

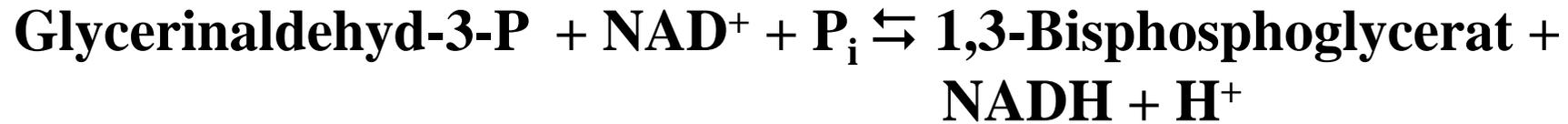
# **BIOCHEMIE des Stoffwechsels**

## **(772.113)**

### **5. Einheit**

#### **Glycolyse (2)**

# Glycolyse 6. Reaktion: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

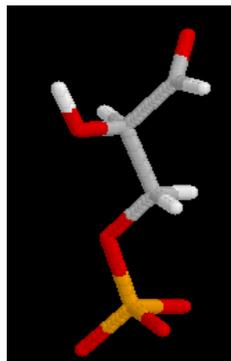


**Enzym:** Oxidoreductase

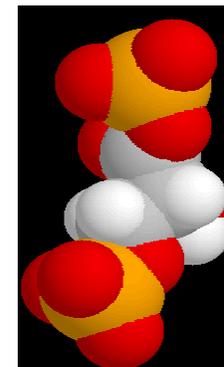
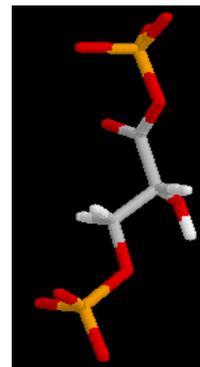
**Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase**  
(E.C. 1.2.1.12)

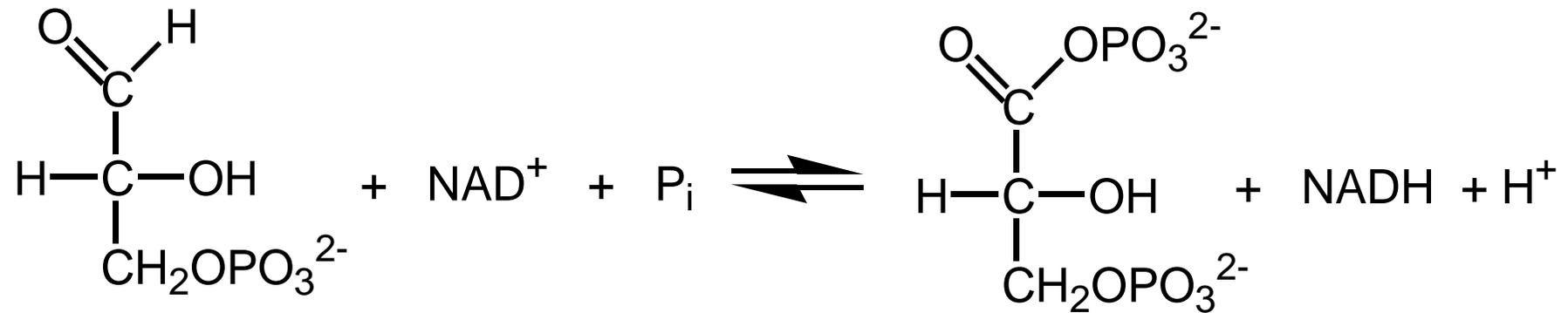
**Tetramer 4 × 37 kDa (Kaninchenmuskel)**

Glycerinaldehyd-3-P



1,3-Bisphosphoglycerat





Aldehydoxidation: stark exergonisch

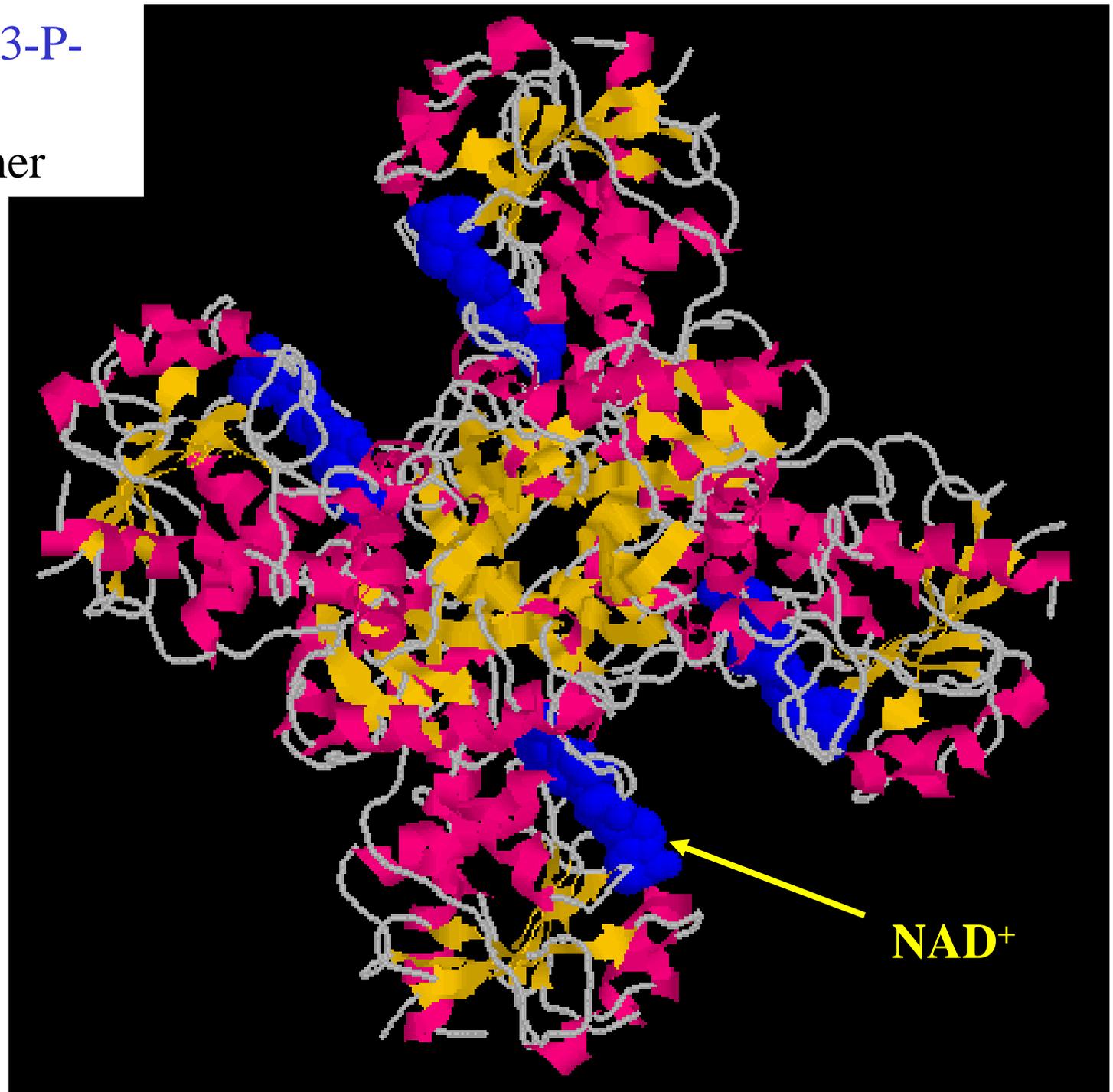
Bildung von NADH und Bisphosphoglycerat (Acylphosphat = gemischtes Anhydrid): endergonisch

---

$$\Delta G^{\ominus'} = + 6,3 \text{ kJ/mol } (K_{\text{eq}} = 0,078)$$

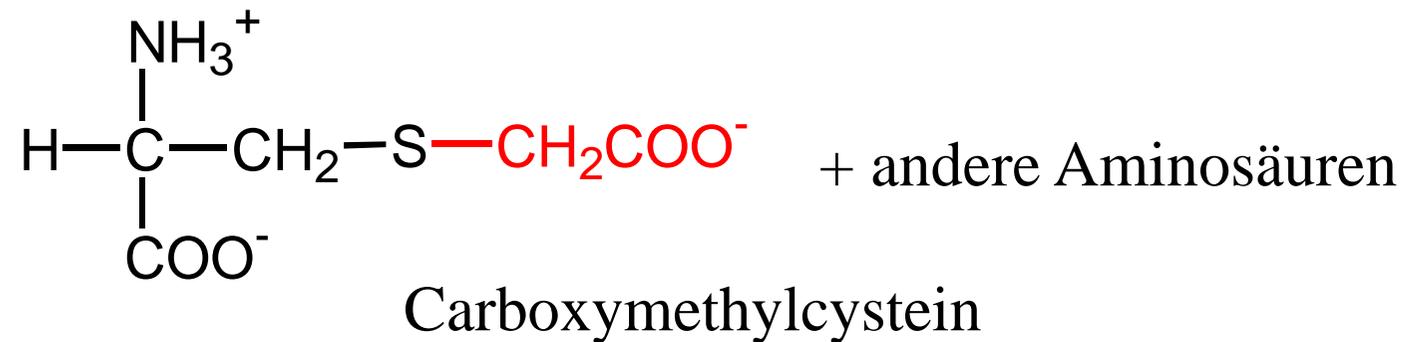
$$\Delta G' = -1,29 \text{ kJ/mol}$$

Glycerinaldehyd-3-P-  
Dehydrogenase  
(Mensch): Tetramer

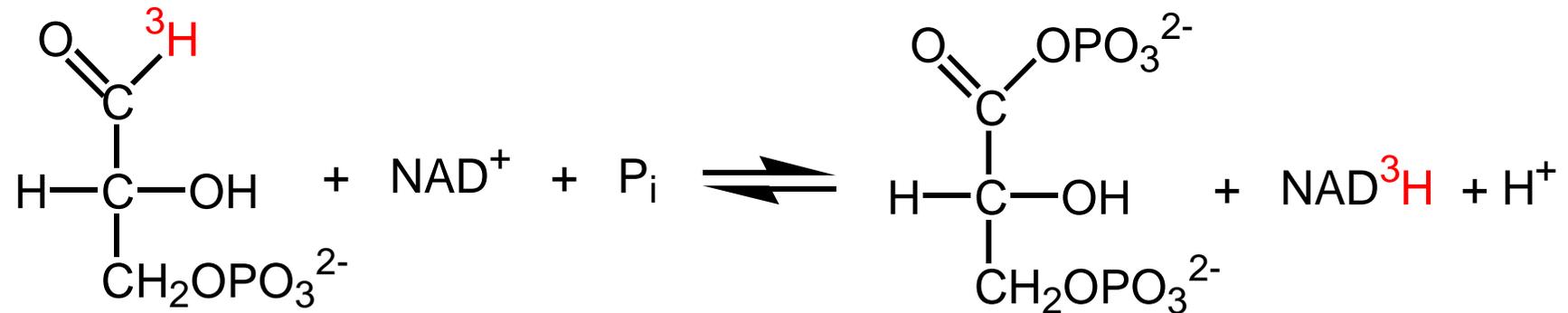


## Mechanistische Untersuchungen:

- A. **Glycerinaldehyd-3-P-DH** wird durch Alkylierung mit stöchiometrischen Mengen **IODACETAT** inaktiviert. Akkumulierung von Fructose-1,6-bisphosphat im Cytosol ( $\rightarrow$  Cystein im aktiven Zentrum).

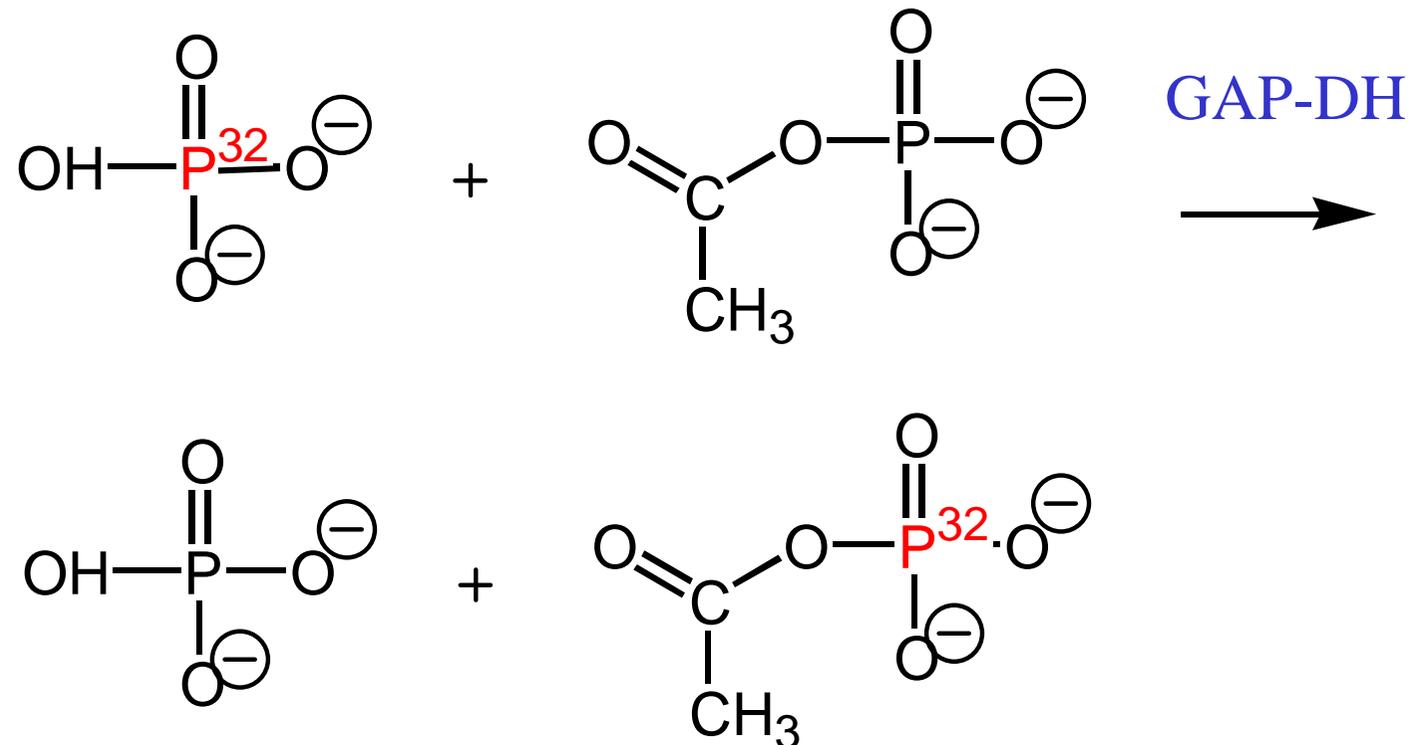


B..  $^3\text{H}$  aus  $1\text{-}^3\text{H}\text{-GAP}$  wird durch **Glycerinaldehyd-3P-DH** auf  $\text{NAD}^+$  übertragen ( $\rightarrow$  Reaktion verläuft über direkte Hydrid-Übertragung).



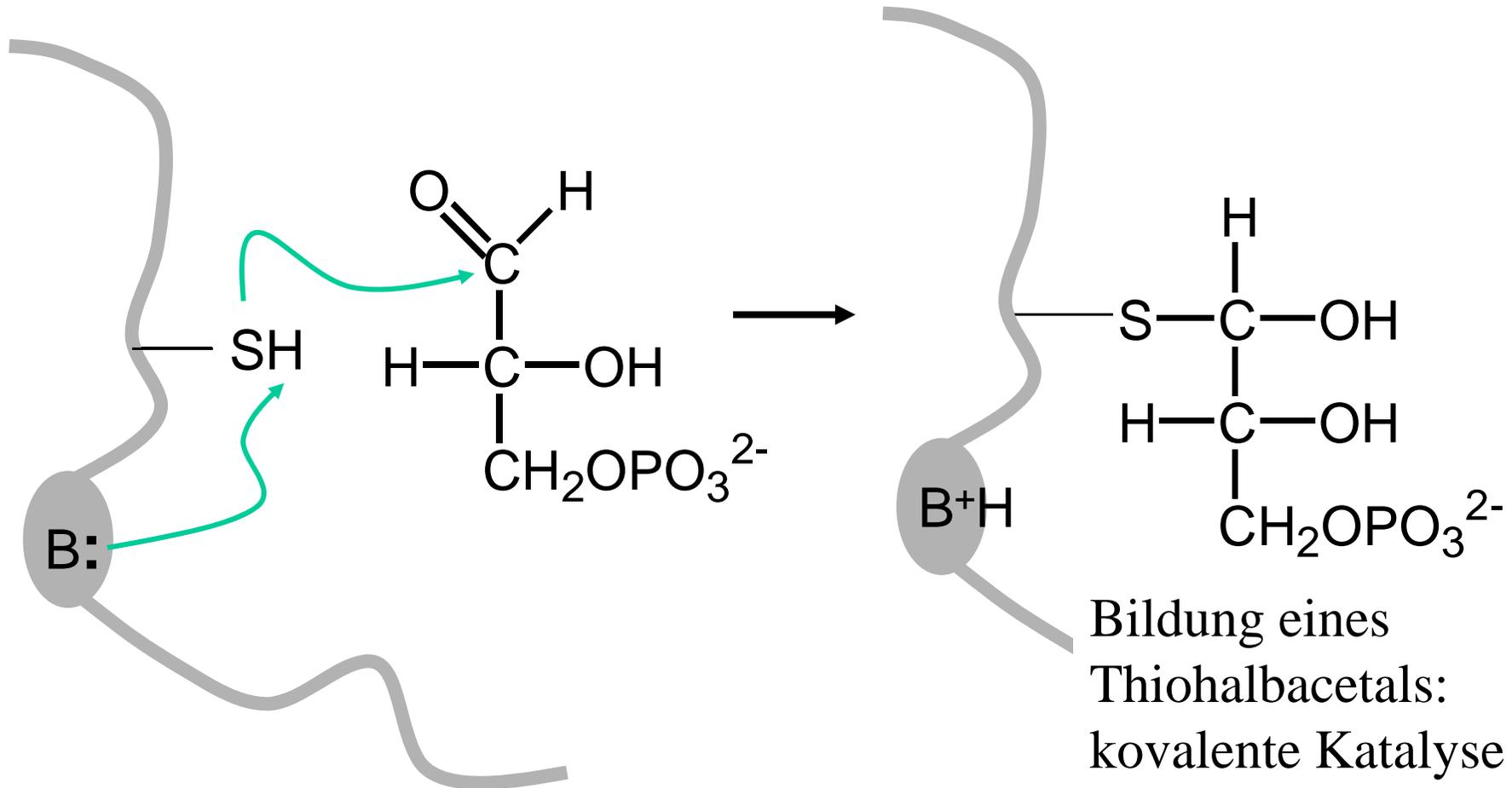
## Mechanistische Untersuchungen:

- C. Die **GAP-DH** katalysiert (reversible) Isotopenaustauschreaktion von  $^{32}\text{P}$  zwischen  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-P}_i$  und Acetylphosphat (Analogon des Produkts). Dies weist auf Acyl-Enzym-Zwischenprodukt hin (reversible kovalente Knüpfung der gemischten Anhydridbindung).



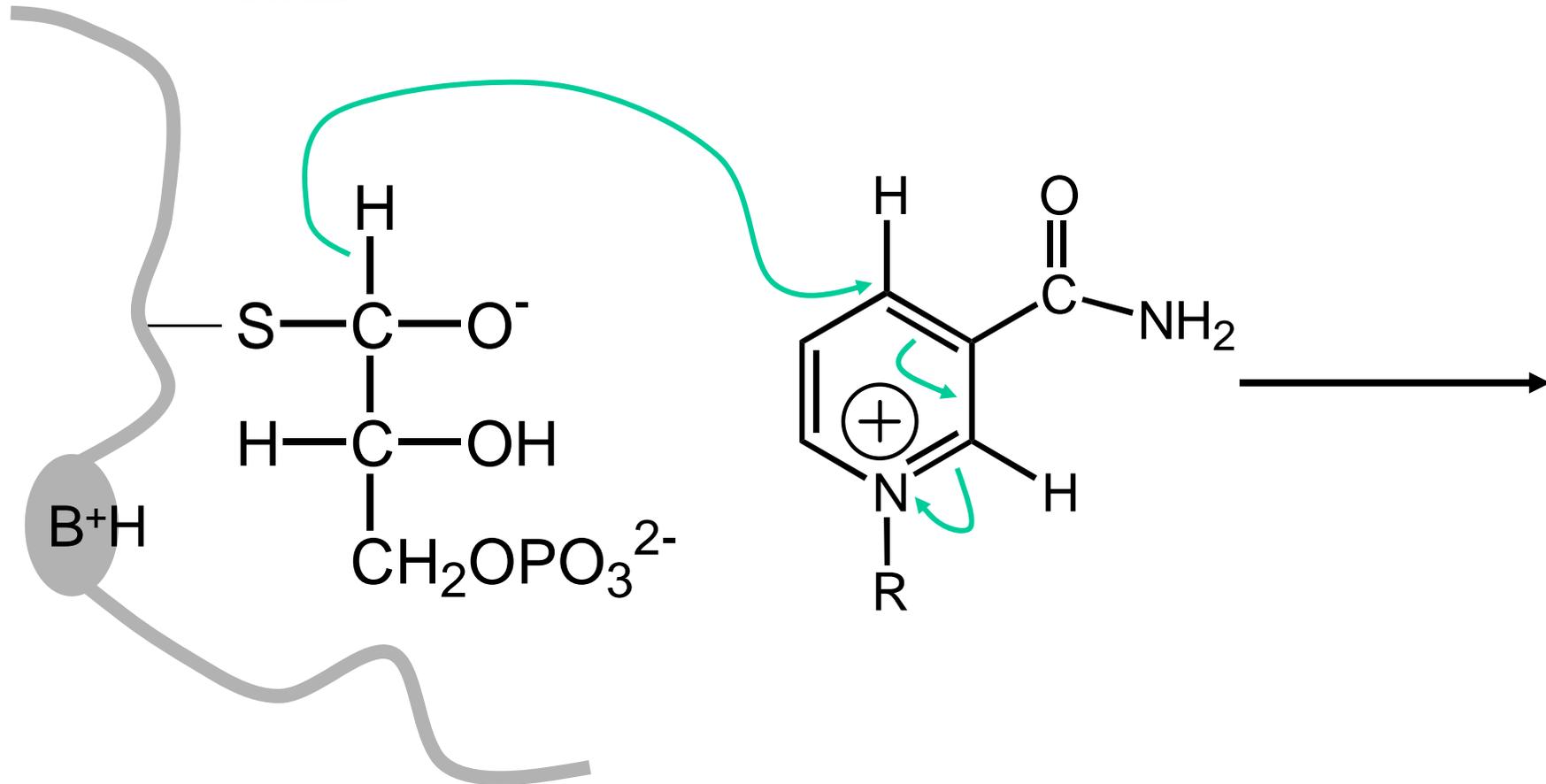
## Reaktionsmechanismus

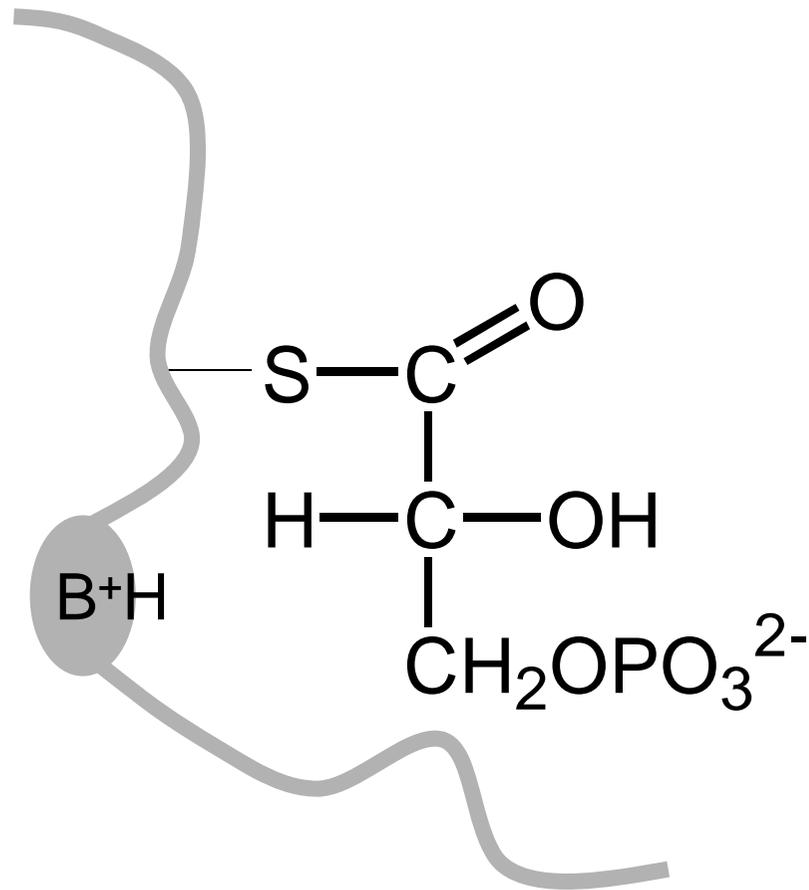
1. Binden von Glycerinaldehyd-3-Phosphat an das Enzym
2. Nucleophiler Angriff der Sulphydrylgruppe am Carbonyl-C-Atom des Aldehyds. Bildung eines Thiohalbacetals.



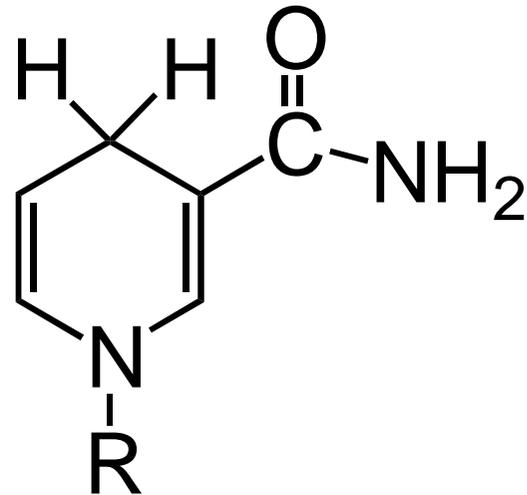
# Reaktionsmechanismus

3. Oxidation des Thiohalbacetals zu einem Acylthioester (wurde als Zwischenprodukt isoliert) durch direkte Übertragung eines Hydrid-Ions auf  $\text{NAD}^+$



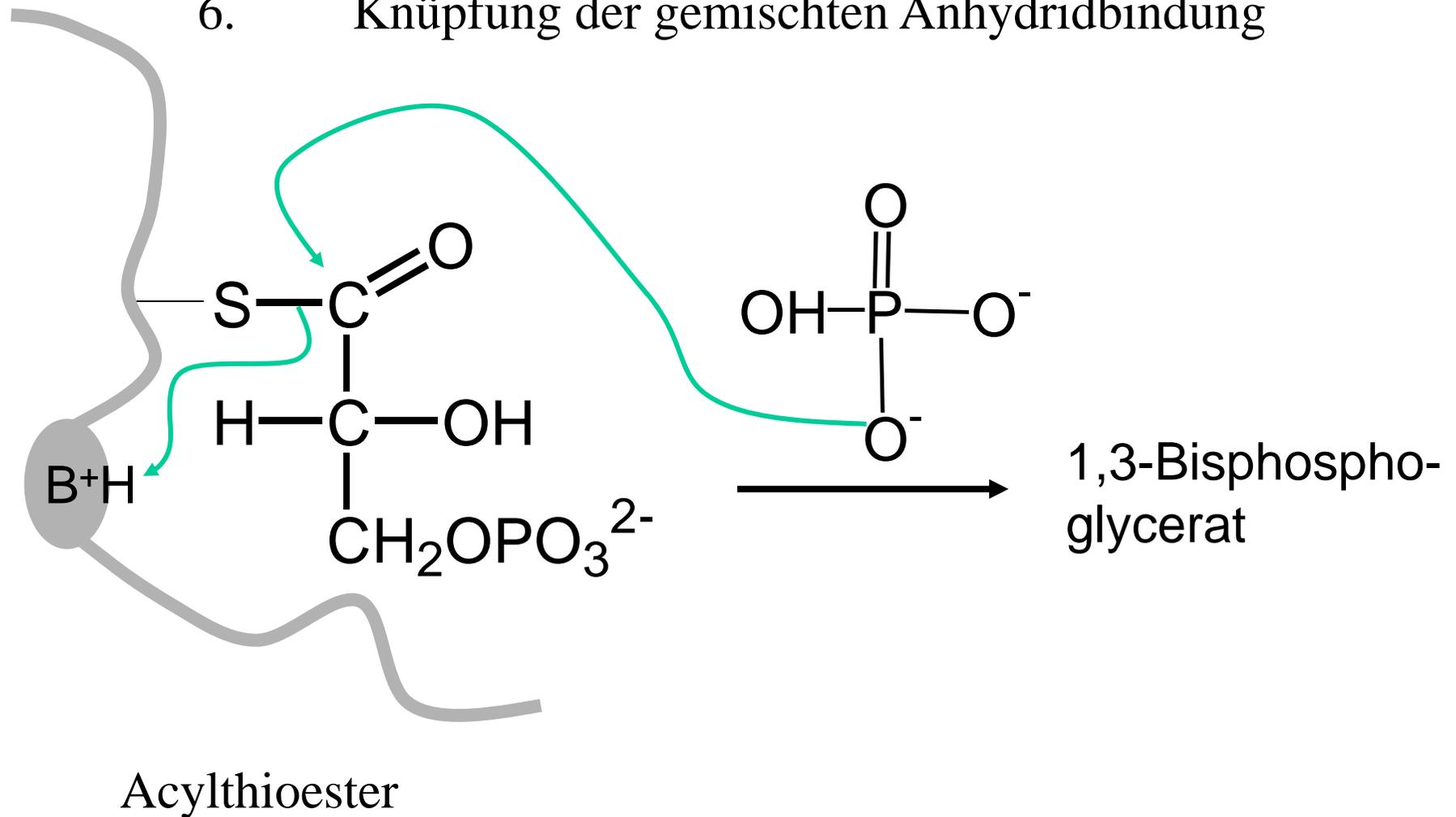


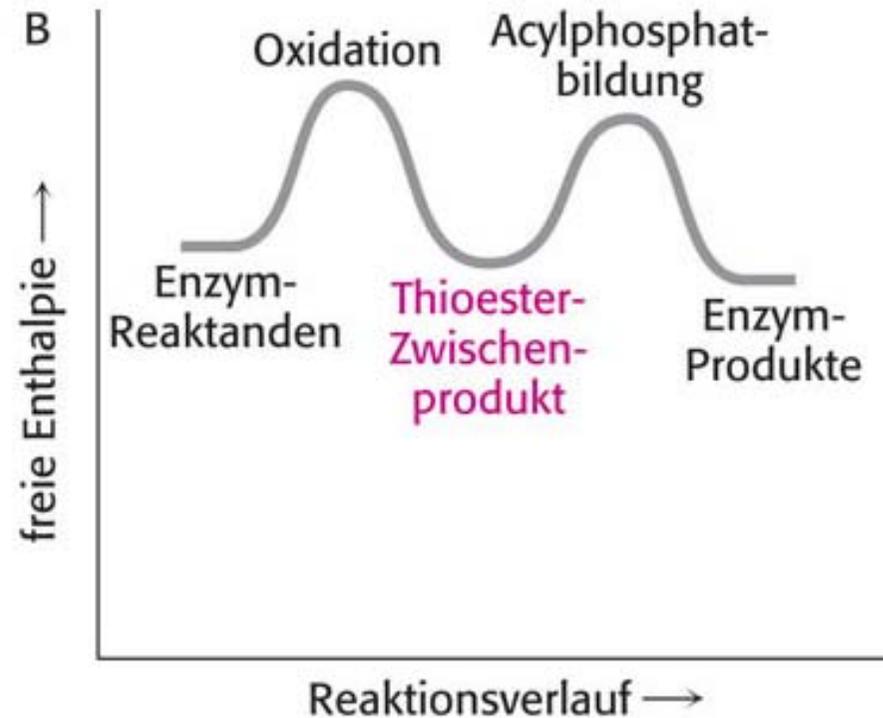
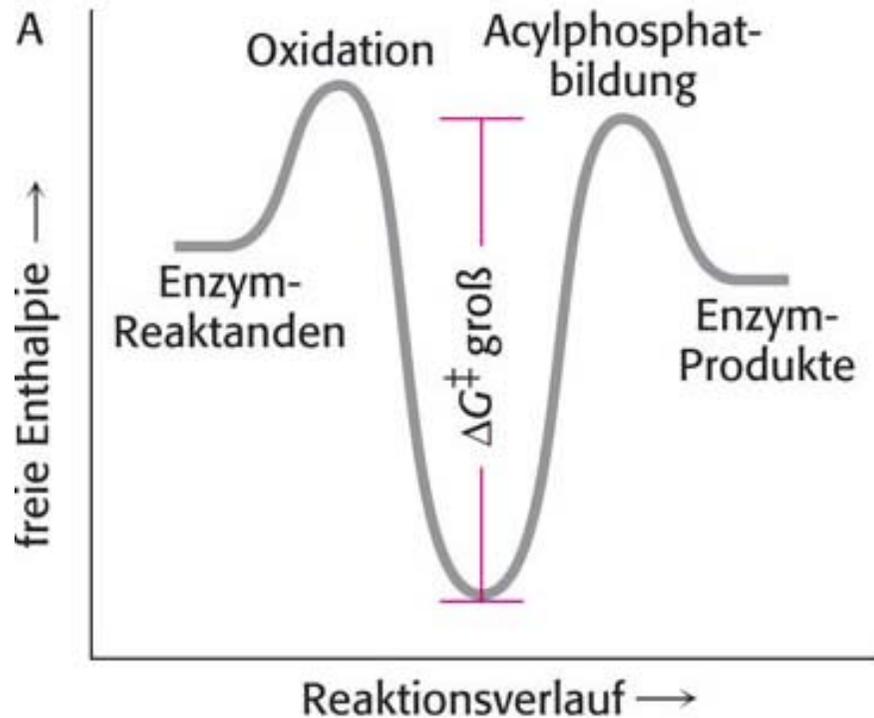
Acylthioester



Im Acylthioester wird der Großteil der bei der Oxidationsreaktion freigesetzten Freien Enthalpie gespeichert (letztendlich für die Kopplung an *o*-Phosphat und Ausbildung des gemischten Anhydrids)

4.  $\text{NAD}^+$  verdrängt  $\text{NADH}$
5. Nucleophiler Angriff von  $\text{P}_i$  an das Thioester-Zwischenprodukt
6. Knüpfung der gemischten Anhydridbindung



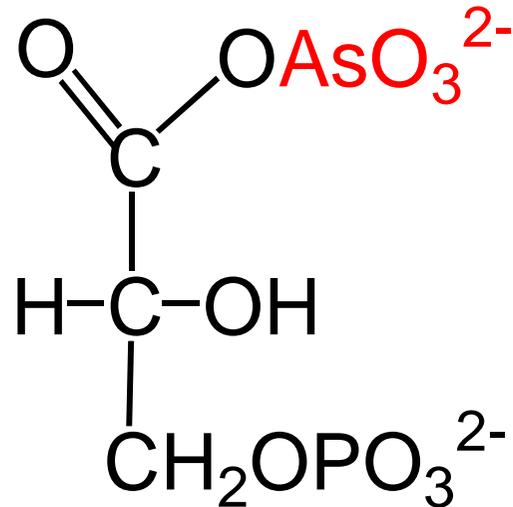


Veränderung der Freien Enthalpie bei der Oxidation von Glycerinaldehyd mit anschließender Bildung von Acylphosphat.

- (A) Hypothetischer Fall ohne Kopplung beider Prozesse. Der zweite Schritt benötigt eine große Aktivierungsenergie, was die Reaktion sehr verlangsamt.
- (B) Der tatsächliche Verlauf. Die beiden Reaktionen sind über ein Thioester-Zwischenprodukt miteinander gekoppelt.

