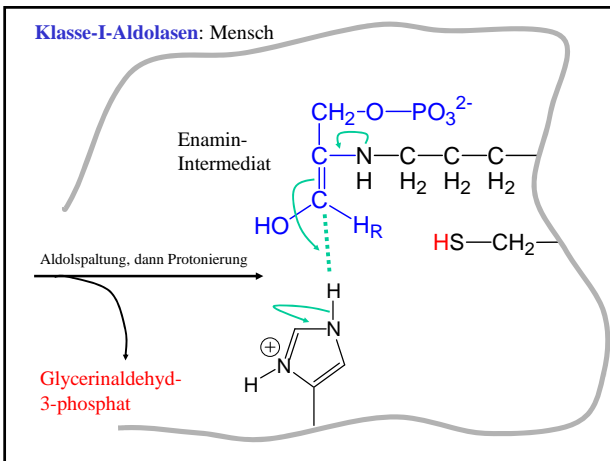
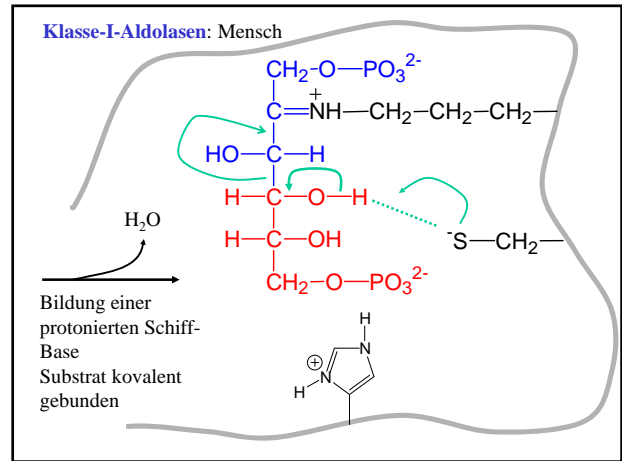
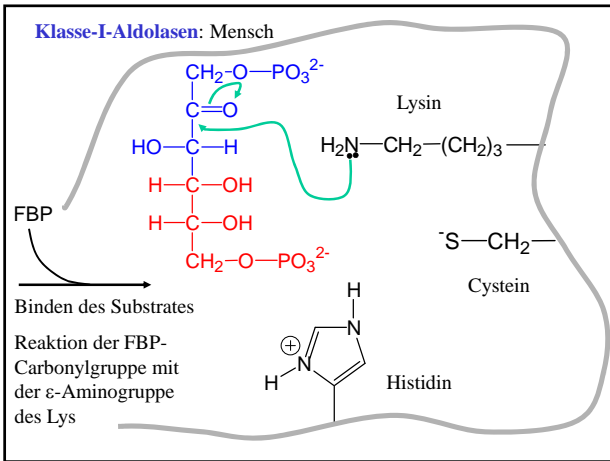
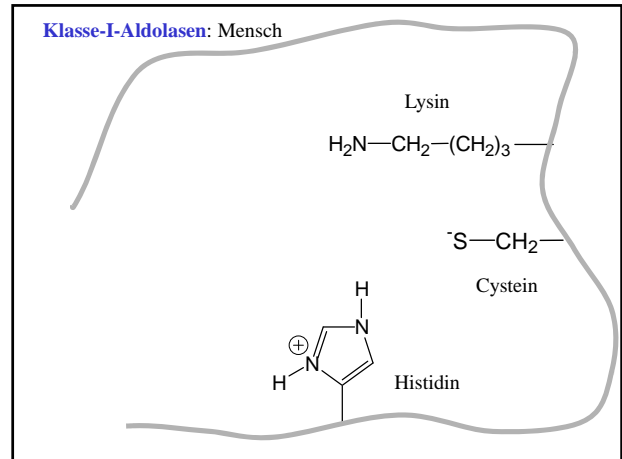
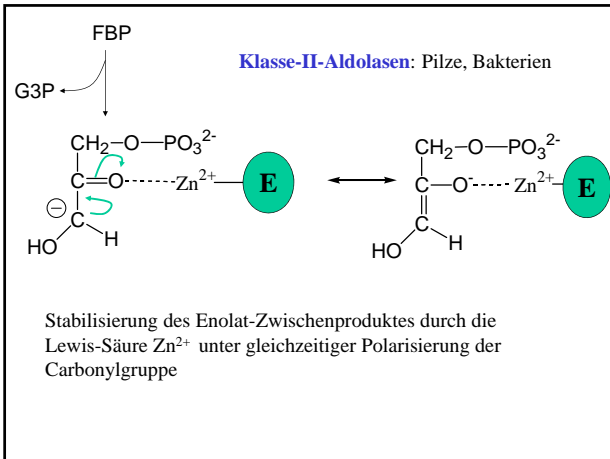
Inhibierung durch  $NaBH_4$ , aber nicht durch EDTA (kein divalentes Kation im aktiven Zentrum).

