

BIOCHEMIE des Stoffwechsels

(772.113)

7. Einheit

Citrat- und Glyoxylat-Cyclus

Citrat-Cyclus

Allgemeines

Reaktionsfolge

Thermodynamik und Regulation

Amphibole Natur des Citrat-Cyclus

Anaplerotische Reaktionen

Glyoxylat-Cyclus

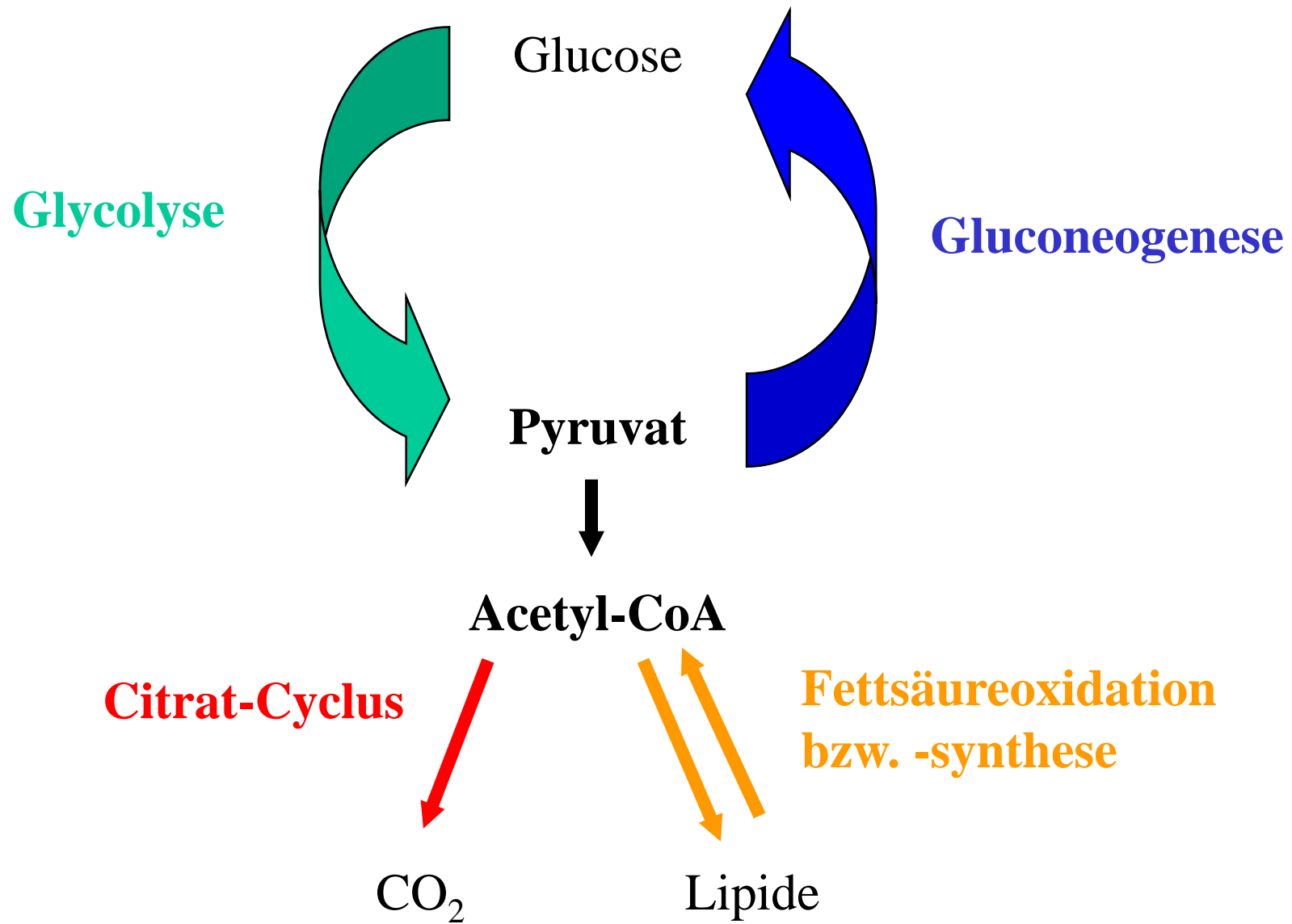
Citrat-Cyclus

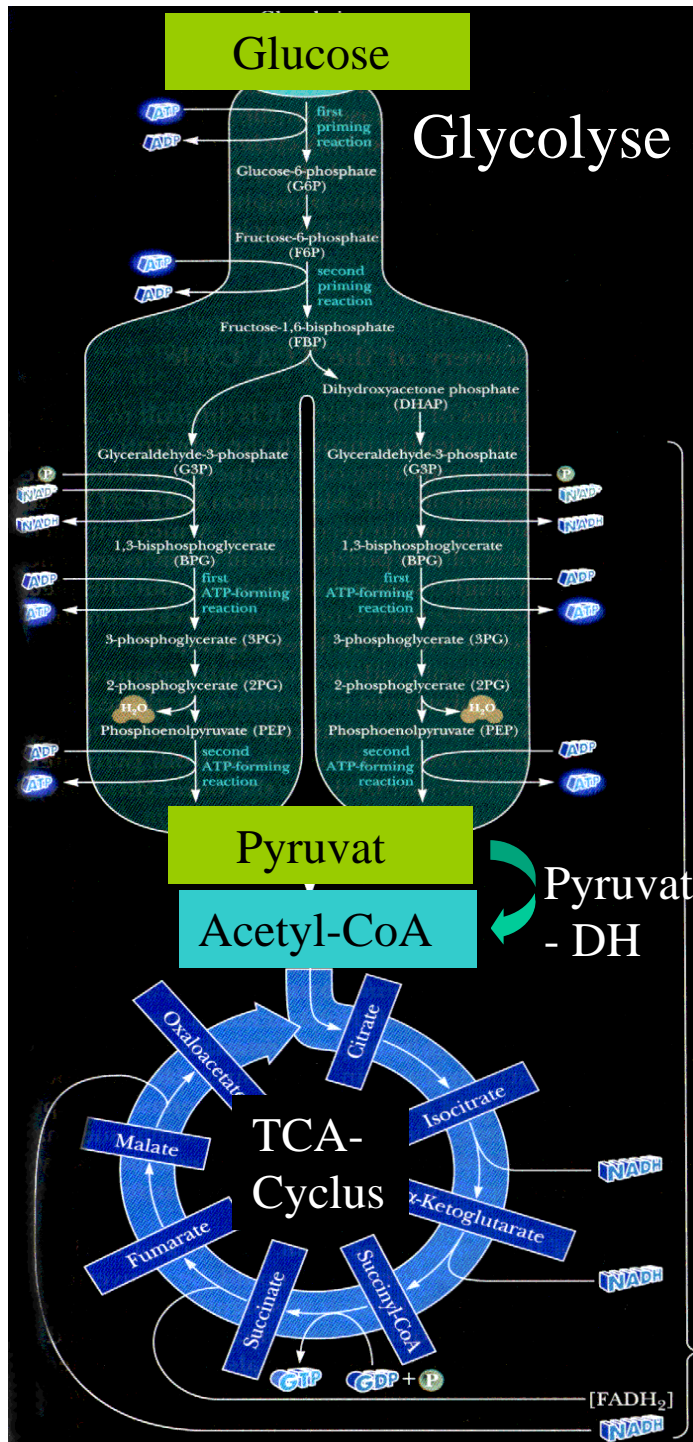
Allgemeines

Bei der Umsetzung von Glucose zum Pyruvat (Glycolyse) bleibt der Hauptteil der im Glucosemolekül steckenden Energie ungenutzt.

Wird allerdings Sauerstoff zugelassen, so kann die Zelle sämtliche Kohlenstoffatome der Glucose (oder eines anderen Substrats) vollständig zu CO_2 oxidieren und alle Elektronen, die bei den zahlreichen Oxidationen entzogen wurden, letztendlich auf Sauerstoff übertragen. In diesem Prozeß ist die ATP-Ausbeute pro Glucose mindestens 15mal größer als unter anaeroben Bedingungen. Hierin liegt ein großer Vorteil des aeroben Lebens.

Aerobe Prozesse, die dem Pyruvat weitere Energie entziehen können, spielen also im Energiestoffwechsel eine zentrale Rolle. Der aerobe Energiestoffwechsel kann als Zusammenspiel zweier getrennter, aber eng verknüpfter Prozesse betrachtet werden: Citrat-Cylus und Atmungskette.





Historisches:

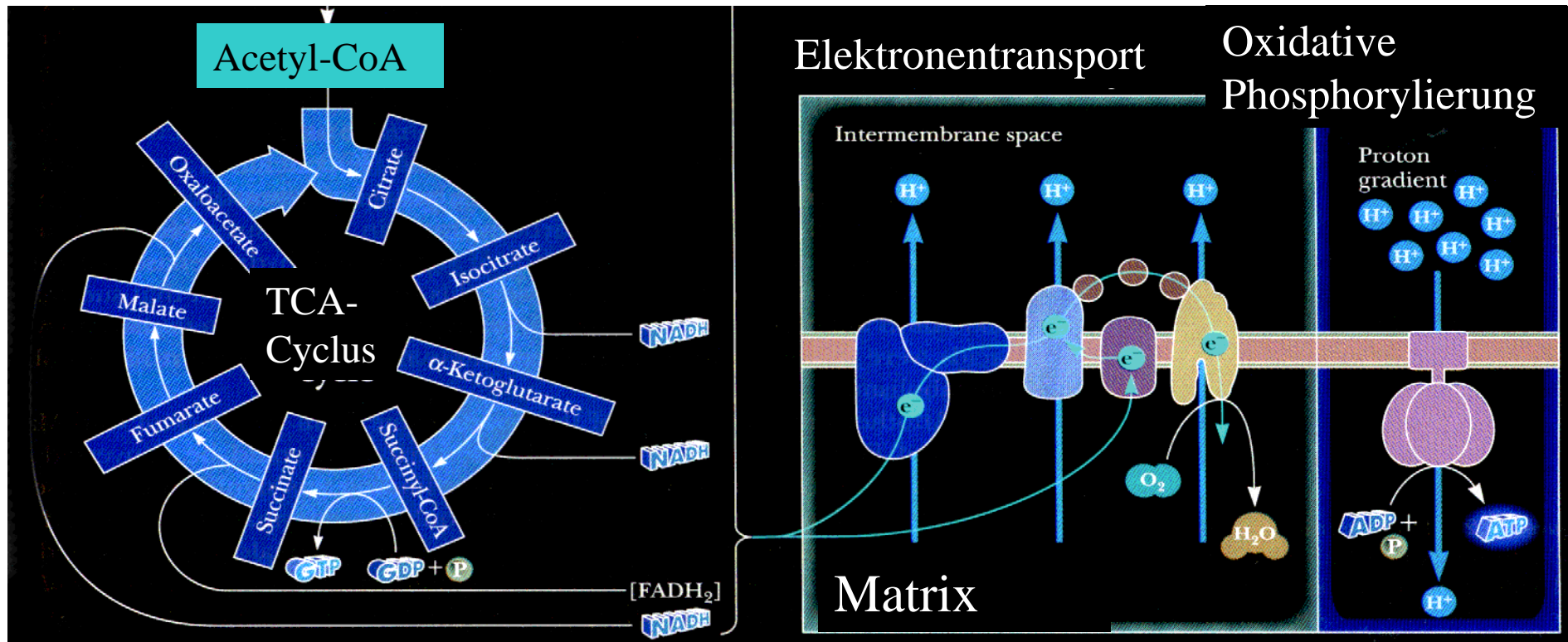
30er Jahre: Succinat, Malat und α -Ketoglutarat werden im Muskelgewebe durch Atmung oxidiert

1935 Albert Szent-Györgyi:
Die Zellatmung wird durch katalytische Mengen von Succinat, Fumarat, Malat oder Oxalacetat drastisch beschleunigt.
Reaktionsfolge: Succinat \rightarrow Fumarat \rightarrow Malat \rightarrow Oxalacetat

Carl Martius und Franz Knoop:
Umlagerung Citrat zu Isocitrat über cis-Aconitat. Reaktionsfolge: Citrat \rightarrow cis-Aconitat \rightarrow Isocitrat \rightarrow α -Ketoglutarat \rightarrow Succinat \rightarrow Fumarat \rightarrow Malat \rightarrow Oxalacetat

1936 Krebs:
Citrat aus Oxalacetat und Acetateinheit. Postulierung eines Cyclus

1945 N. Kaplan und F. Lipmann:
Entdeckung des Coenzym A



Im Citronensäure-Cyclus werden die (u.a. durch **Pyruvat-Dehydrogenase**) gebildeten Acetyl-CoA-Einheiten formal zu CO_2 oxidiert. Nettoreaktion:



Die gebildeten Reduktionsäquivalente werden anschließend in der Atmungskette mittels Sauerstoff, O_2 , reoxidiert.