**Arsenat** entkoppelt die Oxidationsreaktion von der Phosphorylierungsreaktion:

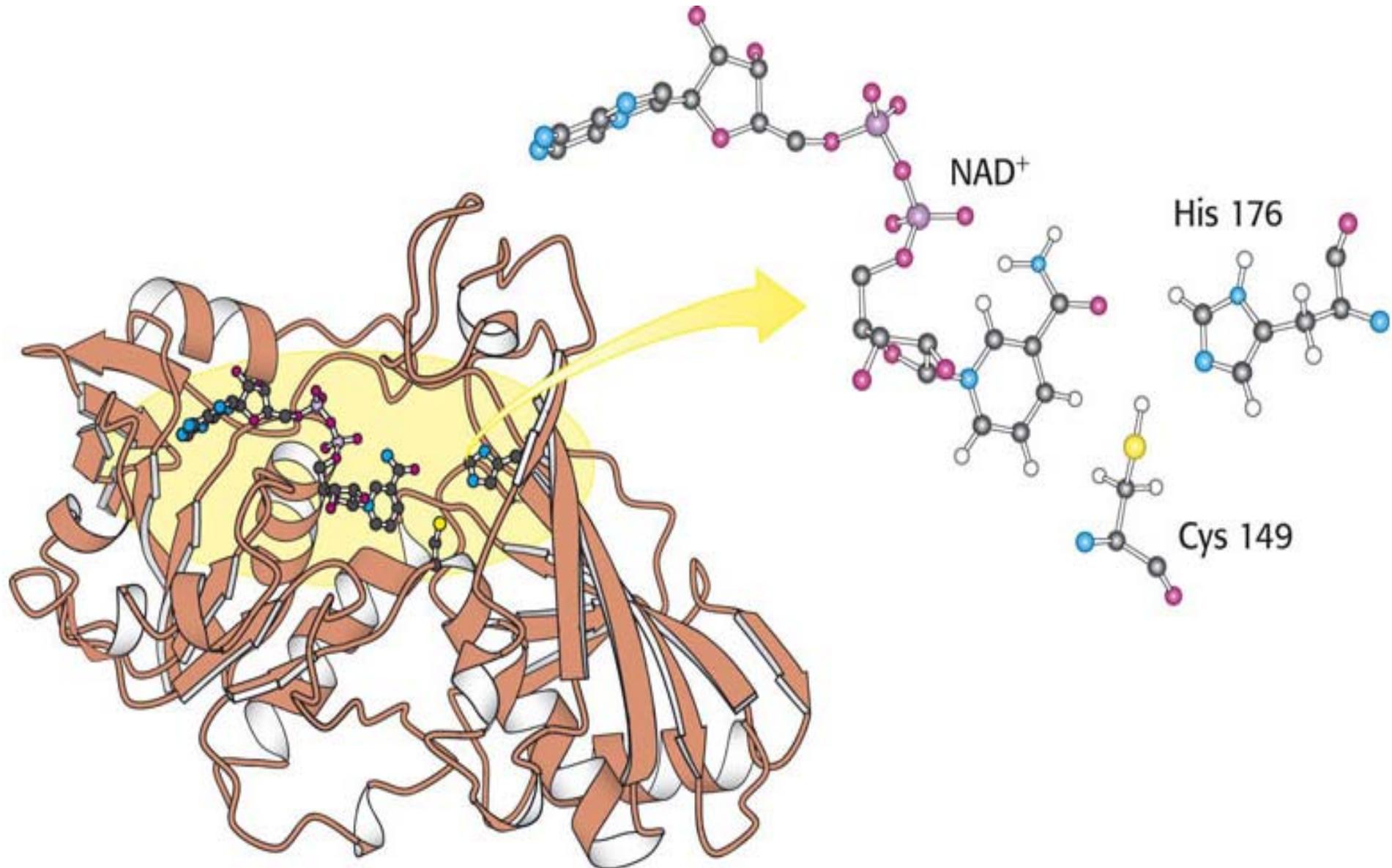
Arsenat ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) ist anionisches Analogon zu Phosphat. Es reagiert mit **GAP-DH** unter Bildung von 1-Arseno-3-Phosphoglycerat:

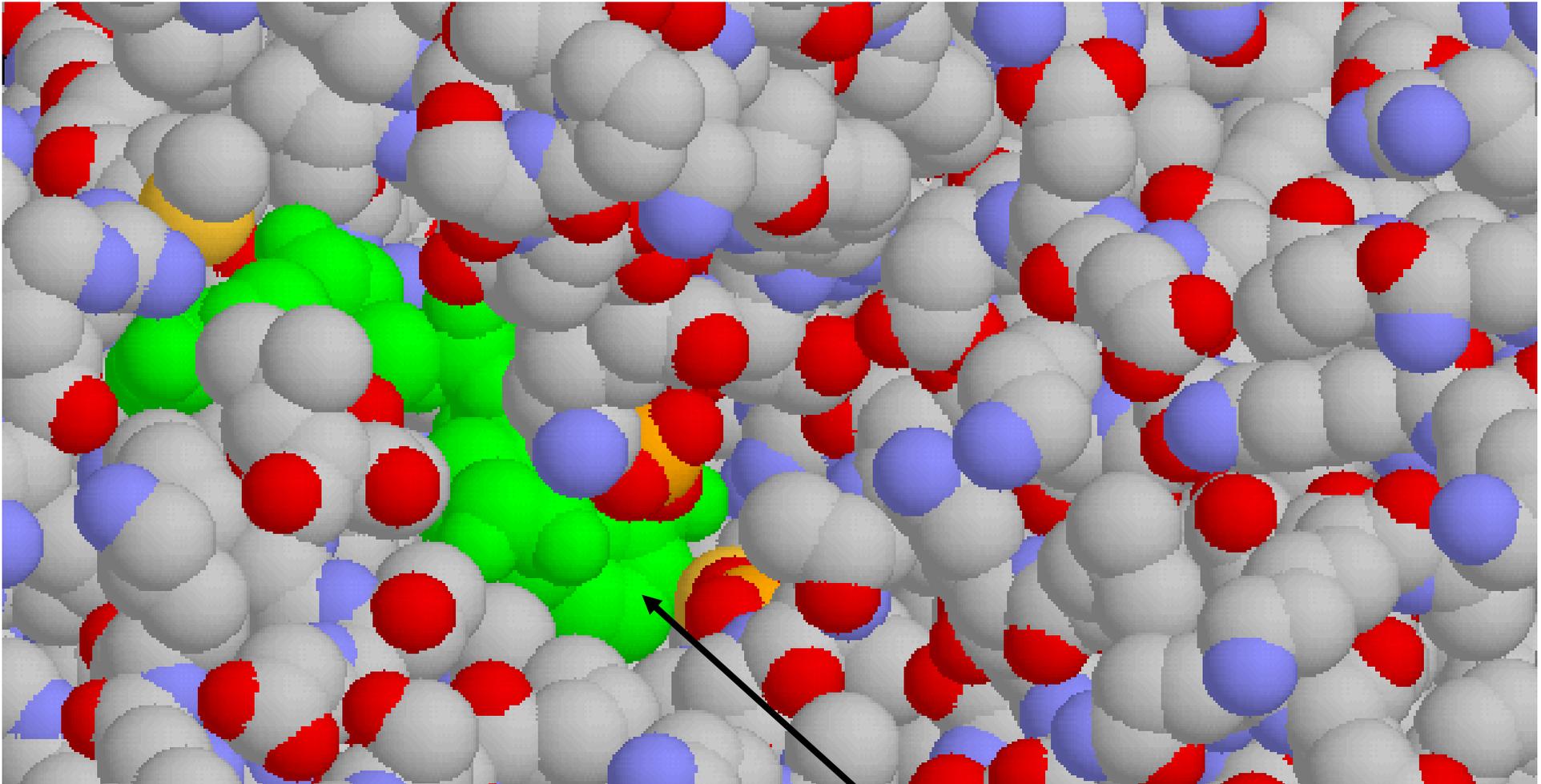


**Acylarsenate** sind jedoch Hydrolyse-labil und zerfallen unter Bildung von 3-Phosphoglycerat. Glycolyse geht weiter, jedoch ist ATP-Bildung über Substratkettenphosphorylierung durch nachfolgende Kinase-Reaktion nicht mehr möglich.

# Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase (Mensch): Tetramer

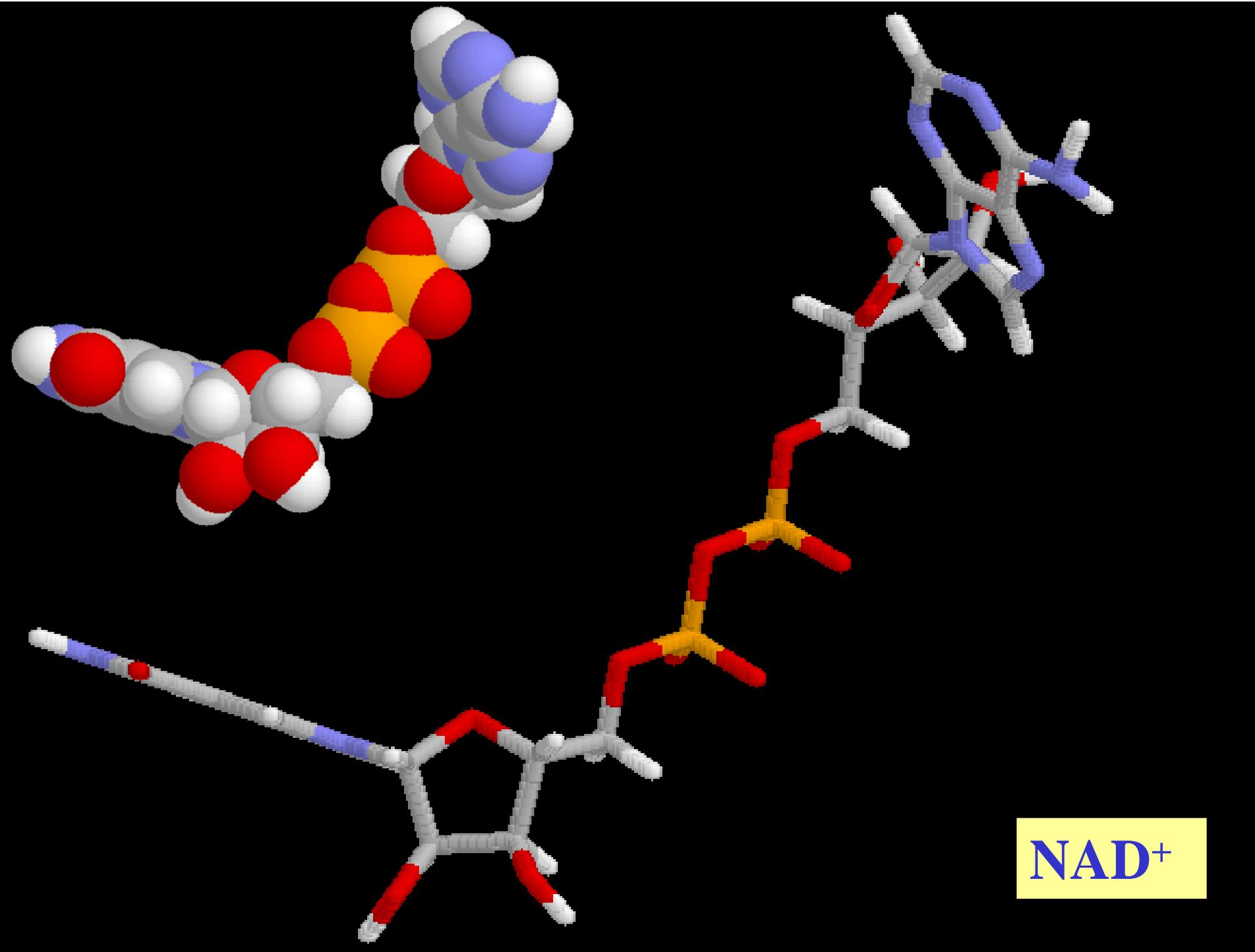
Hier ist die Struktur eines Monomers dargestellt.





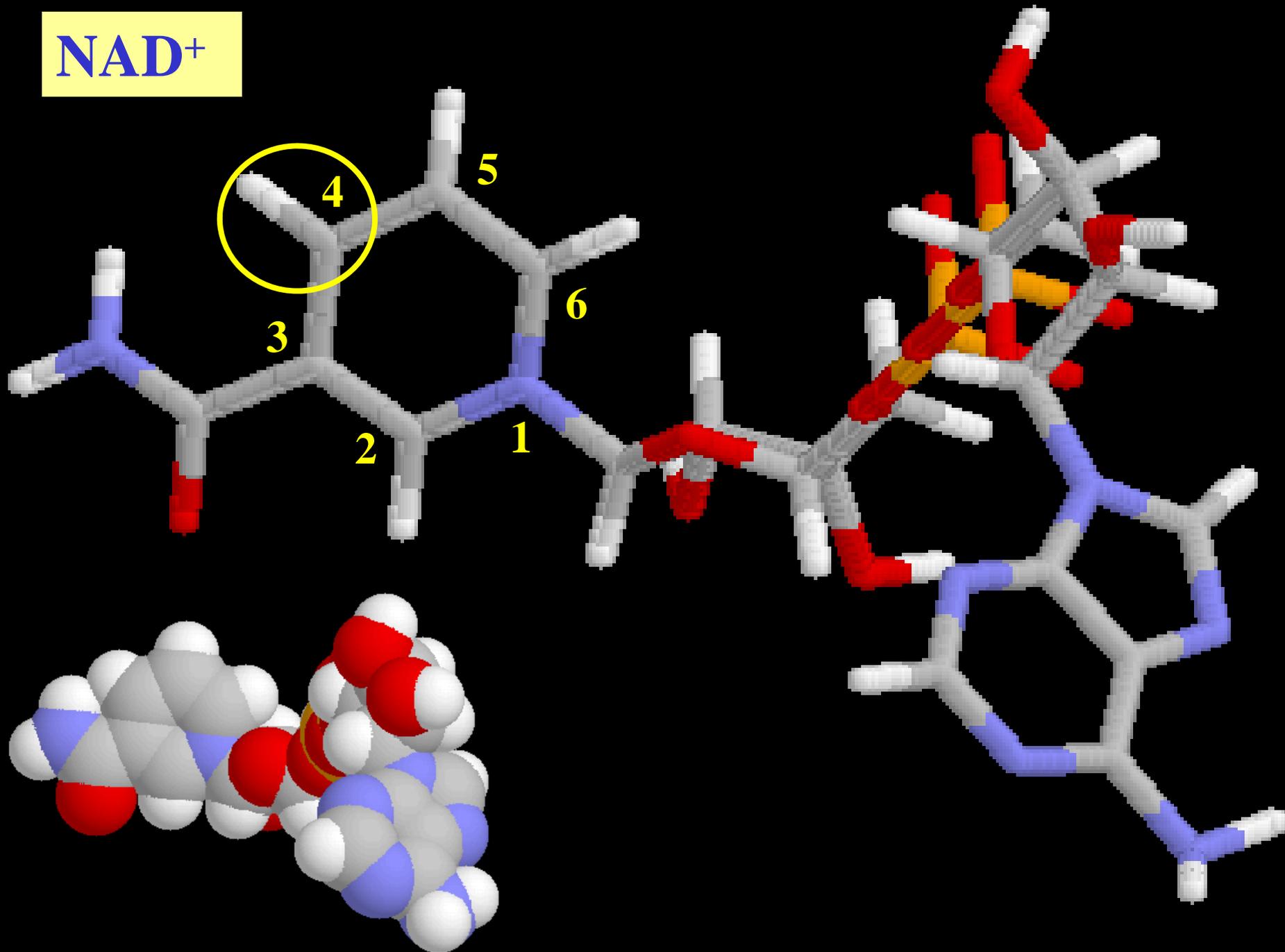
Blick von außen auf  
NAD<sup>+</sup>-Bindungsstelle

**NAD<sup>+</sup>**



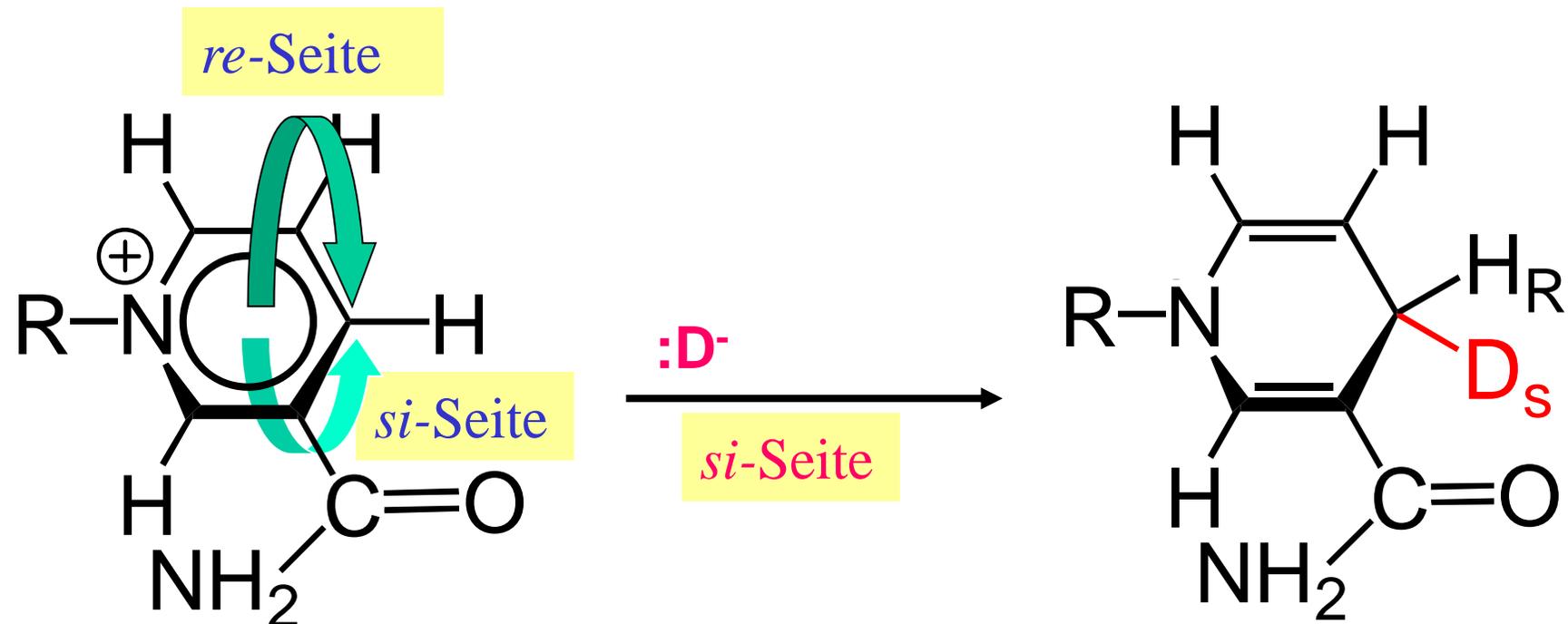
NAD<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup>



Markierungsversuche mit Deuterium:

**GAP-DH** überträgt Hydrid-Ion stets auf die *si*-Seite des Nicotinamidringes von  $\text{NAD}^+$ . Das übertragene H-Atom wird zum *pro-S*-Substituenten am C(4) des NADH. Die Hydrid-Ionenübertragung ist absolut stereospezifisch.



Lactat-DH, Alkohol-DH katalysieren die Übertragung des *pro-R*-Wasserstoffs von NADH

# Glycolyse 7. Reaktion: Phosphoglycerat-Kinase



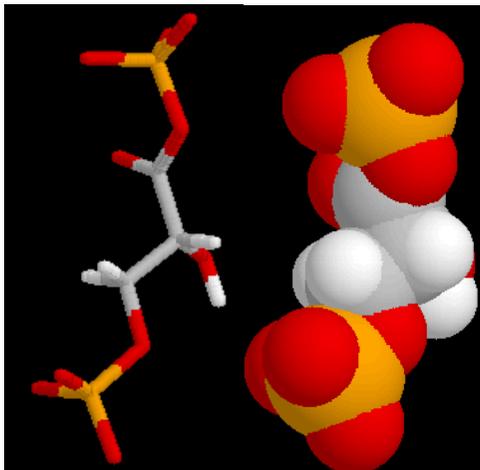
**Enzym:** Phosphotransferase

**Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3)**

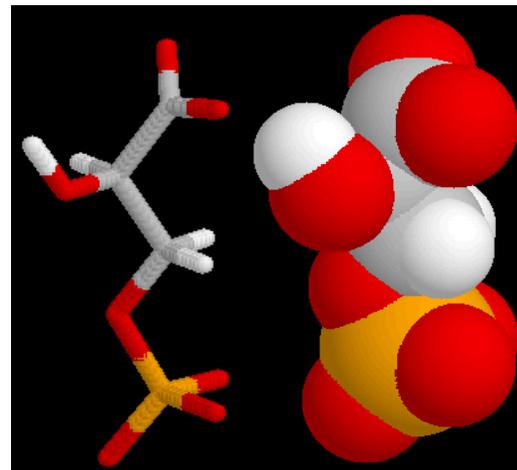
**Monomer 64 kDa (Kaninchenmuskel)**

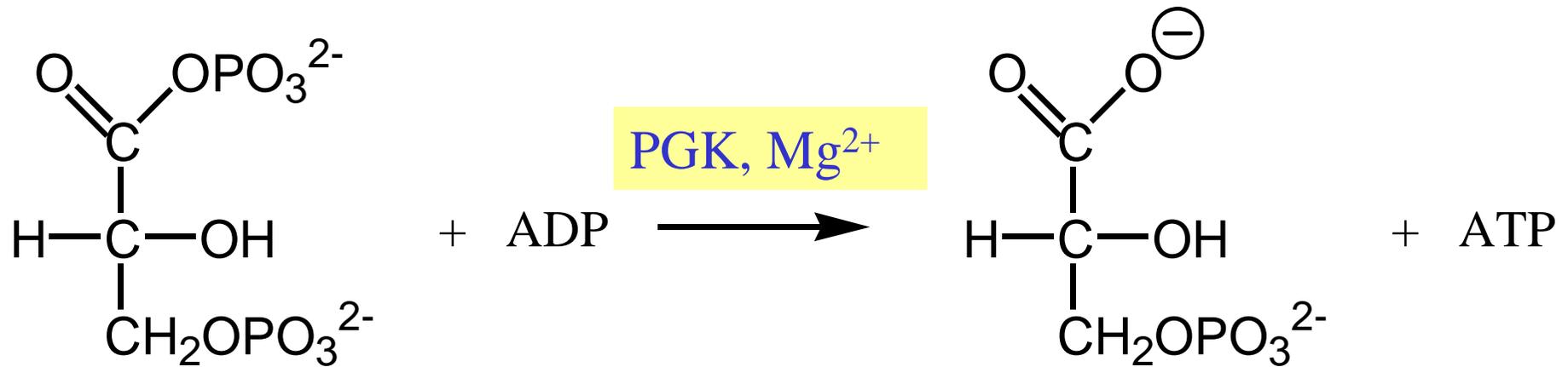
**Cofactor:  $\text{Mg}^{2+}$**

1,3-Bisphosphoglycerat



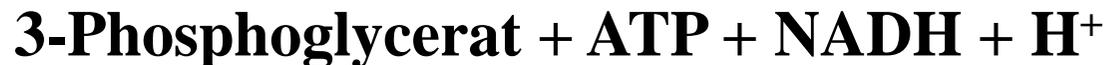
3-Phosphoglycerat





$$\Delta G^{\ominus'} = -18,9 \text{ kJ/mol} (K_{\text{eq}} = 2060), \Delta G' = 0,1 \text{ kJ/mol}$$

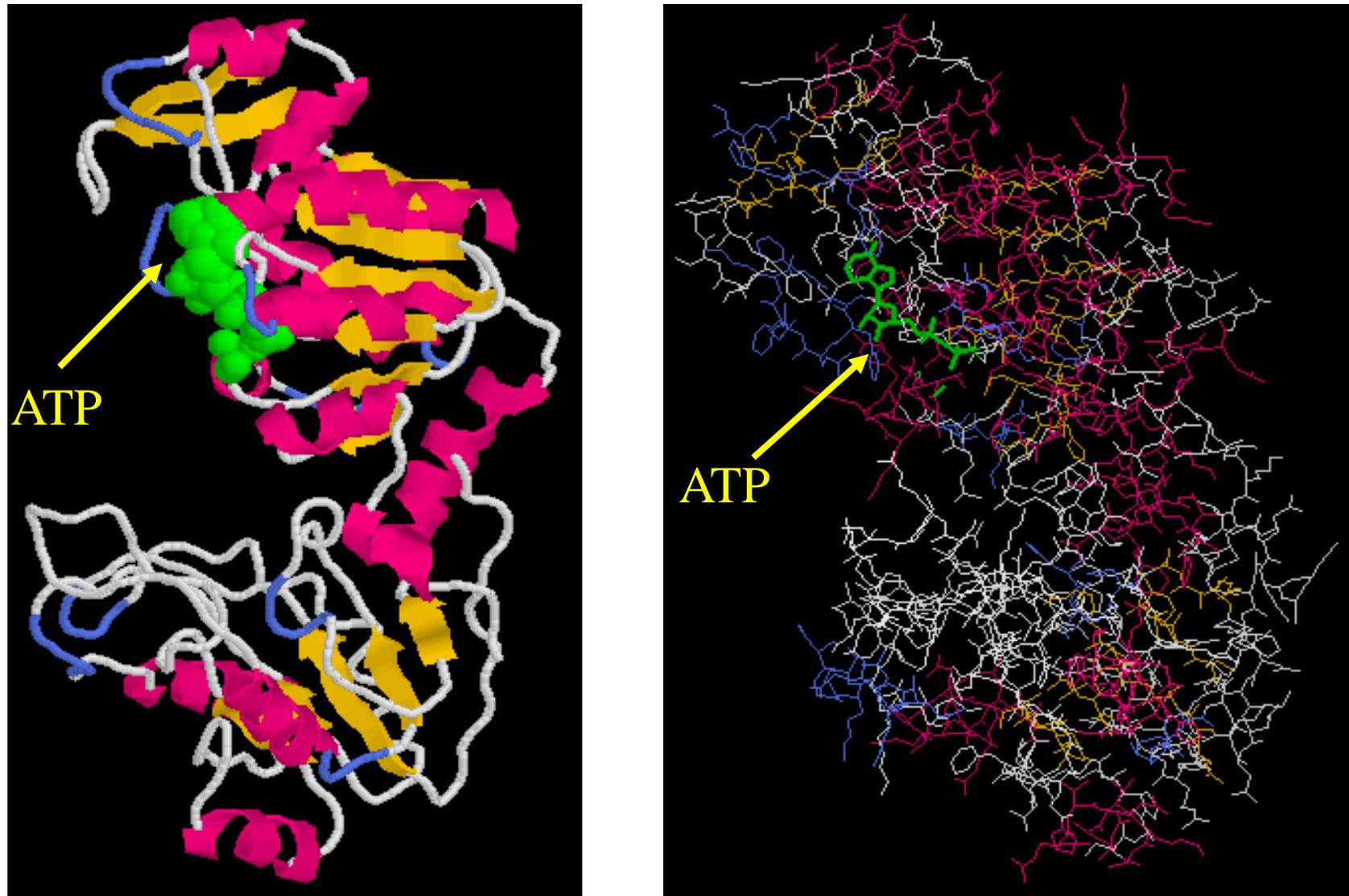
Reaktion 6 und 7 der Glycolyse sind gekoppelt (1,3-Bisphosphoglycerat als Intermediat):



$$\Delta G_{6+7}^{\ominus'} = -12,6 \text{ kJ/mol}$$

## SUBSTRATKETTENPHOSPHORYLIERUNG

## Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe



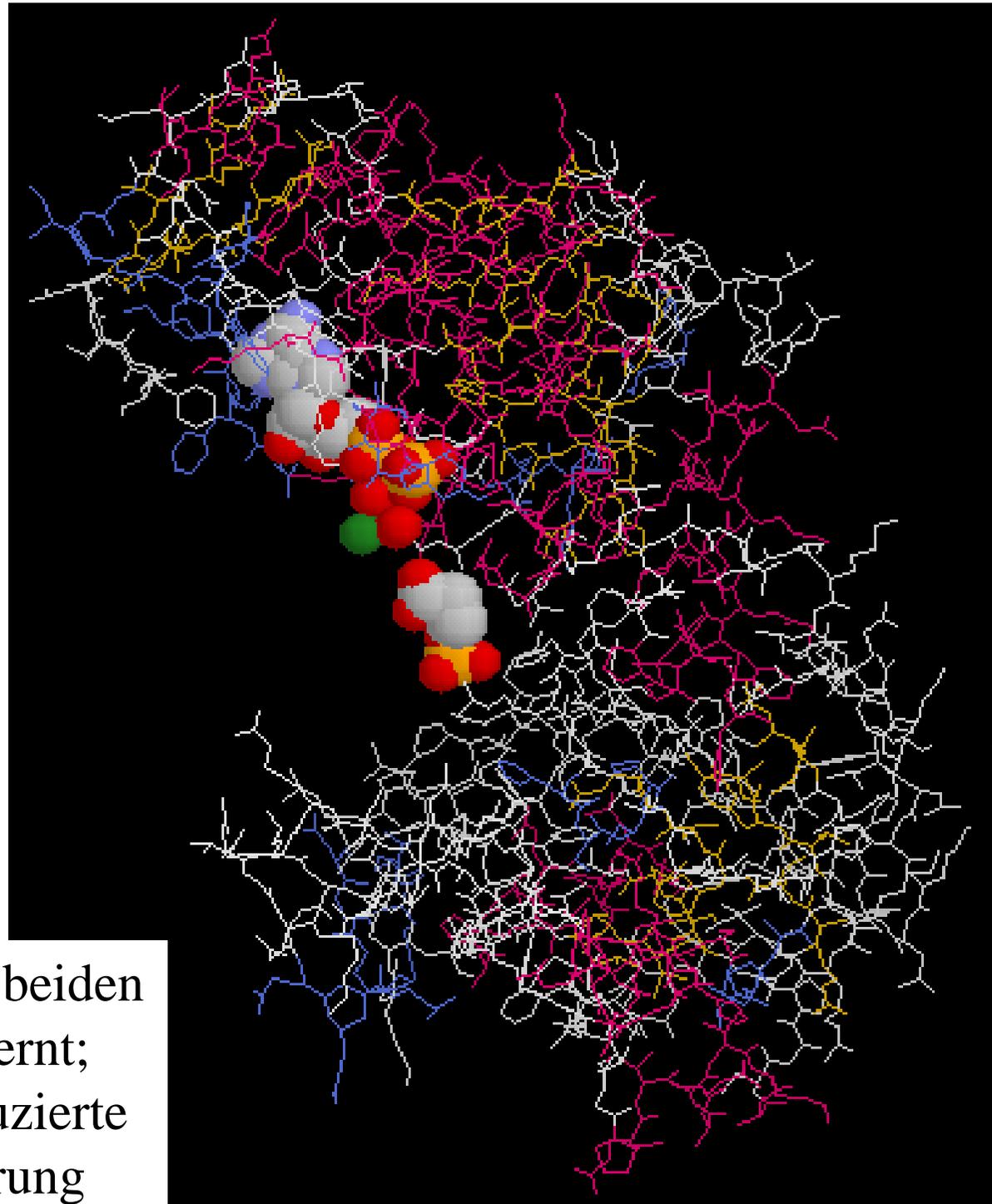
Typische (zweilappige) Domänenstruktur (vgl. [Hexokinase](#))

## PGK-Komplex mit ATP und 1,3-BPG

Domäne 1:  
Bindungsstelle  
für  $Mg^{2+}$ -ADP

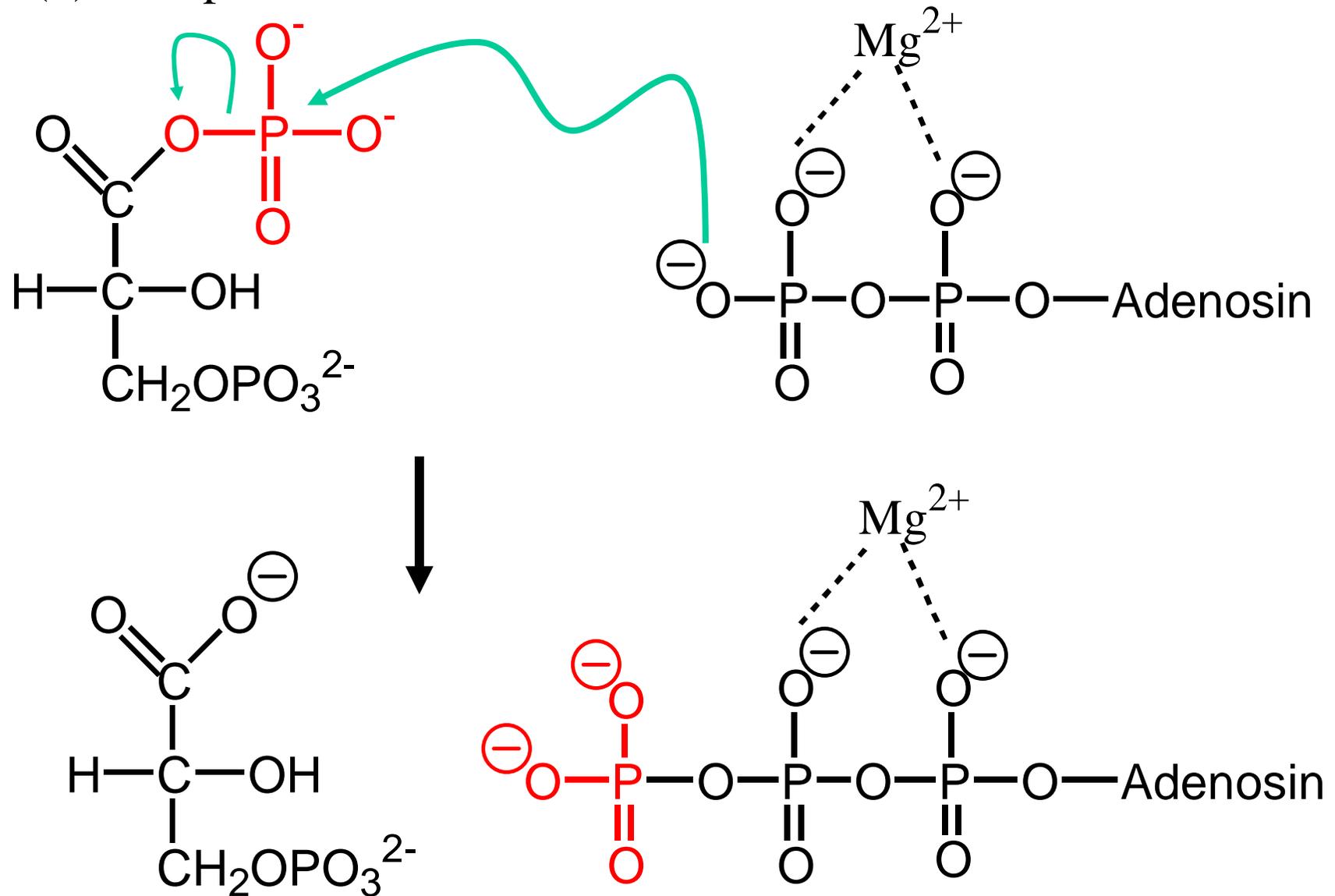
Domäne 2:  
Bindungsstelle  
für 1,3-BPG

Bindungsstellen der beiden  
Substrate: 10 Å entfernt;  
Kinase: Substratinduzierte  
Konformationsänderung



Sequentieller kinetischer Mechanismus:

Angriff des terminalen Phosphoryl-Sauerstoffs des ADP auf das C(1)-Phosphoratom von 1,3-BPG:



Nebenweg der Glykolyse:

## Synthese von 2,3-Bisphosphoglycerat in Erythrocyten

Glycerinaldehyd-3-Phosphat

GAP-DH ↓↑

1,3-Bisphosphoglycerat

Bisphospho-  
glycerat-  
Mutase

PGK ↓↑

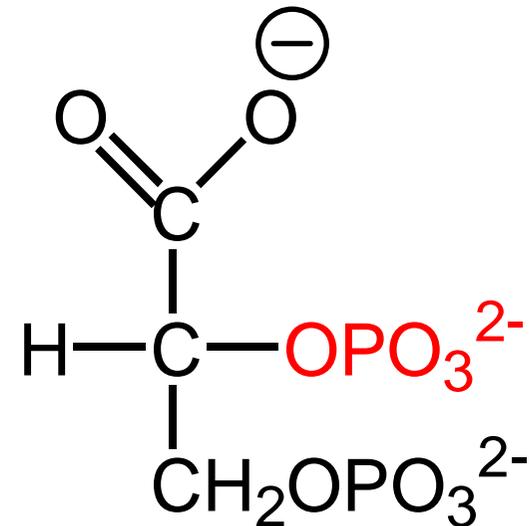
3-Phosphoglycerat

PGM ↓↑

2-Phosphoglycerat

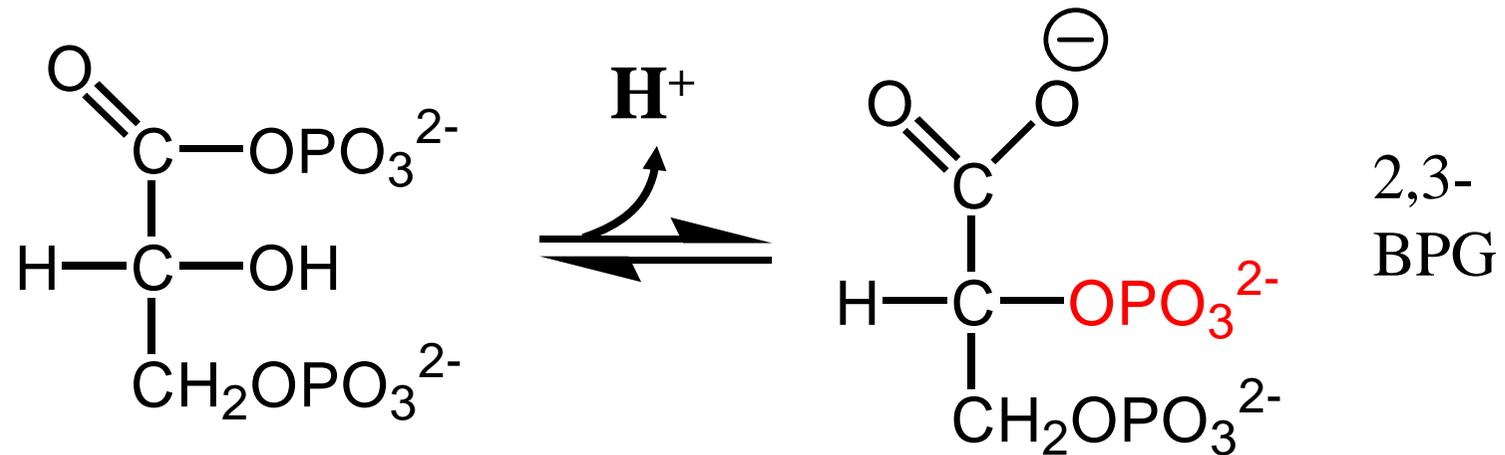
P<sub>i</sub>

2,3-  
Bisphospho  
glycerat-  
Phosphatase

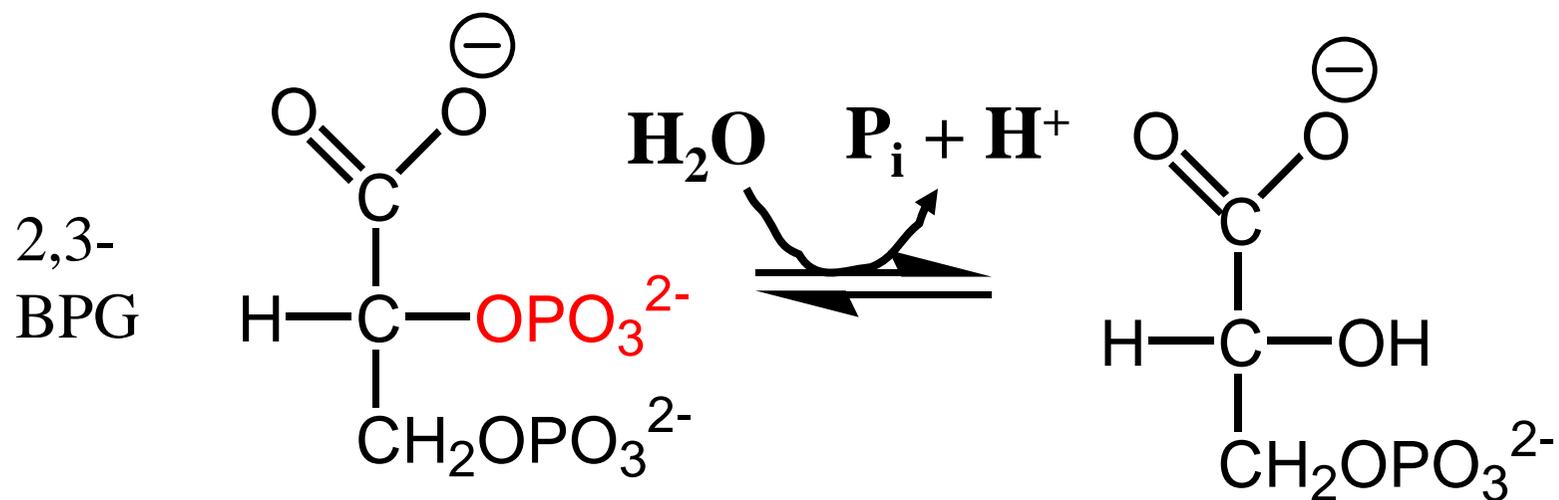


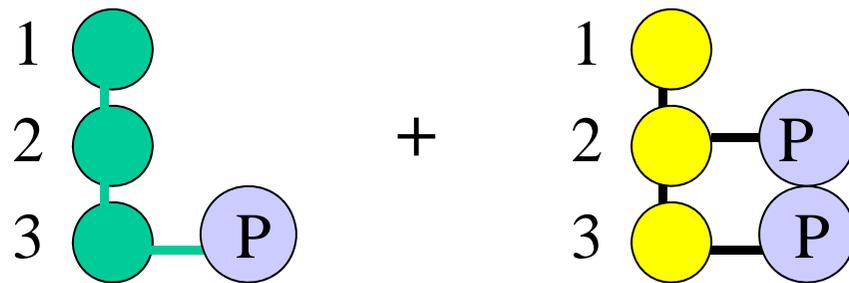
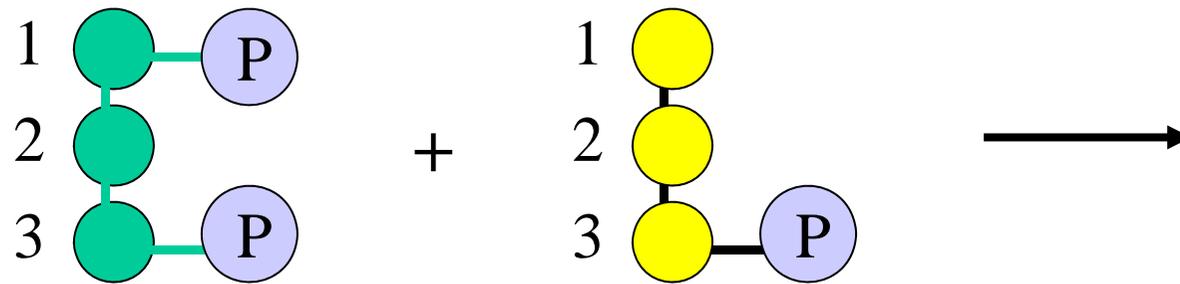
2,3-  
Bisphospho-  
glycerat