Pflanzen, Tiere, Mensch.

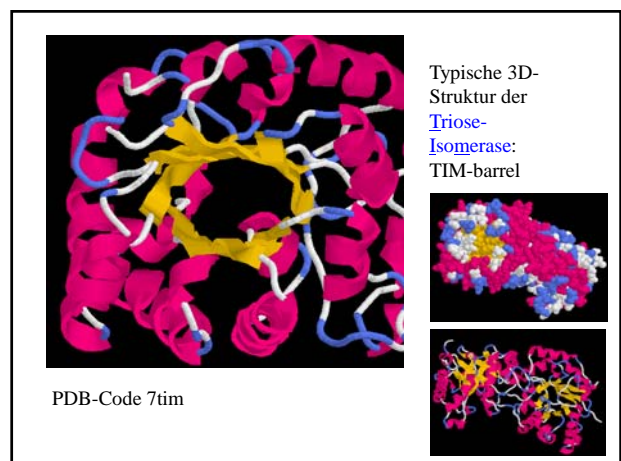
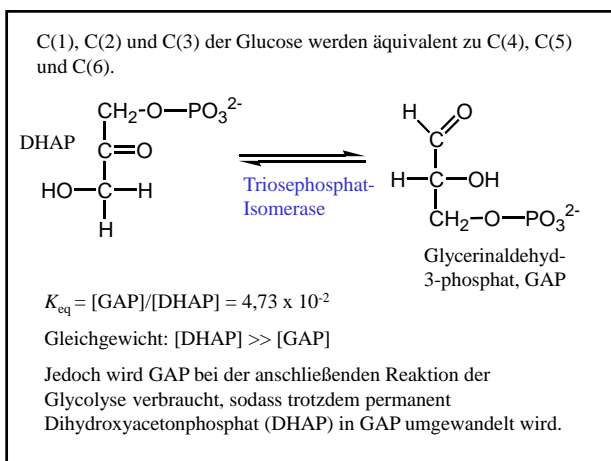
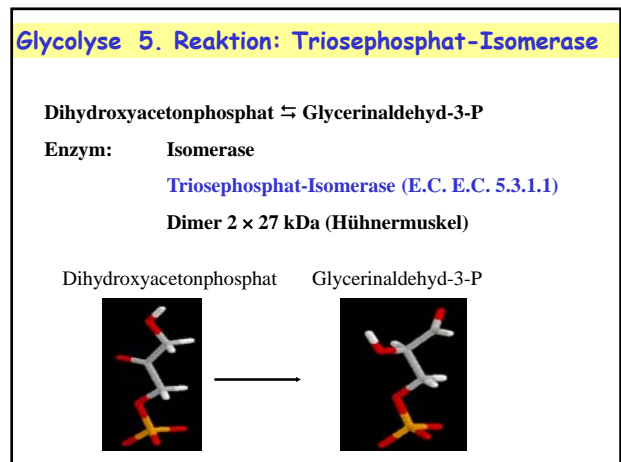
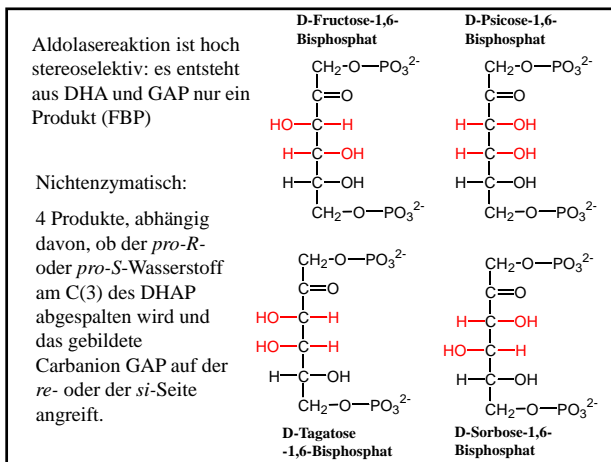