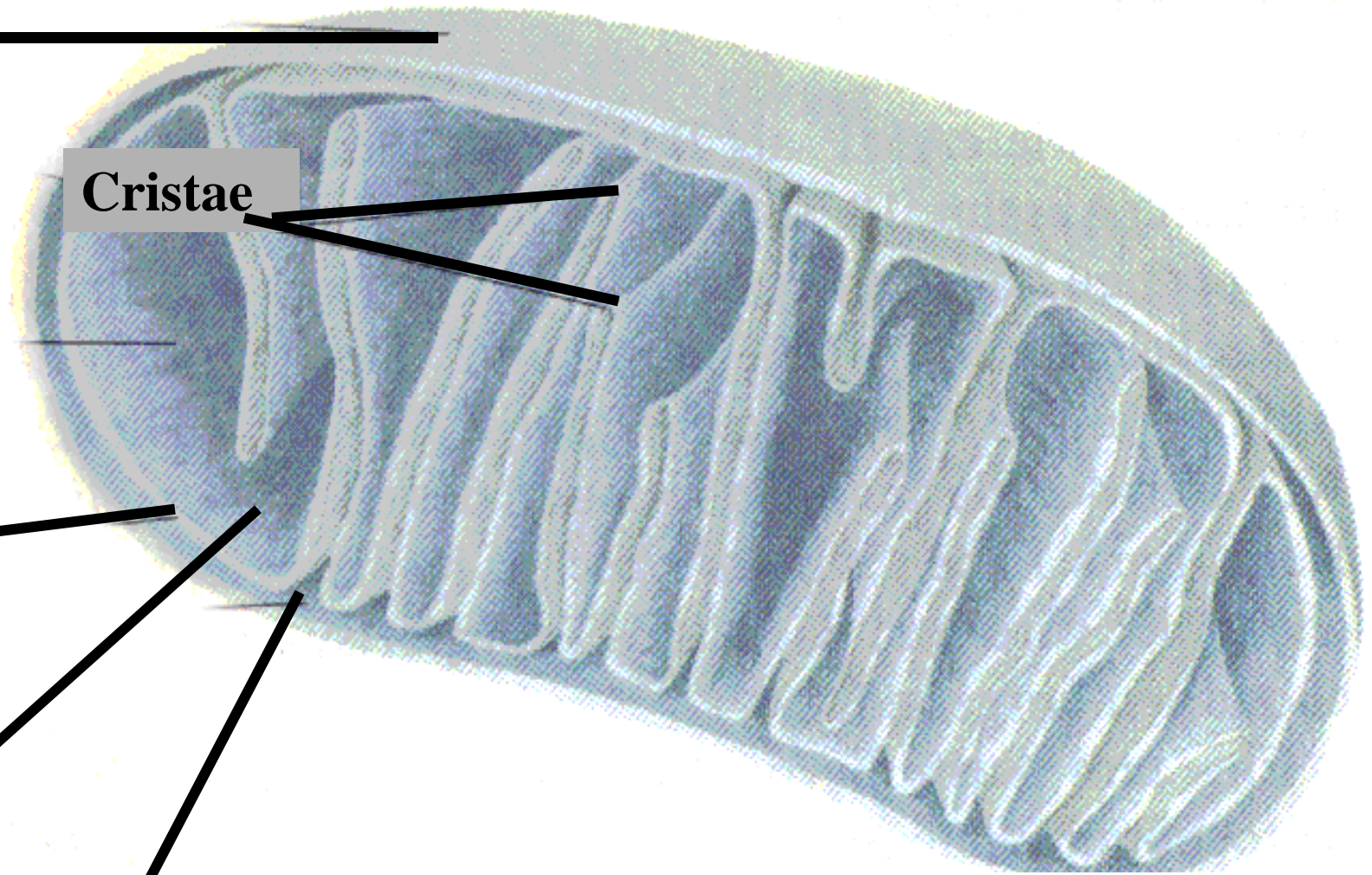
Äußere
Membran

Cristae

Innere
Membran

Matrix

Intermembranraum



Mitochondriale Matrix: enthält (u.a.) Enzyme des Citronensäure-Cyclus sowie den Multienzymkomplex **Pyruvat-Dehydrogenase** (Rinderherz: 8400 kDa), der aus Pyruvat Acetyl-CoA synthetisiert.

Mitochondrium

Äußere Membran

Cristae

Matrix

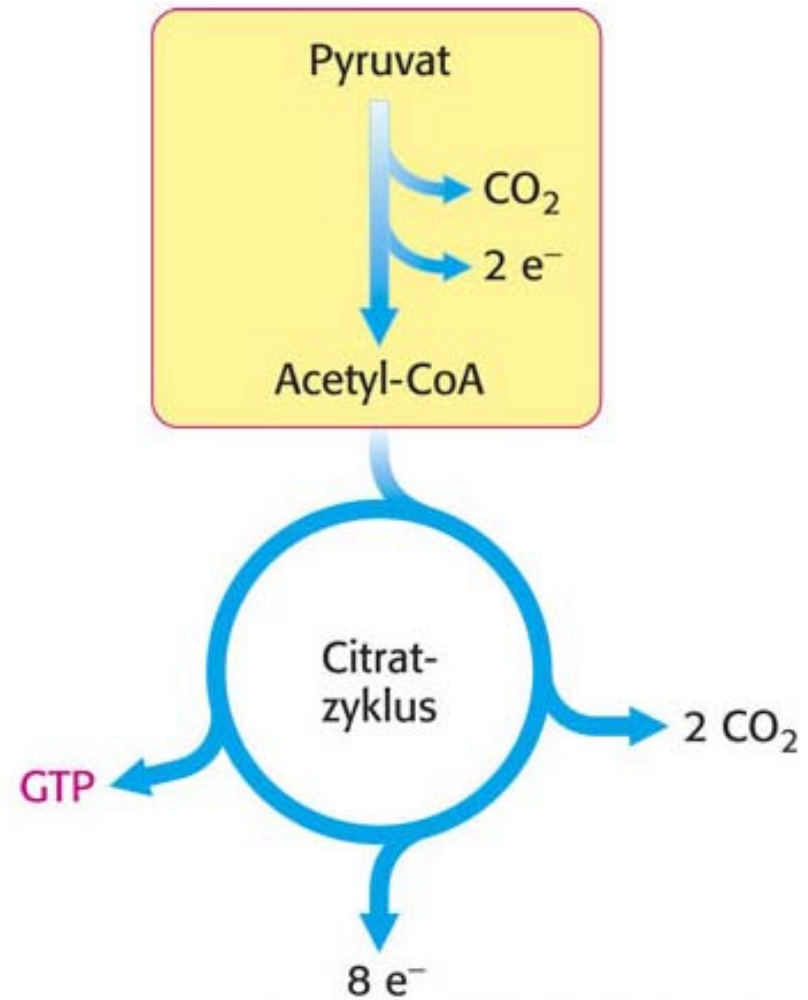
Matrix

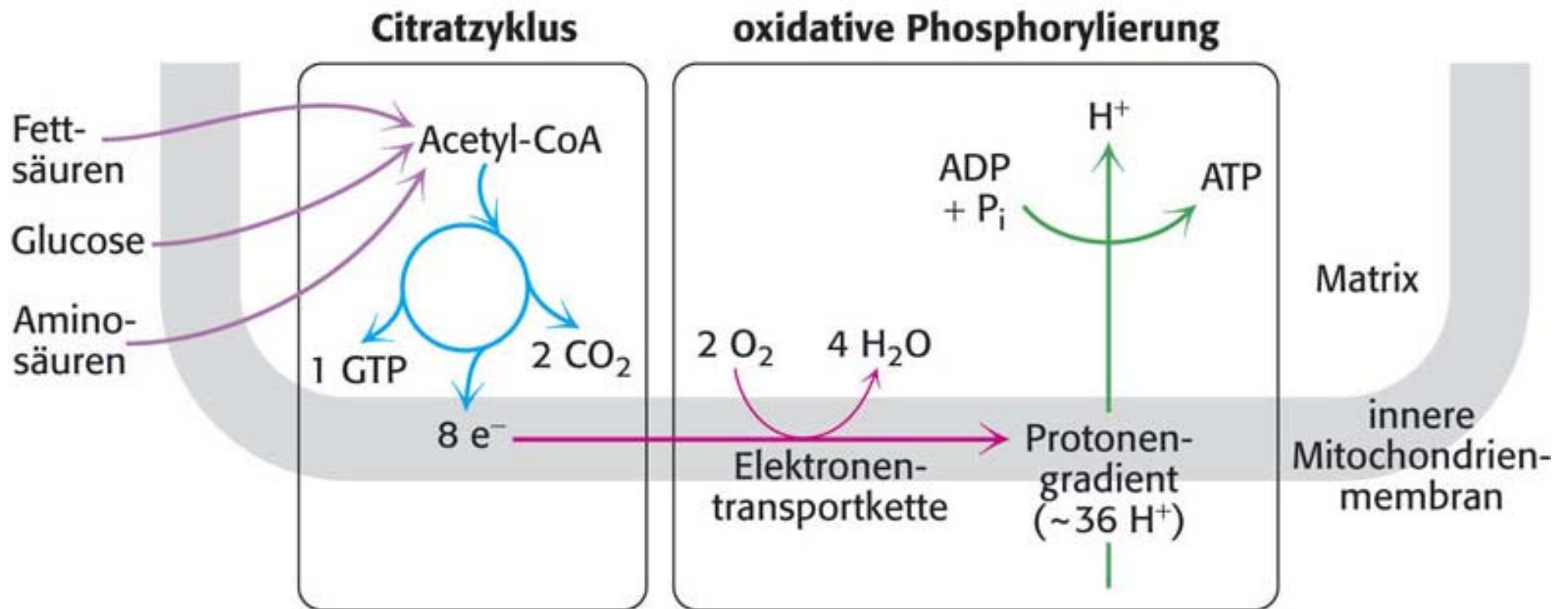
Innere Membran

Fast alle Enzyme des TCA-Cyclus sind in der Matrix lokalisiert. Einzige Ausnahme: Succinat-Dehydrogenase, die als Teil der Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran sitzt.