## Bisphosphoglycerat-Mutase



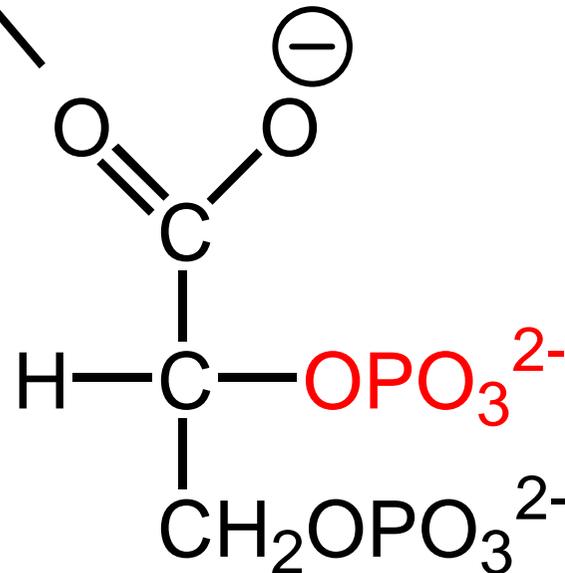
## 2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase





**Intermolekularer Phosphoryltransfer vom C(1) des  
1,3-BPG zum C(2) des 3-PG**

**Konzentration von 2,3 BPG  
in Erythrocyten: 3 mM; in  
Spuren in allen anderen  
Zellen**

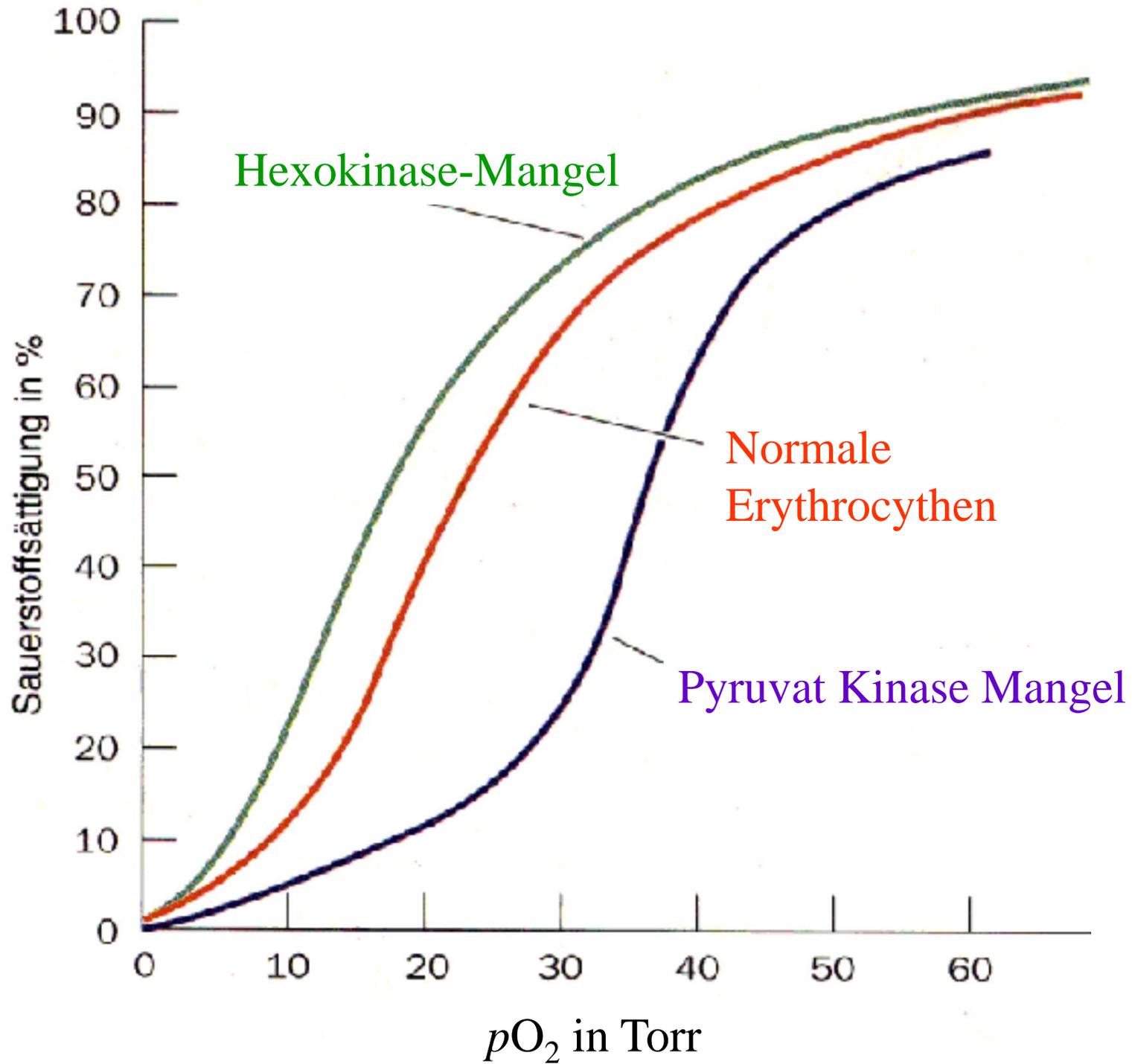


**2,3 BPG ist wichtigster  
allosterischer Effektor des  
Hämoglobins; Bindung an  
Desoxyhämoglobin: Erniedrigung  
der Sauerstoffaffinität**

Kopplung Glycolyse und  
Sauerstoffmetabolismus.

\* **Hexosekinasemangel**  
→ Sinken des 2,3-BPG-  
Spiegels → gesteigerte  
Sauerstoffaffinität des  
Hämoglobins

\* **Pyruvatkinase-  
Mangel** → Steigen des  
2,3-BPG-Spiegels →  
verringerte  
Sauerstoffaffinität des  
Hämoglobins



# Glycolyse 8. Reaktion: Phosphoglycerat-Mutase

**3-Phosphoglycerat  $\rightleftharpoons$  2-Phosphoglycerat**

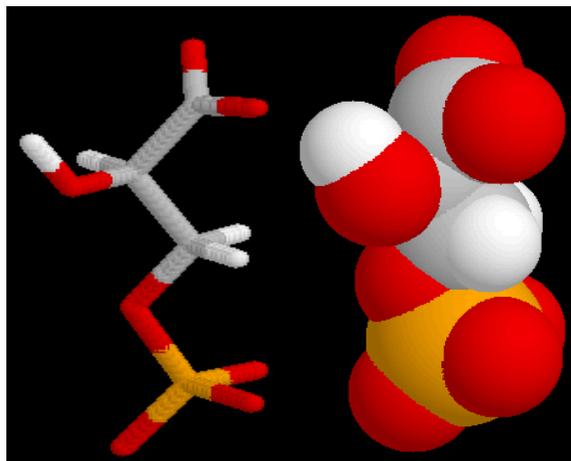
**Enzym: Isomerase**

**Phosphoglycerat-Mutase (EC 5.4.2.1)**

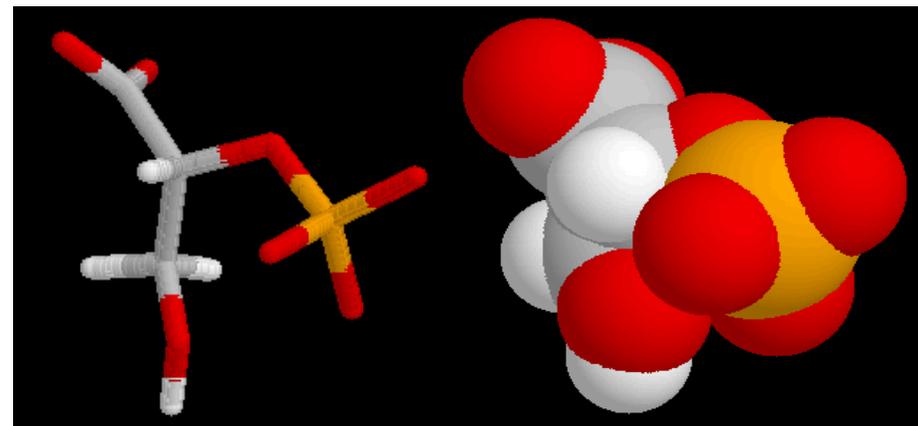
**Dimer: 2  $\times$  27 kDa (Kaninchenmuskel)**

**Cofactor: 2,3 -BPG**

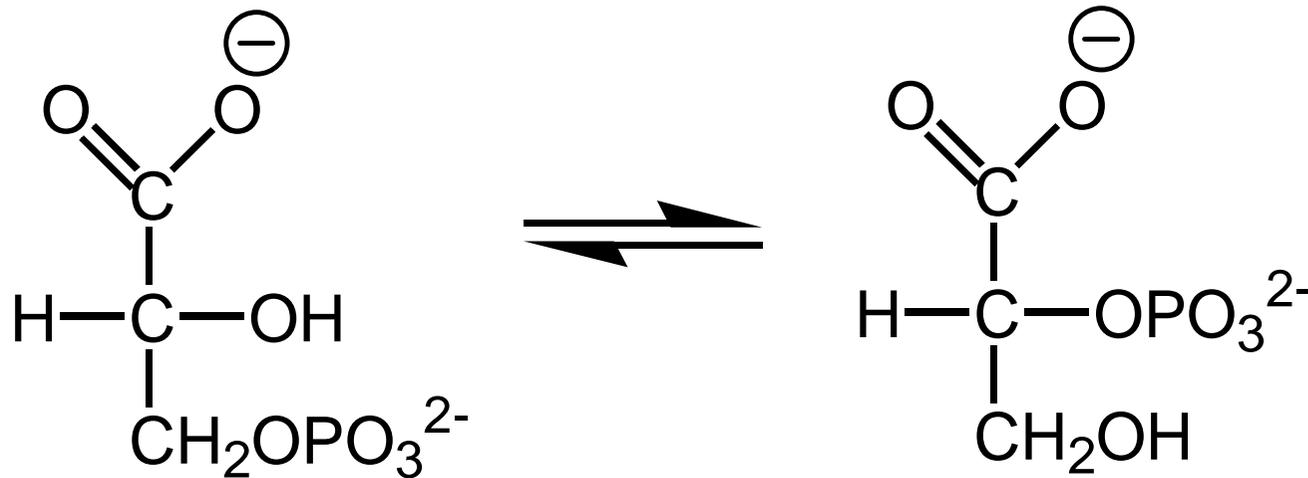
3-Phosphoglycerat



2-Phosphoglycerat



## Phosphoglycerat-Mutase



**Mutase:** Formal intramolekulare Übertragung einer funktionellen Gruppe (formal, da dies nicht immer mit dem Mechanismus vereinbar sein muss)

$$\Delta G^{\ominus'} = + 4,4 \text{ kJ/mol } (K_{\text{eq}} = 0,169); \Delta G' = 0,83 \text{ kJ/mol}$$

**Typ 1 Mutasen:** Hefe, Säugetiere

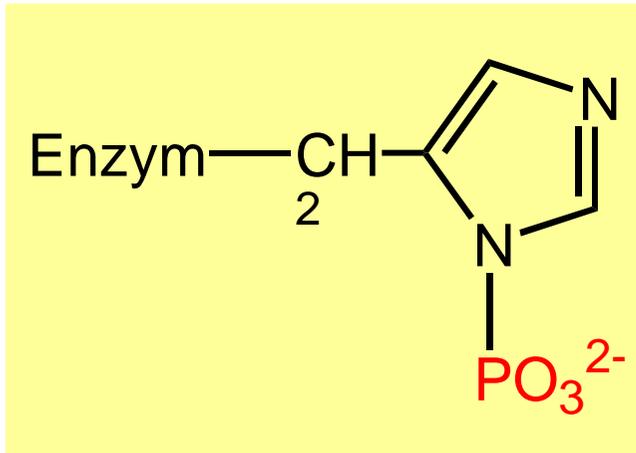
2,3-Bisphosphoglycerat als Cofaktor nötig

Experimentelle Daten:

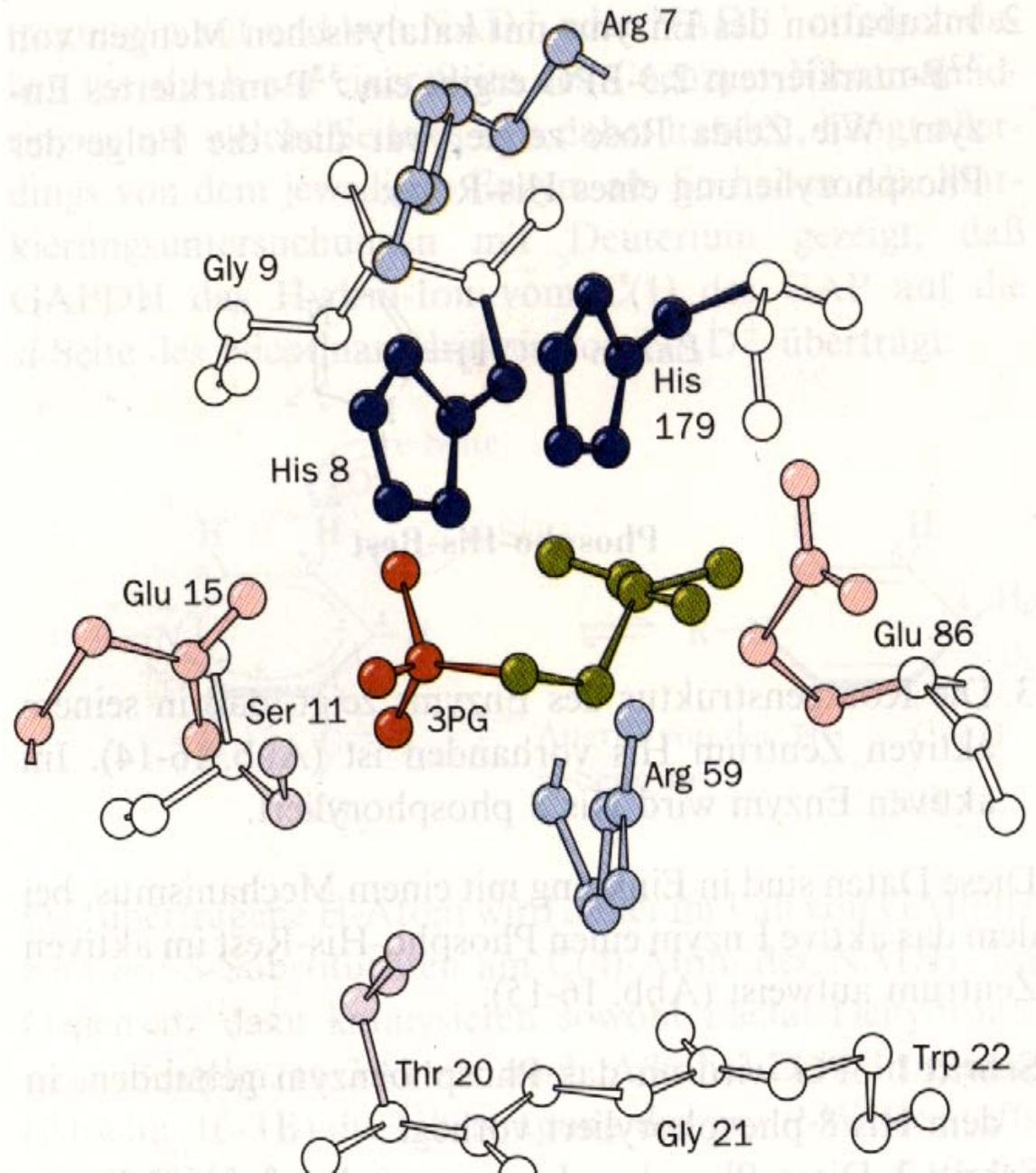
1. Für die Enzymaktivitäten sind katalytische Mengen von 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) erforderlich
2. Inkubation des Enzyms mit katalytischen Mengen von  $^{32}\text{P}$ -markiertem 2,3-BPG ergibt ein  $^{32}\text{P}$ -markiertes Enzym
3. Phosphoryliert wird ein im aktiven Zentrum sitzendes Histidin (H8)

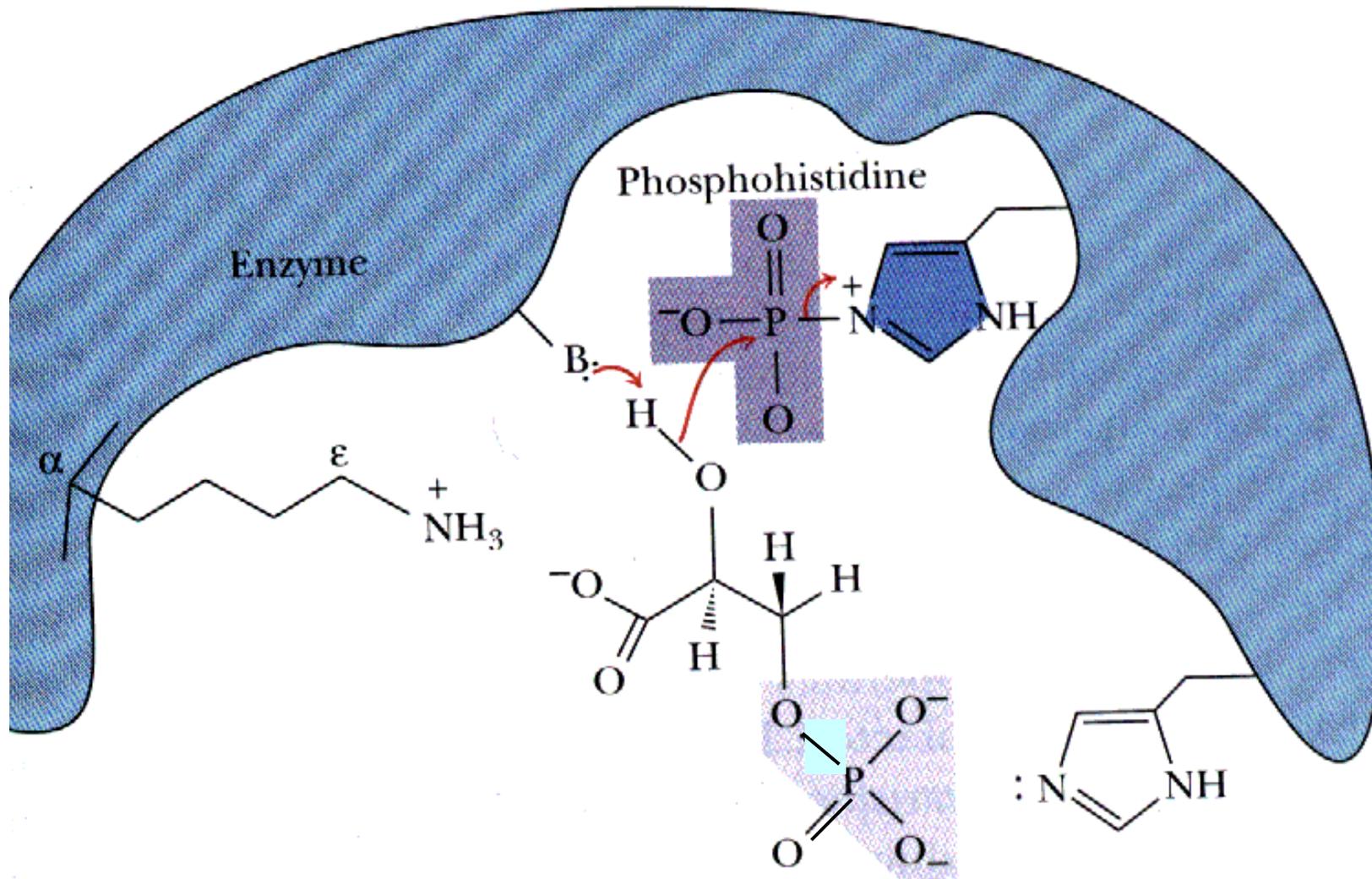
Aktives Zentrum  
von Hefe-  
Phosphoglycerat-  
Mutase

Aktives Enzym:  
**Histidin 8** ist  
phosphoryliert

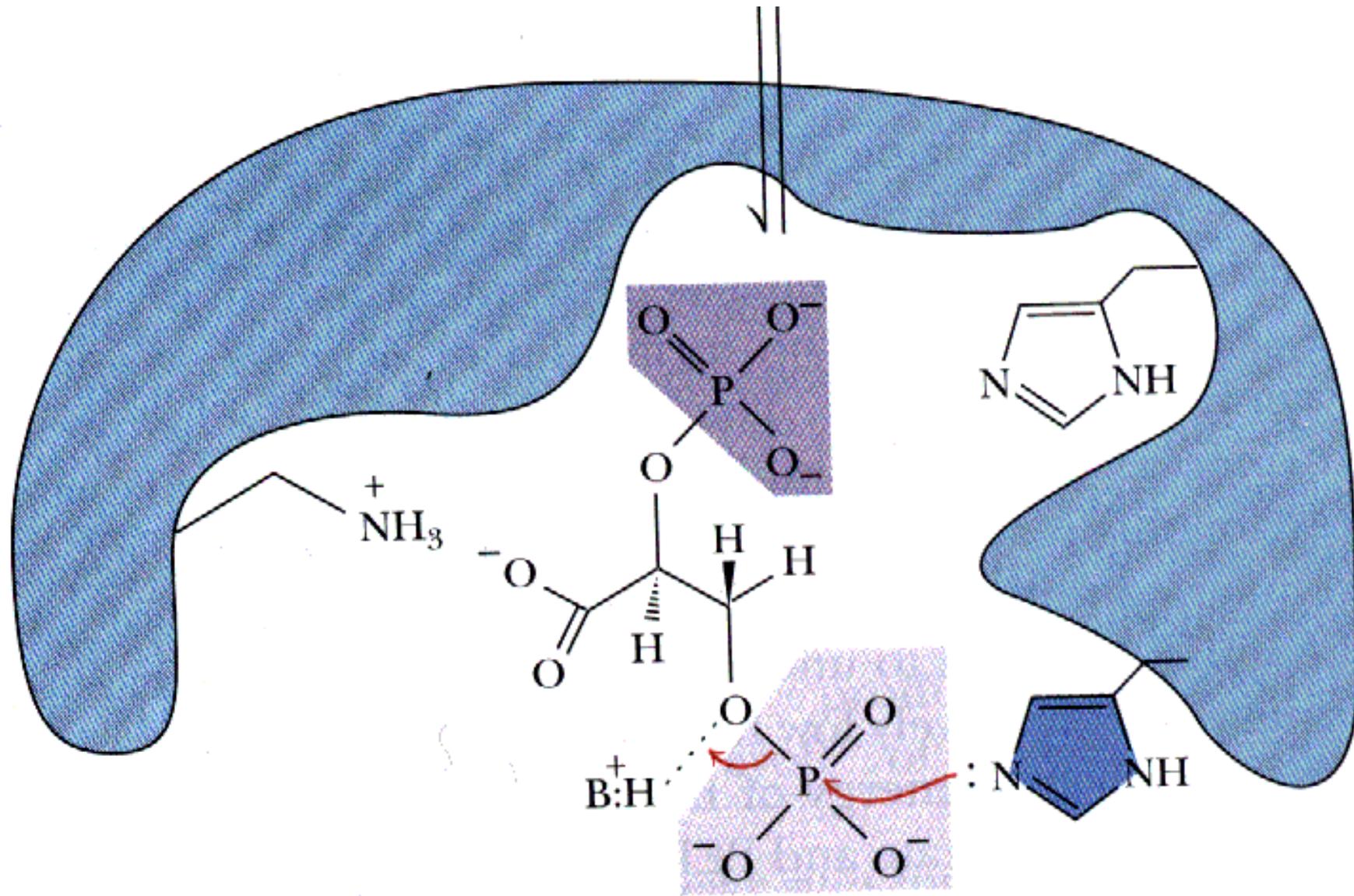


Phospho-His-Rest

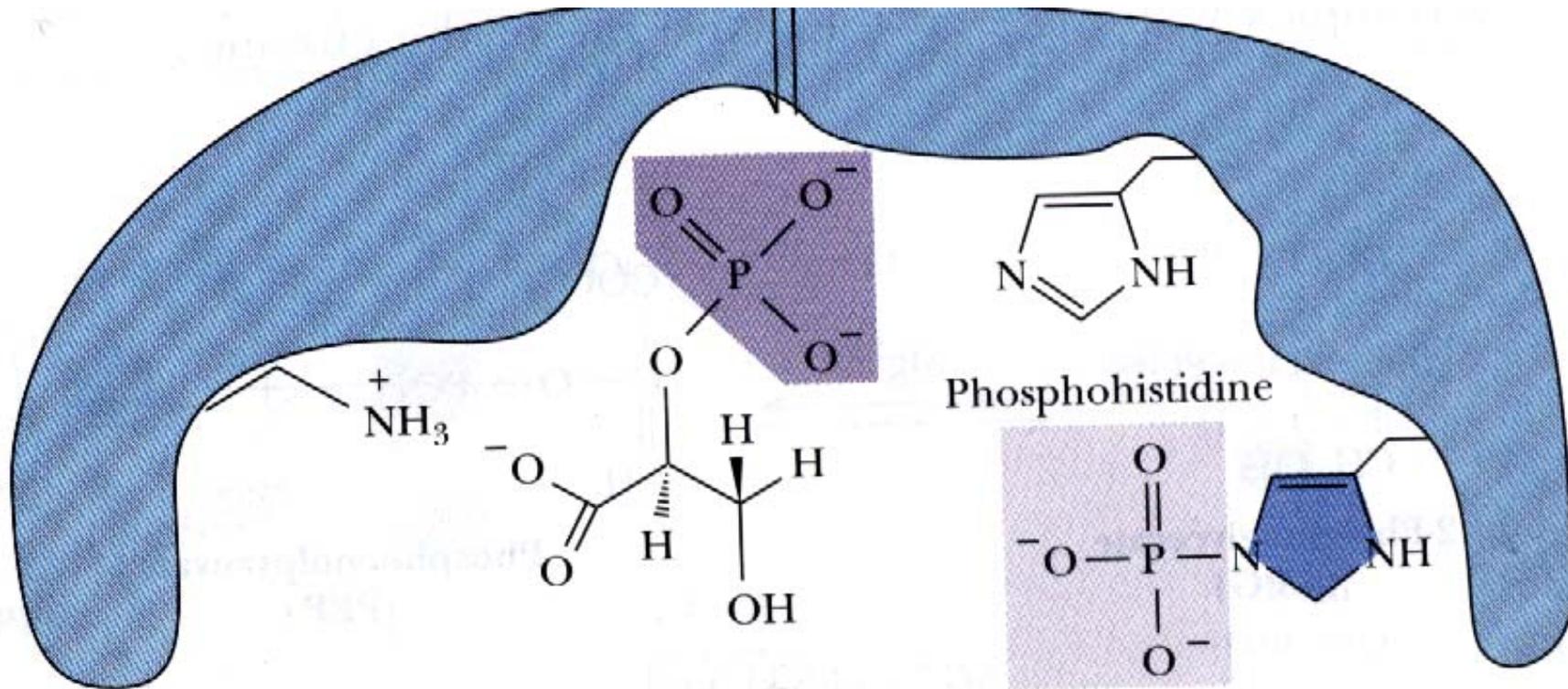




Schritt 1: 3-PG wird an das Phosphoenzym gebunden, in dem His 8 phosphoryliert ist



Schritt 2: Die Phosphorylgruppe wird auf das Substrat übertragen, wodurch 2,3-Bisphosphoglycerat im Komplex mit dem Enzym entsteht



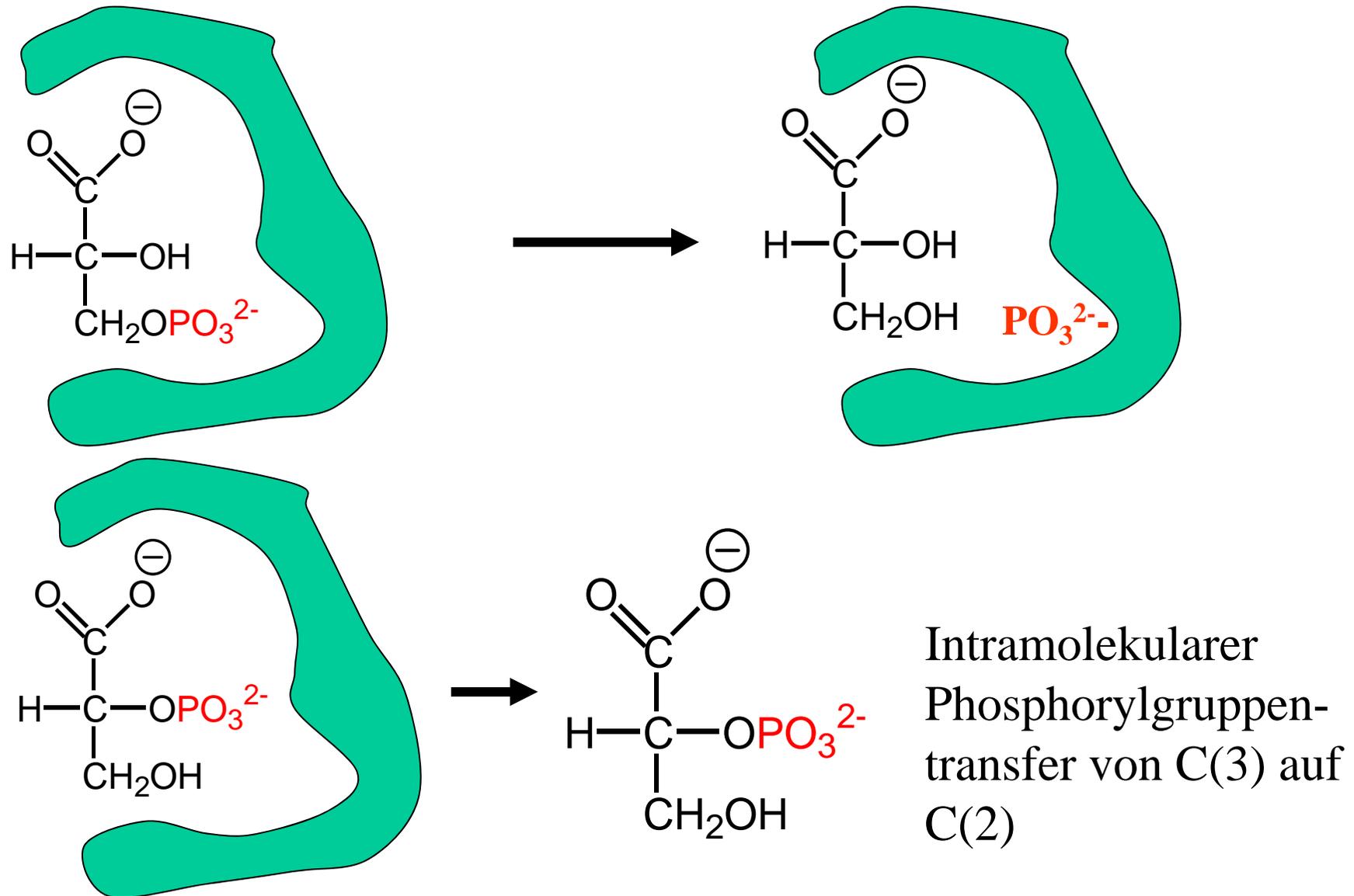
Schritt 3: Zersetzung des Komplexes unter Bildung des Produktes 2-PG, wobei das Enzym regeneriert wird.

Die ursprüngliche Phosphorylgruppe des 3-PG landet also am C(2) des nächsten 3-PG, das diese Reaktion eingeht!

Geringer Prozentsatz des 2,3-BPG dissoziiert ständig ab, daher muss 2,3-BPG in Spuren vorhanden sein.