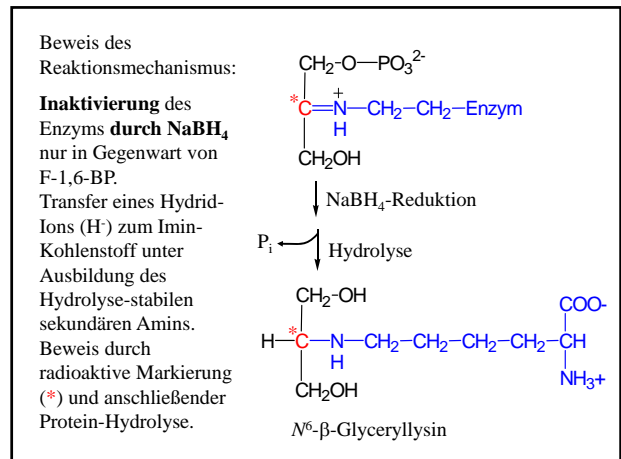
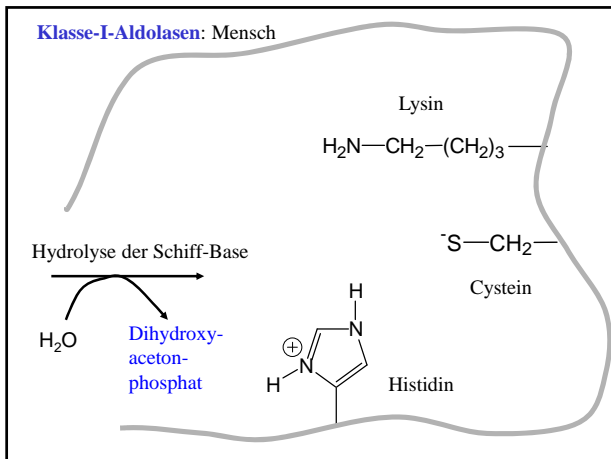
**Klasse-II-Aldolasen:** Metalloproteine: meist  $Zn^{2+}$  im aktiven Zentrum. Durch EDTA inhibierbar.