Citrat-Cyclus

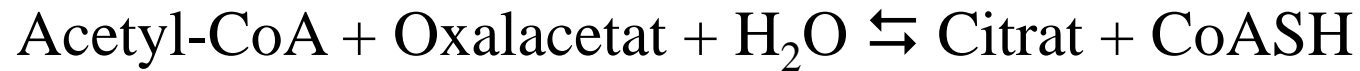
Allgemeines
Reaktionsfolge





Citrat-Cyclus

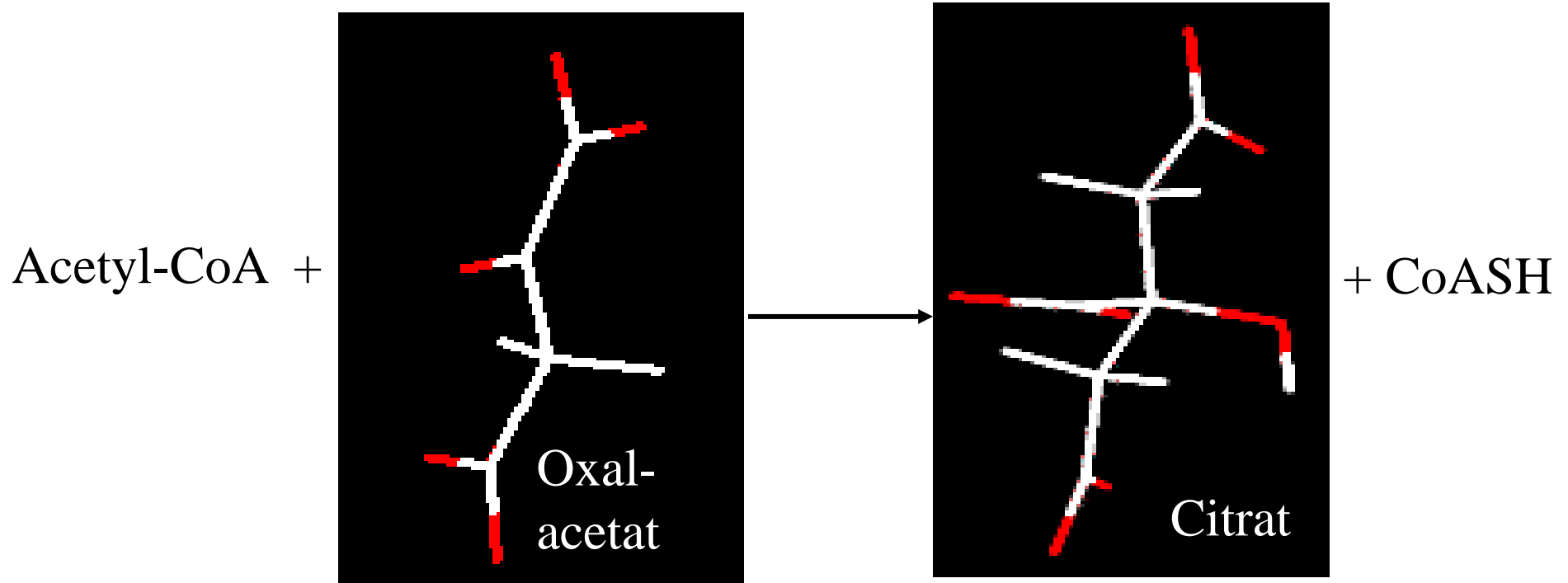
1. Reaktion: Citrat-Synthase

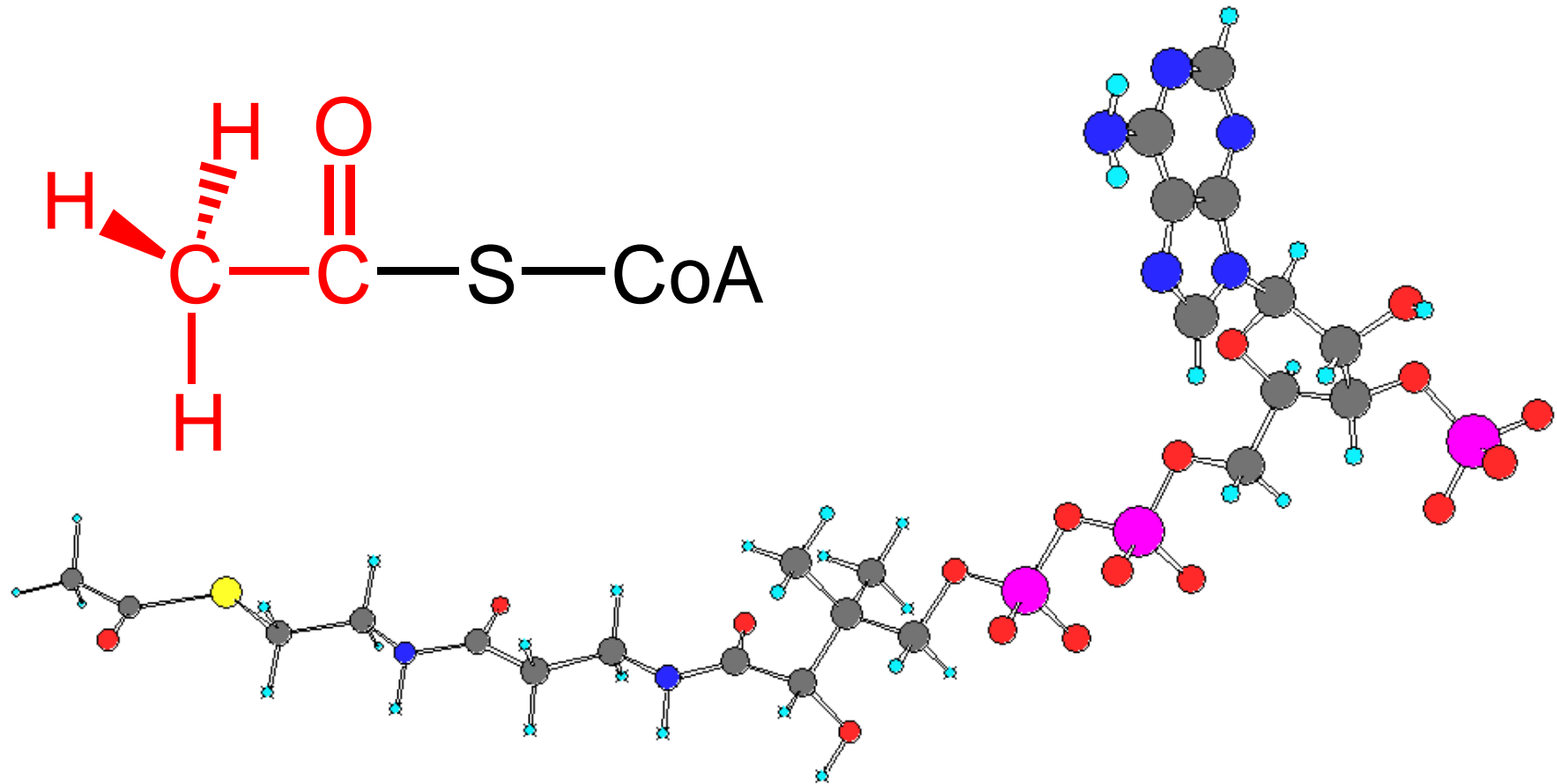


Enzym: (C-C) Lyase

Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7)

Homodimer: 49 kDa pro Untereinheit (Schweineherz)



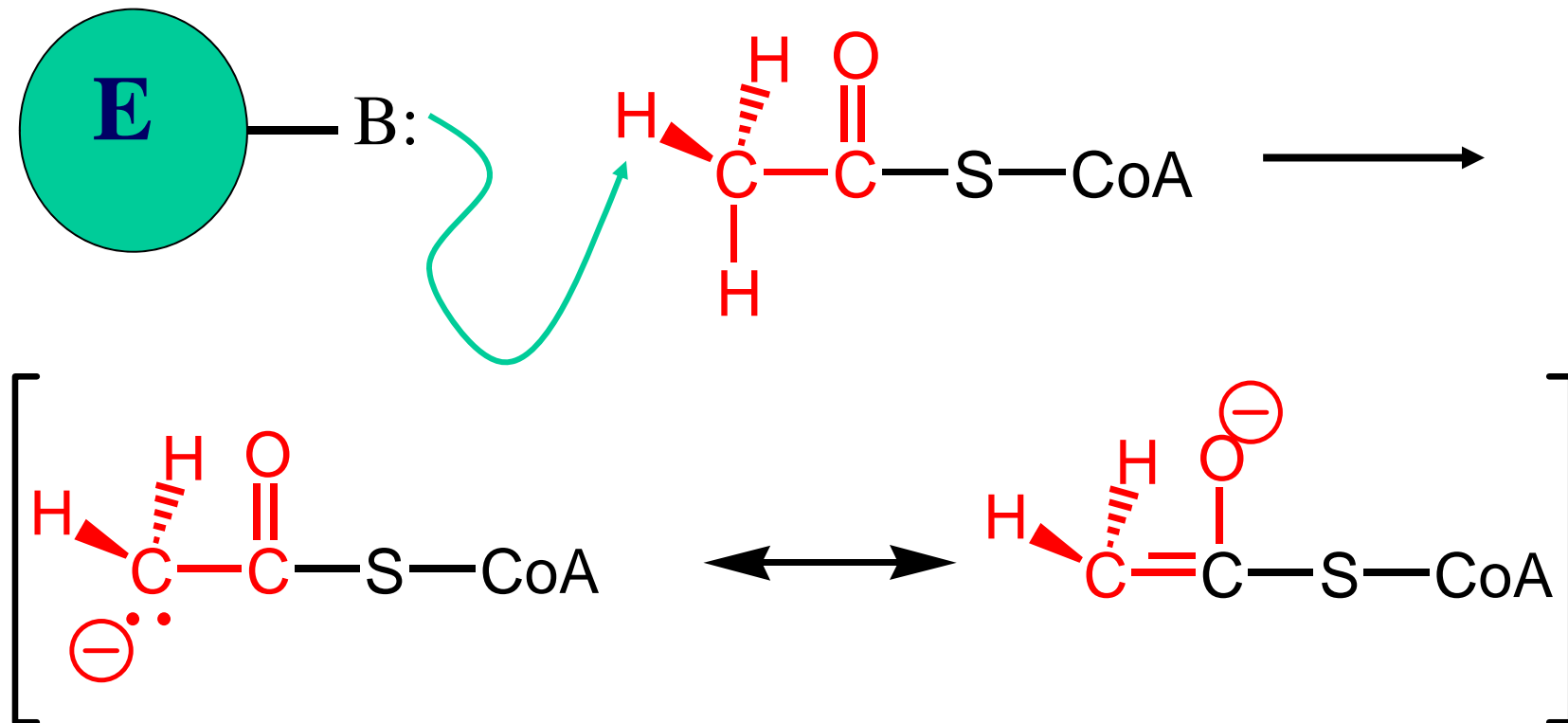


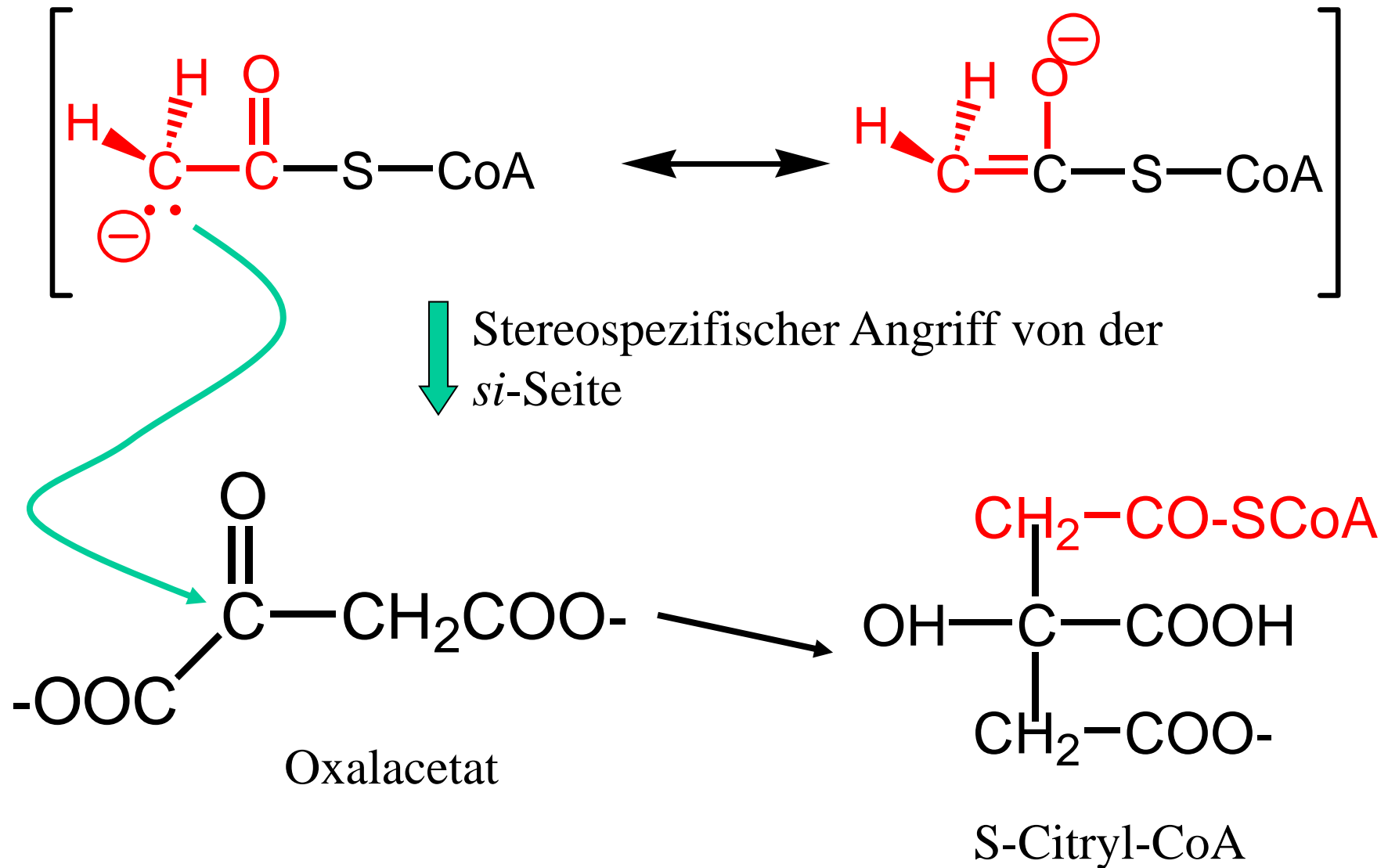
Eigenschaften von CH_3COSCoA :

Bedingt durch die Nachbarschaft der Thioestergruppierung sind die Protonen der Methylgruppe am C_α acider als in freier Form (Carbanion-Bildung im aktiven Zentrum der **Citratsynthase**)

Reaktionsmechanismus:

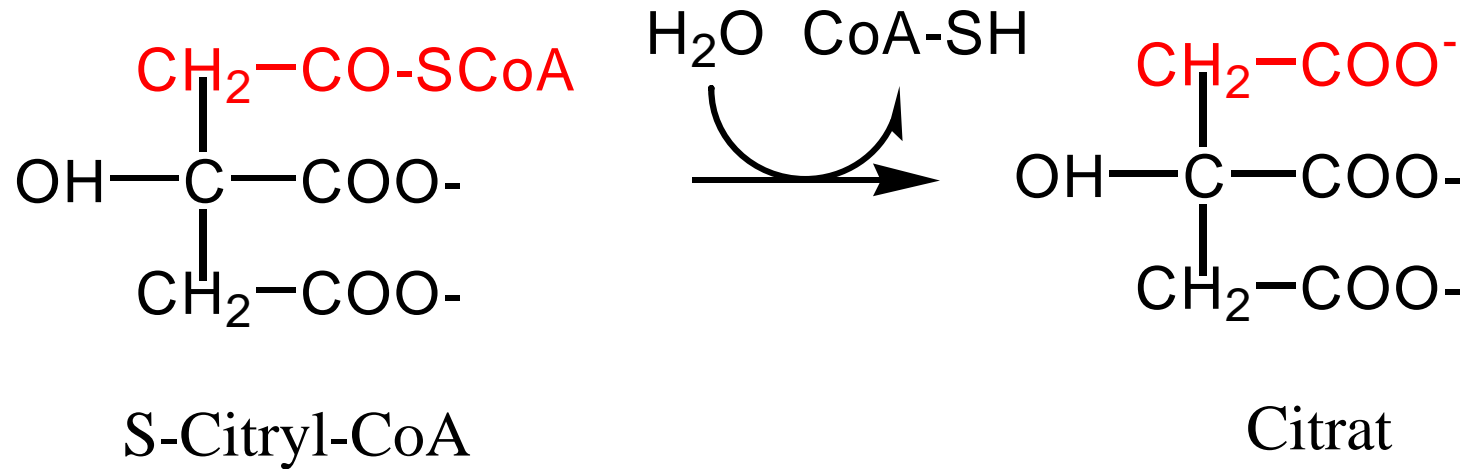
1. Base im aktiven Zentrum (Histidin) abstrahiert Proton der Methylgruppe in CH_3COSCoA . Die Thioestergruppe stabilisiert das Carbanion und ermöglicht so die Enolisierung





Gemischte Ester-Aldolkondensation (Perkinkondensation).