## Typ 2 Mutasen: Pflanzen (z.B. Weizen)

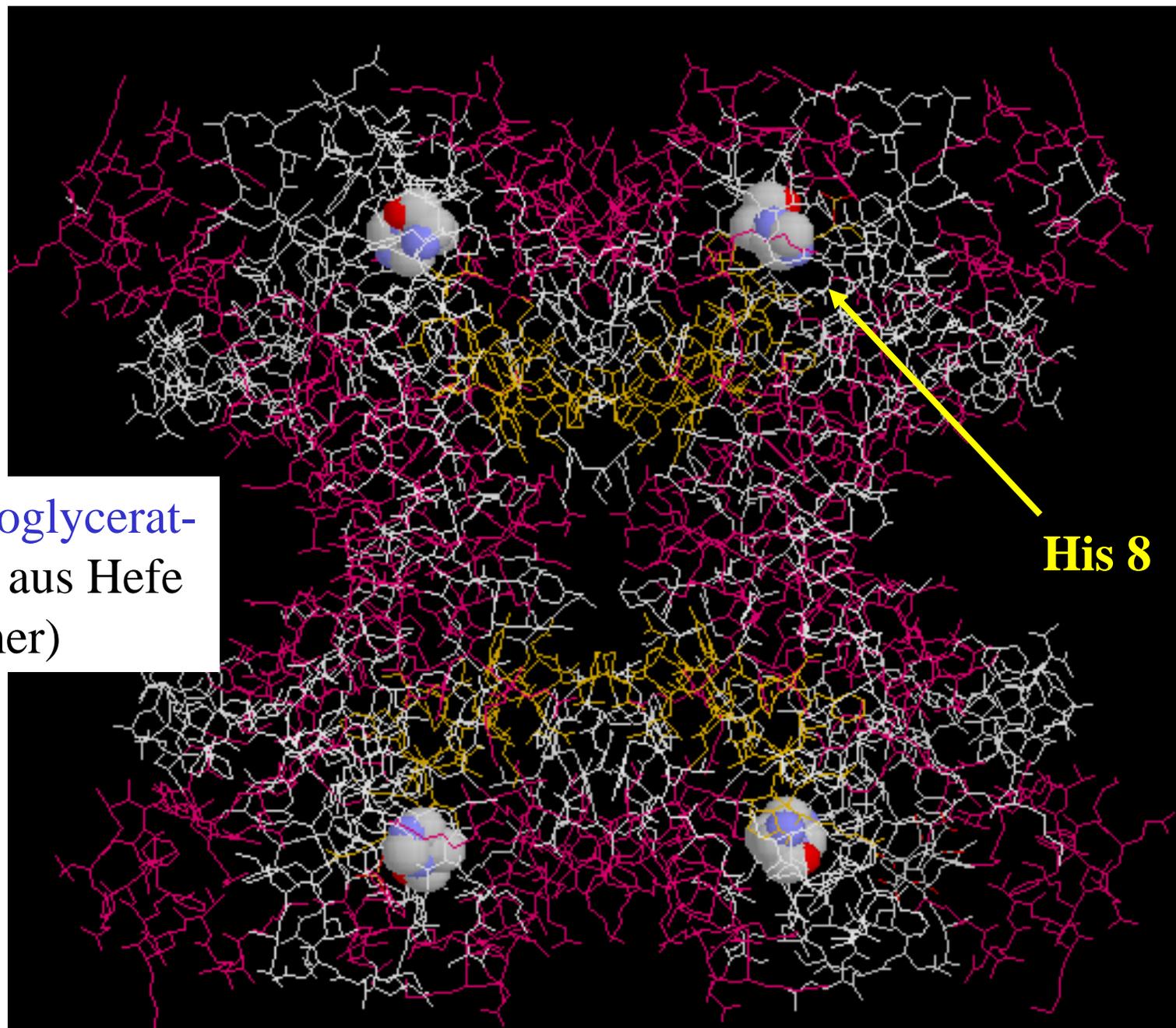
2,3-Bisphosphoglycerat ist kein Cofaktor





Phosphoglycerat-  
Mutase aus Hefe  
(Tetramer)

Phosphoglycerat-  
Mutase aus Hefe  
(Tetramer)



## Glycolyse 9. Reaktion: Enolase



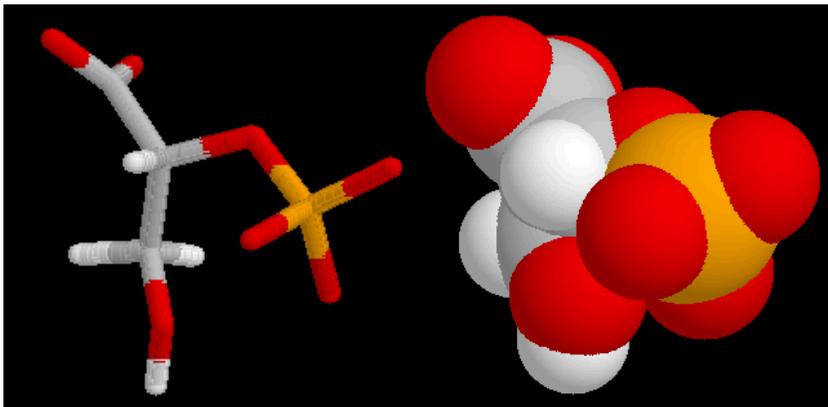
**Enzym:** Lyase

**Enolase (EC 4.2.1.11)**

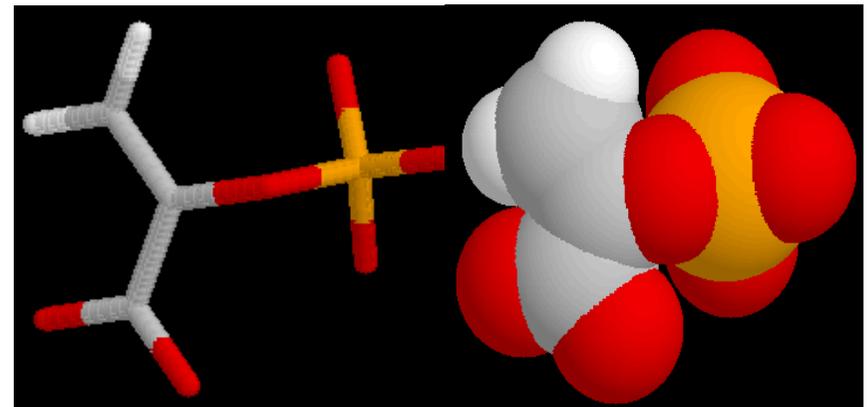
**Dimer: 2 × 41 kDa (Kaninchenmuskel)**

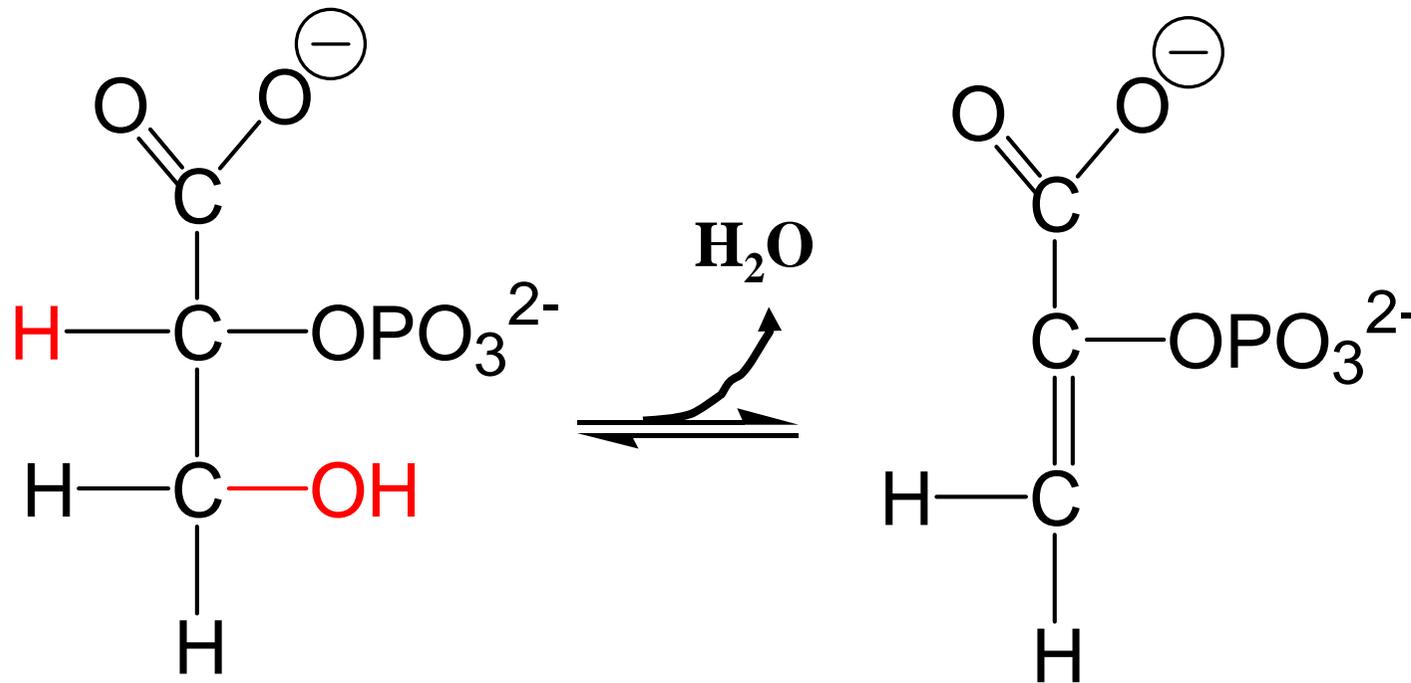
**Cofaktor: Mg<sup>2+</sup>**

2-Phosphoglycerat



Phosphoenolpyruvat, PEP





Dehydratation (Eliminierung eines Wassermoleküls)

$$\Delta G^{\ominus'} = + 1,8 \text{ kJ/mol } (K_{\text{eq}} = 0,5); \Delta G' = +1,1 \text{ kJ/mol}$$

„Innere Logik der Glykolyse“: Durch Hydrolyse von PEP kann viel mehr Energie freigesetzt (-61,9 kJ/mol) werden als durch Hydrolyse von 2-PG (-17,6 kJ/mol).

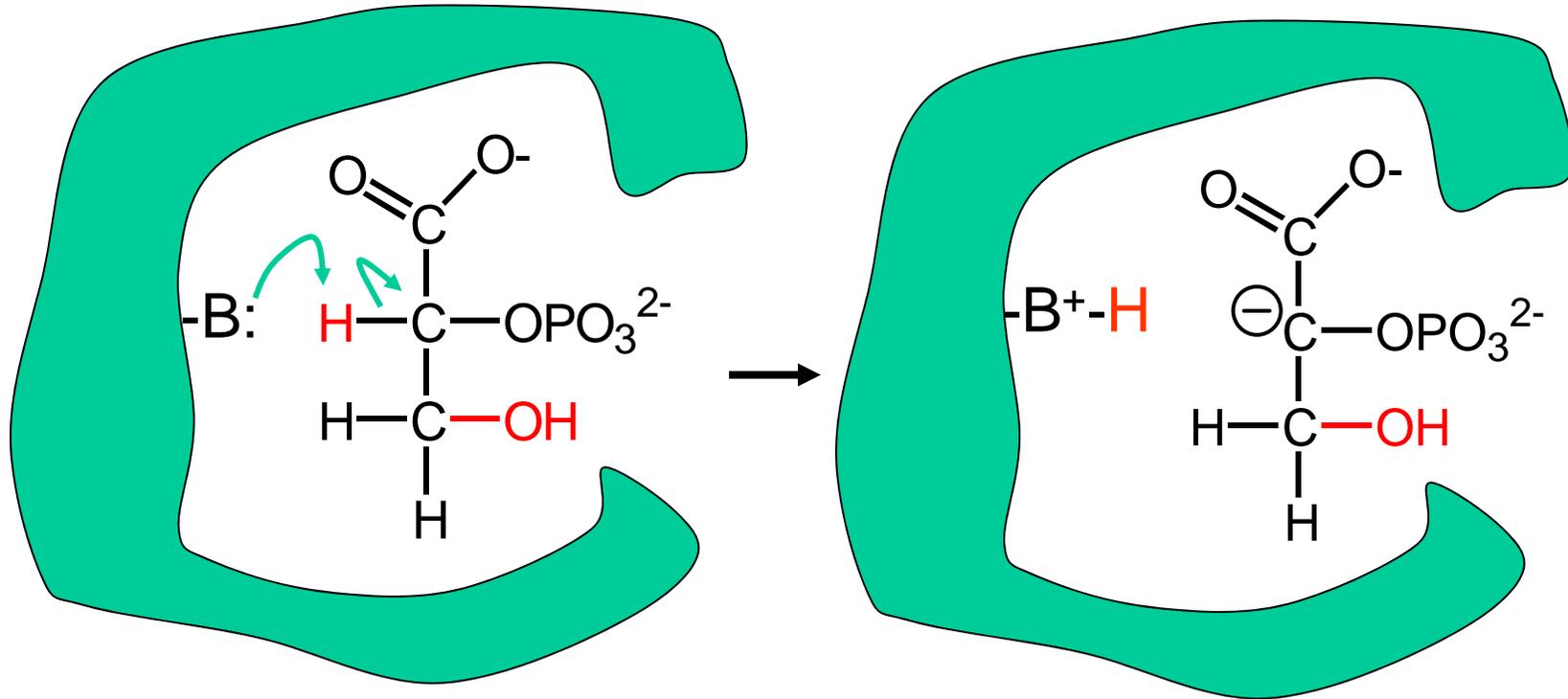
## **Inhibierung der Enolase durch Fluorid:**

Anwendung in der Kariesprophylaxe. Durch Hemmung der bakterieller Enolase durch Fluorid wird der Abbau von Zucker in organische Säuren durch Bakterien in den Plaques verhindert. Säuren würden den Zahnschmelz [Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )] auflösen. Hemmung der **Enolase**. Konsequenz: Akkumulation von 2-PG und (durch **PG-Mutase** Aktivität) von 3-PG.

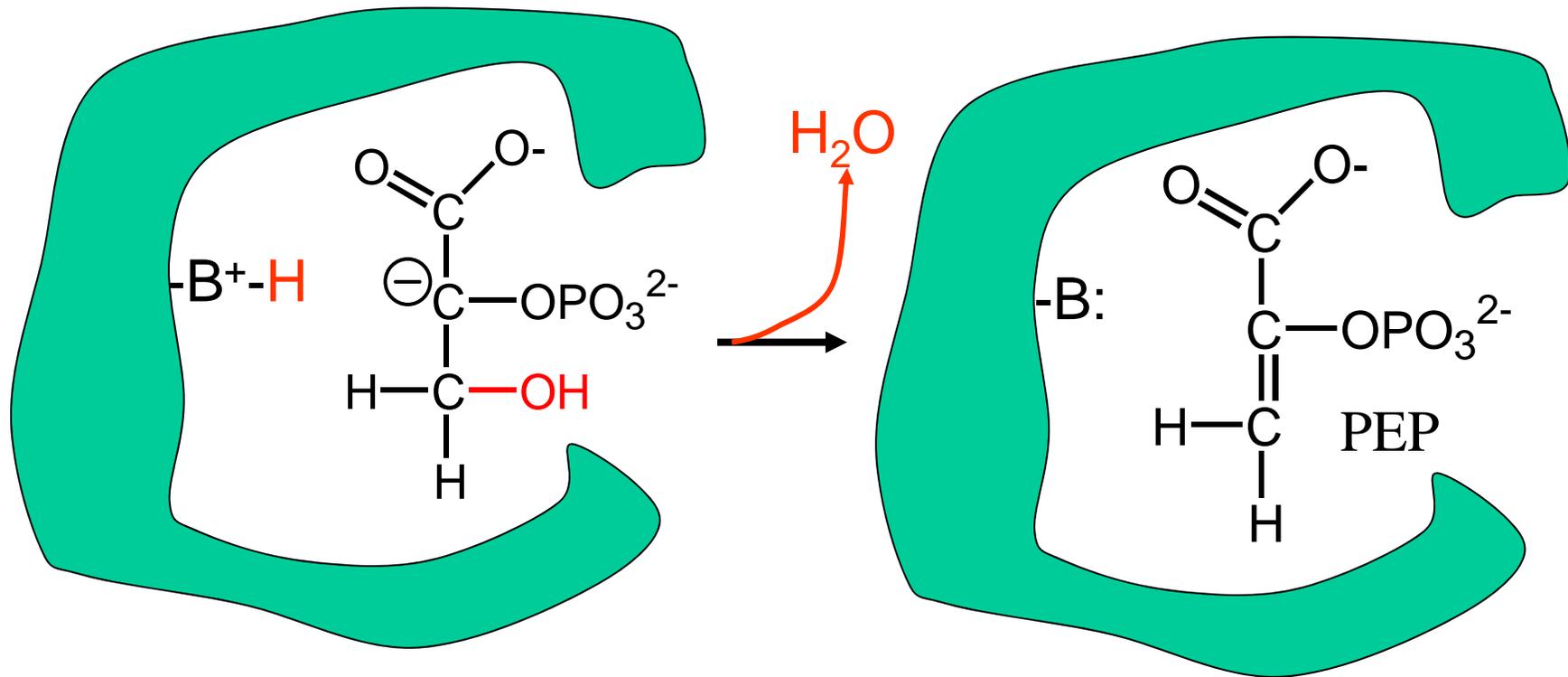
[F<sup>-</sup> wird aber auch in den Apatit des Zahnschmelzes eingebaut; der Ersatz von OH<sup>-</sup> durch F<sup>-</sup> im Apatit macht das Mineral resistenter gegen seine Auflösung].

## **Reaktionsmechanismus der Enolase:**

Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts im Enzym-Turnover. Austausch des C(2) Protons von 2-PG mit dem Lösungsmittel viel schneller als die PEP-Bildung (→ Carbanion-Bildung durch die Gegenwart einer basischen Gruppe erfolgt sehr rasch). Dagegen tauscht der C(3)-Sauerstoff des 2-PG mit dem Lösungsmittel mit einer Geschwindigkeit aus, die jener der PEP-Bildung entspricht.



Carbanion-Bildung an C(2) durch Base (schnelle Reaktion).  
 Abstrahiertes Proton tauscht rasch mit Lösungsmittel (bulk phase) aus. Beweis durch Isotopenaustauschuntersuchungen, dass der Austausch des C(2)-Protons mit dem Lösungsmittel 12× schneller als die PEP-Bildung abläuft.



Eliminierung der C(3)-OH-Gruppe (langsamer = geschwindigkeitsbestimmender Schritt).

Enolase

Homodimer



## Glycolyse 10 Reaktion: Pyruvat-Kinase



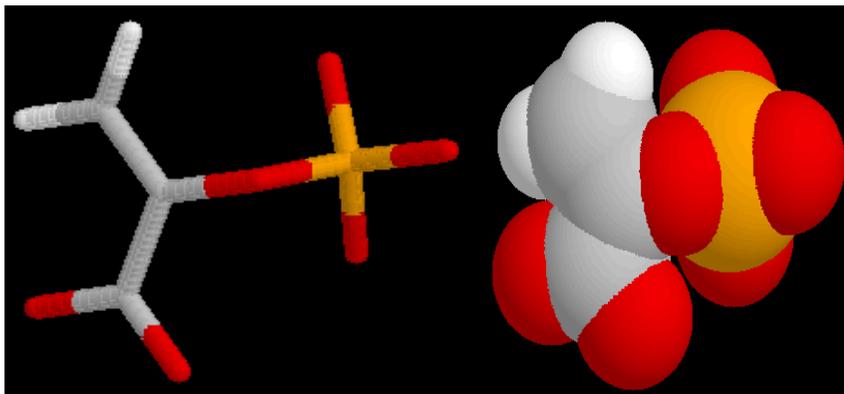
**Enzym:** Phosphotransferase

**Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40)**

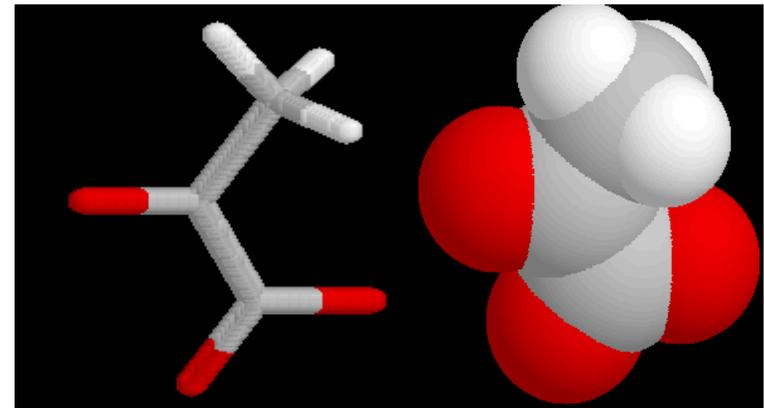
**Tetramer: 4 × 57 kDa (Kaninchenmuskel)**

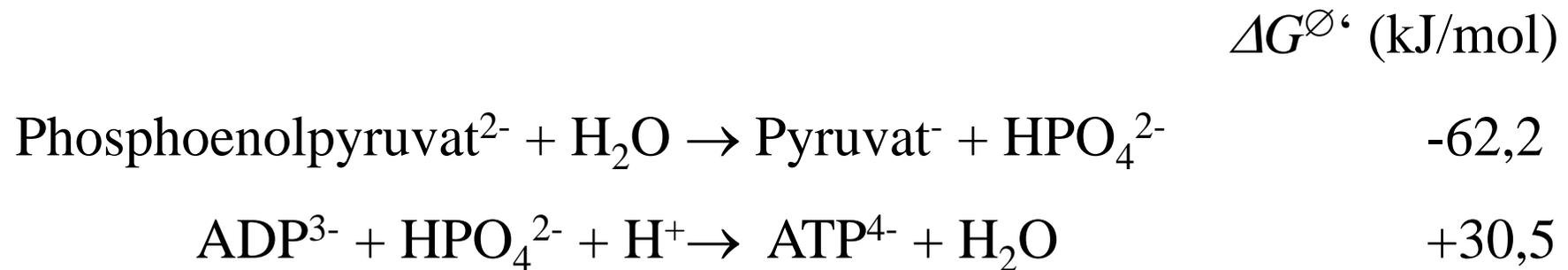
**Cofactor: Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>**

Phosphoenolpyruvat



Pyruvat





$K_{eq} = 363000$ ;  $\Delta G'$  (Erythrocyten) = -23 kJ/mol

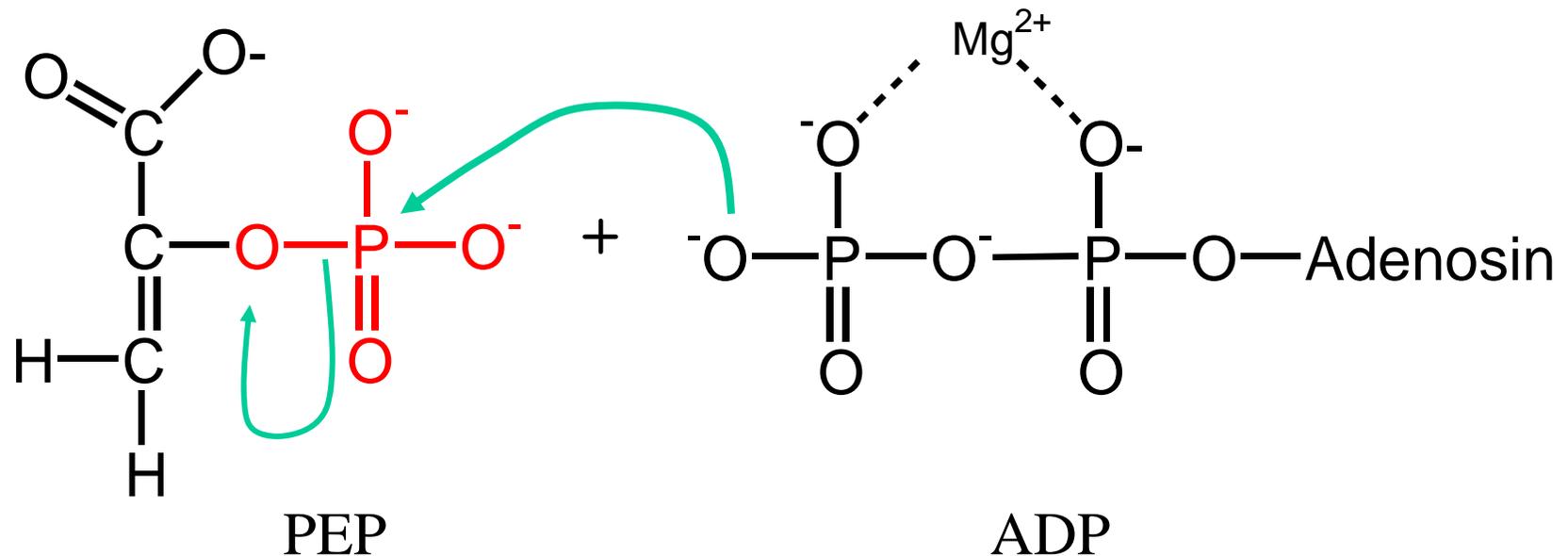
Dritte stark exergonische Reaktion: Dritter Regulationspunkt der Glycolyse. Pyruvat-Kinase wird allosterisch reguliert.

Warum ist Phosphoenolpyruvat so „energiereich“:

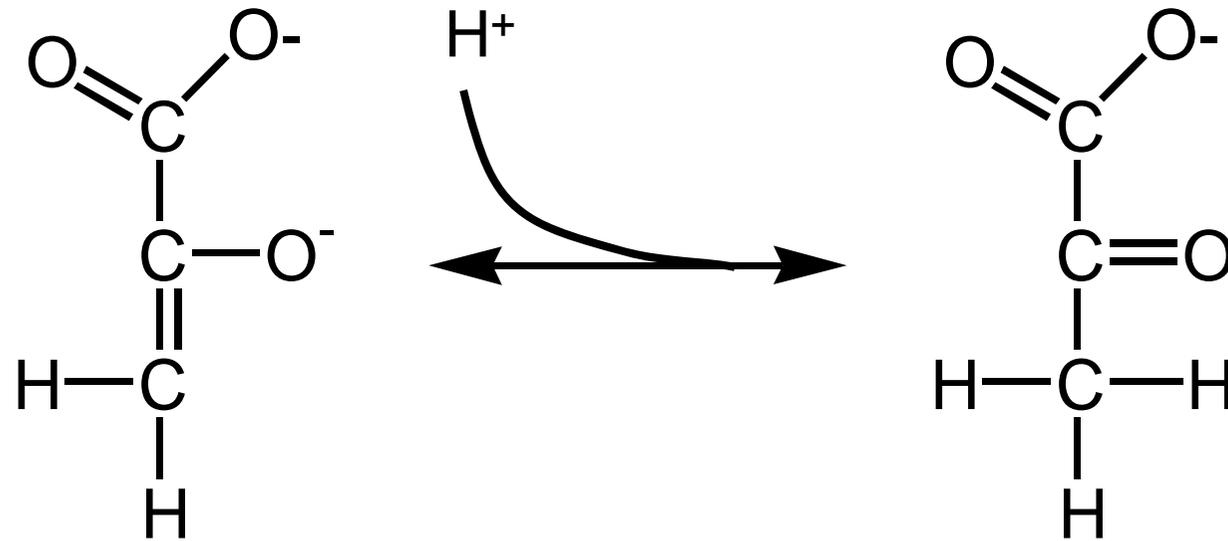
Die Phosphatgruppe „fixiert“ quasi das Molekül in seiner instabilen Enolform!

## Mechanismus:

1. Das  $\beta$ -Phosphorylsauerstoffatom des ADP greift das PEP-Phosphoratom nucleophil an. Unter Verdrängung von Enolpyruvat wird ATP gebildet.

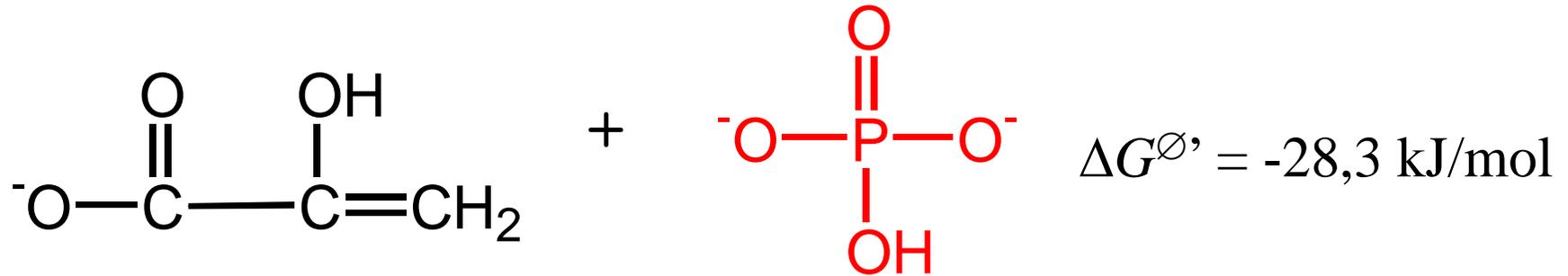
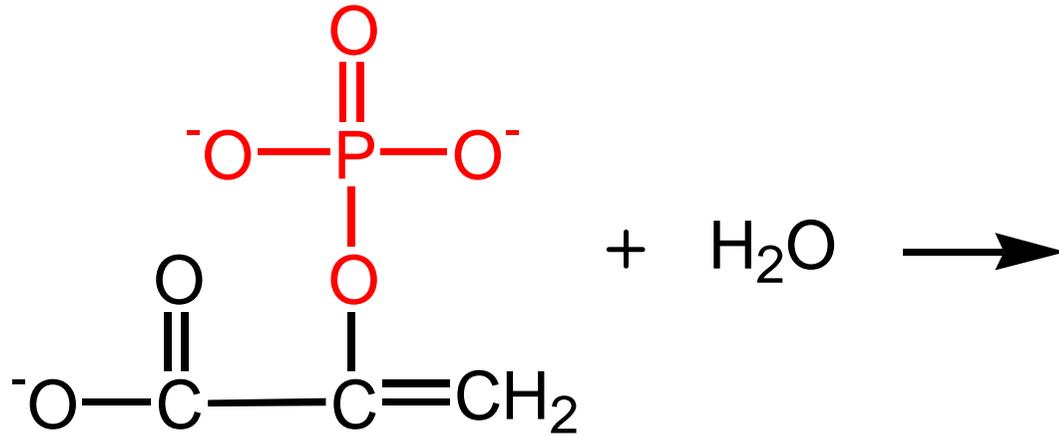


2. Enolpyruvat geht in Pyruvat über. Stark exergonische Keto-Enol-Tautomerisierung (treibt ATP-Synthese an).



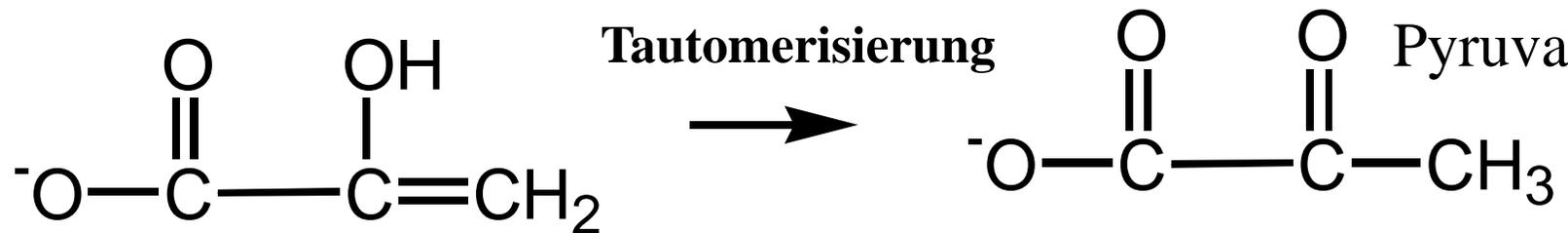
Enolpyruvat

Pyruvat



Instabile Enolform des Pyruvats

Stabile  
Ketoform des  
Pyruvats



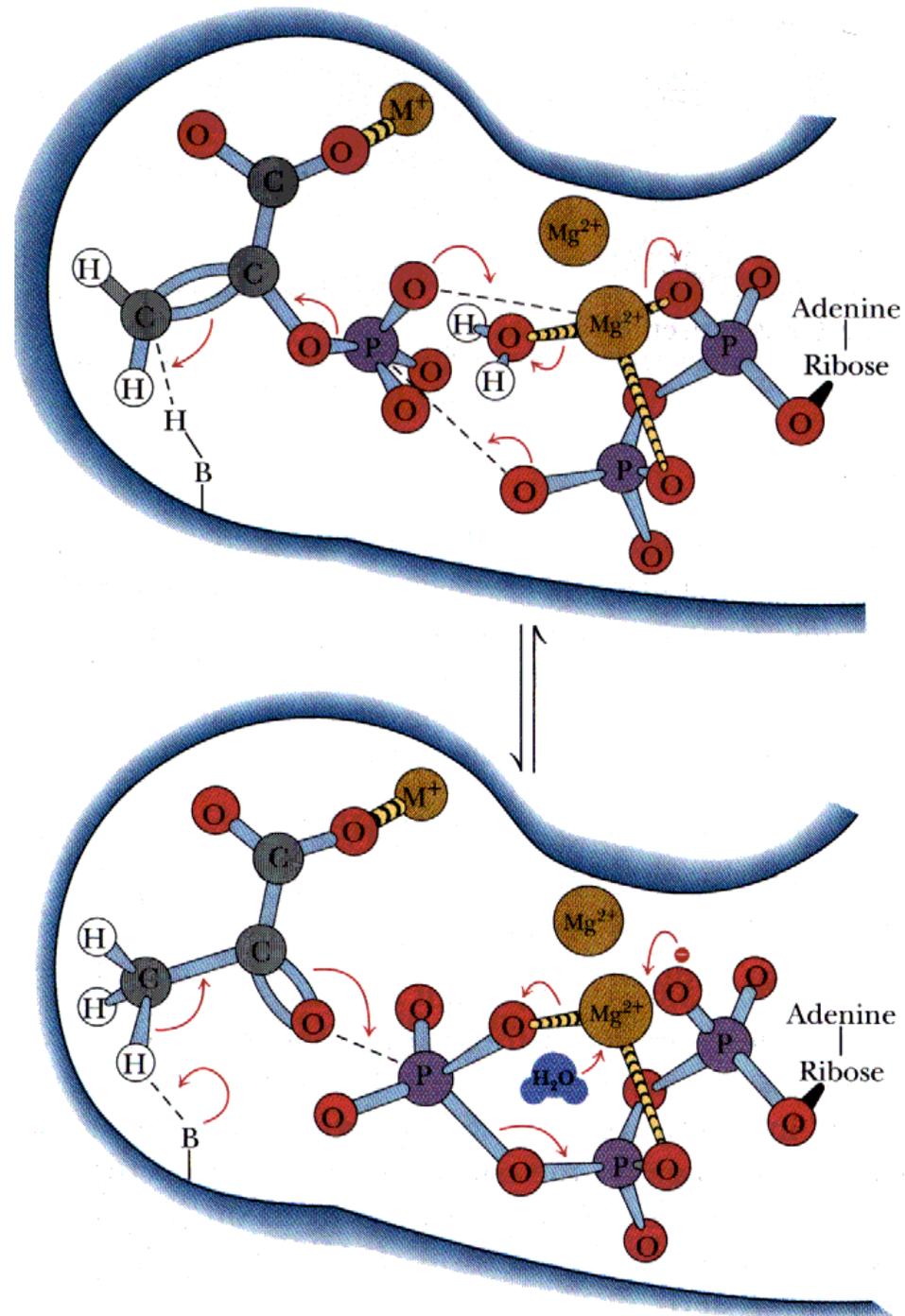
$$\Delta G^{\ominus'} = -33,6 \text{ kJ/mol}$$

## Pyruvat-Kinase-Reaktion:

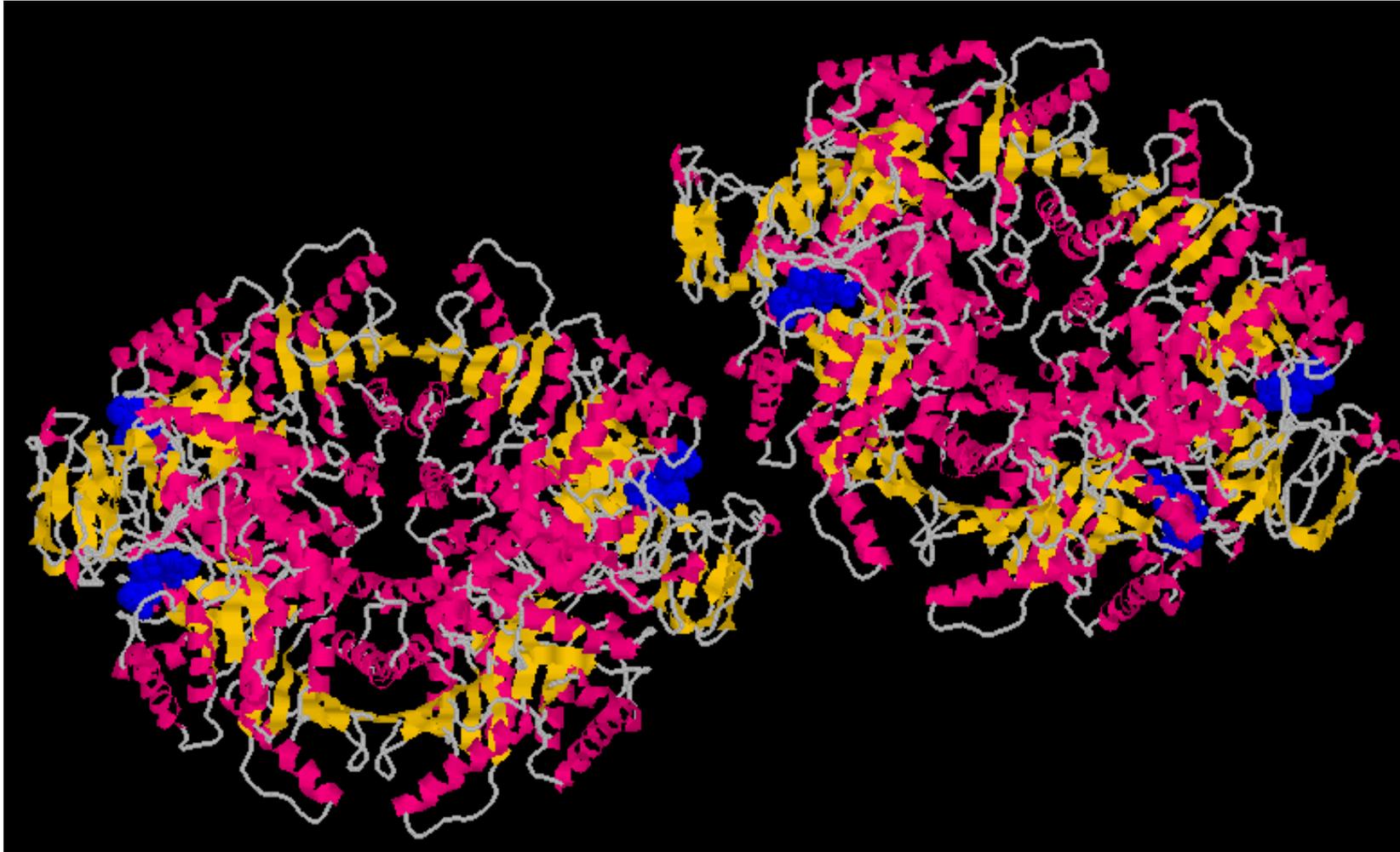
Phosphorylgruppen-Transfer  
von PEP auf ADP

4 Stufen:

- Koordinativ zu ADP gebundenes Wasser wird durch die Phosphorylgruppe des PEP ersetzt
- $Mg^{2+}$  dissoziiert vom  $\alpha$ -P des ADP ab
- Transfer der Phosphorylgruppe
- Protonierung der Enolatform des Pyruvats



# Pyruvat-Kinase





Evolution der Glycolyse ?

Zufälliges Auftreten der Enzymaktivität mit anschließender Feinabstimmung ? UNWAHRSCHEINLICH!