Nicht durch  $NaBH_4$  inhibierbar.

Pilze, Bakterien









**Triosephosphat-Isomerase (TIM)** ist ein perfektes Enzym: Die Geschwindigkeit der bimolekularen Assoziation des Enzyms mit dem Substrat ist diffusionskontrolliert! Aufgrund seiner Struktur ist TIM ein  $\alpha/\beta$ -Barrel-Protein

PDB-Code  
7tim

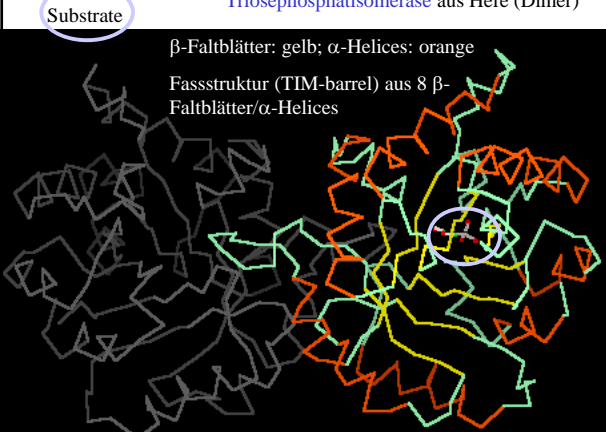
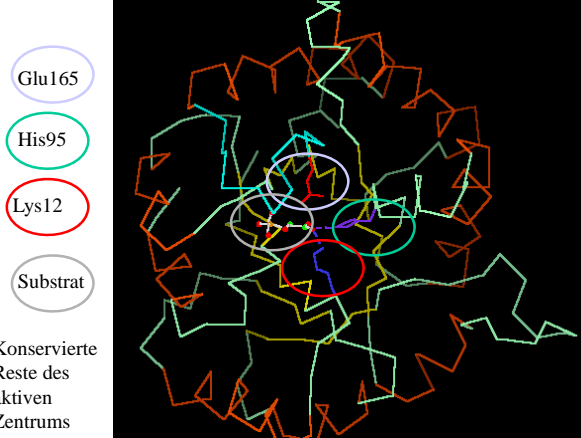
Viele Proteine (mit oft ganz anderen katalytischen Eigenschaften) haben diese Struktur: oft als TIM-Barrel bezeichnet: Acht parallele Faltblätter werden durch acht  $\alpha$ -Helices verbunden. Das Faßinnere ist hydrophob, am "Faßboden" sitzen die für die jeweilige enzymatische Aktivität notwendigen Reste.

**Triosephosphatisomerase aus Hefe (Dimer)**

Substrate

$\beta$ -Faltblätter: gelb;  $\alpha$ -Helices: orange

Faßstruktur (TIM-Barrel) aus 8  $\beta$ -Faltblätter/ $\alpha$ -Helices

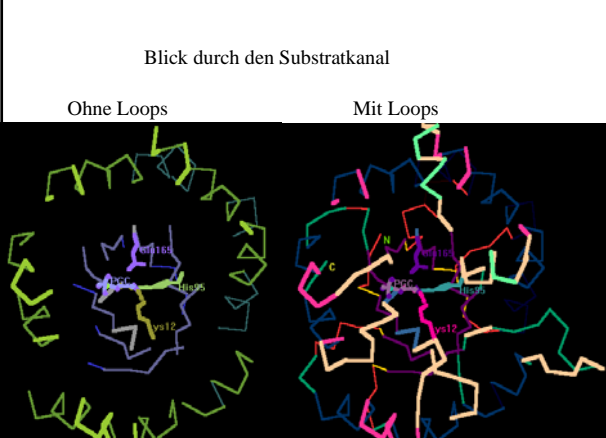



Glu165  
His95  
Lys12  
Substrat

Konservierte Reste des aktiven Zentrums

Blick durch den Substratkanal

Ohne Loops      Mit Loops



Enzymkinetik der Triose-Isomerase: Glockenförmige pH-Abhängigkeit mit  $pK_a$ -Werten von 6,5 und 9,5.

Was ist die Natur der sauren Gruppe ( $pK_a = 6,5$ ) ?

Markierung durch **Affinitätsreagenzien** (Bromhydroxyacetonphosphat oder Glycidolphosphat): Inaktivierung von TIM durch Ausbildung von Estern mit Glutaminsäure.

Freie Glutaminsäure (wässriges Medium):  $pK_a = 4,1$

Aktives Zentrum (hydrophober „Faßboden“):  $pK_a = 6,5 !!$

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-O-PO}_3^{2-} \\ | \\ \text{C=O} \\ | \\ \text{CH}_2\text{Br} \end{array}$$

Bromhydroxyacetonphosphat

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-O-PO}_3^{2-} \\ | \\ \text{C-H} \\ / \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{CH}_2 \end{array}$$

Glycidolphosphat

**Reaktionsmechanismus über Endiolat-Zwischenprodukt ?**

Beweis durch Pseudosubstrate (meist Inhibitoren), die eine hohe Affinität zur Geometrie des Übergangszustandes haben.

Phosphoglycohydroxamat bindet 155mal besser an TIM als GAP oder DHAP)

$$\begin{array}{c} \text{N-OH} \\ | \\ \text{C-O-} \\ | \\ \text{CH}_2\text{-O-PO}_3^{2-} \end{array}$$

Phosphoglycohydroxamat

$$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \\ || \\ \text{C-O-} \\ | \\ \text{CH}_2\text{-O-PO}_3^{2-} \end{array}$$

Postuliertes Endiolat-Zwischenprodukt der Isomerase-Reaktion