Nucleophiler Angriff des Acetyl-CoA Carbanions an die Carbonylgruppe des Oxalacetats. Reaktionsprodukt: enzymgebundenes Citryl-CoA



Bildung von Citryl-CoA $\Delta G^{\ominus'}$ = 0 kJ/mol

Hydrolyse von Citryl-CoA $\Delta G^{\ominus'}$ = -31,4 kJ/mol

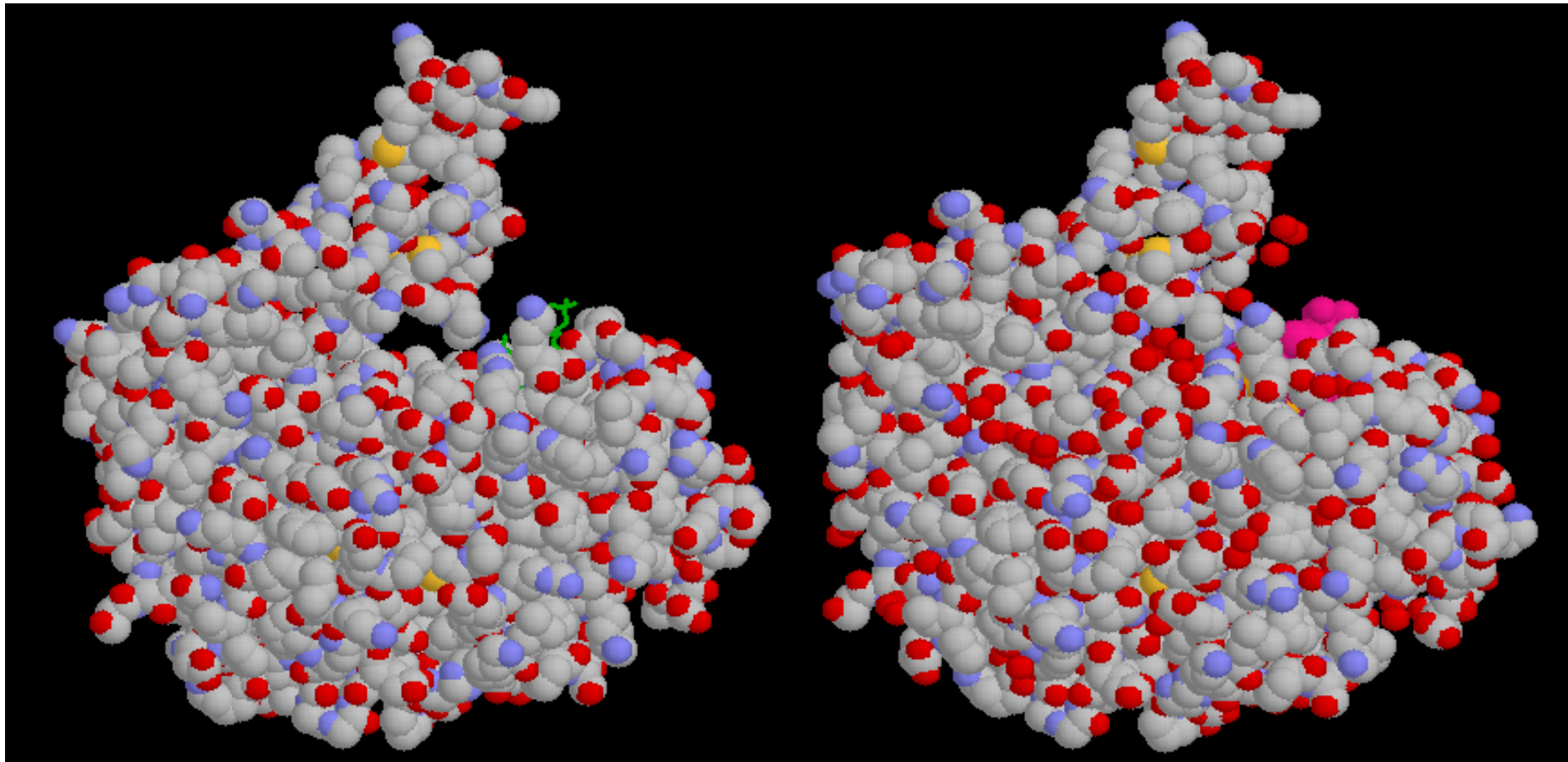
Gesamtreaktion $\Delta G^{\ominus'}$ = -31,4 kJ/mol; $K_{\text{eq}} = 2,2 \times 10^5$

$[\text{Oxalacetat}]_{\text{Mitoch}} < 1 \mu\text{M}$, daher $\Delta G' = -53,9 \text{ kJ/mol}$

Regulationspunkt: Alloster. Inhibition durch NADH und Succinyl-CoA

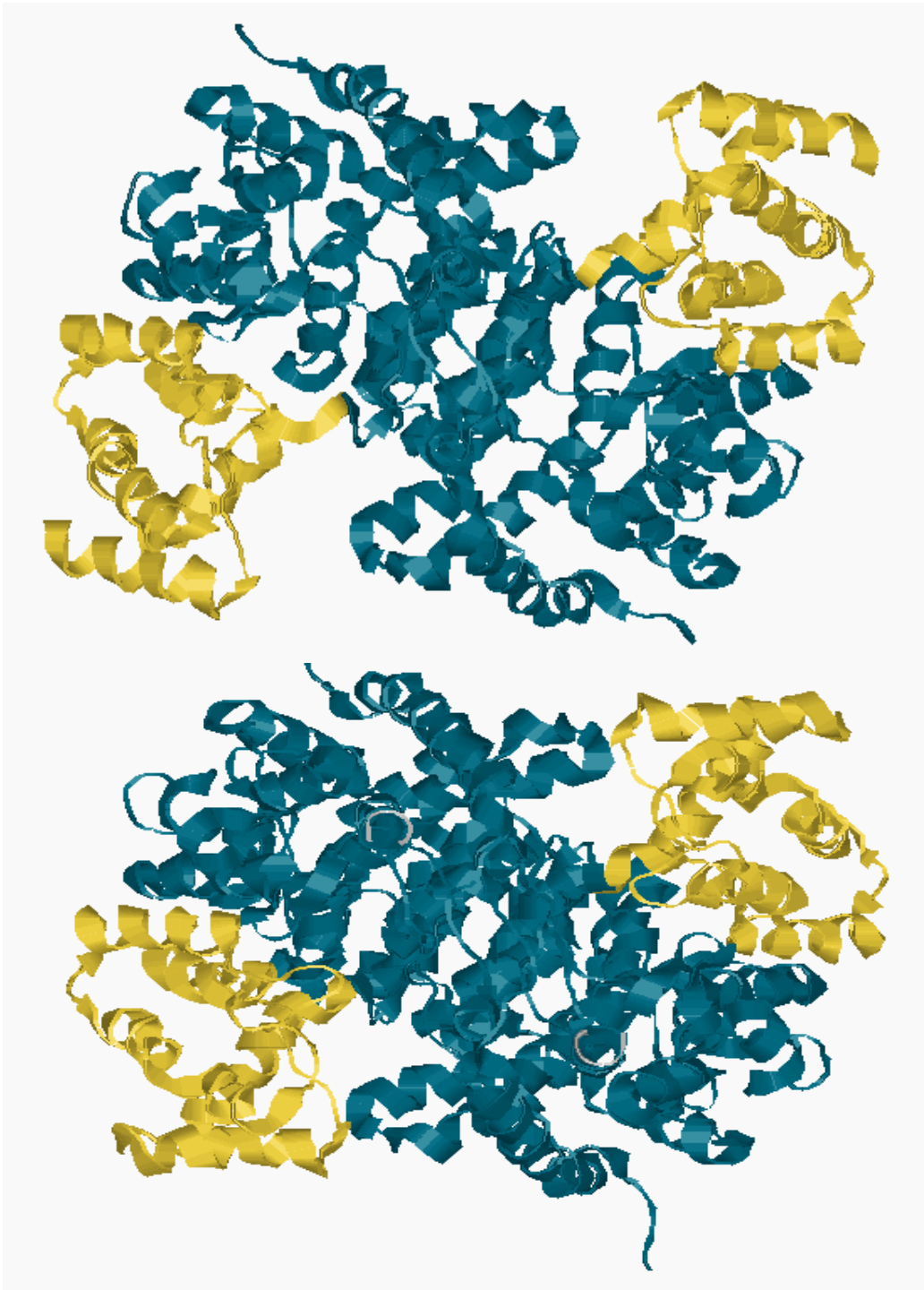
Citrat-Synthase (1 Untereinheit): Sequentieller Mechanismus