WAHRSCHEINLICHER:

**Gen-DUPLIKATIONEN und divergente Evolution des Enzyms des vorhergehenden Schritts.**

Beispiel: Enolase und Pyruvat-Kinase besitzen beide C-terminale PEP-bindende  $\beta$ -Barrels mit fast deckungsgleichem Rückgrat

# Inhaltsverzeichnis Glycolyse

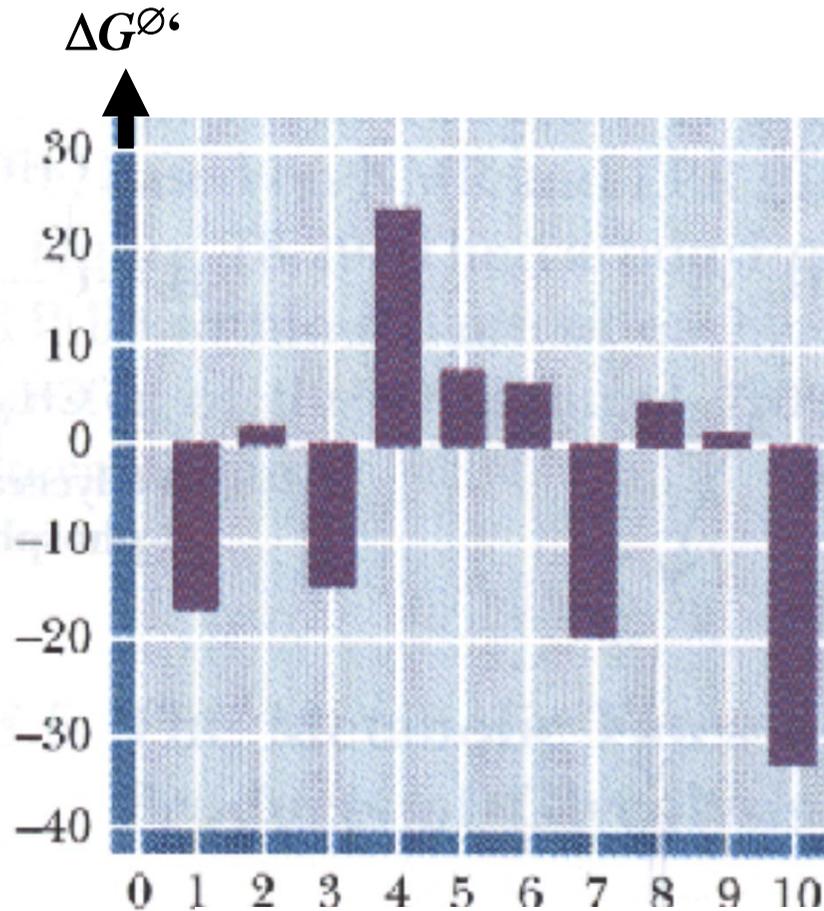
1. Glucosetransport
2. Abfolge der chemischen Umwandlungen der Glucose in Pyruvat (10 Reaktionen)
3. Mechanismen der einzelnen Reaktionen
4. Thermodynamik und Regulation

# Reaktionen und Thermodynamik der Glycolyse

Reaktion	Enzym	$\Delta G^{\circ\prime}$ kJ/mol	$K_{eq}$ 25°C	$\Delta G^{\prime}$ 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>	Phosphofructo- kinase	-14,2	310	-18,8
Fructose-1,6-bisphosphat $\rightleftharpoons$ Dihydroxyacetonphosphat + Glycerinaldehyd-3-P	Aldolase	+23,9	$6,4 \times 10^{-5}$	-0,23

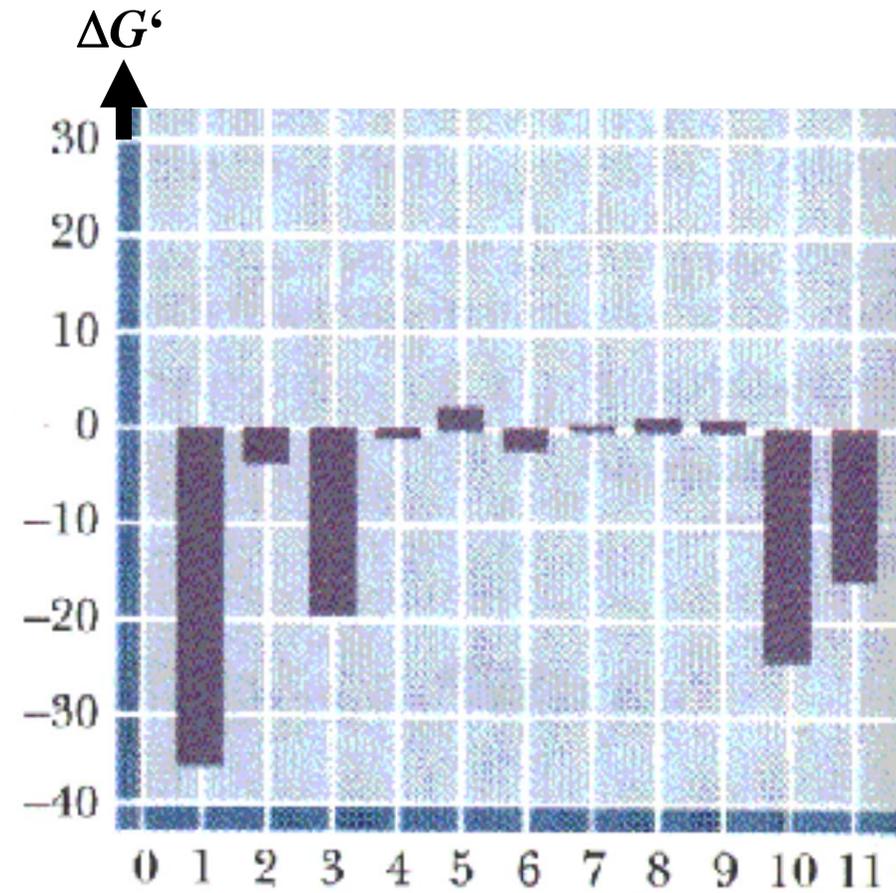
Reaktion	Enzym	$\Delta G^{\ominus'}$ kJ/mol	$K_{eq}$	$\Delta G'$ kJ/mol
Dihydroxyacetonphosphat $\rightleftharpoons$ Glycerinaldehyd-3-P	<b>Triosephosphat- Isomerase</b>	7,56	0,0472	2,41
Glycerinaldehyd-3-P + P <sub>i</sub> + <b>NAD<sup>+</sup></b> $\rightleftharpoons$ 1,3- Bisphosphoglycerat + <b>NADH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

Standardbedingungen



Glycolyse-Reaktionen

*in vivo*-Konzentrationen



Glycolyse-Reaktionen

- (1) Hexokinase; (3) Phosphofruktokinase; (10) Pyruvatkinase;  
(11) Lactat-Dehydrogenase

Die Glycolyse hat zwei Funktionen:

1. Produktion von ATP
2. Produktion von Bausteinen für Biosynthesen (Beispiel: Fettsäure-Biosynthese aus Acetyl-CoA).

Enzyme, die weitgehend irreversible Reaktionen katalysieren, sind generell in Stoffwechselwegen potentielle Kontrollpunkte. Diese Enzyme haben also neben katalytischen auch regulatorische Funktionen (Kontrollpunkte).

Glycolyse:

Hexokinase

Phosphofruktokinase

Pyruvatkinase

## Hexokinase

Die **Hexokinase** wird durch **Glucose-6-Phosphat (G6P)** gehemmt. (**feedback-Hemmung**). In der Leber befindet sich anstelle der Hexokinase **Glucokinase**, die nicht durch G6P gehemmt wird. Glucokinase phosphoryliert Glucose nur, wenn sie in höheren Mengen vorhanden ist. Ihr hoher  $K_M$ -Wert garantiert die Glucoseversorgung des Gehirns und der Muskulatur.

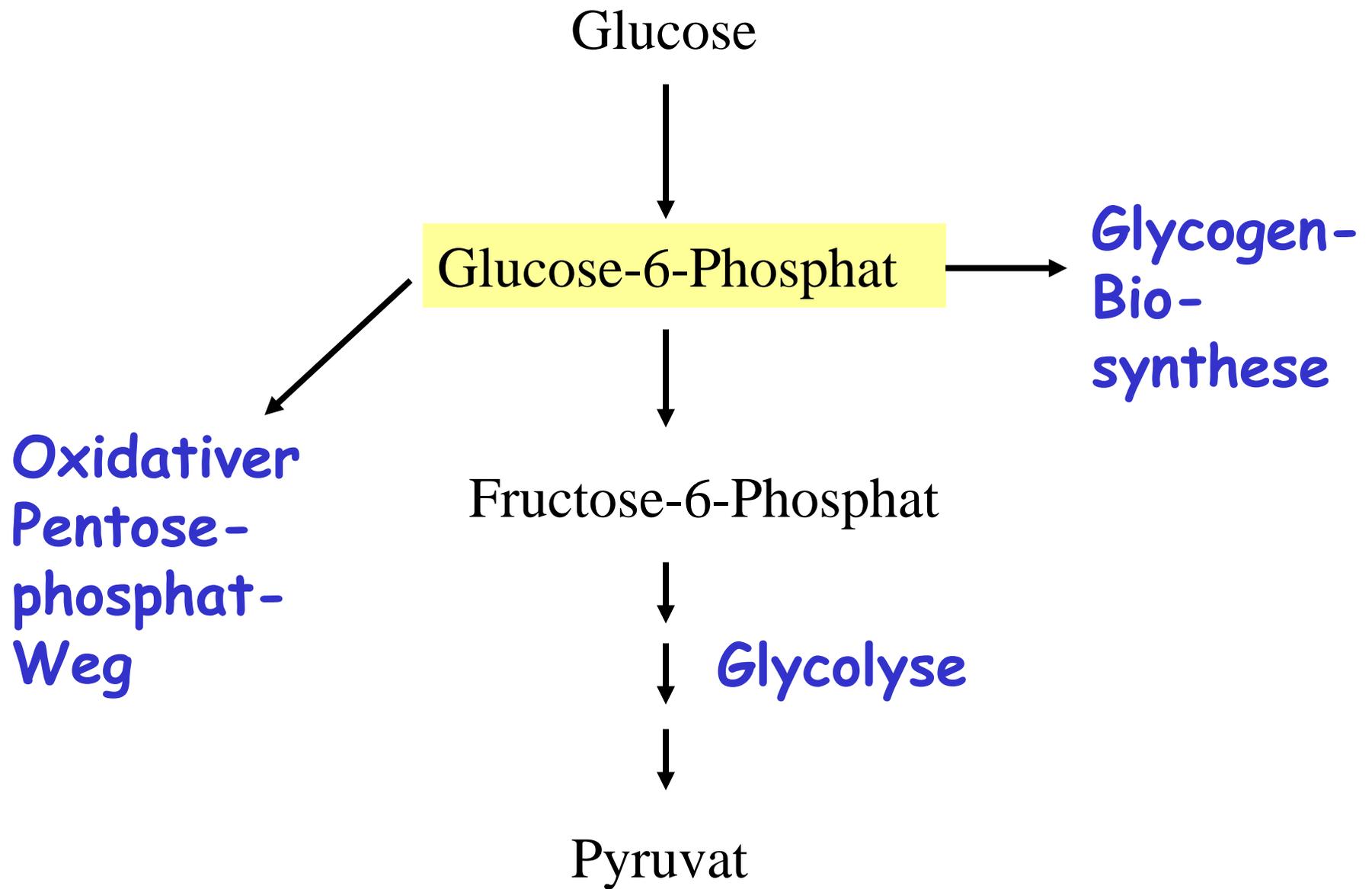
Die Aufgabe der **Glucokinase** besteht darin, Glucose-6-phosphat für die Synthese von Glycogen zu liefern, einer Glucose-Speicherform. Die Expression von **Glucokinase** wird durch Insulinausschüttung gesteigert.

Das eigentliche Schrittmacherenzym der Glycolyse ist aber die **Phosphofruktokinase**.

## Phosphofruktokinase

Viel bedeutender als die **Hexokinase** hinsichtlich der Regulation ist die **Phosphofruktokinase**. Warum? Weil Glucose-6-P nicht nur in der Glycolyse, sondern auch in der Glycogen-Biosynthese und dem Pentosephosphatweg (NADPH Produktion) eine Rolle spielt. Es gibt daher Sinn, dass die erste irreversible Reaktion, die NUR in der Glycolyse stattfindet (= **Phosphofruktokinase**-Reaktion) den wichtigsten Regulationspunkt darstellt (den sog. “*committed step*”).

Allgemein stellt jenes Enzym, das die Schrittmachereaktion einer Reaktionsfolge katalysiert, das wichtigste Kontrollelement dieses Stoffwechselweges dar.



## Pyruvatkinase

**Pyruvatkinase** katalysiert den dritten irreversiblen Schritt der Glycolyse. Es kontrolliert die Menge der gebildeten Endprodukte ATP und Pyruvat. Pyruvat kann als Baustein für Biosynthesen dienen oder weiteroxidiert werden. In Säugetieren gibt es zwei Isoformen (Isozyme, Isoenzyme) der **Pyruvat-Kinase** (allosterisches Enzym: Tetramer), die von verschiedenen Genen codiert werden. Beide Isoformen werden durch **Fructose-1,6-bisphosphat** (FBP) aktiviert (**feedforward-Aktivierung**).

L-Typ (Isoform): Leber; M-Typ (Isoform): Muskel, Gehirn.

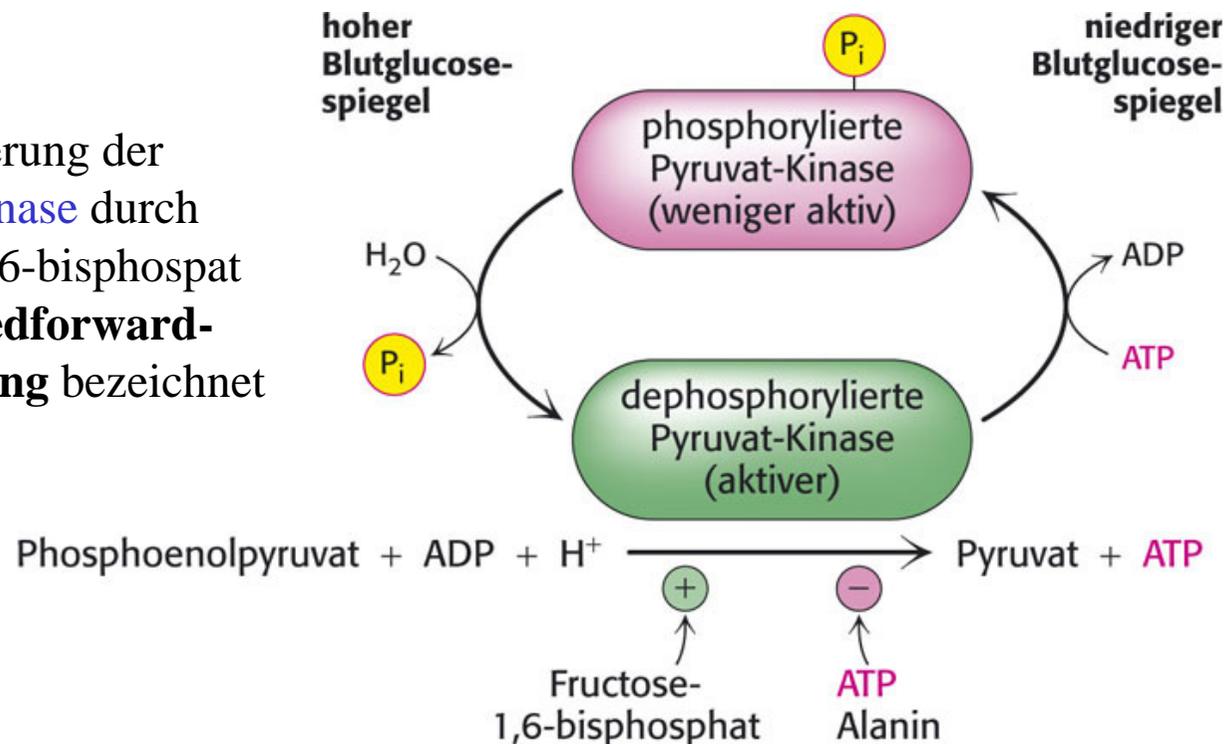
Hohe Energieladung (**ATP**) und **Alanin** (Aminosäure-Äquivalent des Pyruvats) inhibieren die **Pyruvat-Kinase**.

Das Leber (L)-Isoenzym, nicht jedoch das M-Isozym, wird zusätzlich durch **Proteinphosphorylierung** in seiner Aktivität modifiziert.

Niedriger Glucosespiegel im Blut ist der Auslöser einer bedeutenden Reaktions-Kaskade (cAMP-Kaskade, siehe Einheit 10).

Das Hormon **Glucagon** wird ausgeschüttet und aktiviert (cAMP-abhängig) letztendlich eine sog. **Protein-Kinase**, die die L-Form der **Pyruvat-Kinase** phosphoryliert. In phosphorylierter Form ist **Pyruvat-Kinase** weniger aktiv und PEP wird eher für die Glucose-Synthese (Gluconeogenese) verwendet. Auch ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  führt zur Phosphorylierung der **Pyruvat-Kinase**.

Die Aktivierung der **Pyruvat-Kinase** durch Fructose-1,6-bisphosphat wird als **feedforward-Stimulierung** bezeichnet



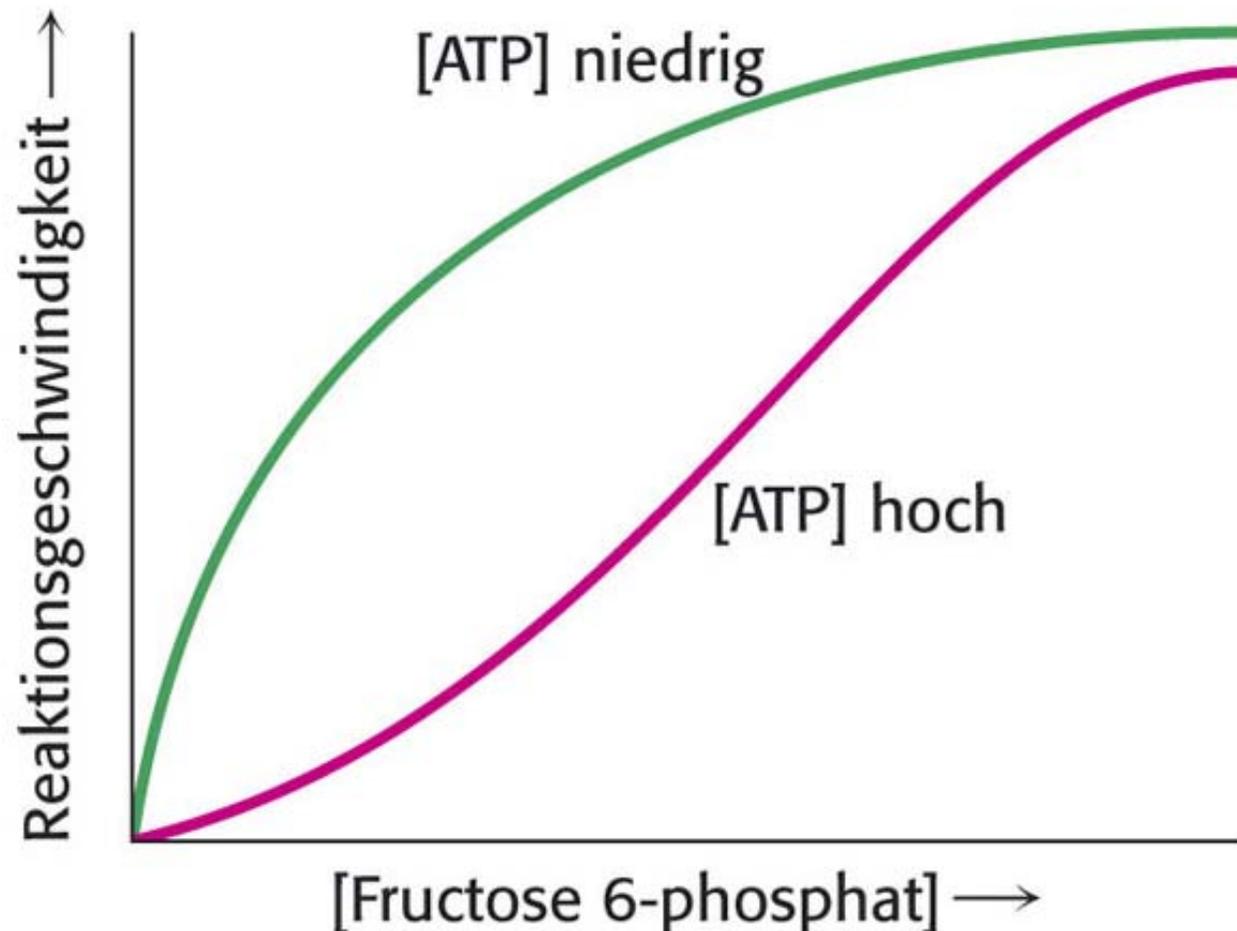
## Phosphofruktokinase

Die **Phosphofruktokinase** ist das wichtigste Kontrollelement der Glycolyse.

Ein hoher **ATP**-Spiegel senkt die Affinität des Enzyms für das Substrat Fructose-6-Phosphat. **AMP** und **ADP** heben diesen Hemmeffekt wieder auf. Die Aktivität des Enzyms steigt also, wenn der ATP/AMP-Quotient kleiner wird. Generell wird die Glycolyse angeregt, wenn die **Energieladung** der Zelle sinkt.

**Phosphofruktokinase** wird auch beim Absinken des **pH-Wertes** (Anstieg der  $H^+$ -Ionen) gehemmt. Dies verhindert eine exzessive Lactatbildung und den damit verbundenen Abfall des Blut-pH-Wertes (**Acidose**).

Inhibierung der **Phosphofruktokinase** durch hohe ATP-Konzentrationen. Umwandlung der hyperbolischen Bindungskurve für das Substrat F6P in eine sigmoide Kurve (typisch für allosterische Enzyme). Der Hemmeffekt des ATP wird von AMP (und Citrat) vermindert.



ATP, ADP und AMP modulieren also die Aktivität des Schrittmacher-Enzyms **Phosphofruktokinase** (PFK):

Bei hohen ATP-Konzentrationen wird die Kinetik der **PFK** kooperativ (sigmoider Kurvenverlauf). Allerdings schwanken die zellulären ATP-Konzentrationen nur um maximal 10%. Jedoch kann der Fluss durch die Glykolyse um den Faktor 100 schwanken !!!

AMP und ADP heben die inhibitorischen Eigenschaften von ATP auf. Die Schwankungsbreite der AMP-Konzentrationen in der Zelle ist im Vergleich zu ATP viel größer !

Der Adenylat-Pool jeder Zelle wird durch das ubiquitäre Enzym **Adenylat-Kinase** (früher Myokinase) ineinander übergeführt:



$$K_{\text{eq}} = [\text{ATP}][\text{AMP}]/[\text{ADP}]^2 = 0,44$$

**Rechenbeispiel:** Berechnen Sie die Änderung der [AMP]-Konzentration, wenn in einer Erythrocyten-Zelle plötzlich 8% des ATP in ADP hydrolysiert werden. Typische Konzentrationen im Erythrocyt: [ATP] = 1850  $\mu$ M, [ADP] = 145  $\mu$ M, [AMP] = 5  $\mu$ M. Gesamtadenylatkonzentration: 2000  $\mu$ M

$$K_{eq} = [\text{ATP}][\text{AMP}]/[\text{ADP}]^2 = 0,44$$

$$\text{ATP: 8\% hydrolysiert: } [\text{ATP}] = 1850(0,92) = 1702 \mu\text{M}$$

$$[\text{AMP}] + [\text{ADP}] = 2000 - 1702 = 298 \mu\text{M}$$

$$[\text{AMP}] = 298 \mu\text{M} - [\text{ADP}]$$

$$K_{eq} = (1702)(298 - [\text{ADP}])/([\text{ADP}]^2) = 0,44$$

$$[\text{ADP}] = 278 \mu\text{M}, [\text{AMP}] = 20 \mu\text{M}$$

Die AMP-Konzentration steigt um das Vierfache !!!

Die **Phosphofruktokinase** ist eines von vielen Schrittmacher-Enzymen, die durch den Energiezustand reguliert werden. Ein Index für den Energiezustand einer Zelle ist die **Energieladung** (energy charge). Sie entspricht dem Stoffmengenanteil (früher Molenbruch) des ATP plus dem halben Molenbruch des ADP (ATP enthält zwei und ADP eine “energiereiche” gemischte Anhydrid-Bindung)

$$\text{Energieladung} = \frac{[\text{ATP}] + 0,5 \cdot [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

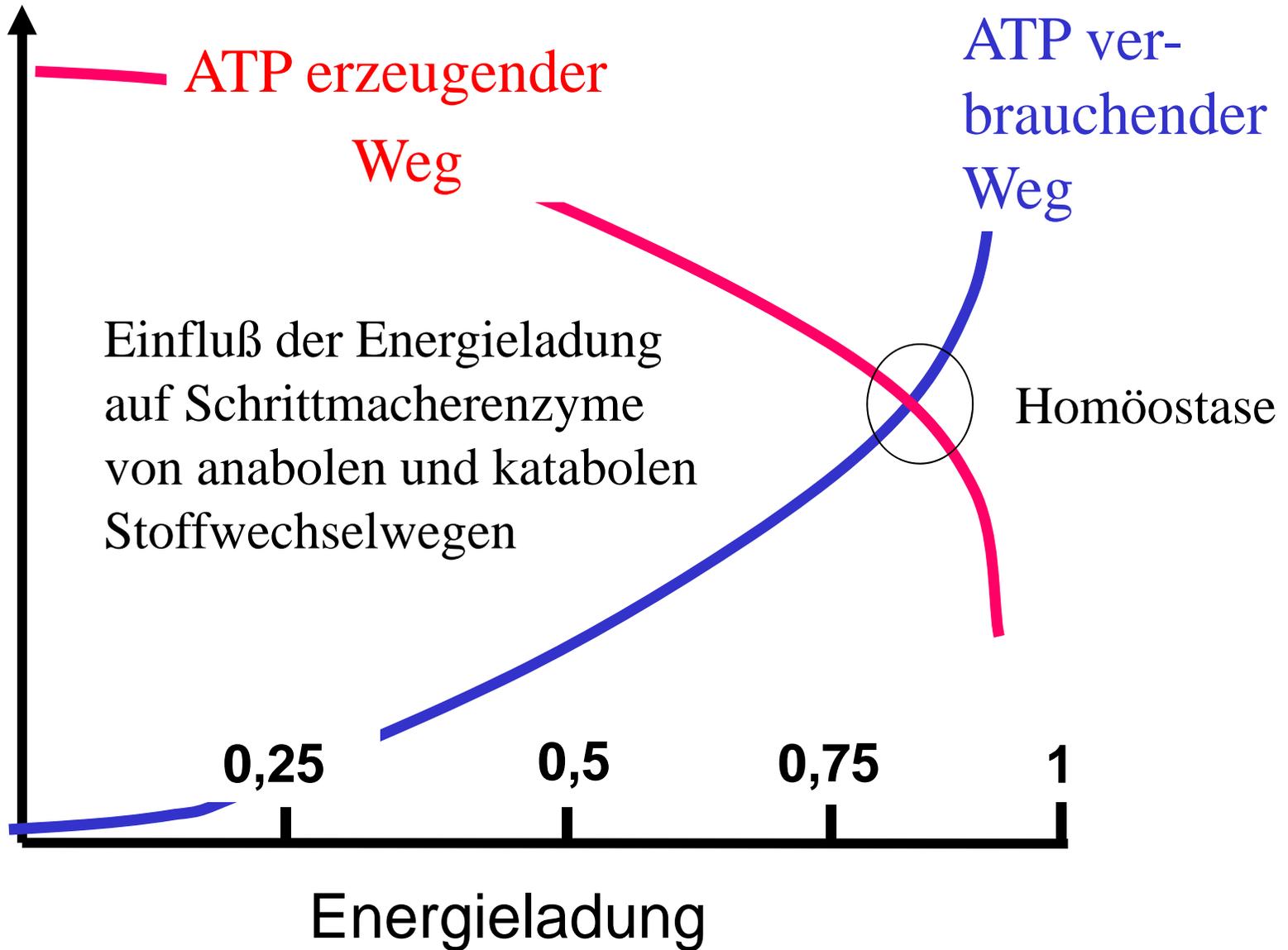
Energieladung = 0      nur AMP

Energieladung = 1      nur ATP

Die Energieladung der meisten Zellen ist zwischen 0,80 und 0,95 gepuffert. Typisch sind folgende Konzentrationsverhältnisse:

$$[\text{ADP}] \approx 0,1 \times [\text{ATP}] \quad \text{und} \quad [\text{AMP}] \approx 0,01 \times [\text{ATP}]$$

# Relative Reaktionsgeschwindigkeit



**Katabole Stoffwechselwege** werden durch eine hohe Energieladung gehemmt, **anabole Stoffwechselwege** (verbrauchen ATP) werden dagegen angeregt!

Die Energieladung einer Zelle ist gepuffert.

Die für anaerobe körperliche Anstrengung (z.B. kurze Sprints) verwendeten Brennstoffe unterscheiden sich von denen, die für aerobe körperliche Anstrengung (Langstreckenlauf) benutzt werden. Das Protein **Myosin**, das unmittelbar für die Umsetzung chemischer Energie in Bewegung verantwortlich ist, wird direkt von ATP angetrieben.

Im Muskel steht prinzipiell nur wenig ATP zur Verfügung. Die erzeugte Leistung und damit auch die erzielte Laufgeschwindigkeit hängen von der Schnelligkeit ab, mit der ATP aus anderen Energiequellen bereitgestellt wird und/oder durch Stoffwechselprozesse nachgeliefert wird.

In einer Muskelzelle kann **ATP** rasch aus **Creatinphosphat** (Phosphocreatin = ATP-Depot) gebildet werden. Bildung von Creatinphosphat ist Umkehrreaktion. Enzym: **Creatin-Kinase**:



Typische Konzentrationen im ruhenden Muskel:

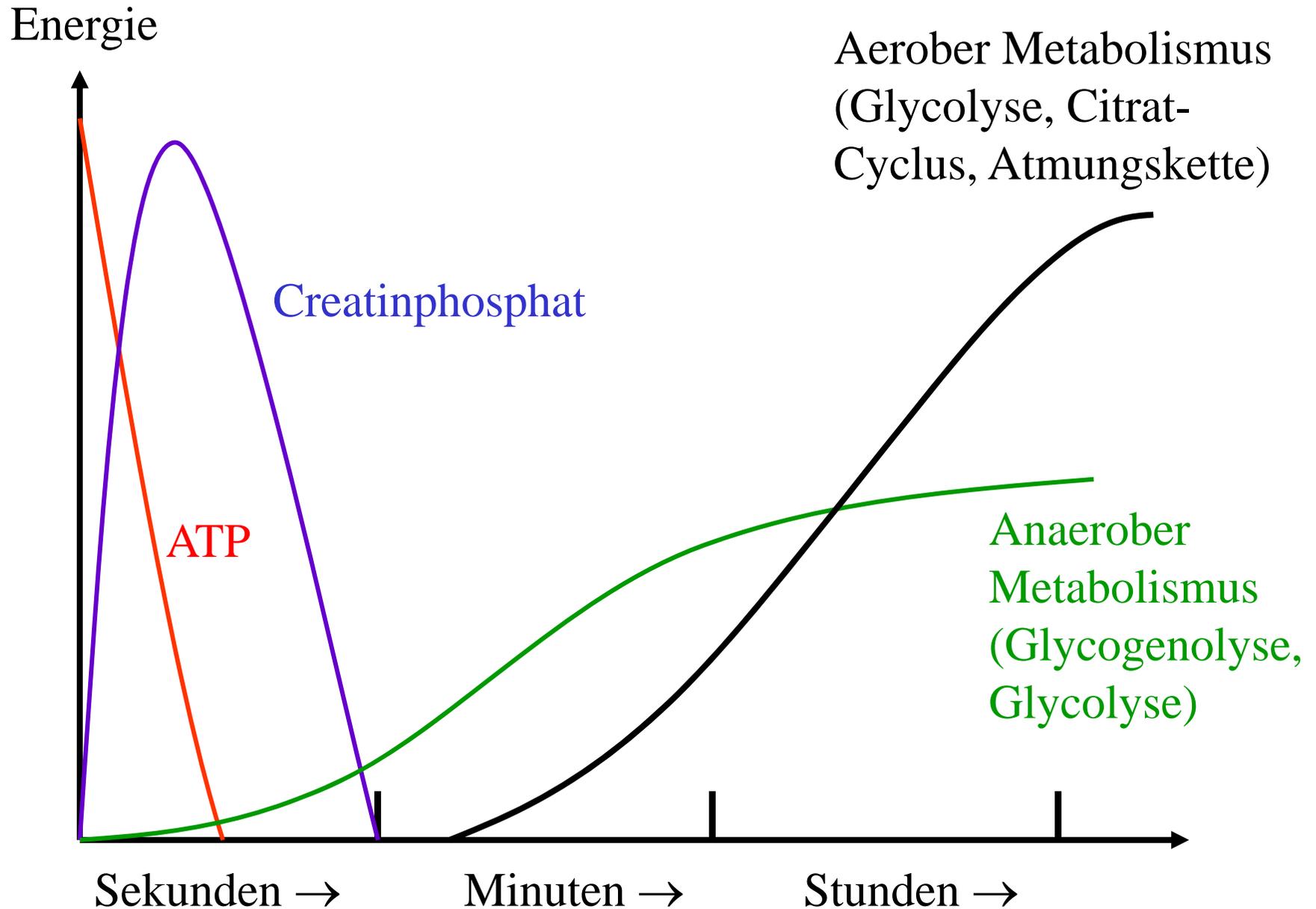
[ATP] = 4 mM, [ADP] = 0,013 mM, [Creatinphosphat] = 25 mM,  
[Creatin] = 13 mM

Für einen Sprinter ist **Creatinphosphat** die Hauptquelle für energiereiches Phosphat.

Doch auch die Menge an Creatinphosphat ist beschränkt.

Die gespeicherten Mengen ATP und Phosphocreatin reichen für einen Sprint von maximal 5-6 Sekunden. Dann muss durch anaerobe Glycogenolyse und Glycolyse ATP nachgeliefert werden. Bei längerem Lauf wird dann die oxidative Phosphorylierung (siehe Einheiten 7 & 8) zunehmend wichtig.

# ATP-Quellen während körperlicher Anstrengung



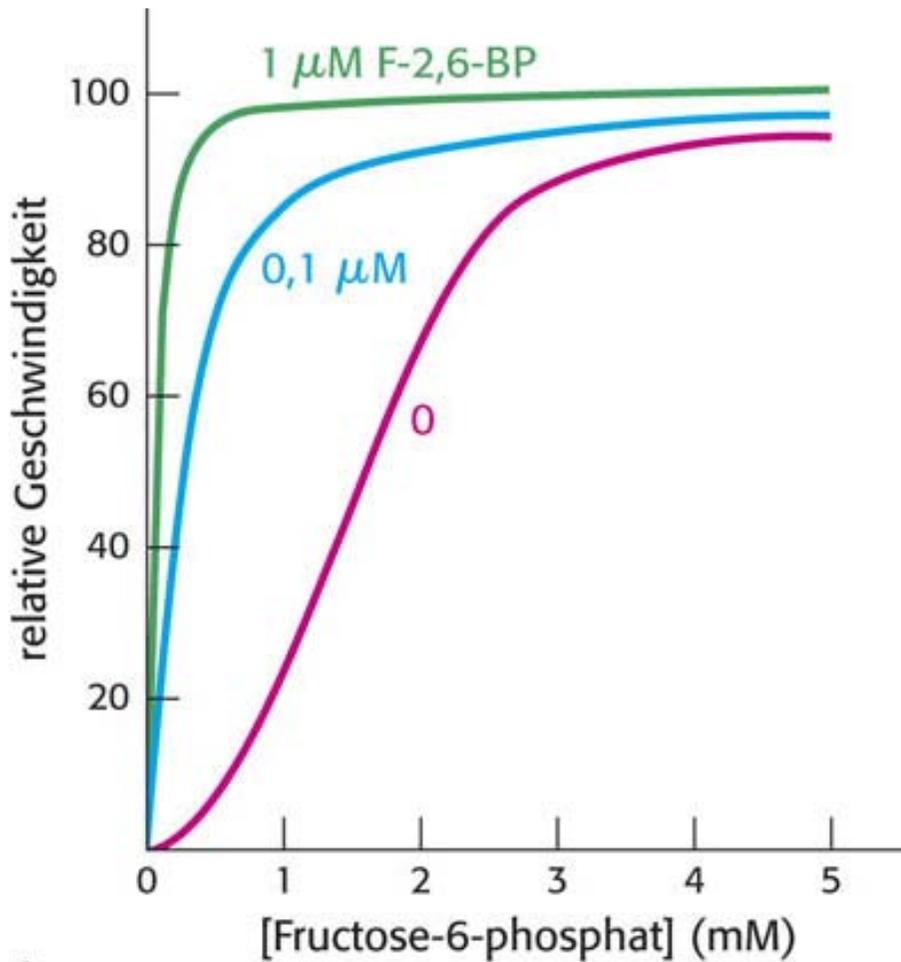
Da die Glycolyse auch Moleküle produziert, die in Biosynthesen verwendet werden, wird **Phosphofruktokinase** auch durch andere, nicht in der Glycolyse vorkommende Metaboliten reguliert.

**Citrat** (Citronensäurezyklus) inhibiert die **Phosphofruktokinase**. Ein hoher Citratspiegel bedeutet, dass reichlich Biosynthesevorstufen vorhanden sind. Citrat steigert den inhibitorischen Effekt des ATP.

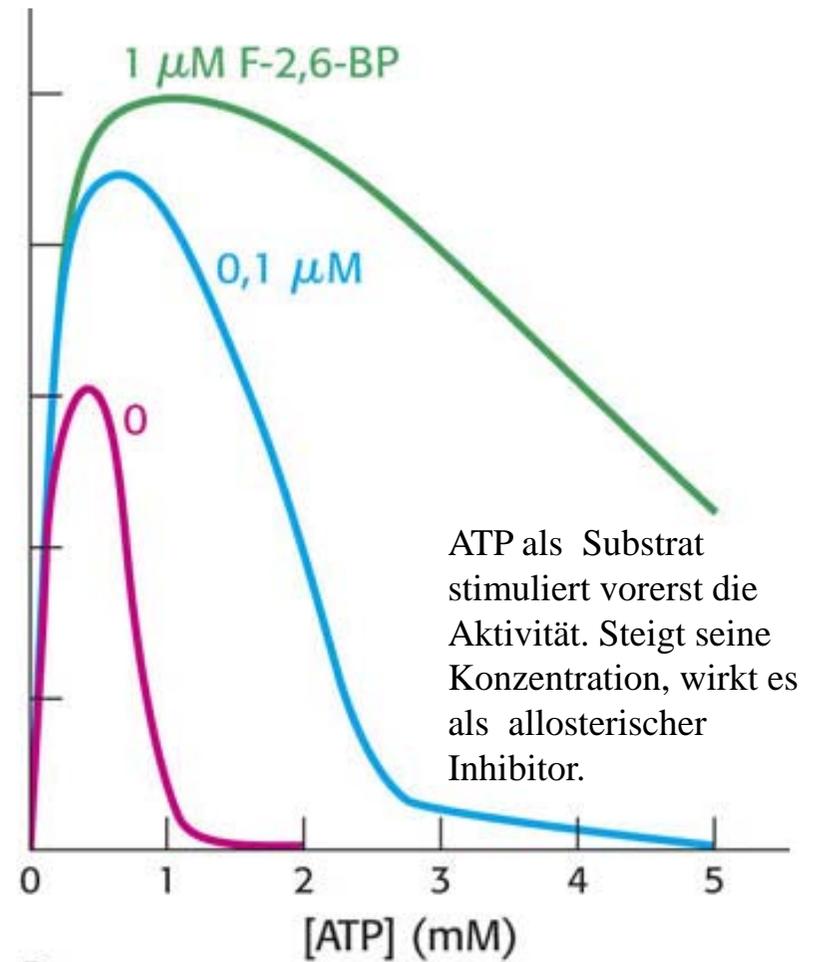
**$\beta$ -D-Fructose-2,6-bisphosphat** aktiviert die **Phosphofruktokinase**. Es erhöht die Affinität zum Substrat Fructose-6-Phosphat. Es ist ein allosterischer Aktivator (siehe auch Gluconeogenese).

Außerdem wird die Aktivität der **Phosphofruktokinase** durch **F6P**, **Ammonium-Ionen** und **anorganisches Phosphat** stimuliert.

**Fructose-2,6-bisphosphat ist ein allosterischer Aktivator der Phosphofruktokinase.** In seiner Gegenwart ( $1 \mu\text{M}$ ) wird die sigmoidale Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration hyperbolisch (A). Fructose-2,6-bisphosphat hebt den Hemmeffekt von ATP auf.



A



B

Glucose



F-6P



F-2,6-BP

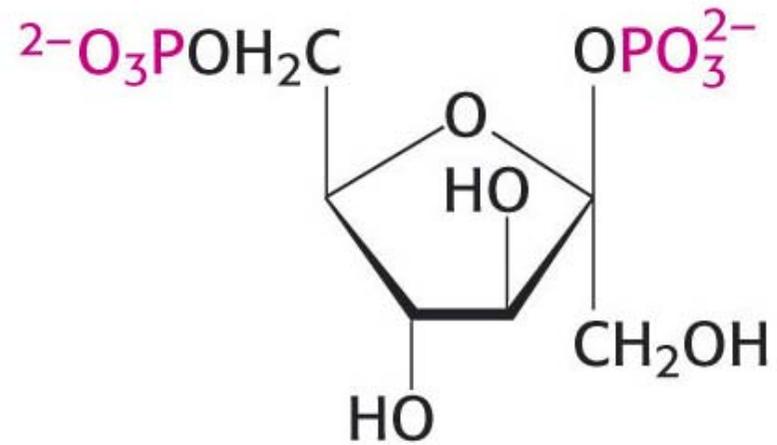
aktiviert PFK



PFK



F-1,6-BP



Wie kann man sich nun den Einfluss dieser Effektoren auf die Enzymaktivität auf molekularer Ebene vorstellen?

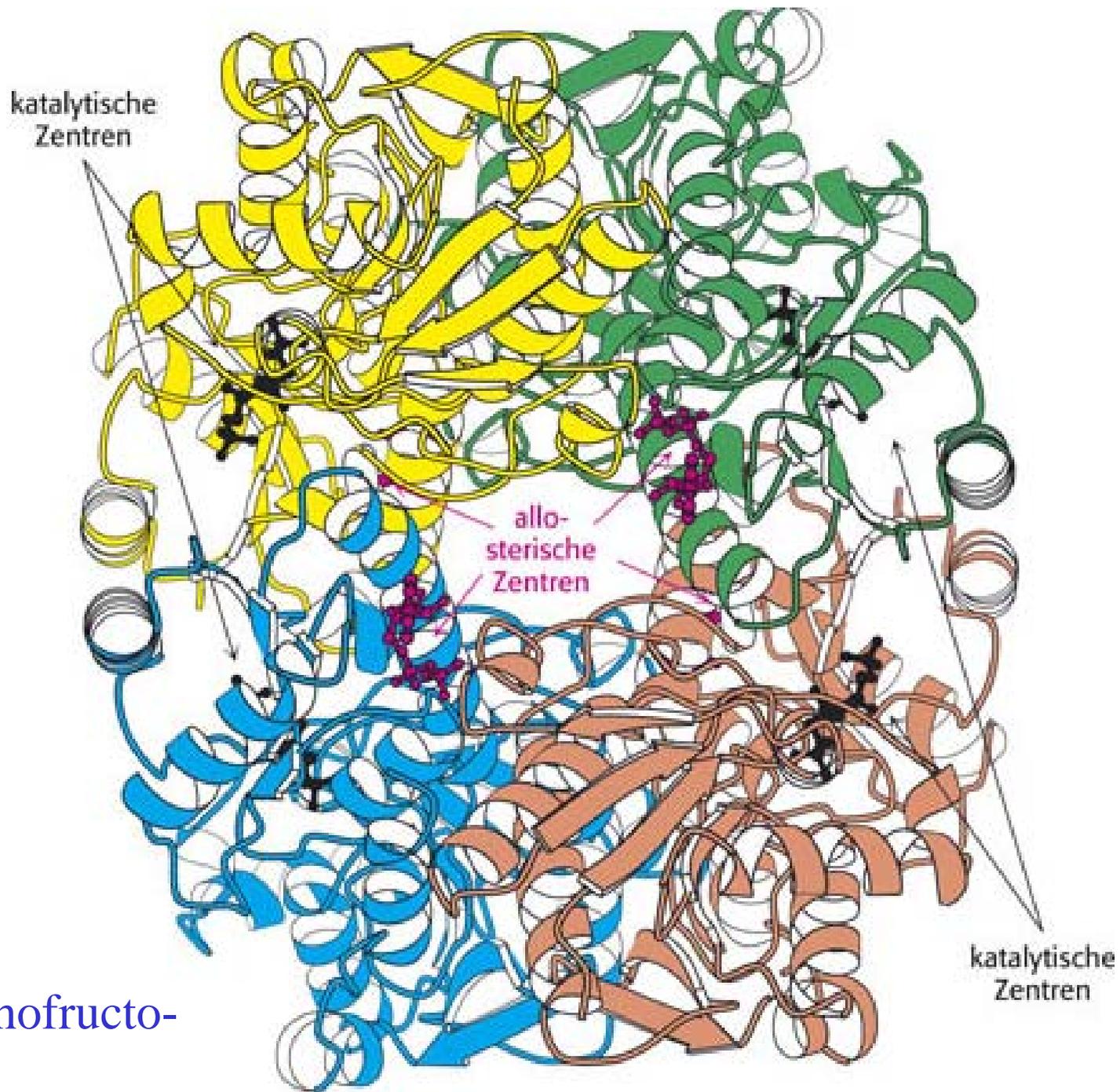
Die allosterischen Eigenschaften der **Phosphofruktokinase** lassen sich durch das **Symmetrie-Modell der Allosterie** erklären:

Symmetriemodell: 1965 von Jacques Monod, Jeffrie Wyman und Jean-Pierre Changeaux postuliert

**Phosphofruktokinase** ist ein Tetramer, das aus untereinander symmetrischen Protomeren besteht. Die Untereinheiten sind funktionell identisch.

Jedes Protomer kann in mindestens **2 Konformationszuständen** vorliegen, **T** und **R**, die miteinander im Gleichgewicht stehen.

Die molekulare Symmetrie des Proteins bleibt während des Konformationswechsels erhalten, d.h. die Umwandlung erfolgt in einer konzertierten Reaktion. Das Holoenzym liegt entweder in **R** oder in **T** vor.



Phosphofruktokinase

Die **Phosphofruktokinase** ist der wichtigste Regulationspunkt der Glykolyse. Ihre Aktivität wird daher durch eine Vielzahl niedermolekularer Verbindungen kontrolliert:

**Inhibitoren:** **ATP** (d.h. ATP ist Substrat und Inhibitor!),  
**Citrat, H<sup>+</sup>**

**Aktivatoren:** **ADP, AMP, Fructose-2,6-bisphosphat, Fructose-6-Phosphat, Ammonium-Ionen, anorganisches Phosphat**

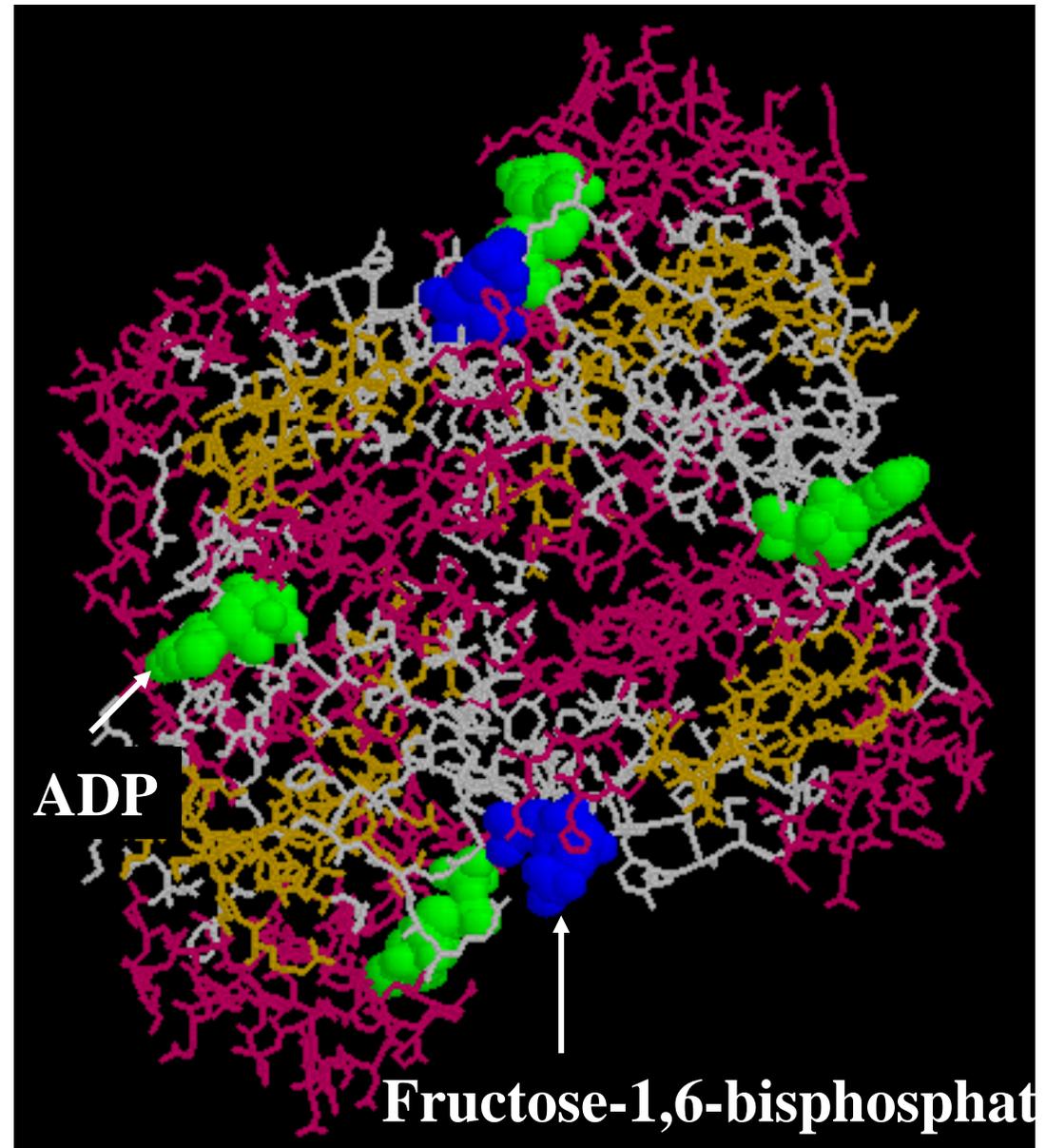
Das Enzym kann in 2 Konformationen, die miteinander im Gleichgewicht stehen, vorliegen:  $R \rightleftharpoons T$

Wie jedes allosterische Protein (Enzym) ist **Phosphofruktokinase** ein **Oligomer**, konkret ein Tetramer. Jede Untereinheit hat eine **Substrat-** und eine **allosterische Bindungsstelle**. Die allosterischen Effektoren bestimmen, ob das Enzym im *R*- oder *T*-Zustand vorliegt. Nur der *R*-Zustand hat eine hohe Affinität zum Substrat F6P.

## Phosphofruktokinase (*E. coli*), Dimer

Komplex mit ADP und Fructose-1,6-bisphosphat (FBP). Das humane Enzym der Leber ist ein 340 kDa Tetramer.

Pro Untereinheit ist also eine **Substrat-Bindungsstelle** (ADP, F6P) und eine **allosterische Bindungsstelle** (ADP) vorhanden. Bindung der Effektoren an die allosterische Bindungsstelle bewirkt charakteristische Konformationsänderung im aktiven Zentrum (Substratbindungsstelle).



**Fructose-6-Phosphat:**

Hohe Affinität für den *R*-Zustand,  
niedrige Affinität für den *T*-Zustand.  
Bindungsstelle: Substratbindungsstelle  
Homotropischer Effekt: Binden von  
F6P erhöht die Affinität von weiteren  
F6P Molekülen.

**ATP, Reaktionsprodukt**

**ADP:**

Substratbindungsstelle

**AMP, ADP (Aktivatoren):**

Allosterische Bindungsstelle  
Positiver heterotropischer Effekt: Binden  
von AMP oder ADP verschiebt  
Gleichgewicht Richtung *R*-Zustand.

**ATP, Citrat**

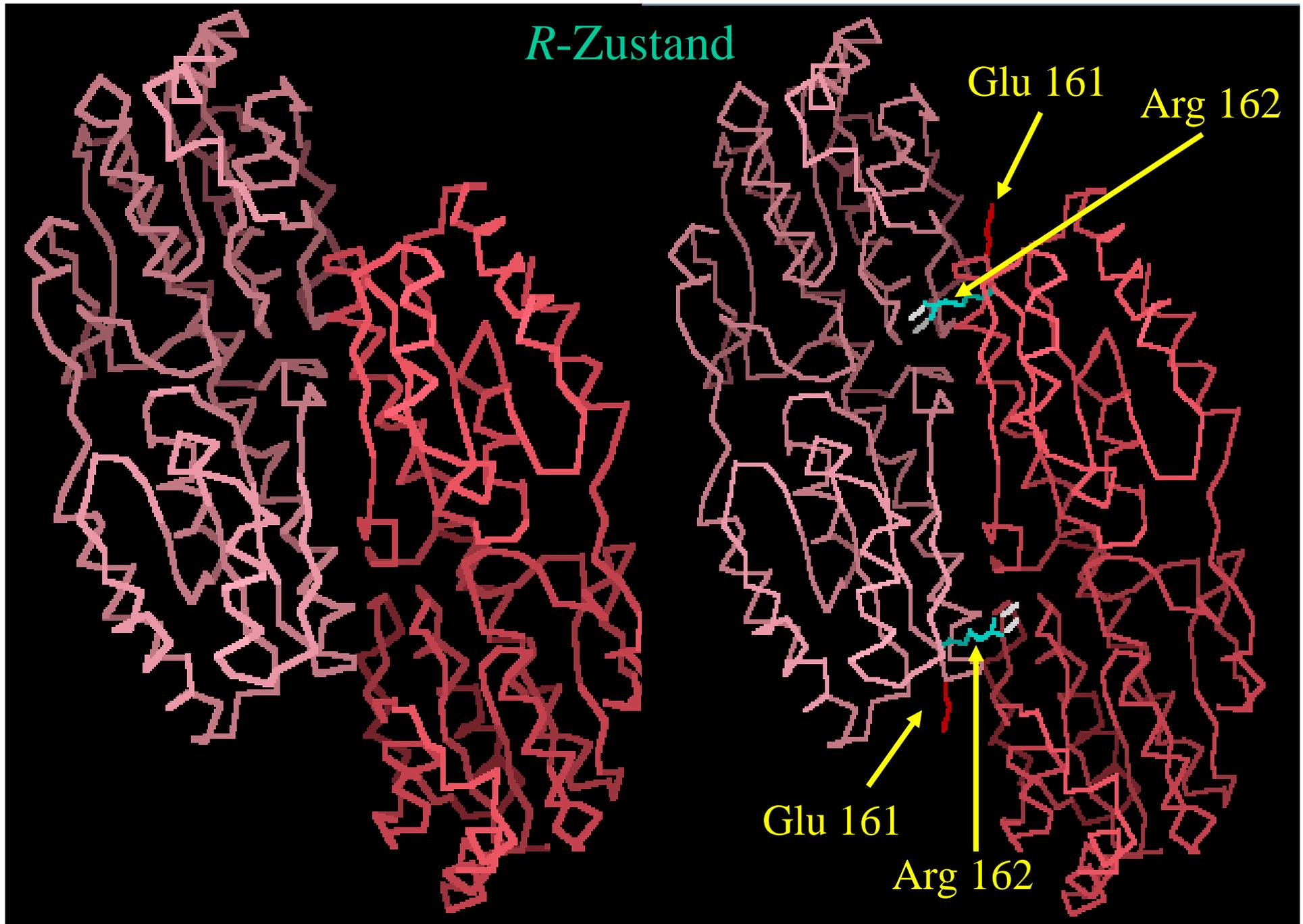
Allosterische Bindungsstelle;  
verschieben Gleichgewicht Richtung  
*T*-Zustand; negativer heterotroper Effekt

Wieso hat das Substrat Fructose-6-Phosphat, F6P, zum Enzym im *R*-Zustand eine hohe und zum *T*-Zustand eine niedrige Affinität?

Die Betrachtung der jeweiligen dreidimensionalen Strukturen (Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie) zeigt dramatische Konformationsunterschiede im aktiven Zentrum:

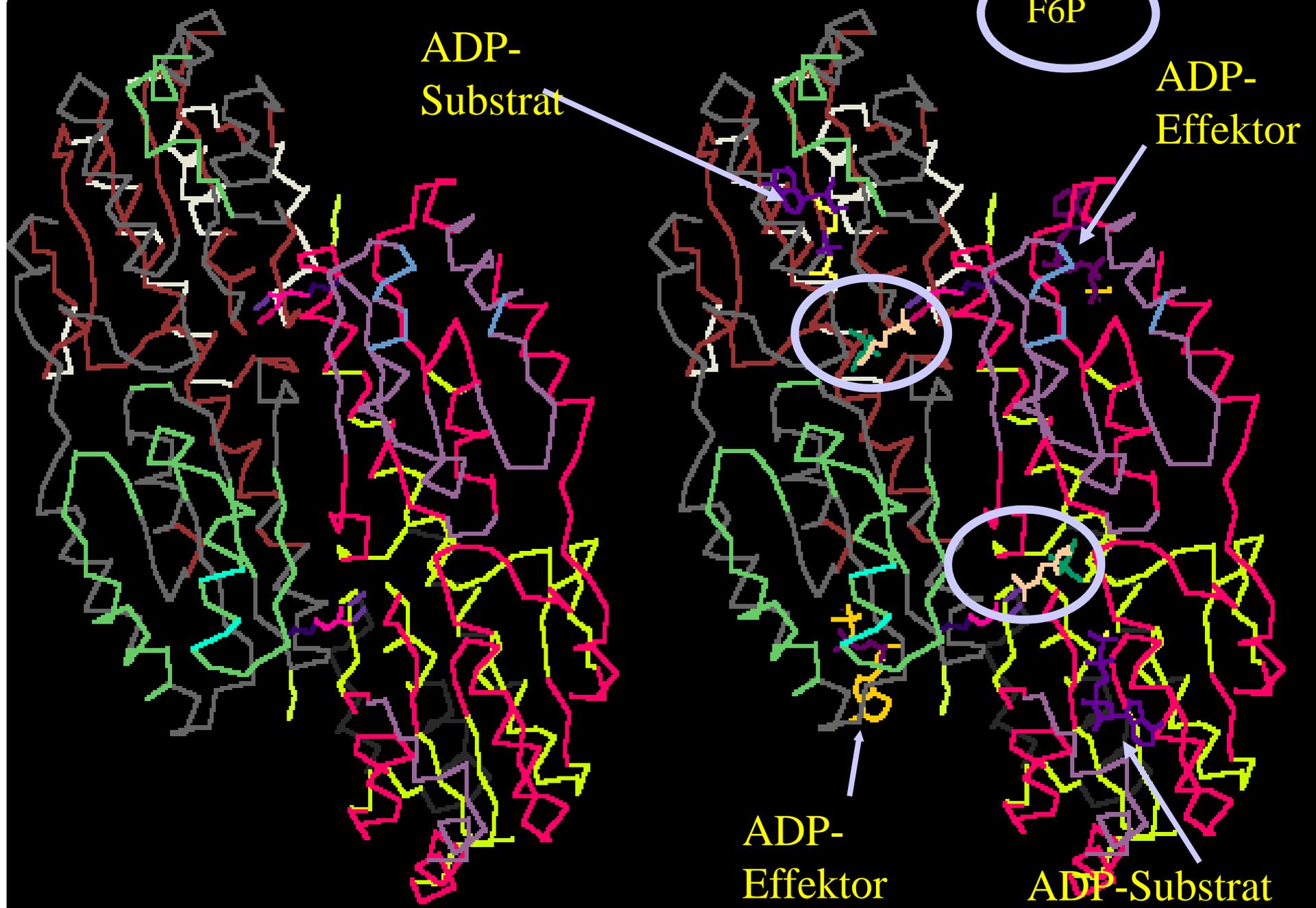
*R*-Zustand: Arginin (positive Guanidiniumgruppe) ist Teil der Bindungsstelle für F6P (negative Phosphatgruppe)

*T*-Zustand: Arginin um 180° gedreht. In die Bindungstasche zeigt nun die Carboxylat-Gruppe eines Glutamat-Restes (Abstoßung von F6P)



Phosphofruktokinase (Dimer) aus *Bacillus stearothermophilus*

R-Zustand



*R*-Zustand

Überlagerung *R*- und *T*-Zustand

---



# Vergleich *R*- und *T*-Zustand

F6P

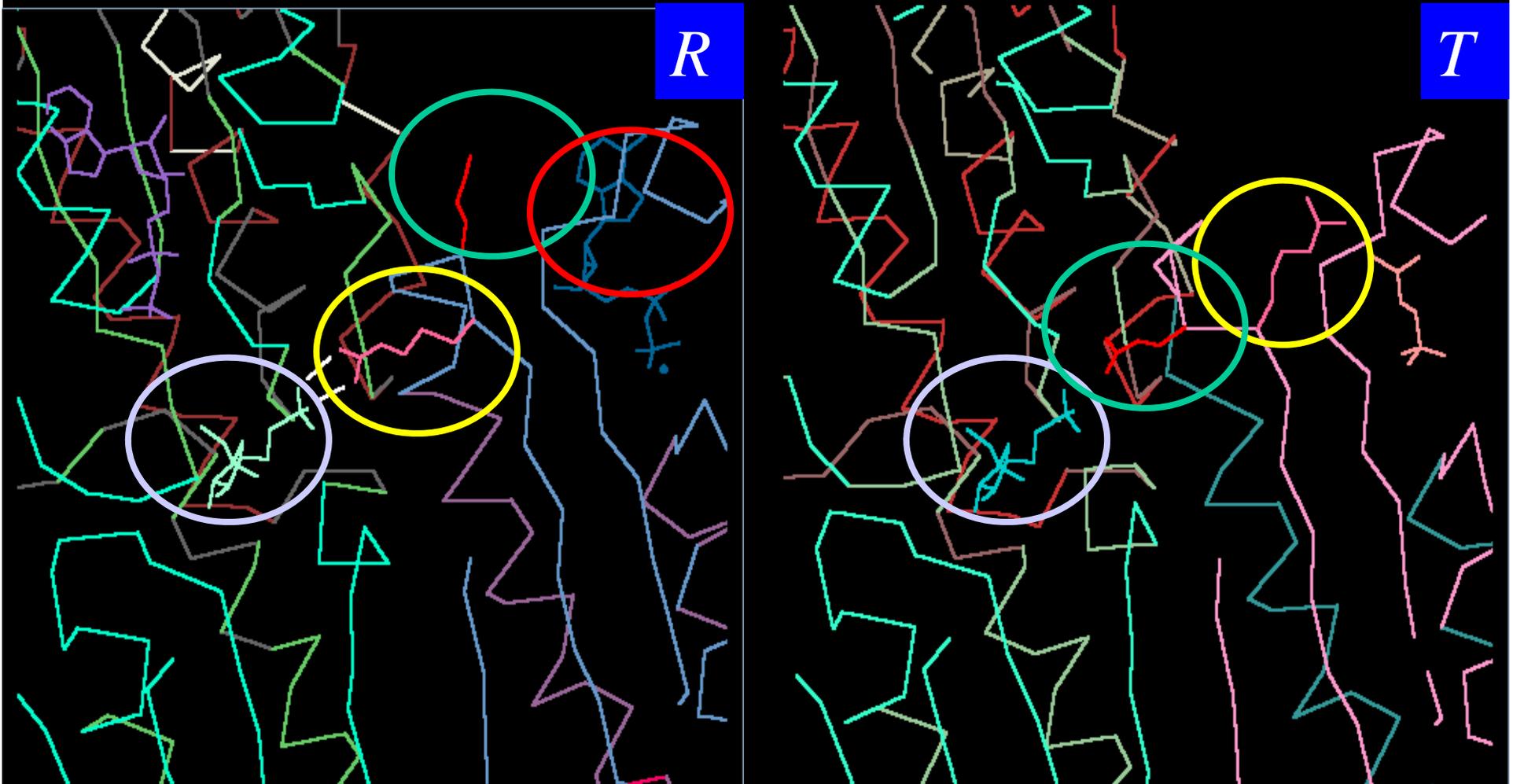
Arg162

Glu161

allo-ADP

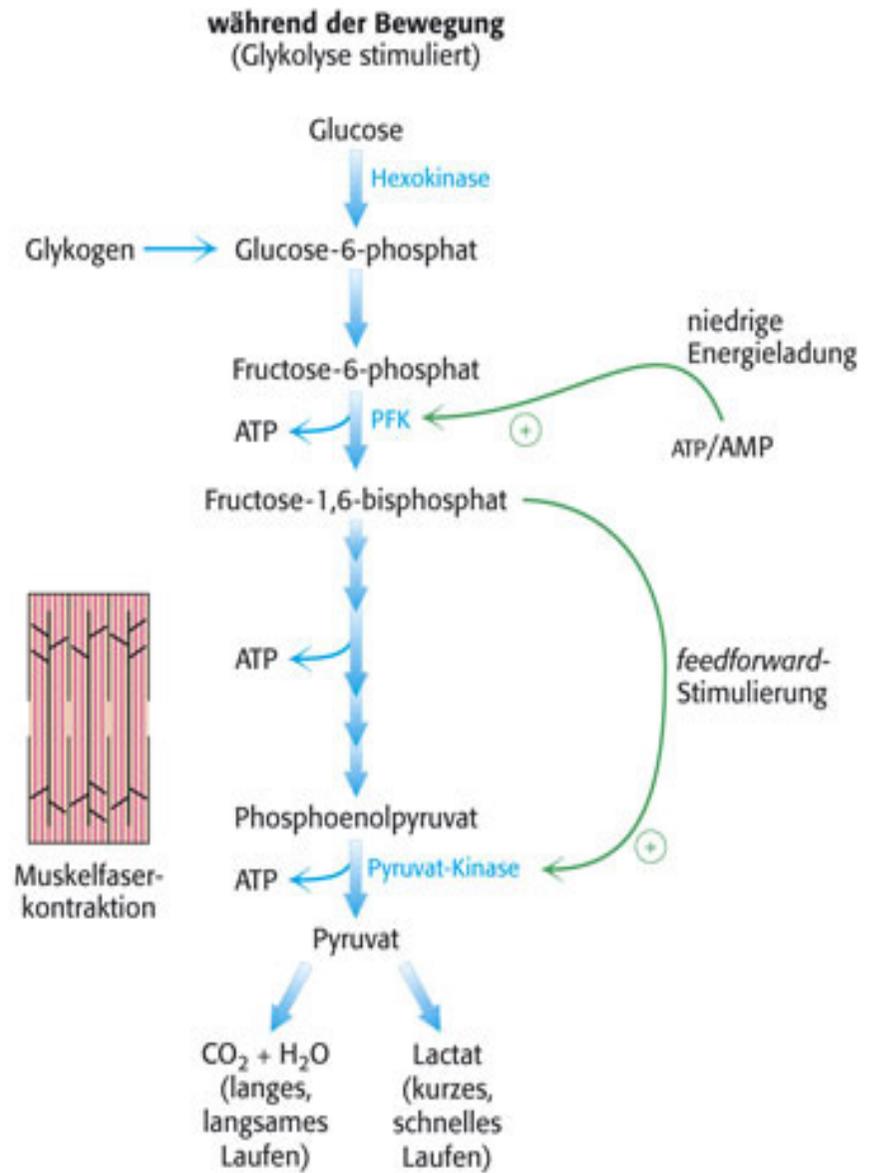
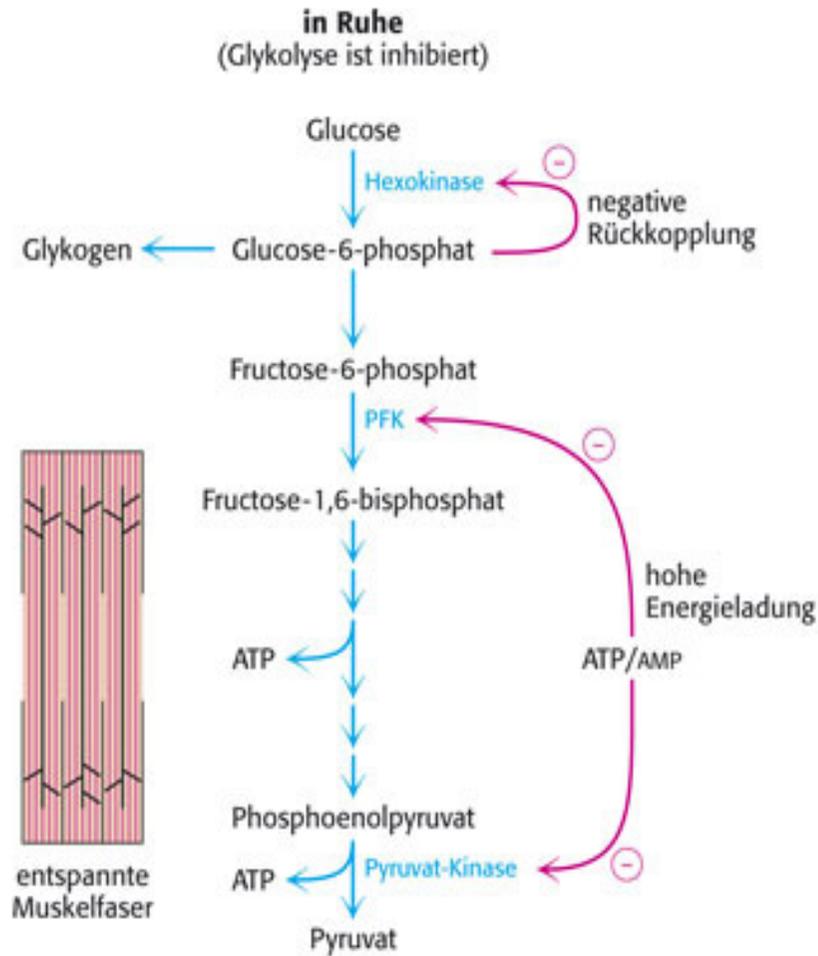
*R*

*T*

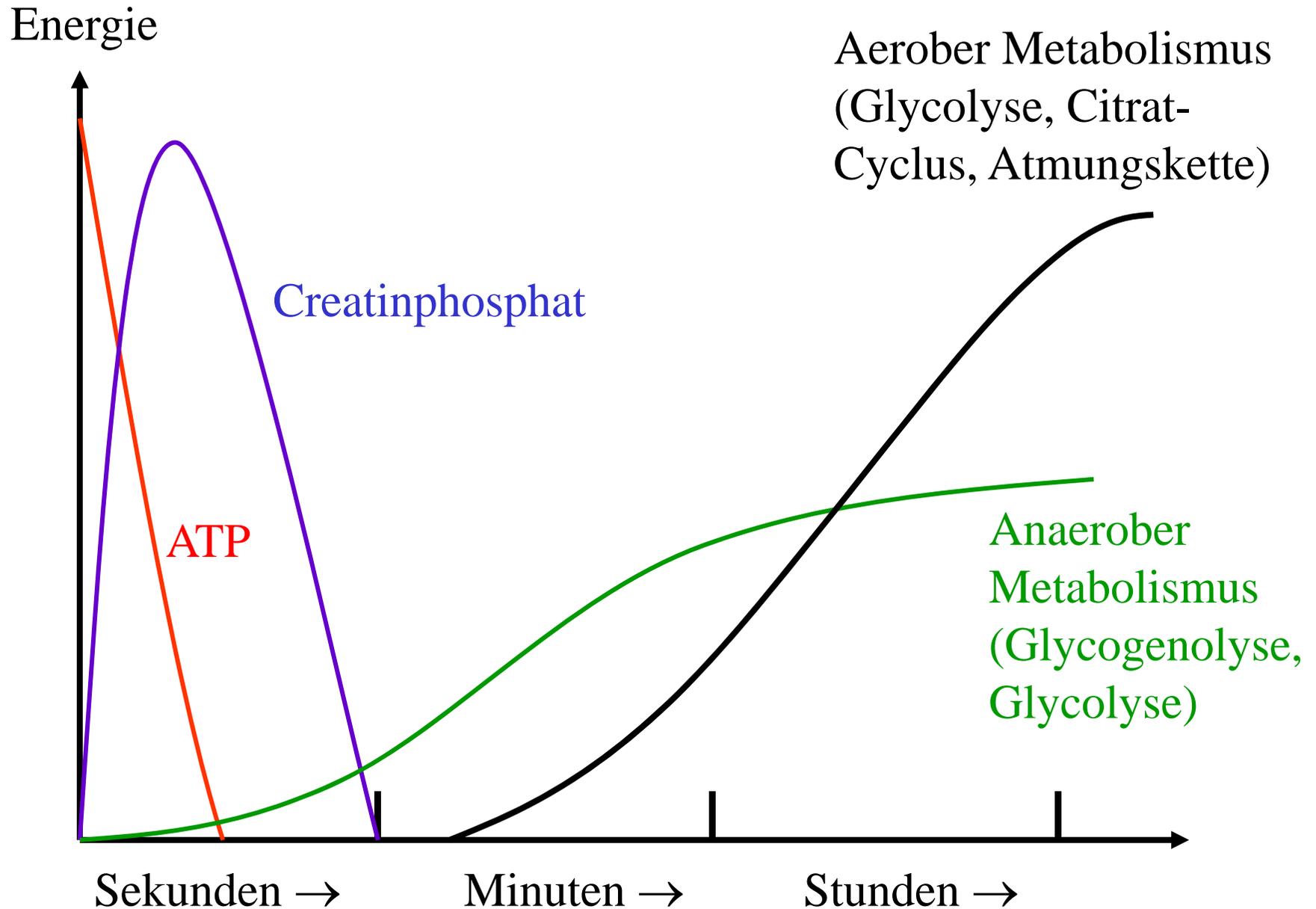


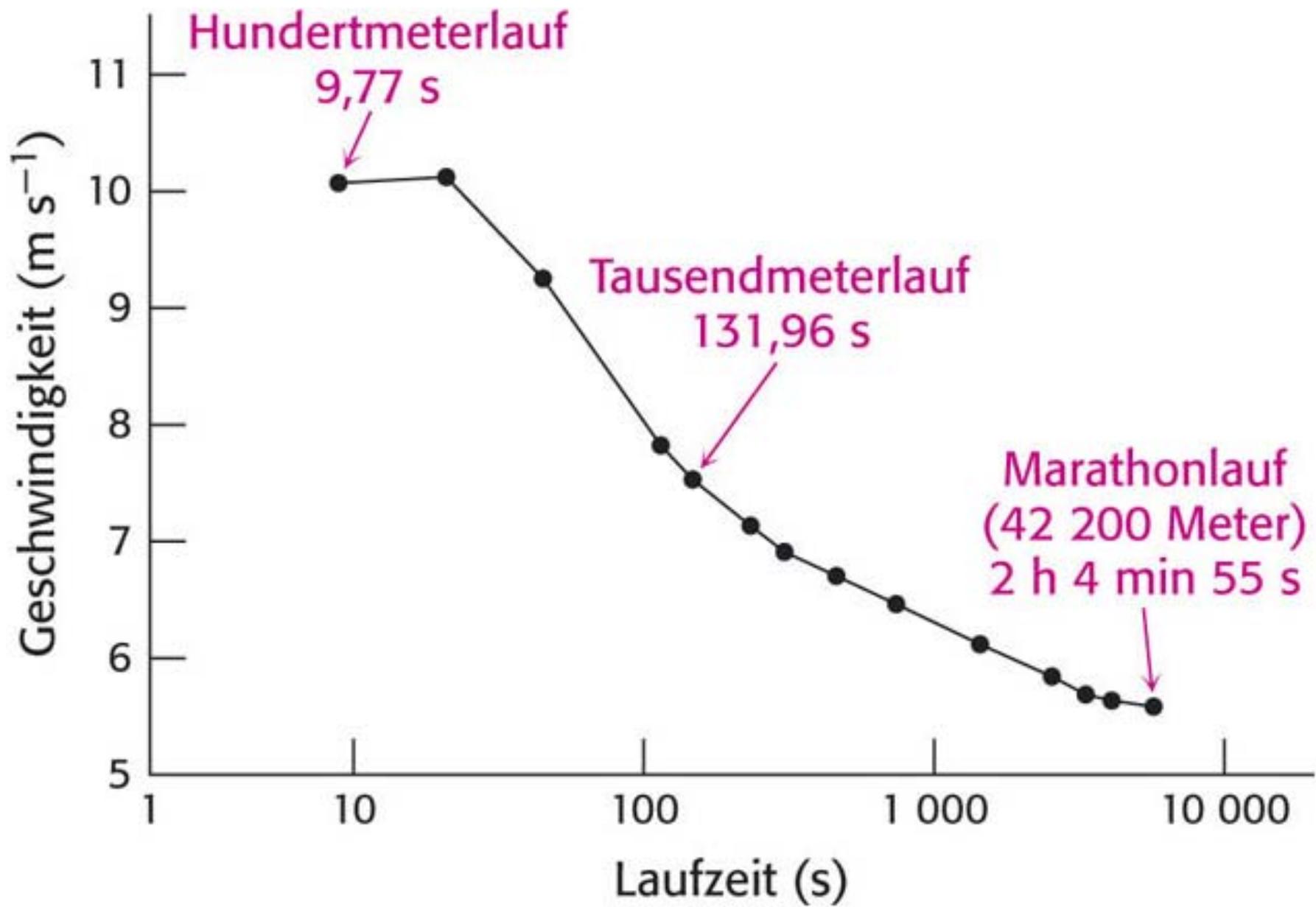
Zusammenfassung: **Hexokinase**, **Phosphofructokinase** und **Pyruvat-Kinase** sind also jene (allosterischen) Enzyme der Glycolyse, deren Reaktionsgeschwindigkeit von Effektoren beeinflusst wird.