1. Binden von Oxalacetat; 2. Konformationsänderung;
3. Binden von Acetyl-CoA „*Induced fit*“



Offene Konformation:
2 Domänen

Geschlossene Konformation

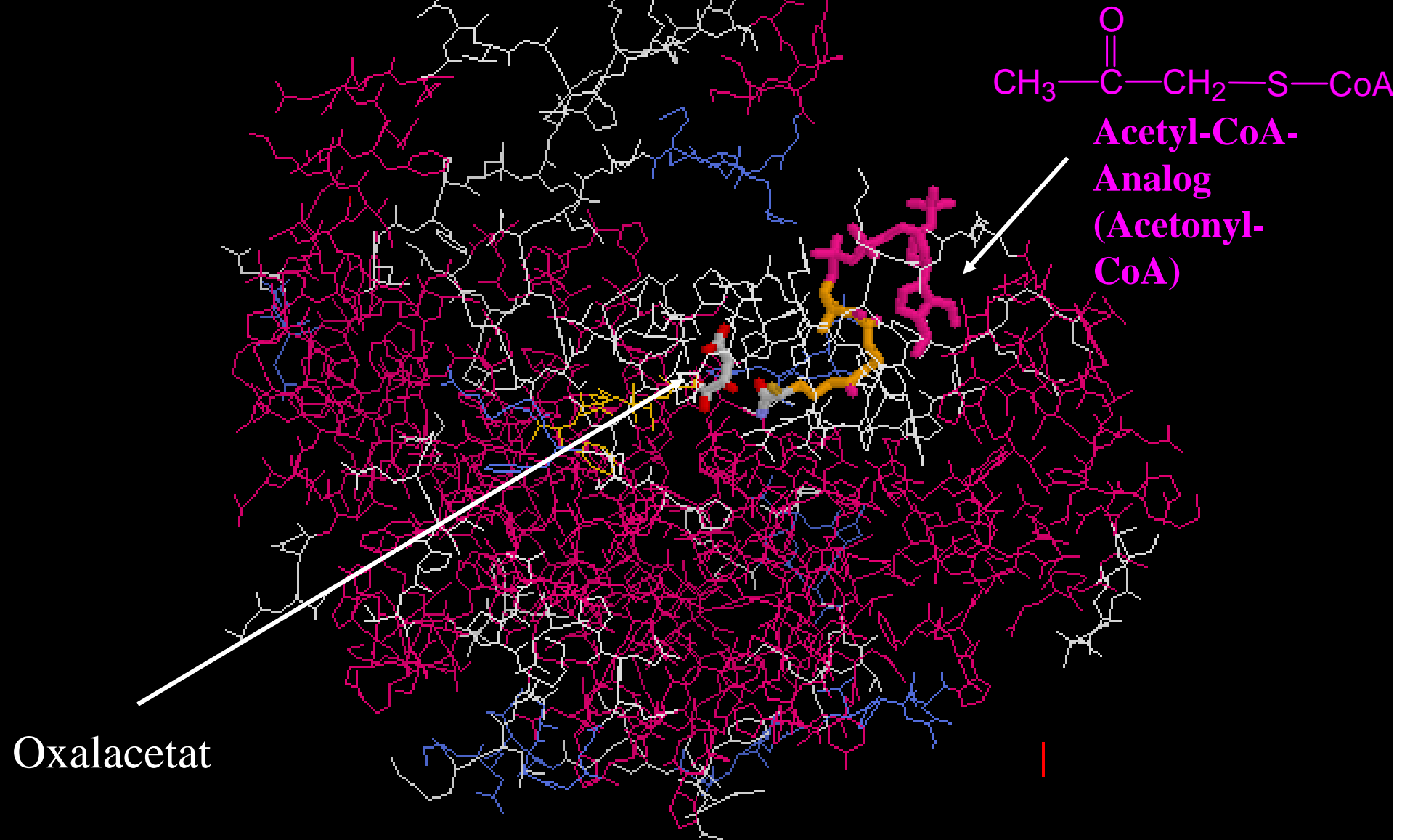


Offene Form der
Citrat-Synthase:
Dimer

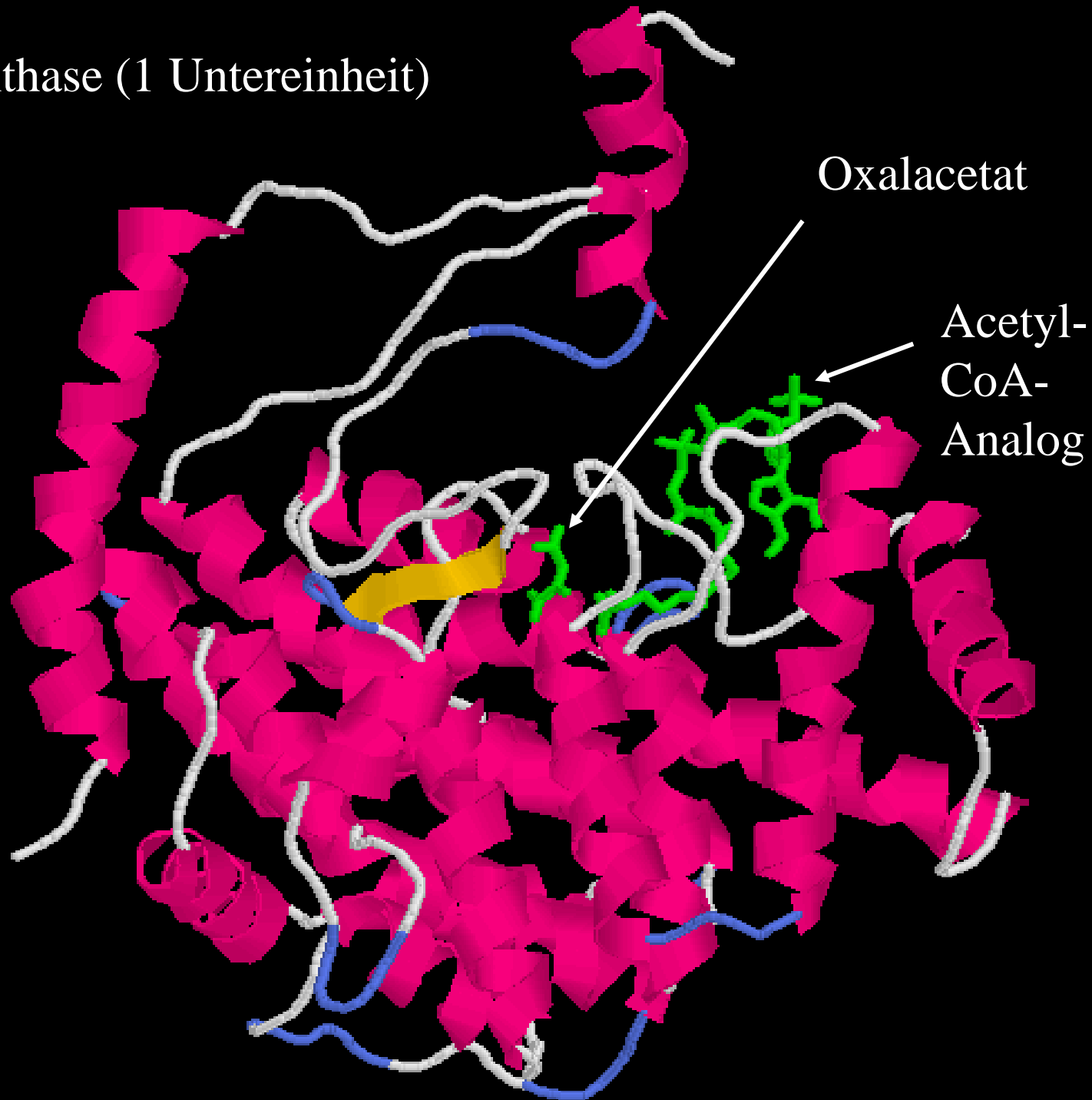
Pro Monomer zwei
Domänen: kleine
(gelb) und große
(grün)

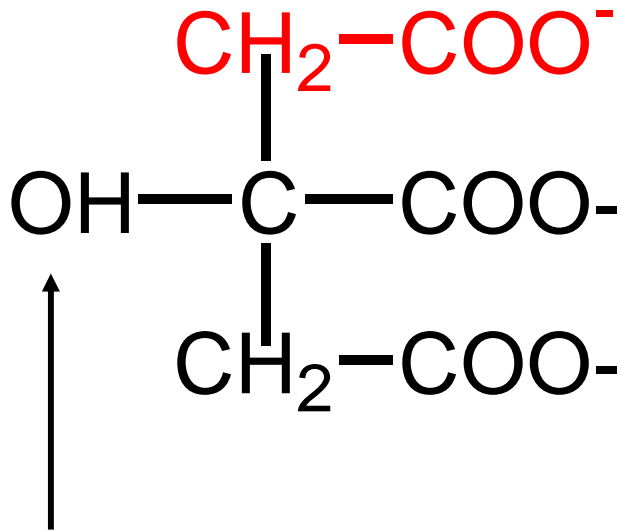
Geschlossene Form
der **Citrat-Synthase**

Citrat-Synthase (1 Untereinheit) geschlossene Konformation



Citrat-Synthase (1 Untereinheit)





Tertiärer Alkohol: kein Kandidat für weitere Oxidation
(nur über C-C-Spaltung)

Strategie: Umwandlung in sekundären Alkohol (Isocitrat) durch das Enzym **Aconitase** und in der Folge Oxidation dieses sekundären Alkohols durch die **Isocitrat-Dehydrogenase** (Spaltung einer C-H-Bindung !)

Citrat-Cyclus 2. Reaktion: Aconitase

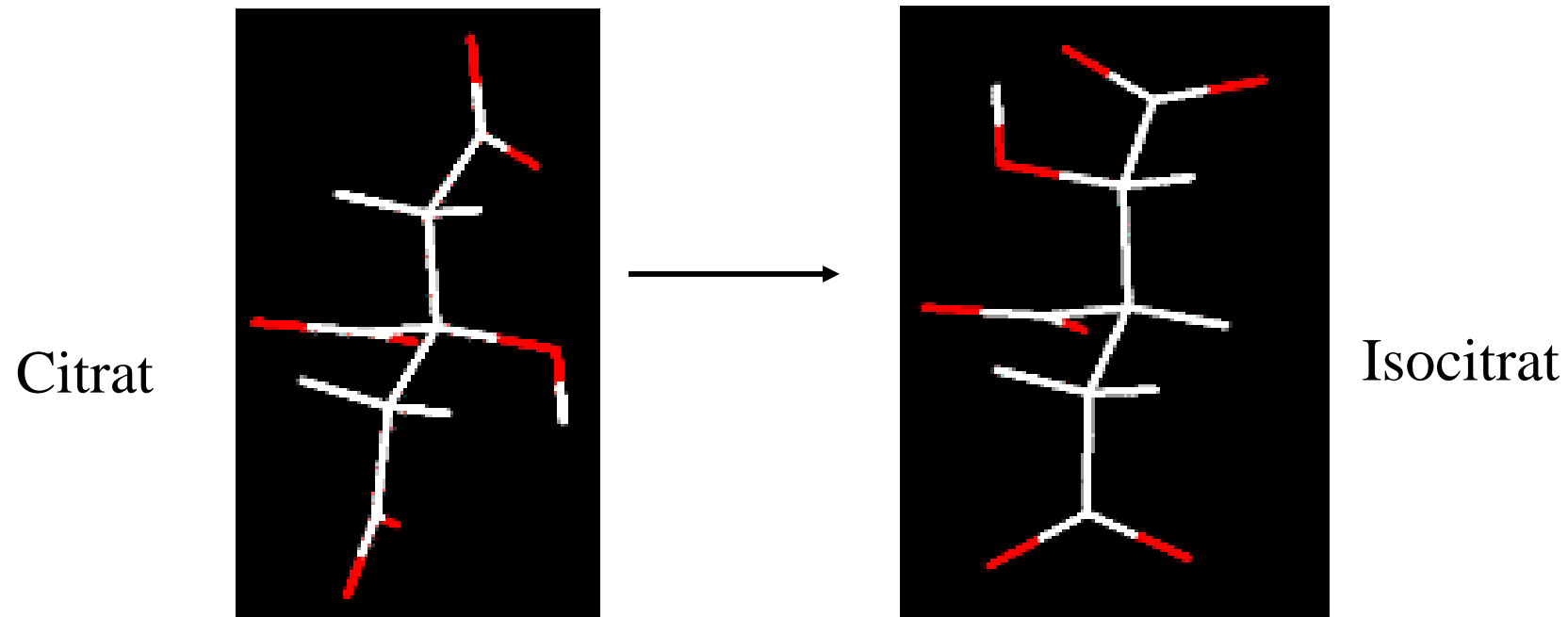
Citrat \rightleftharpoons Isocitrat

Enzym: (C-O) Lyase

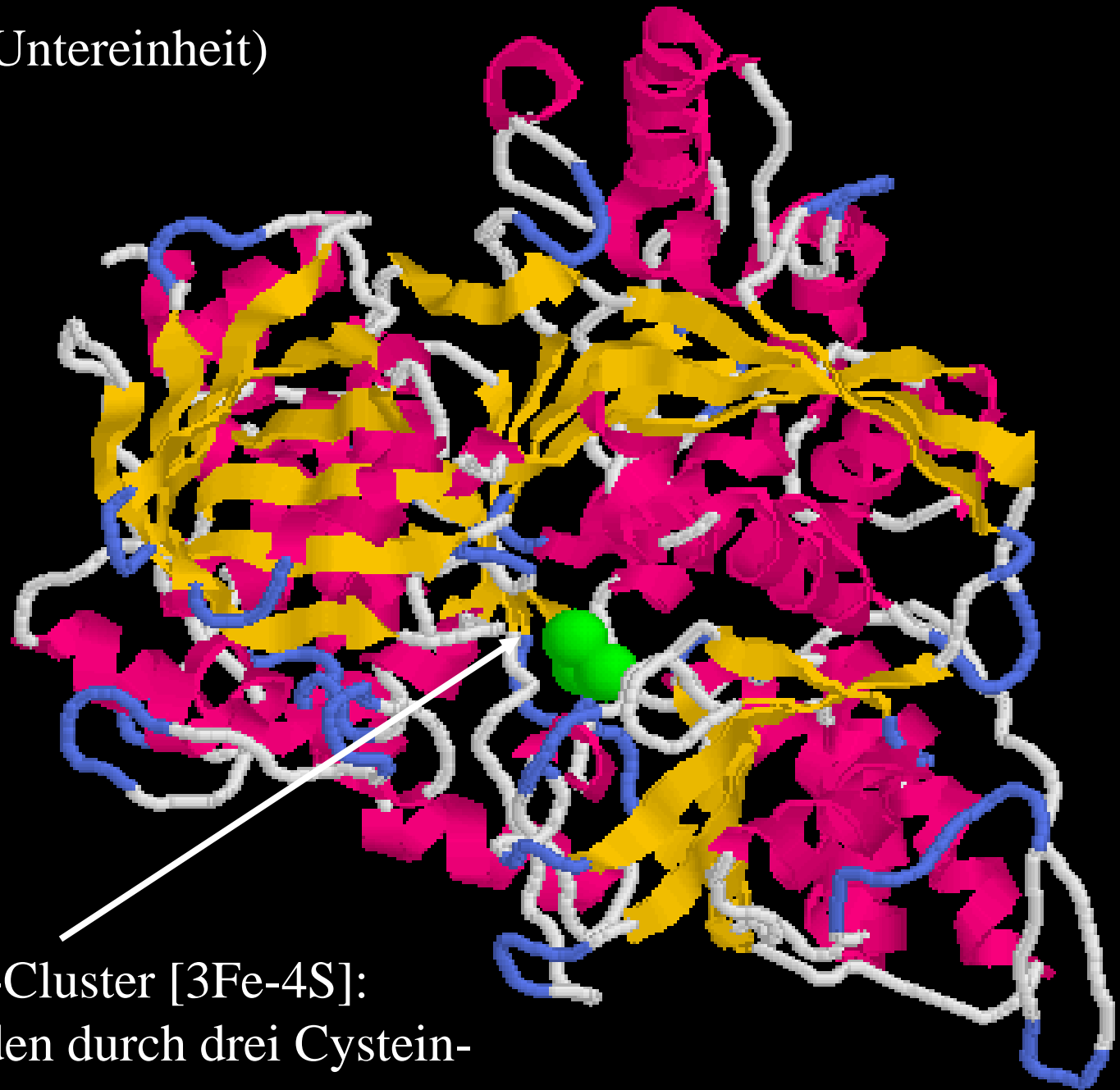
Aconitase (E.C. 4.2.1.3)

Homodimer: 44,5 kDa pro Untereinheit (Schweineherz)