<b>Enzym</b>	<b>Inhibitoren</b>	<b>Aktivatoren</b>
<b>Hexokinase</b>	<b>G6P</b>	
<b>Phospho-fructo-Kinase</b>	<b>ATP, Citrat, H<sup>+</sup></b>	<b>ADP, AMP, F2,6P, F6P, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, P<sub>i</sub></b>
<b>Pyruvat-kinase</b>	<b>ATP, niedriger Blutglucosespiegel, Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels</b> (→ Phosphorylierung)	<b>FBP</b>



# ATP-Quellen während körperlicher Anstrengung





# 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. Einschleusen von Galactose, Mannose, Fructose und Glycerin in die Glykolyse

Neben der Glucose steht den Zellen eine Reihe anderer Zucker zur Verfügung, entweder aus der Nahrung oder aus dem Abbau von Kohlenhydratspeichern, Glycoproteinen oder Glycolipiden. Für jeden dieser Zucker gibt es spezielle Reaktionswege, die einen Anschluß an die Glycolyse ermöglichen.

Beispiele:

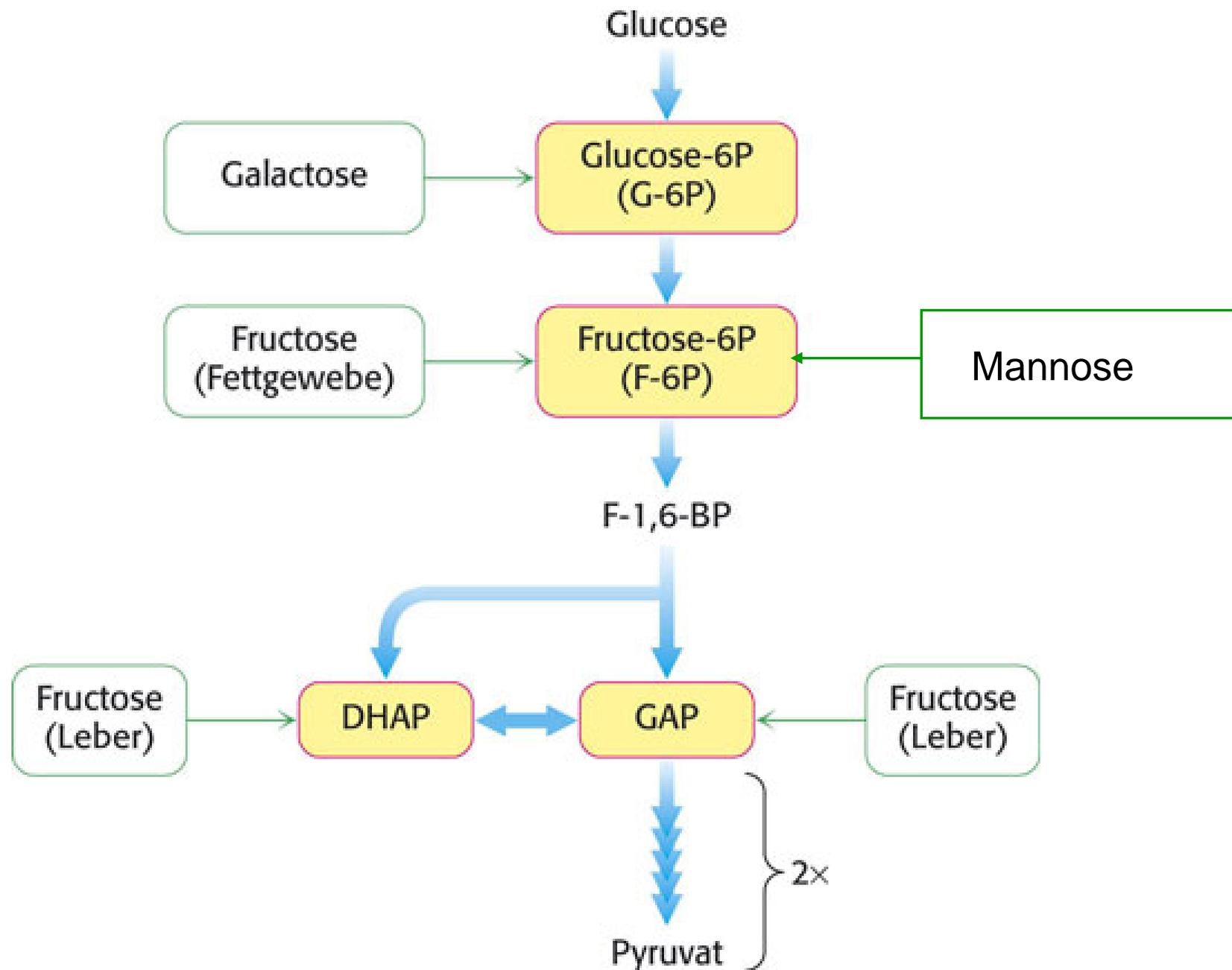
Saccharose (Haushaltszucker):                      Glucose und Fructose

Lactose (Milchzucker):                                Glucose und Galactose

Neben **Fructose** und **Galactose** sind **Mannose** und die Pentosen **Ribose**, **Ribulose** und **Xylose** häufig.

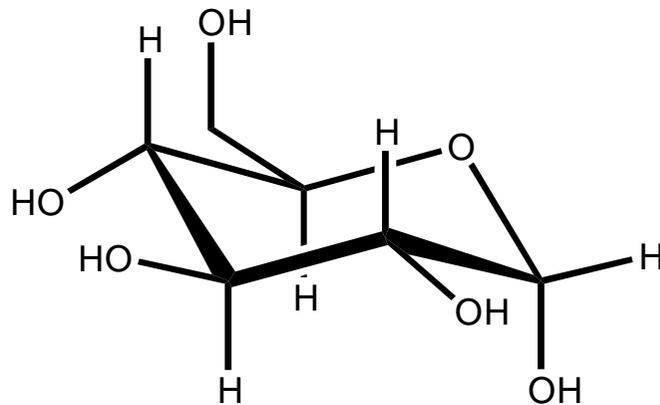
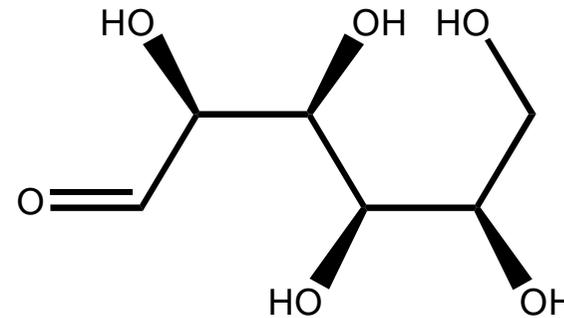
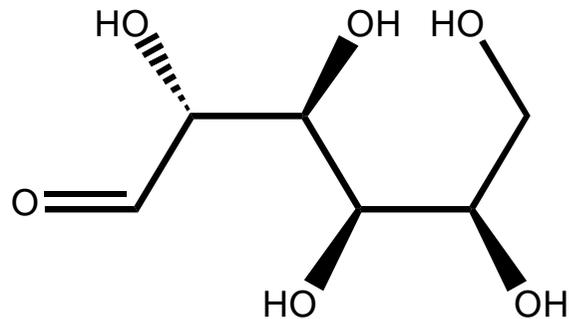
Auch **Glycerin** (siehe Triglyceride) kann in die Glycolyse eingeschleust werden.

Einige exemplarische Beispiele seien erwähnt.

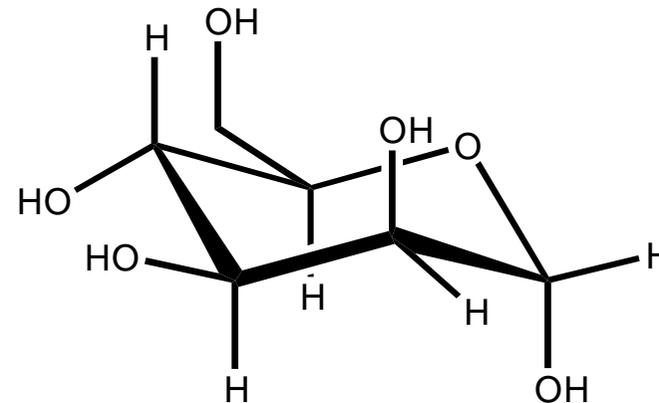


# Mannose

Mannose: Verdauung von Glycoproteinen, Glycolipiden und Polysacchariden



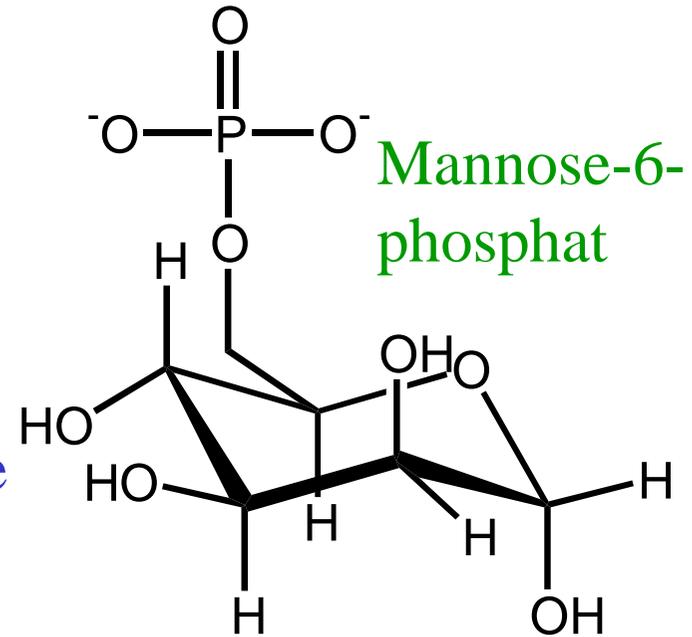
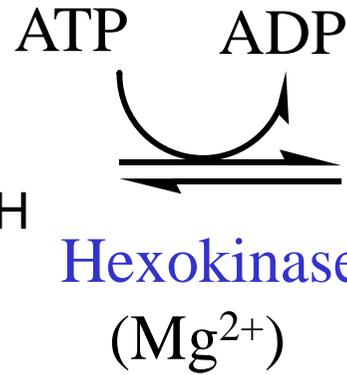
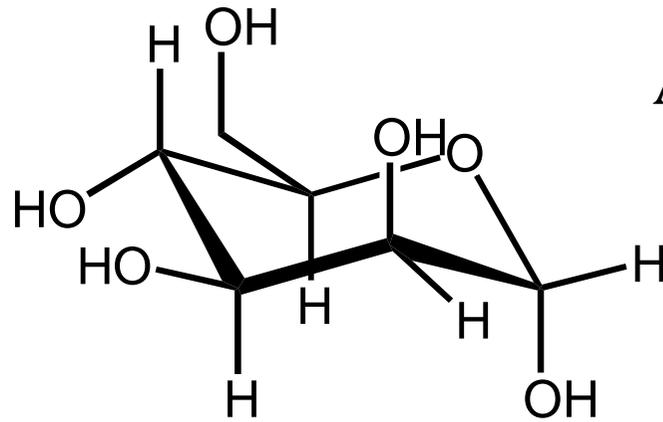
$\alpha$ -D-Glucose



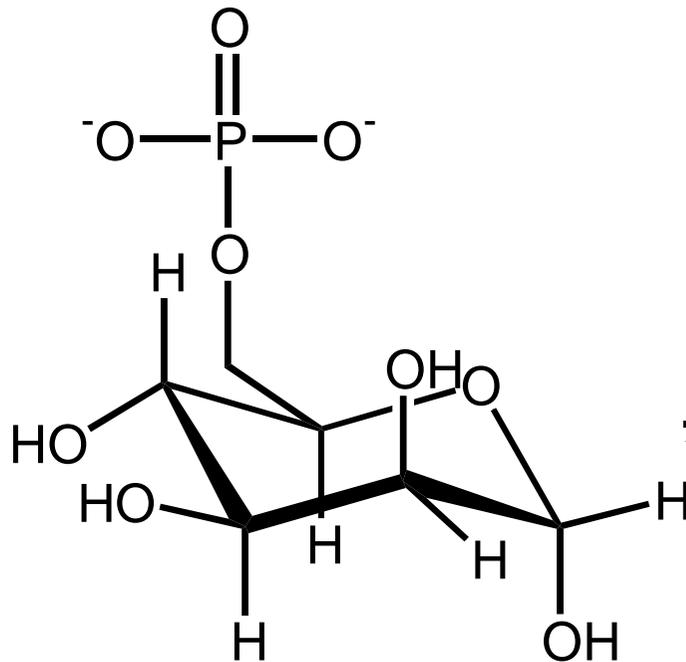
$\alpha$ -D-Mannose

Glucose und Mannose sind Epimere (unterschiedliche Stellung der OH-Gruppe am C-2)

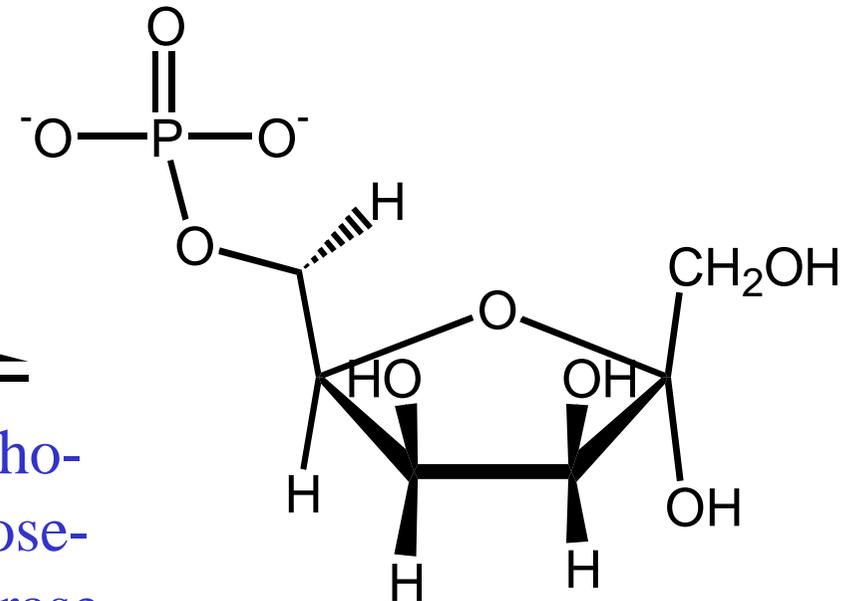
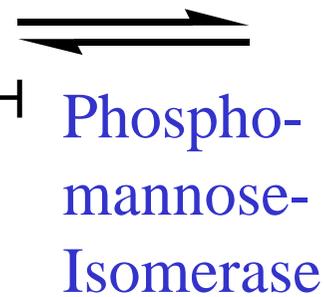
$\alpha$ -D-Mannose



Mannose-6-phosphat

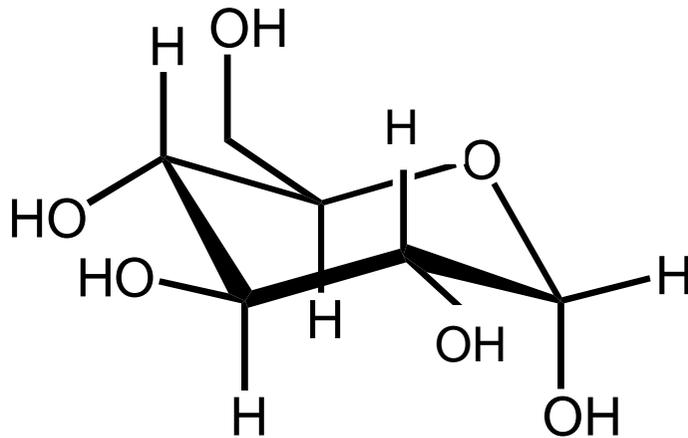
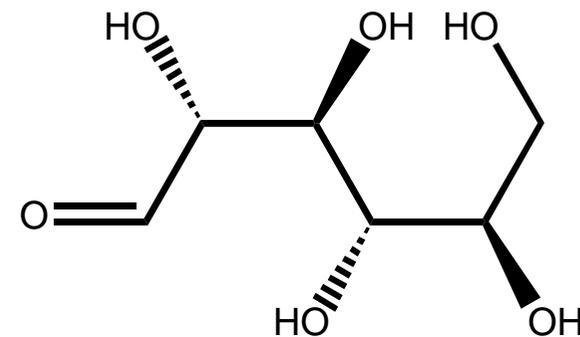
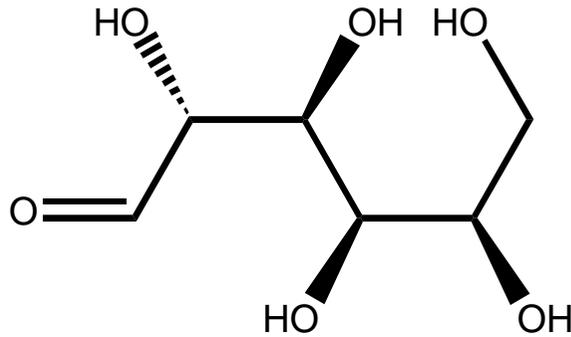


Mannose-6-P

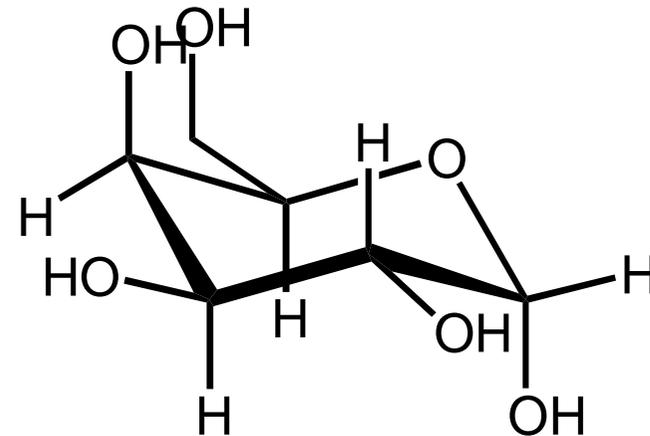


Fructose-6-Phosphat

# Galactose



$\alpha$ -D-Glucose

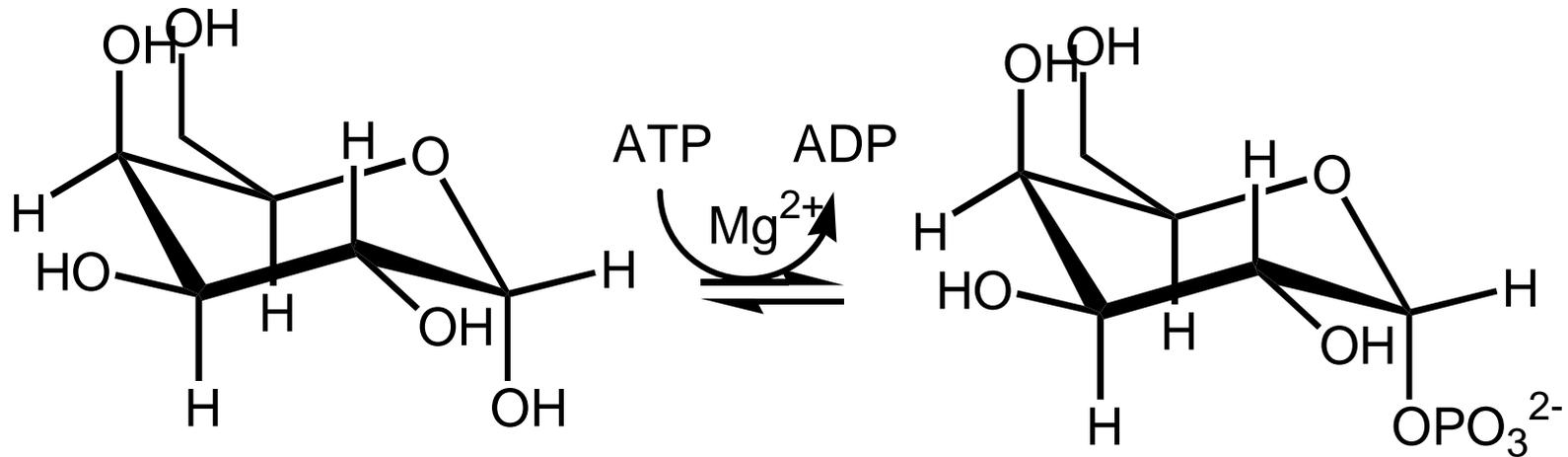


$\alpha$ -D-Galactose

Glucose und Galactose sind Epimere (unterschiedliche Stellung der OH-Gruppe am C-4)

Galactose: Verdauung des Milchzuckers Lactose.  
Einschleusen in Glycolyse umfasst vier Schritte  
(Leloir-Zyklus; *Louis Leloir*)

Die Reaktion beginnt mit einer Phosphorylierung der Galactose am C-1, katalysiert durch die **Galactokinase**, einem Leberenzym:

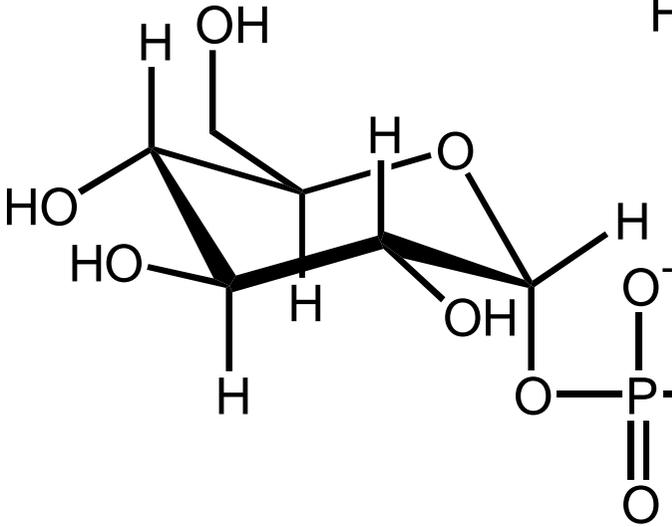
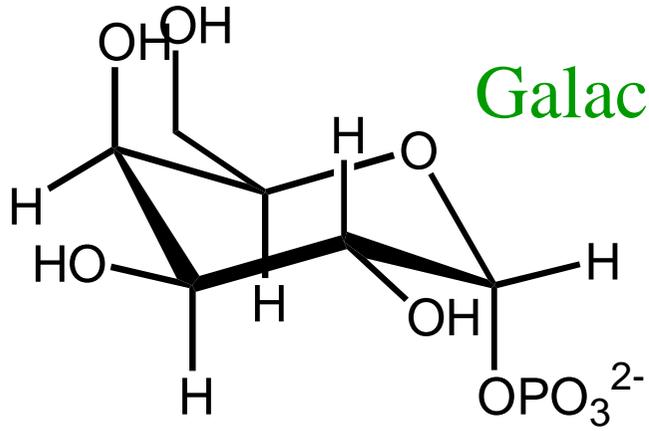


$\alpha$ -D-Galactose

Galactose-1-phosphat

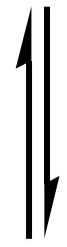
Im nachfolgenden Schritt wird Galactose dann gegen Glucose im UDP-Addukt ausgetauscht (**Phosphohexose-Uridyltransferase**)

Galactose-1-phosphat



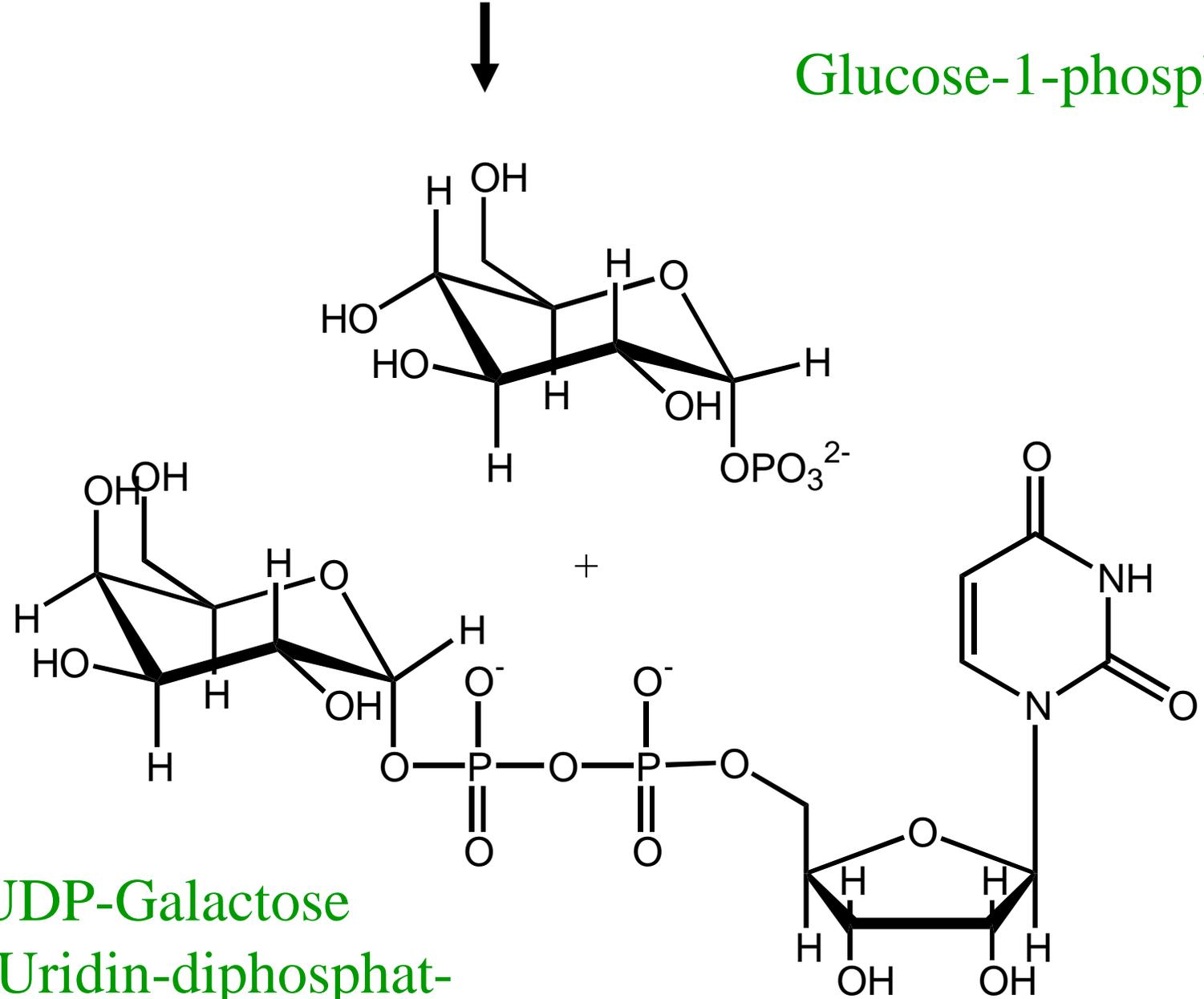
+

Phosphohexose-  
Uridyltransferase



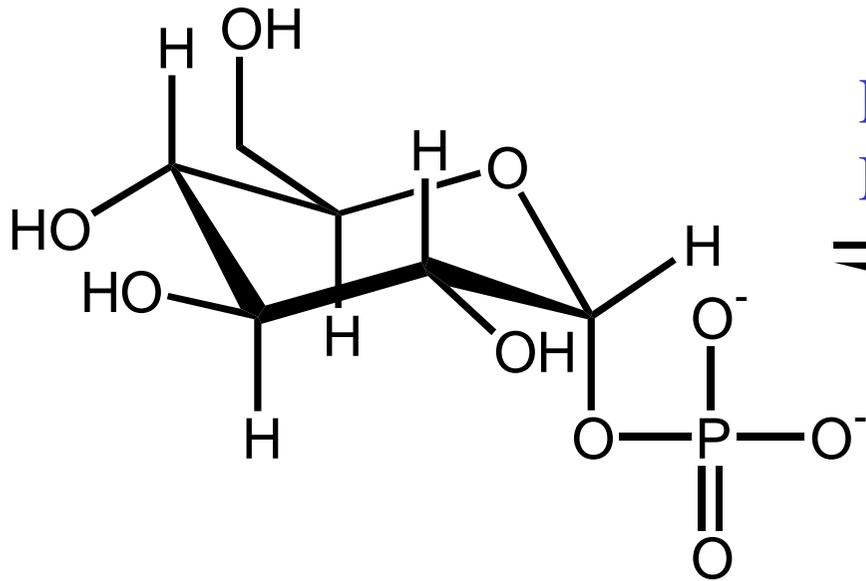
UDP-Glucose  
(Uridin-diphosphat-  
Glucose)

Glucose-1-phosphat



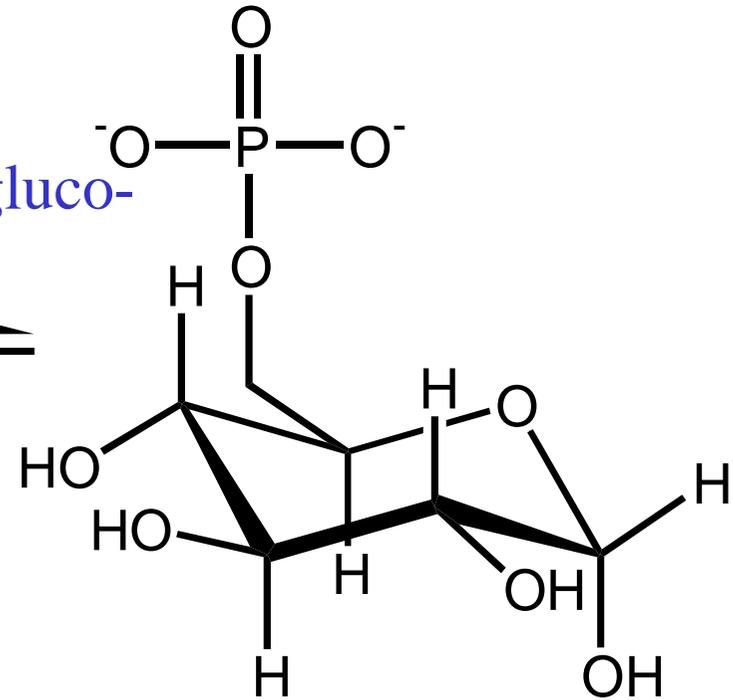
UDP-Galactose  
(Uridin-diphosphat-  
Galactose)

Glucose-1-phosphat



Glycogenbiosynthese

Glucose-6-phosphat

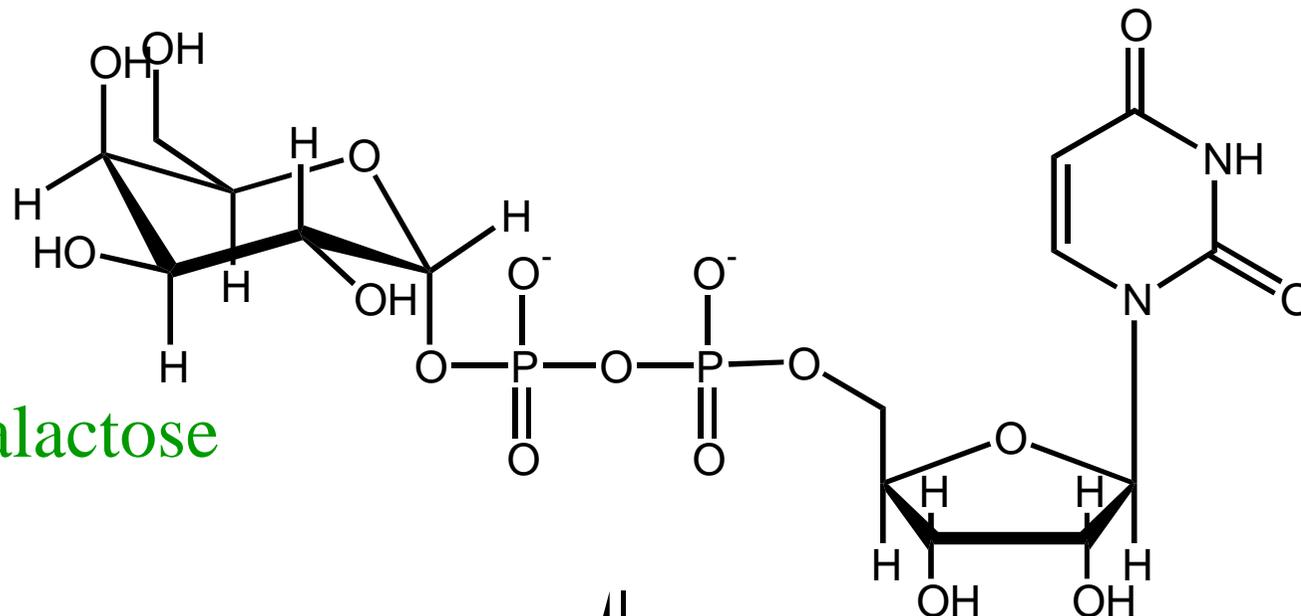


Glycolyse

Phosphogluco-  
Mutase



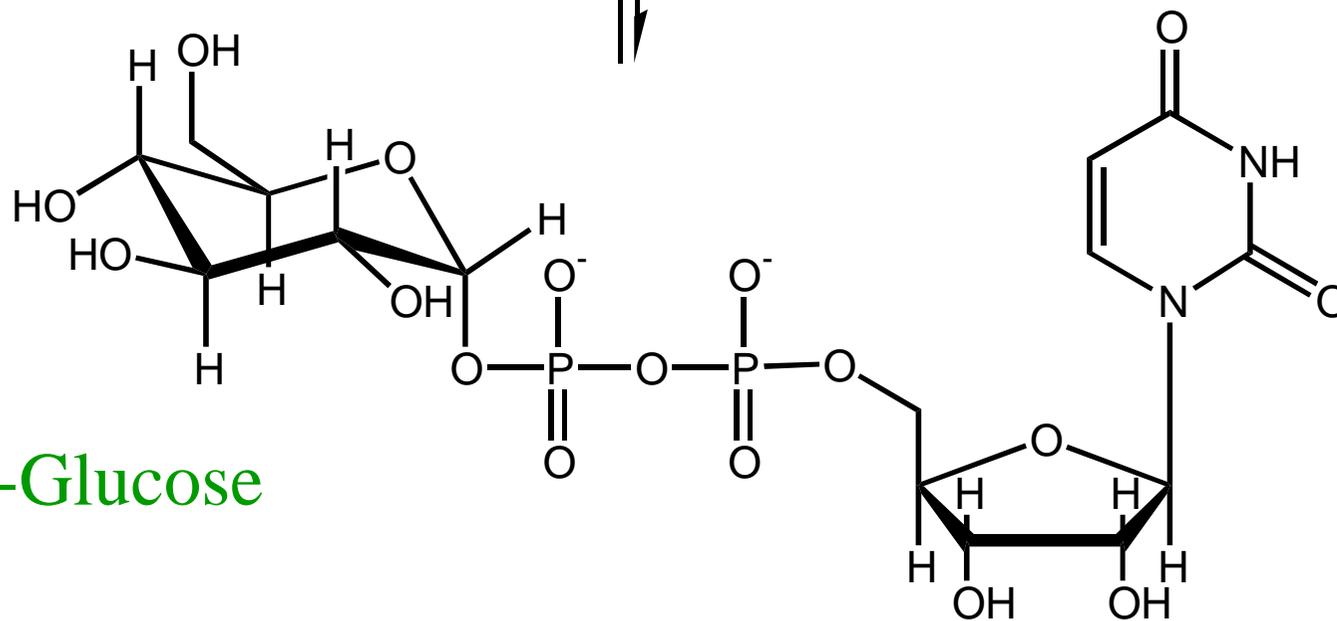
UDP-Galactose



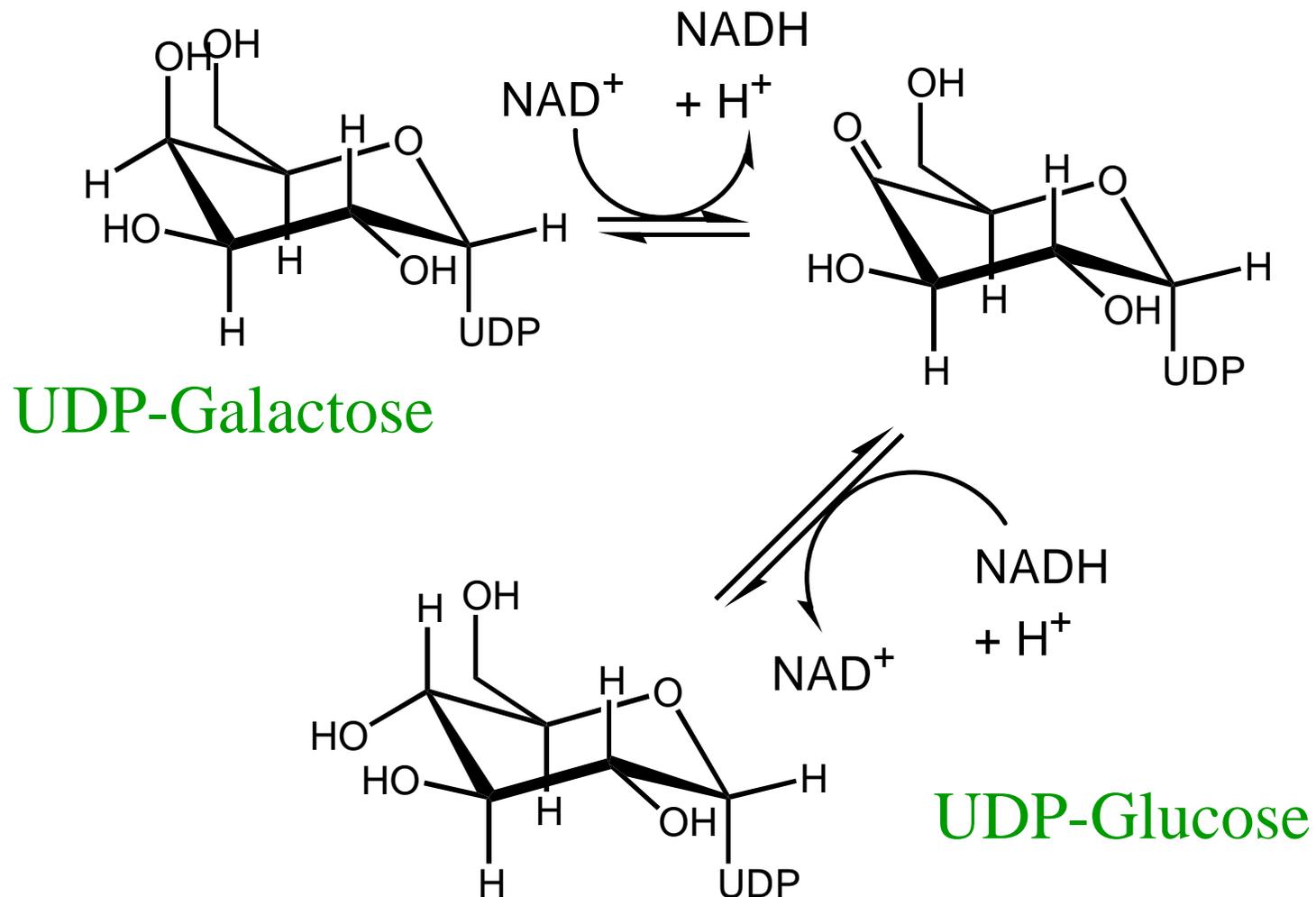
UDP-Glucose-Epimerase

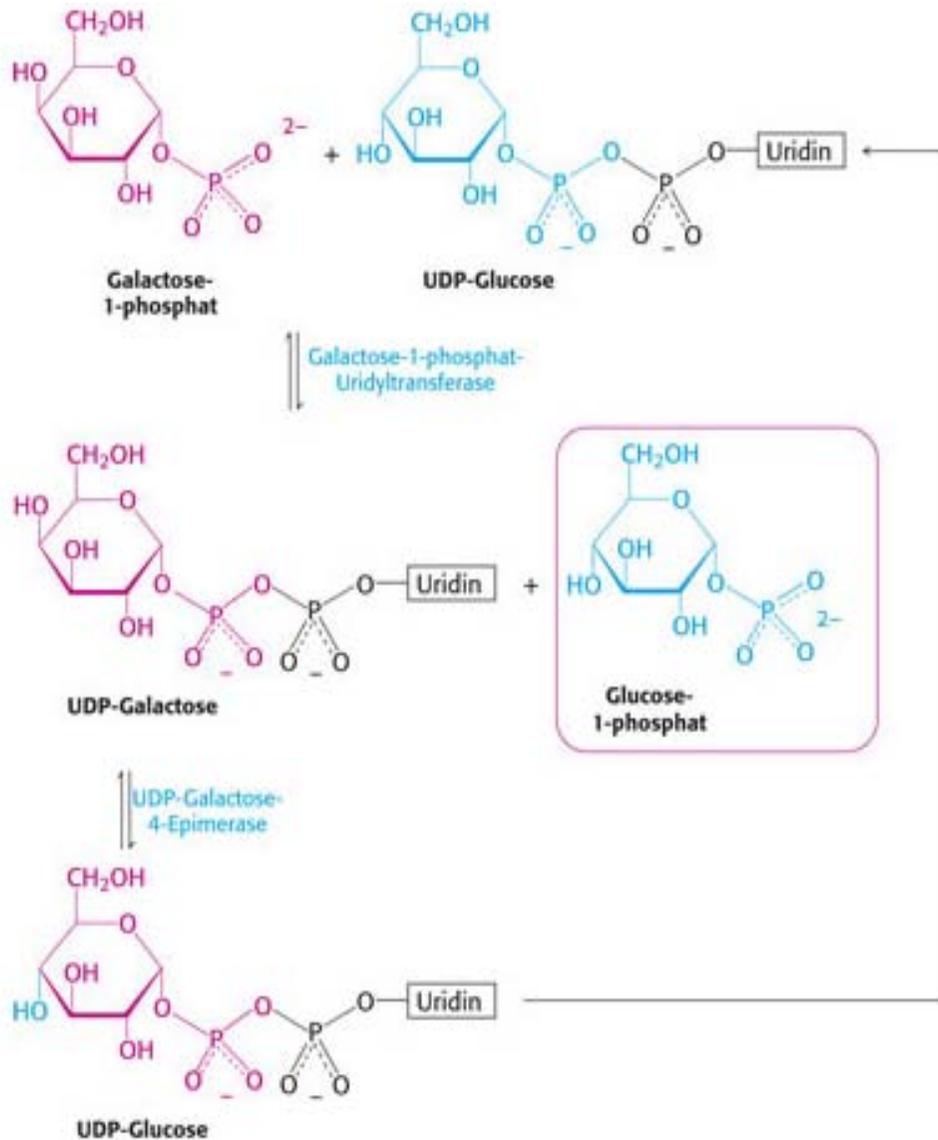


UDP-Glucose



**Epimerase** ändert die Stellung einer funktionellen Gruppe an einem konkreten C-Atom, während **Mutase** eine funktionelle Gruppe innerhalb eines Moleküls transferiert! Die **UDP-Glucose-Epimerase** benötigt  $\text{NAD}^+$  in Spuren als Cofaktor, obwohl der Reaktionsschritt keine Netto-Redoxreaktion darstellt. Grund: Reaktionsmechanismus.