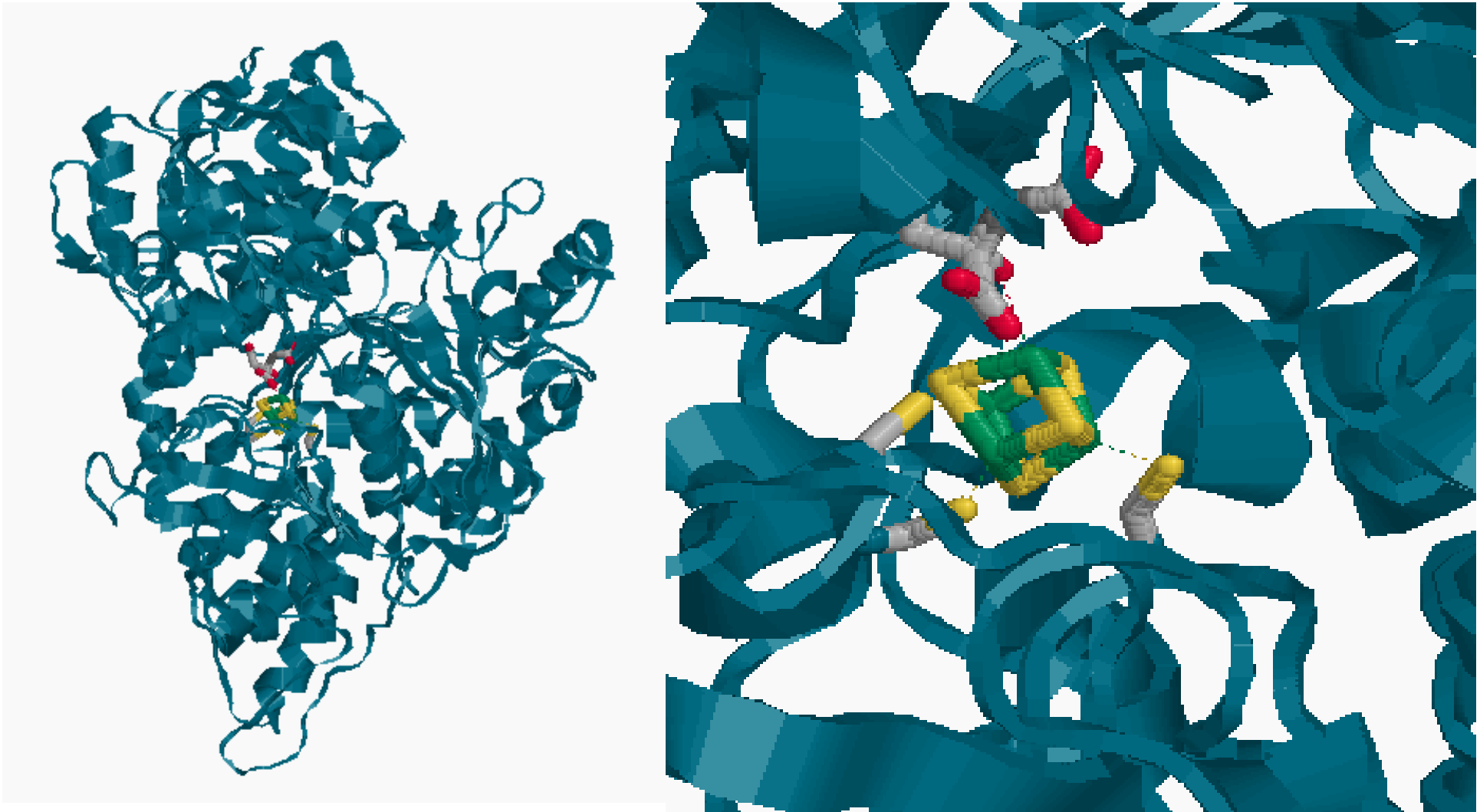
Cofaktor: [3Fe-4S]-Cluster



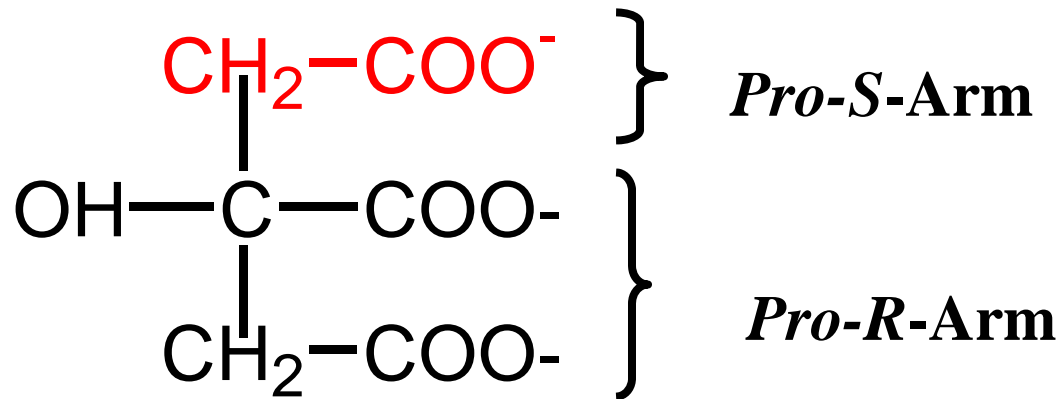
Aconitase (1 Untereinheit)



Eisen-Schwefel-Cluster [3Fe-4S]:
kovalent gebunden durch drei Cystein-
Reste des Enzyms.



Der 4Fe-4S-Cluster (entsteht aus 3Fe-4S, siehe unten) ist Teil des aktiven Zentrums der **Aconitase**. Ein Eisen-Atom des Clusters bindet eine Carboxyl-Gruppe und Hydroxylgruppe des Substrats Citrat.



Citrat: eine Symmetrieebene; optisch nicht aktiv,
jedoch prochiral

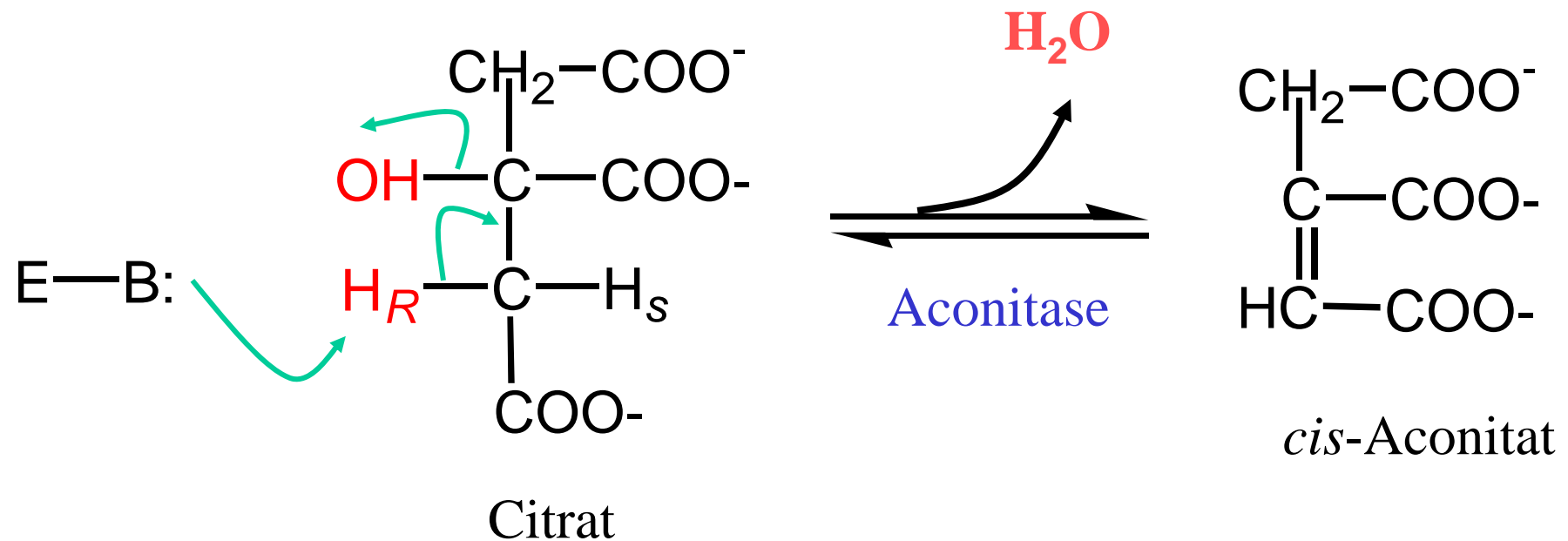
4 chemisch äquivalente H-Atome

Aconitase: kann die *Pro-R*- und *Pro-S*-
Carboxymethylgruppen des Citrats
unterscheiden.

Nur das *Pro-R*-H-Atom wird abstrahiert.

Bildung von *cis*-Aconitat durch Dehydratation:

1. Stereospezifische Abstraktion des Pro-*R*-Protons von Citrat.
2. Bildung einer Doppelbindung (*cis*-Aconitat) erfordert *trans*-Eliminierung der OH-Gruppe vom C(3) katalysiert durch Koordination der OH-Gruppe mit dem Eisen-Schwefelcluster des aktiven Zentrums.

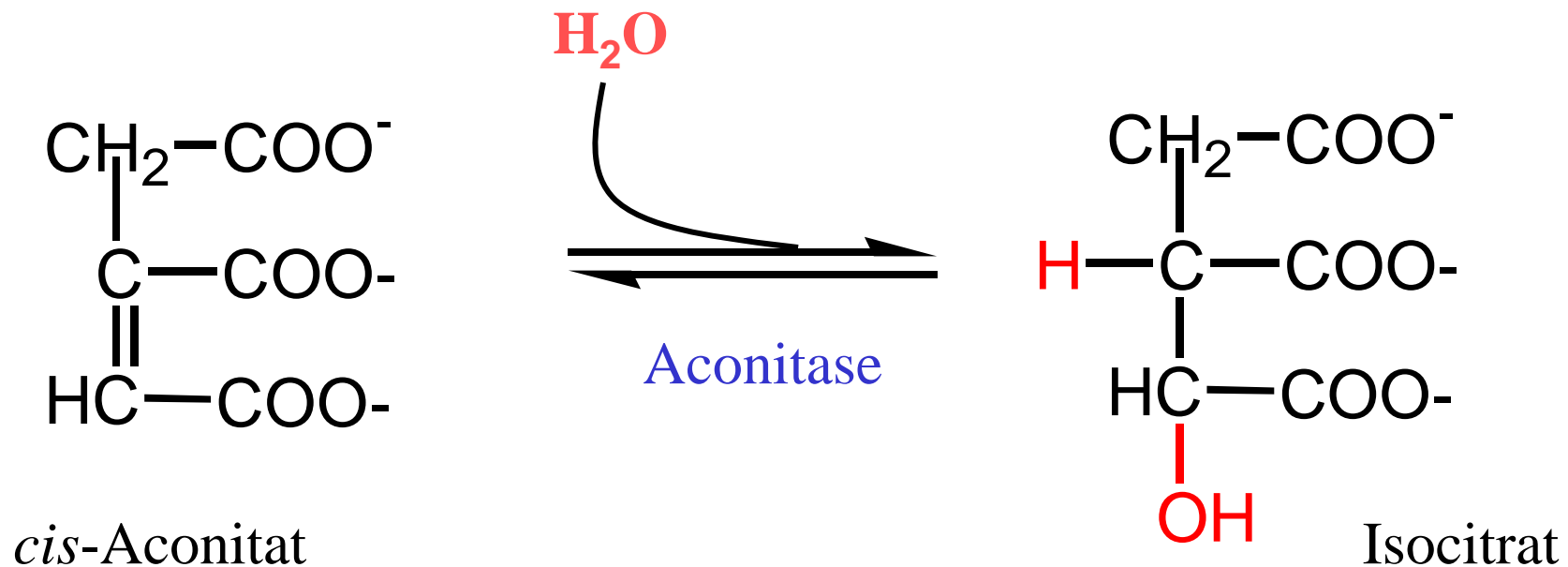


Rehydratation von *cis*-Aconitat unter Bildung von Isocitrat:

Nichtenzymatische Addition an *cis*-Aconitat würde vier Stereoisomere liefern.

Aconitase: Stereospezifische *trans*-Addition von OH⁻ und H⁺ an die Doppelbindung

Produkt: (2*R*,3*S*)-Isocitrat



Gesamtreaktion: $\Delta G' = + 0,8 \text{ kJ/mol}$

Rolle des Eisen-Schwefel-Clusters in **Aconitase**?

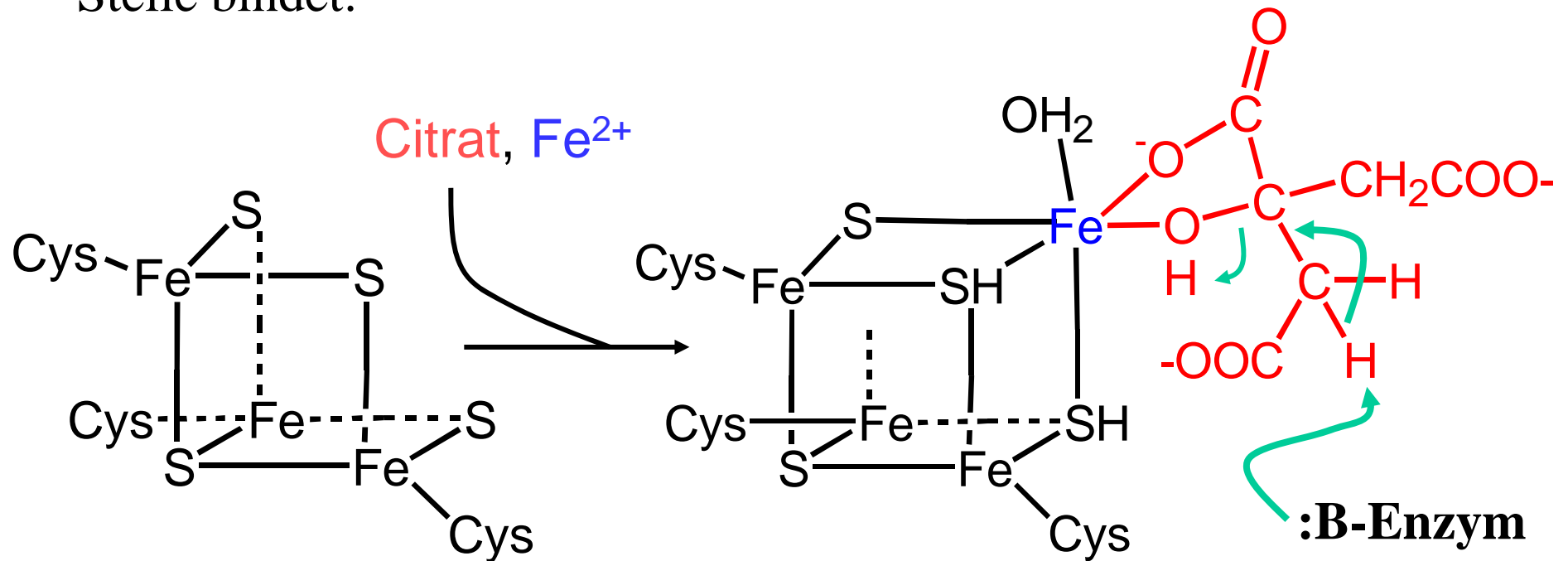
Eisen-Schwefel-Zentren sind oft an Elektronenübertragungsprozessen beteiligt, wo sie als Ein-Elektron-Donoren bzw. –Akzeptoren eingesetzt werden (siehe Einheit 8: Oxidative Phosphorylierung). In Enzymen, wie z.B. der **Aconitase**, können Eisen-Schwefel-Cluster aber auch andere Funktionen ausüben.

Das Hydroxid-Ion ist bei pH 7 eine sehr schlechte Abgangsgruppe, die von allein nicht abgehen kann. Sie muss derivatisiert werden und das Molekül in veränderter Form verlassen.

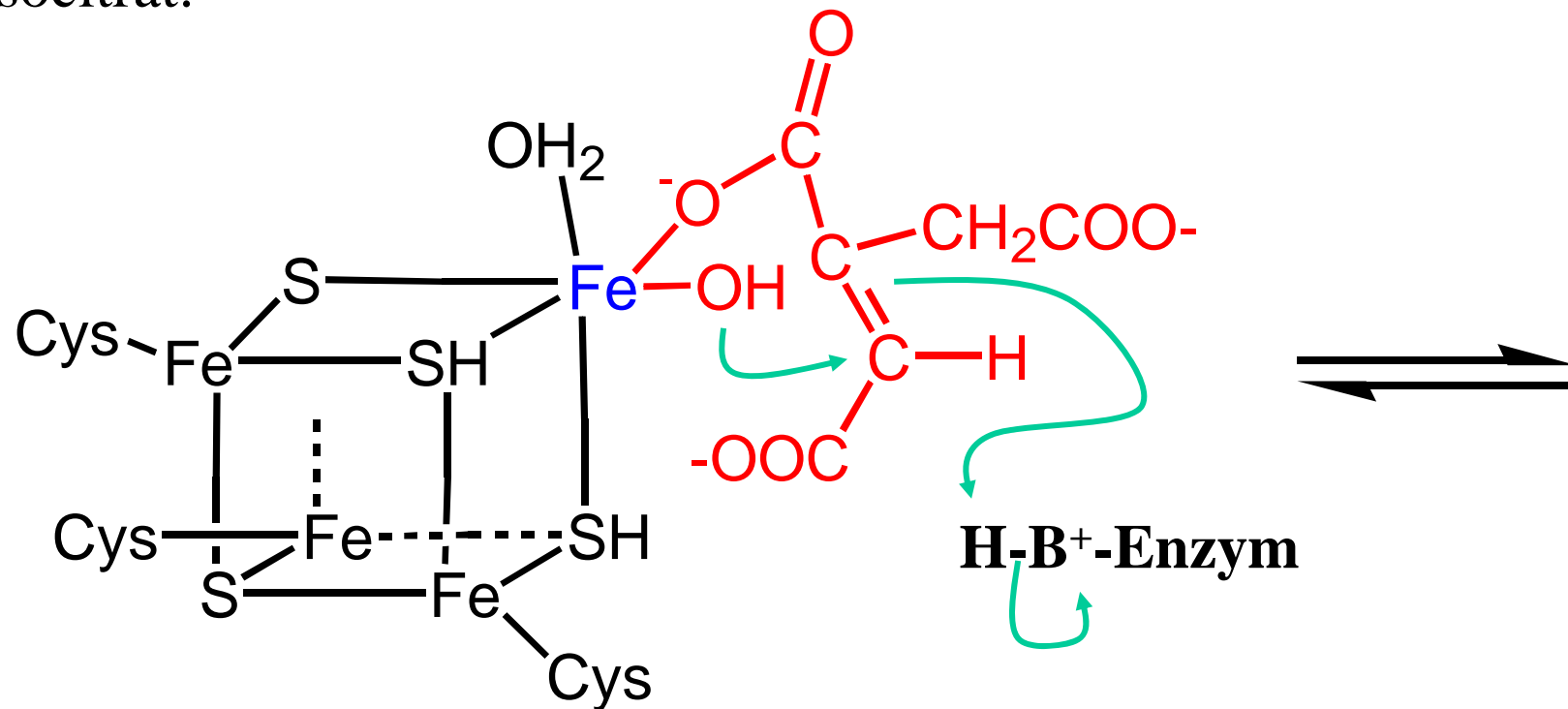
Dehydratisierungen können durch starke Säuren katalysiert werden, die eine Hydroxylgruppe zu einem Oxonium-Ion, $R-OH_2^+$, protonieren. Daraus kann ein Wasser-Molekül freigesetzt werden. Starke Säuren sind jedoch mit zellulären Bedingungen schwer vereinbar.

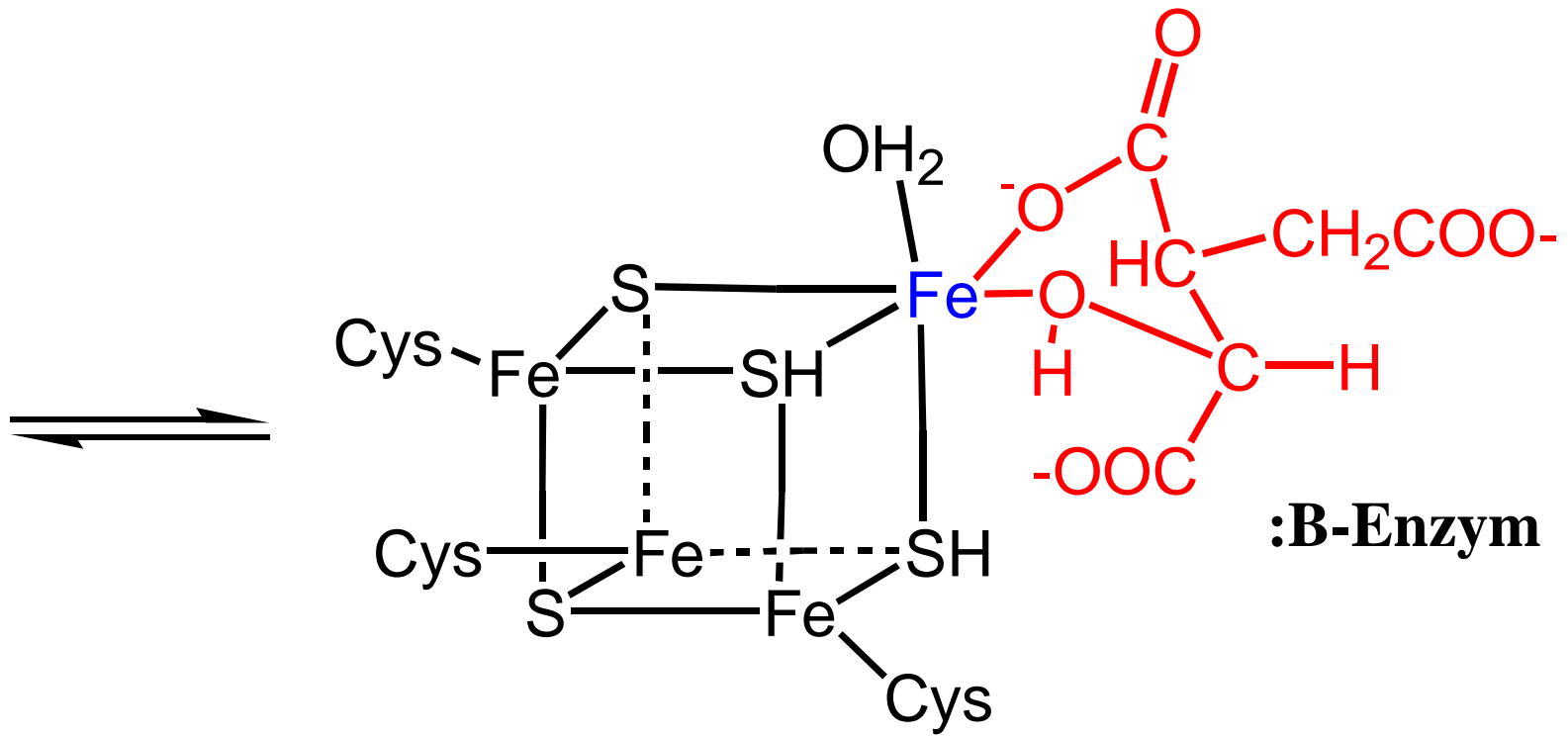
In **Aconitase** wird die Hydroxylgruppe an ein Metall-Ion eines der Eisen-Atome im Eisen-Schwefel-Zentrum koordiniert.

Gereinigte **Aconitase** enthält ein $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentrum, in dem eine der vier Eisenpositionen frei ist. Dem Enzym fehlt ein Cystein-Rest, der normalerweise koordinativ an das vierte Eisen binden würde. Das Enzym wird durch Fe^{2+} aktiviert, das an die freie Stelle bindet:



Die Koordination der abzuspaltenden Hydroxyl-Gruppe zum Fe^{2+} im Eisen-Schwefel-Cluster macht sie zur guten Abgangsgruppe, denn die Metall-Koordination ist jetzt analog einer Protonierung. (Funktion des Metall-Ions als Lewis-Säure = Elektronenmangelverbindung). Im zweiten Schritt bindet die Hydroxyl-Gruppe an das andere Kohlenstoffatom des *cis*-Aconitats, unter Bildung von Isocitrat:



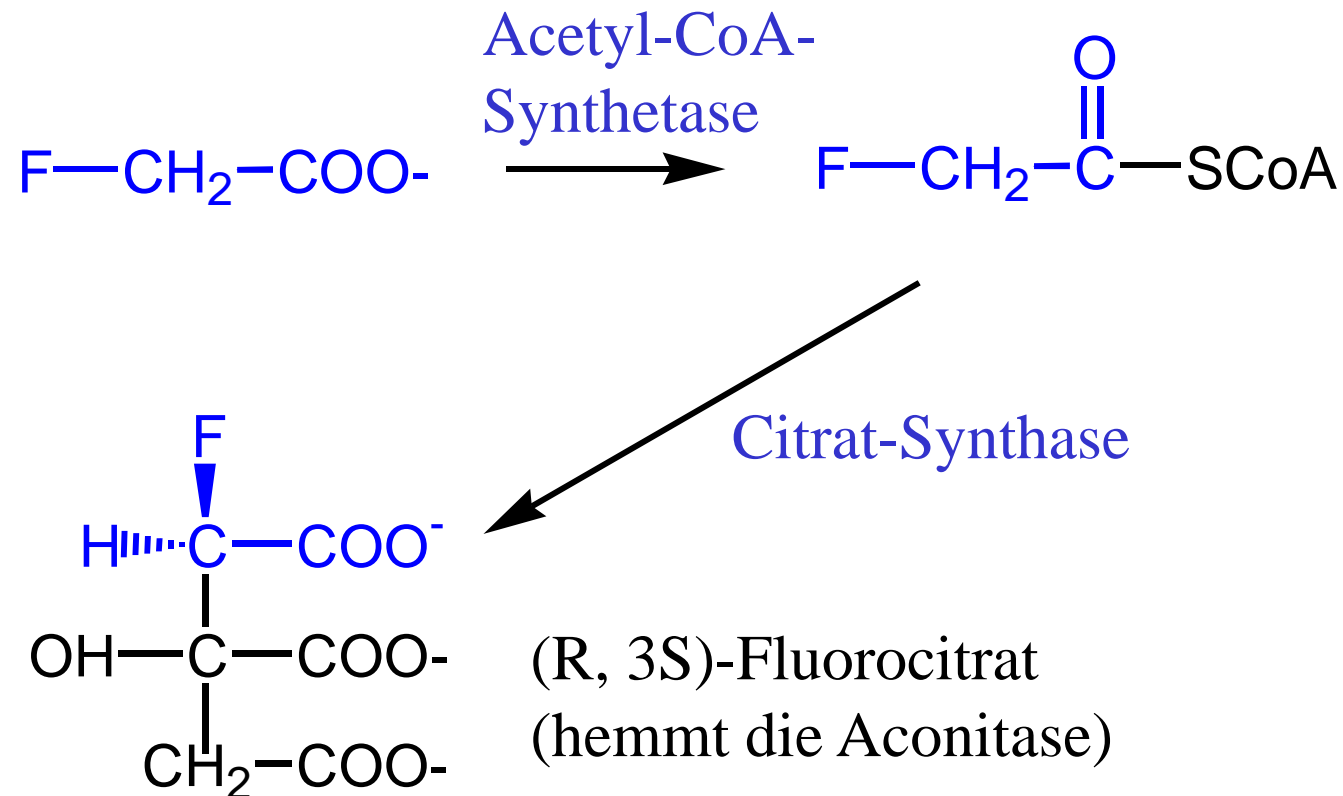


:B-Enzym

Freisetzung des Isocitrats

Hemmung des TCA-Zyklus durch **Fluoroacetat** (Rattengift):
LD₅₀ bei Ratten: 0,2 mg/kg Körpergewicht.

Fluoroacetat kann leicht Membranen permeieren und in die mitochondriale Matrix gelangen. Dort wird es durch die **Acetyl-CoA Synthetase** in Fluoroacetyl-CoA umgewandelt und ferner durch **Citrat-Synthase** in Fluorocitrat.