UDP-Glucose wird bei der Umwandlung von Galactose in Glucose nicht verbraucht, weil sie durch die **Epimerase** aus UDP-Galactose regeneriert wird.

Diese **Epimerase**-Reaktion ist reversibel und das Produkt der umgekehrten Reaktion ist ebenfalls wichtig: Synthese von Galactoseeinheiten in komplexen Polysacchariden und Glycoproteinen, wenn der Anteil der Galactose aus der Nahrung nicht ausreicht.

## Leloir-Cyclus:

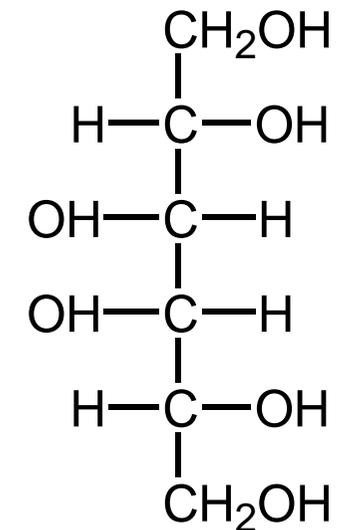


## Galactosämie

Die angeborene Krankheit **Galactosämie** beruht in den meisten Fällen auf dem Fehlen der **Phosphohexose-Uridyltransferase**. Bei Kindern, die viel Milch trinken, kommt es zu hohen Galactose-Konzentrationen im Blut und in der Folge zu den typischen Krankheitsbildern: Entwicklungsstörungen, geistige Retardierung, Katarakte im Auge, Tod durch Leberschäden usw.

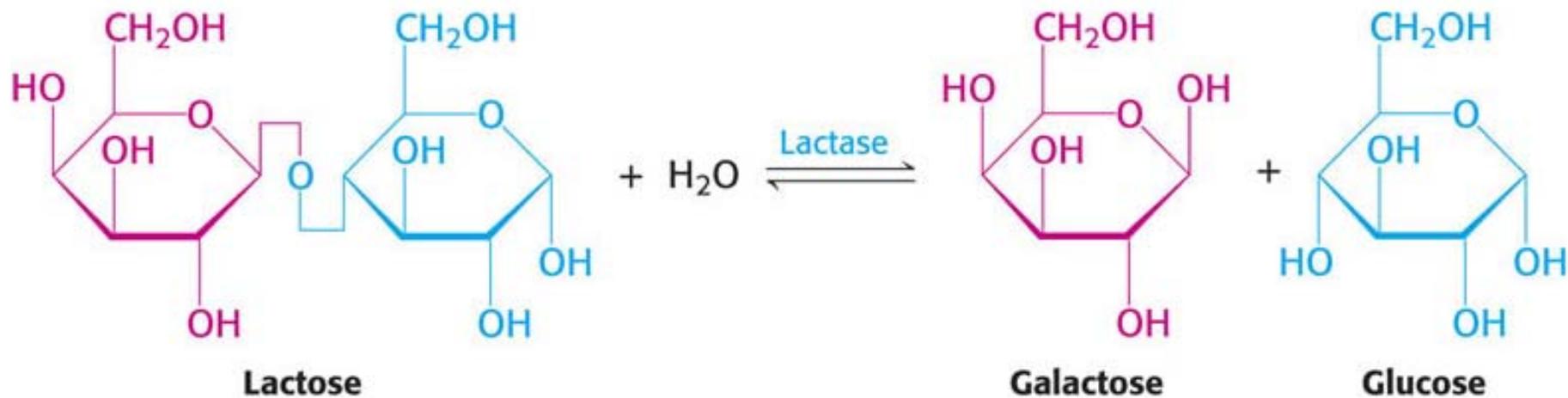
Durch die Unterbleibung der Bildung von UDP-Galactose aus Gal-1-P- häufen sich giftige Stoffwechselprodukte an. Ein Beispiel ist die Reduktion der Galactose zu **Galactitol** in der Augenlinse (Enzym: **Aldose-Reductase**), die für die Linsentrübung (grauer Star) mitverantwortlich gemacht wird.

Galactosämie-krankte Kinder dürfen keine Milch bzw. Galactose-hältige Lebensmittel konsumieren.



D-Galactitol

Viele Erwachsene können das Kohlenhydrat der Milch, die Lactose, nicht abbauen. Folgeerscheinung: Darmstörungen. Diese **Lactoseintoleranz** (Hypolactasie) wird vor allem durch einen Mangel des Enzyms **Lactase** hervorgerufen, das Lactose in Glucose und Galactose spaltet:

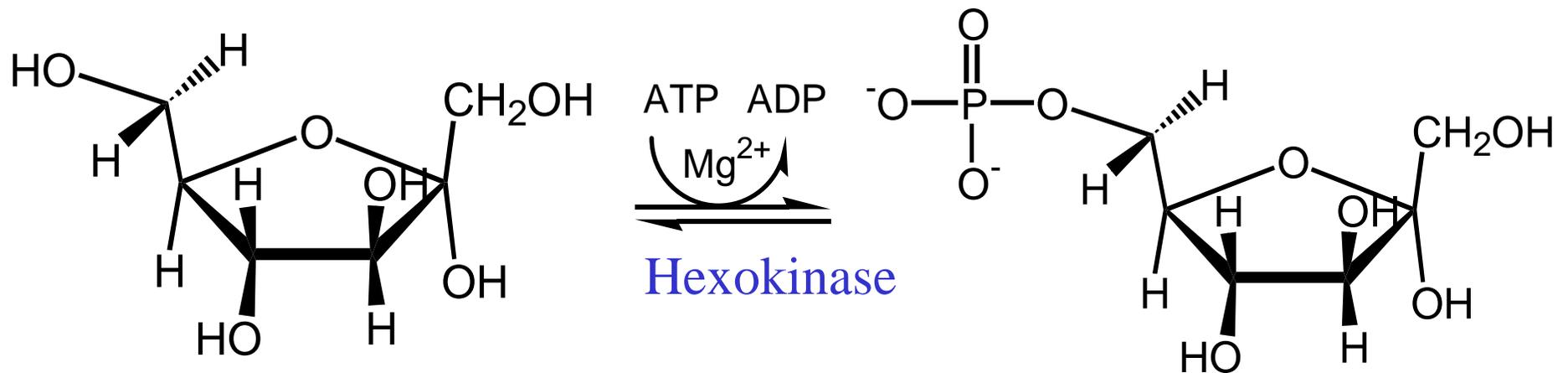


Die Abnahme der **Lactase**-Konzentration beginnt schon bei Kleinkindern nach dem Abstillen und setzt sich im Erwachsenenalter fort. Die Abnahme kann aber je nach Bevölkerungsgruppen unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Was ist die Ursache für die Darmprobleme bei **Lactase**-Mangel? Lactose ist eine wichtige Energiequelle für Mikroorganismen (z.B. *Lactobacilli*) im Dickdarm. Sie vergären Lactose zu Milchsäure (Lactat) und erzeugen dabei Methan,  $\text{CH}_4(\text{g})$ , und  $\text{H}_2(\text{g})$ : Ursache für Blähungen. Zudem ist Milchsäure osmotisch aktiv und führt zum Einstrom von Wasser in den Darm (Durchfall).

# Fructose

Fructose wird vor allem durch die Aufnahme und Hydrolyse von Saccharose in den Stoffwechsel eingeführt. Sie kann direkt in die Glycolyse eintreten, da die Fructose, ebenso wie Glucose und Mannose, am C-6 durch die **Hexokinase** phosphoryliert werden kann:



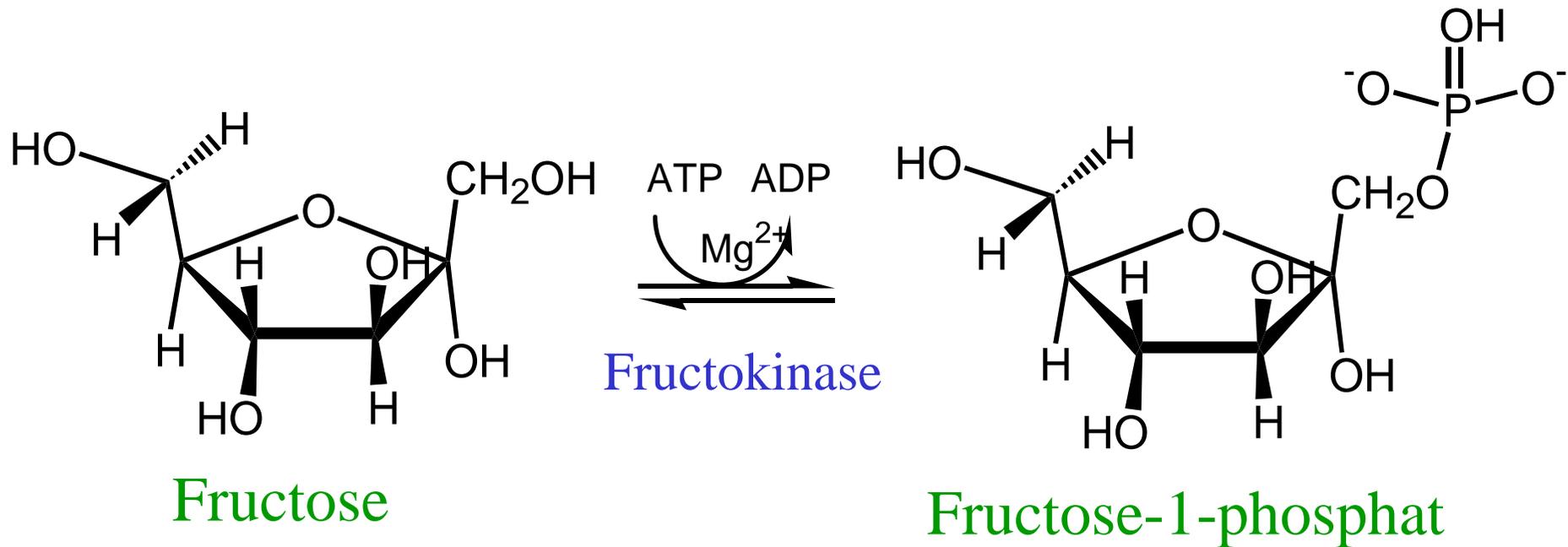
Fructose

Fructose-6-phosphat

Jedoch ist die Affinität der **Hexokinase** zu Glucose 20-mal größer als zu Fructose. In der Leber ist der Glucosespiegel hoch und daher wird hier nur wenig Fructose-6-phosphat gebildet.

Auch im Muskel ist Glucose der bevorzugte Brennstoff, der durch **Hexokinase** umgesetzt wird. Während Leber und Muskulatur mehr Glucose als Fructose phosphorylieren, erhält das Fettgewebe mehr Fructose als Glucose. Deshalb wird die Entstehung von Fructose-6-phosphat dort nur unwesentlich kompetitiv gehemmt. Im Fettgewebe tritt daher die meiste Fructose über Fructose-6-phosphat in den Stoffwechsel ein.

In der Leber von Säugetieren gibt es einen alternativen Weg, bei dem die Phosphorylierung durch das Enzym **Fructokinase** am C-1 erfolgt.



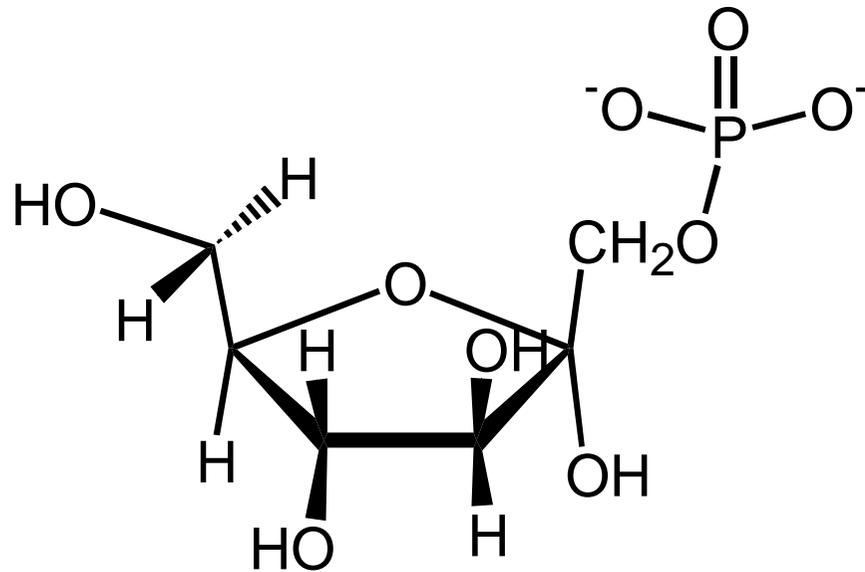
Fructose-1-phosphat wird in der Folge durch eine spezifische **Aldolase** in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd gespalten. Klasse-I-Aldolasen:

- |                 |   |
|-----------------|---|
| Typ A (Muskel): | Spezifisch für Fructose-1,6-bisphosphat |
| Typ B (Leber):  | Verwertet auch Fructose-1-phosphat      |

Glycolyse

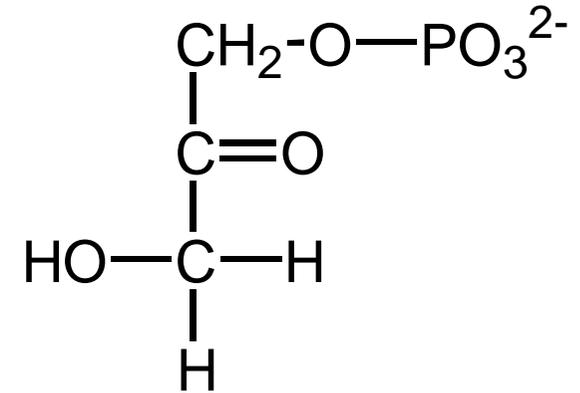
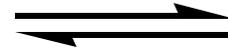


Dihydroxyacetonphosphat

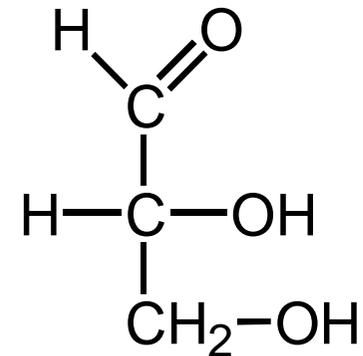


Fructose-1-phosphat

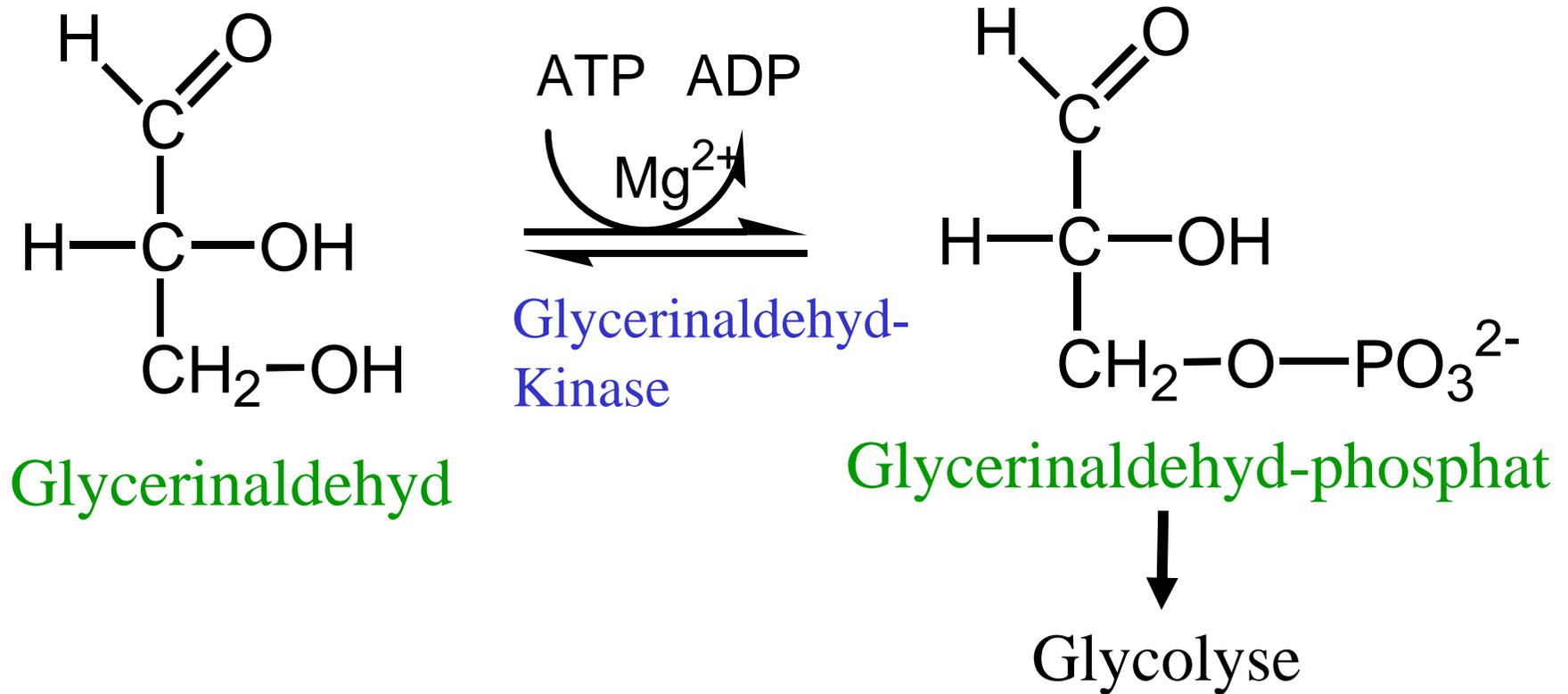
Aldolase B



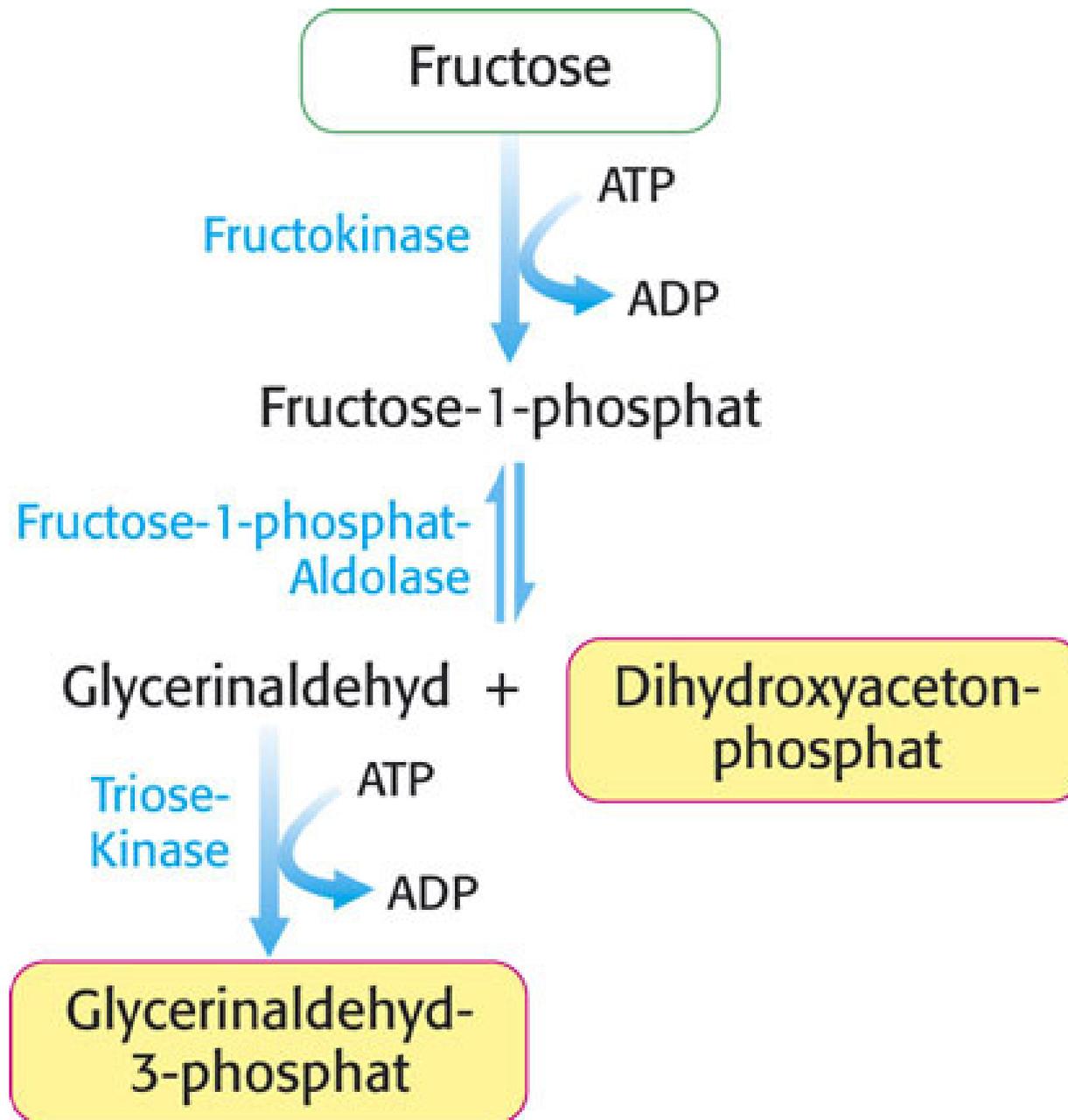
+



Glycerinaldehyd

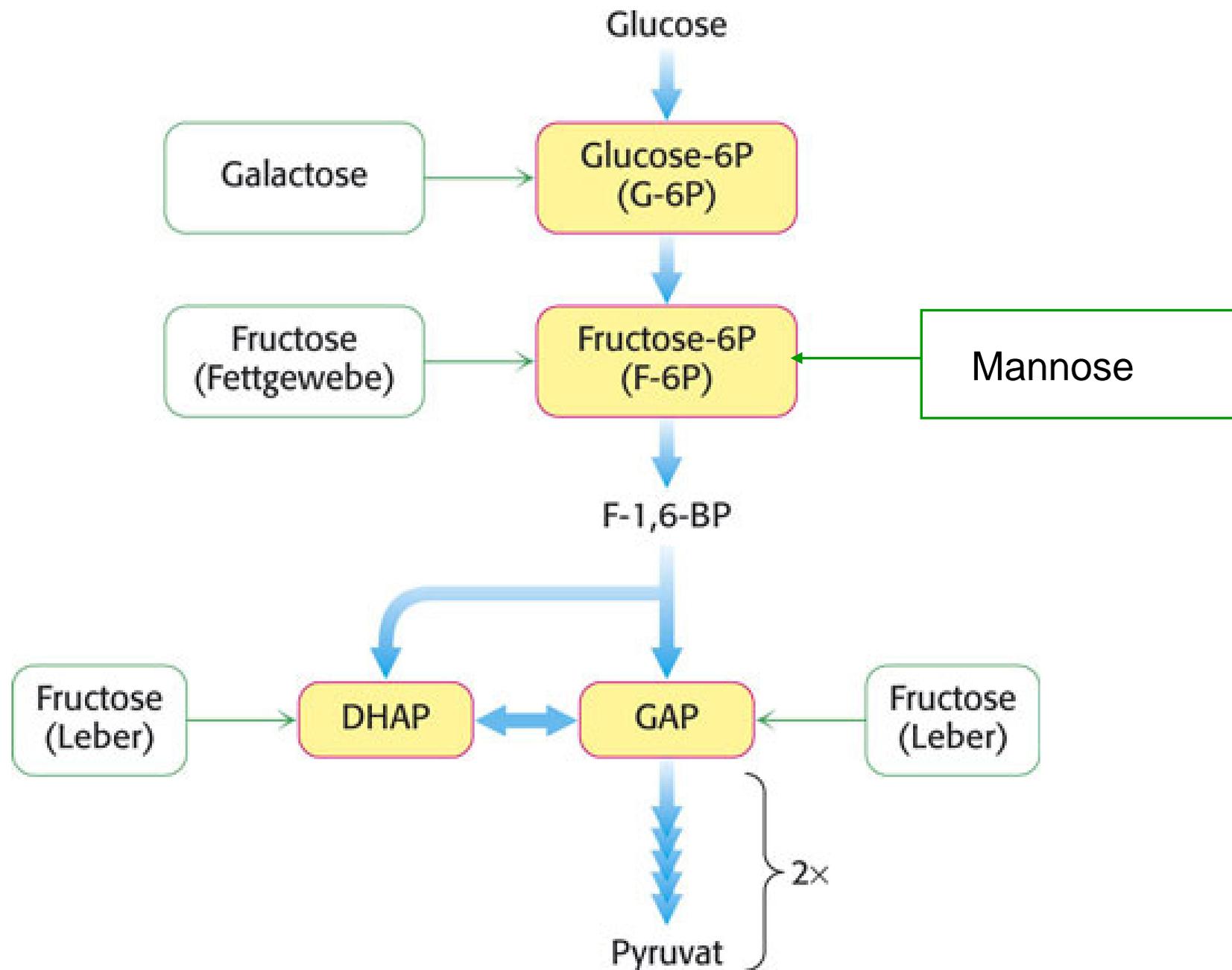


Es gibt mehrere Bedenken gegenüber einer Fructose-reichen Diät; vor allem seit Fructose als Ersatz-Süßstoff in vielen Lebensmitteln verwendet wird (früher sogar für intravenöse Ernährung verwendet). Der Mensch hat nämlich nur eine begrenzte Kapazität der Fructoseverwertung. Die Leber kann zwar Fructose rasch phosphorylieren, aber das Produkt Fructose-1-phosphat nur langsam umsetzen.



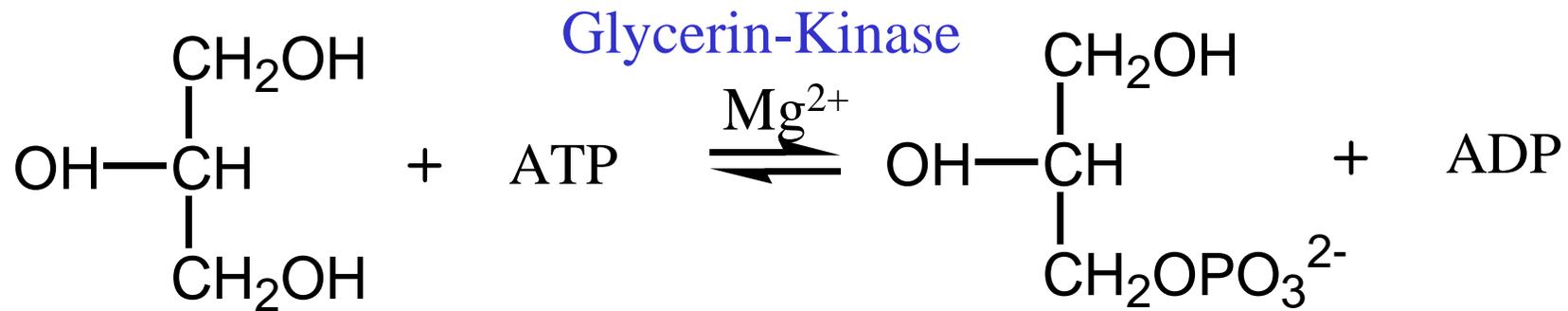
Die Fructoseverwertung ist also schlecht reguliert, und eine extreme Fructosebelastung vermindert die Kapazität der Leberzellen zur ATP-Bildung (der anorganische Phosphat-Pool wird geplündert!).

Einige Menschen haben eine angeborene Enzymmangelkrankheit, die als **Fructose-Intoleranz** bezeichnet wird. Diese Patienten haben einen Mangel an Leber **Aldolase B**. Auch hier kommt es zu einem Anstau von Fructose-1-phosphat und einem Mangel an ATP und  $P_i$  in der Leber und einer bedrohlichen **Hypoglykämie** durch Verdrängung der Glucose (Unterzuckerung bei der der Blutzuckerspiegel auf Werte unter 50 mg/dL absinkt). Wichtige Organe werden nicht mehr mit einer ausreichenden Menge Glucose versorgt. Kommt es bei Kindern mit dieser Störung zu einer länger dauernden Fructosebelastung, kann dies ernste Folgen haben. Oftmals entwickeln diese Personen aber Abneigung gegenüber allem Süßen.



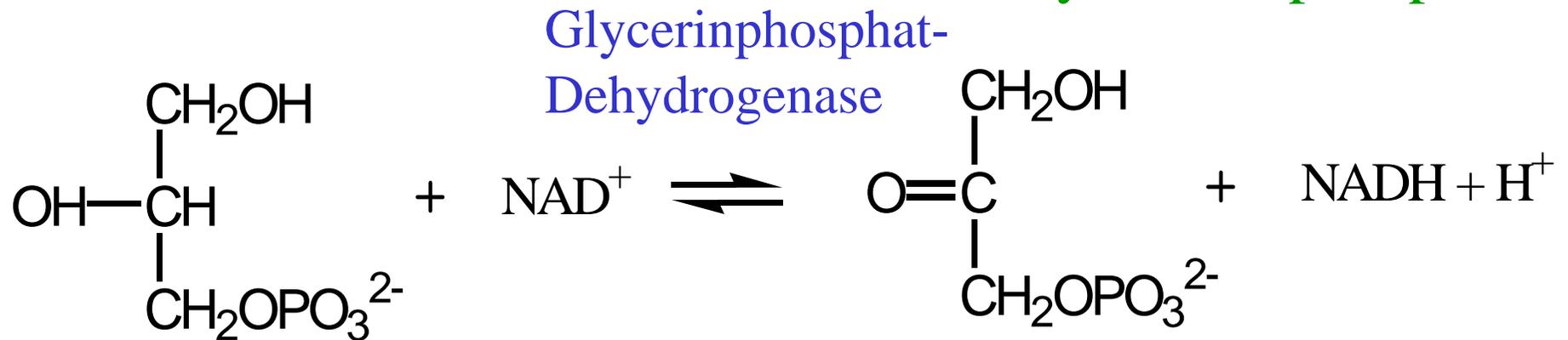
# Glycerin

Glycerin ist ein wichtiger Lipidbaustein und entsteht beim Abbau von z.B. Triacylglycerinen.



Glycerin

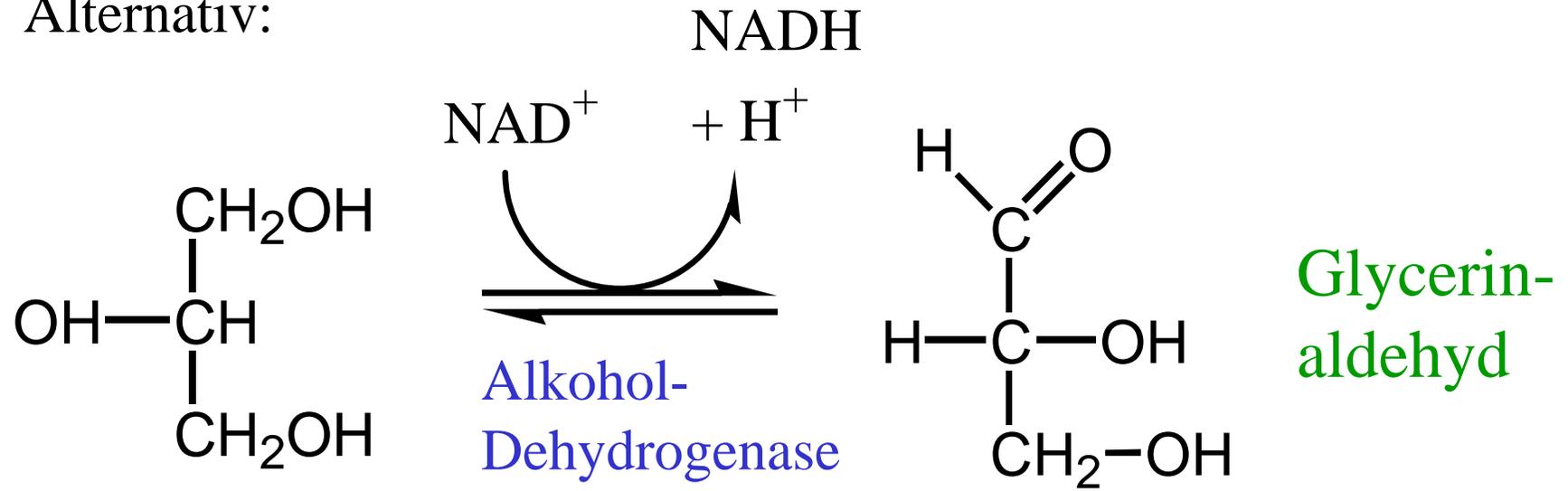
Glycerin-3-phosphat



Glycerin-3-phosphat

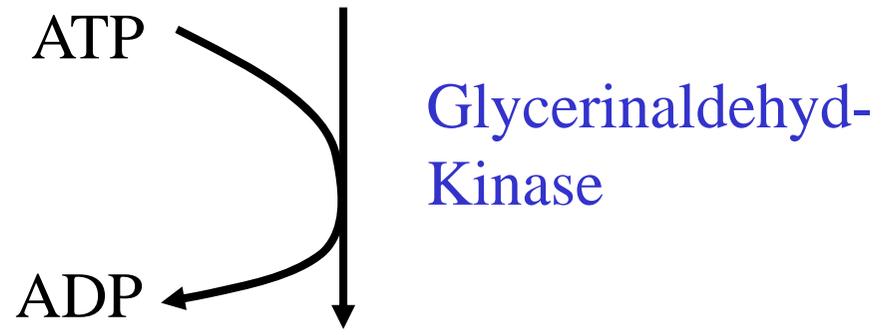
Dihydroxyacetonphosphat

Alternativ:



Glycerin

Glycerinaldehyd



Glycolyse

Glycerinaldehyd-phosphat

# 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. Einschleusen von Galactose, Mannose, Fructose und Glycerin in die Glykolyse
6. Schicksale des Pyruvats