Citrat-Cyclus

3. Reaktion: Isocitrat-Dehydrogenase



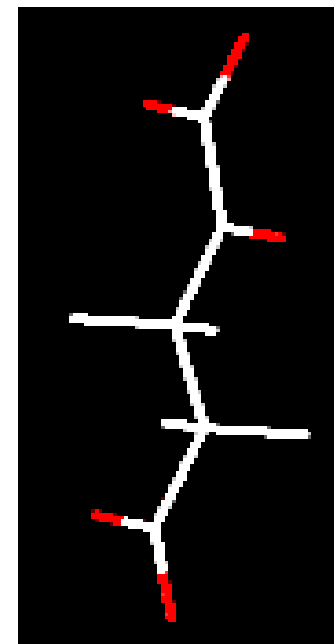
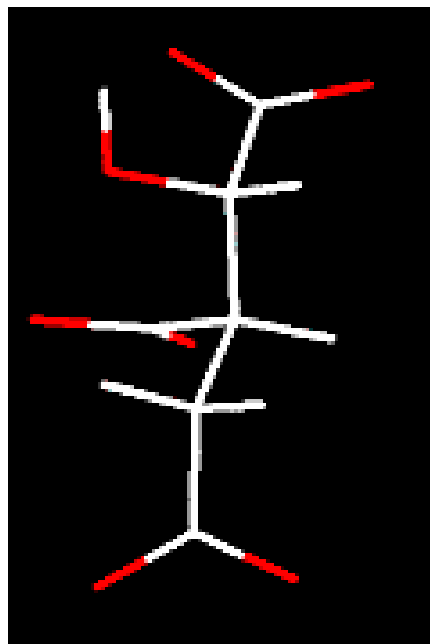
Enzym: Oxidoreductase

Isocitrat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42)

Untereinheitenstruktur: $\alpha_2\beta\gamma$ (Mensch)

Cofaktor: Mg^{2+} oder Mn^{2+} , NAD^+

Isocitrat

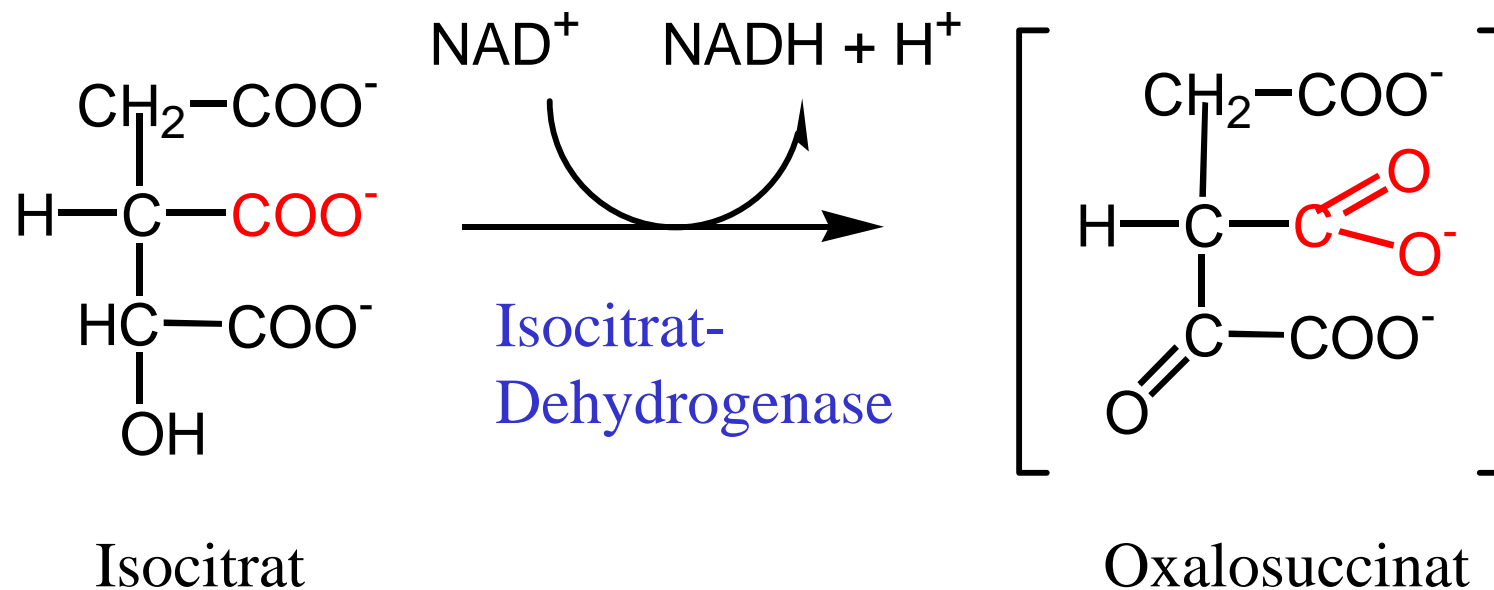


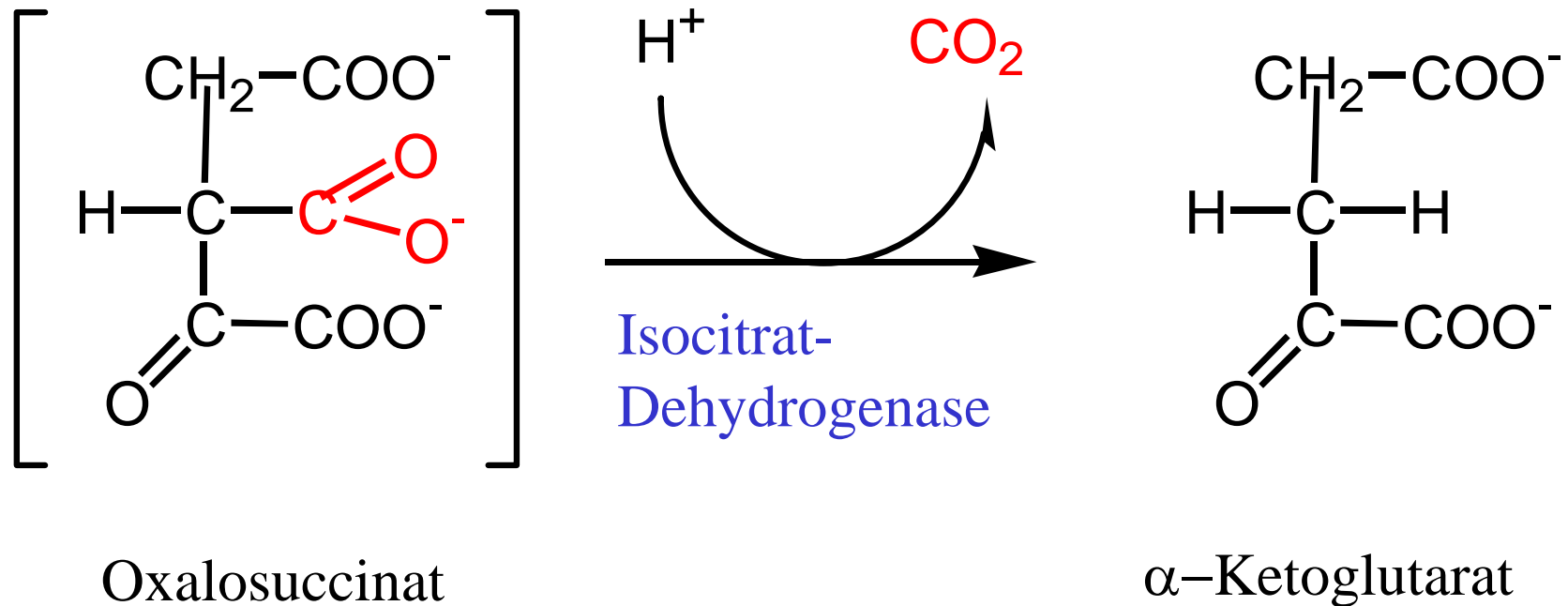
α -Ketoglutarat

Erste oxidative Decarboxylierung im TCA-Cyclus.

Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat unter Abspaltung von CO_2 und Bildung von NADH.

1. Oxidation des sekundären Alkohols (Isocitrats) zu einem Keton (Oxalosuccinat). Gebildete Carbonylgruppe koordiniert an Mg^{2+} oder Mn^{2+} (Polarisierung)
2. Decarboxylierung der zum Keton β -ständigen Carboxygruppe





Erste Bildung von NADH im Citrat-Cyclus, daher erste Verknüpfung mit der Atmungskette. Das Reaktionsprodukt α-Ketoglutarat ist auch ein zentraler Metabolit des Aminosäure- bzw. Stickstoff-Metabolismus.

Reaktion insgesamt exergonisch: $\Delta G^{\ominus'} = -8,4 \text{ kJ/mol}$

Daher **Regulationspunkt**: **ADP** allost. Aktivator (senkt K_M -Wert für Isocitrat um das 10fache);
ATP, NADH allost. Inhibitoren

Citrat-Cyclus 4. Reaktion: α -Ketoglutarat-Dehydrogenase



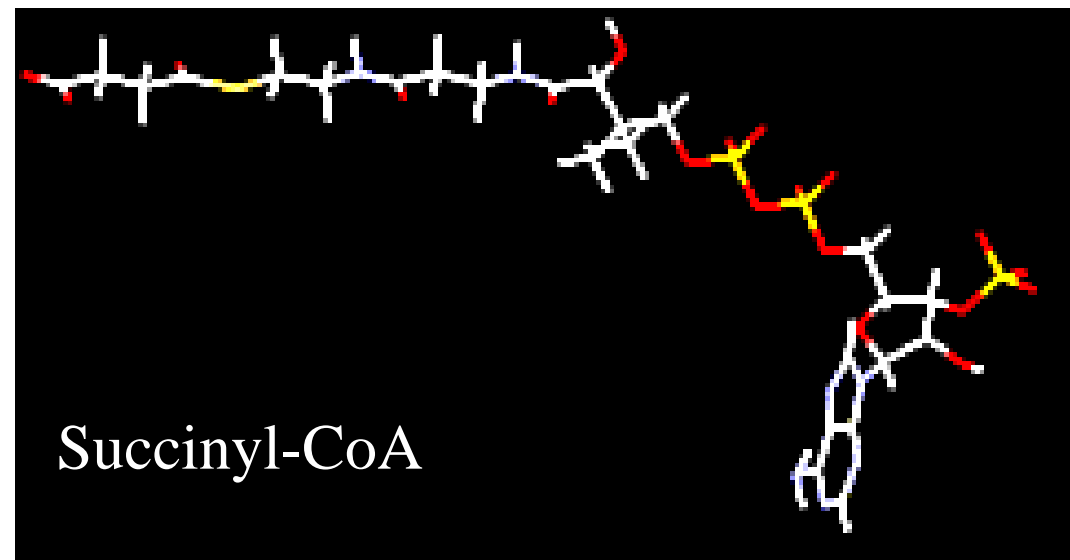
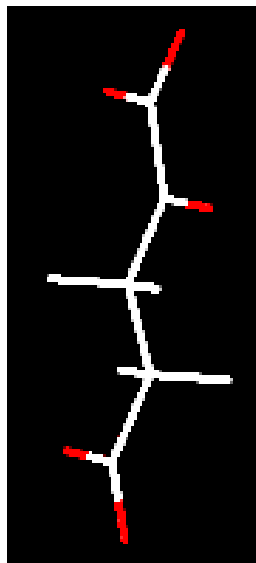
Enzym: Oxidoreductase

α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (E.C. 1.2.4.2)

Untereinheitenstruktur: Multienzymkomplex $(E_1)_6(E_2)_{24}(E_3)_6$

Cofaktoren: TPP, Liponamid, CoA, FAD, NAD^+

α -Keto-
glutarat



Succinyl-CoA

Oxidative Decarboxylierung einer α -Ketocarbonsäure (α -Ketoglutarat). Hohe Analogie in Struktur und Mechanismus zur Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion (siehe Einheit 6).

Ebenso Multienzymkomplex bestehend aus

α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (E_1)

Dihydrolipoyl-Transsuccinylase (E_2)

Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E_3) (ident mit E_3 in Pyruvat-Dehydrogenase)

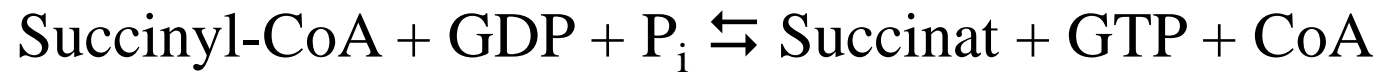
Produkt wieder „energiereicher“ Thioester: Succinyl-CoA.

Reaktion insgesamt exergonisch: ΔG^\ominus etwa -30 kJ/mol

Daher **Regulationspunkt:** **Hemmung durch ATP, Succinyl-CoA.**
 Aktivierung durch ADP und NAD^+ .

Citrat-Cyclus

5. Reaktion: Succinyl-CoA-Synthetase



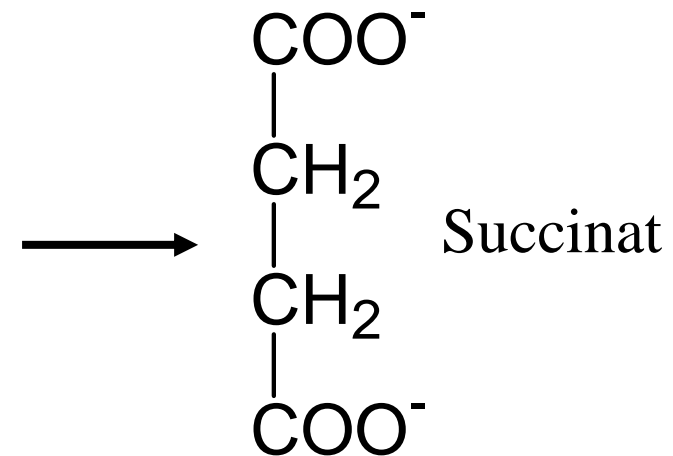
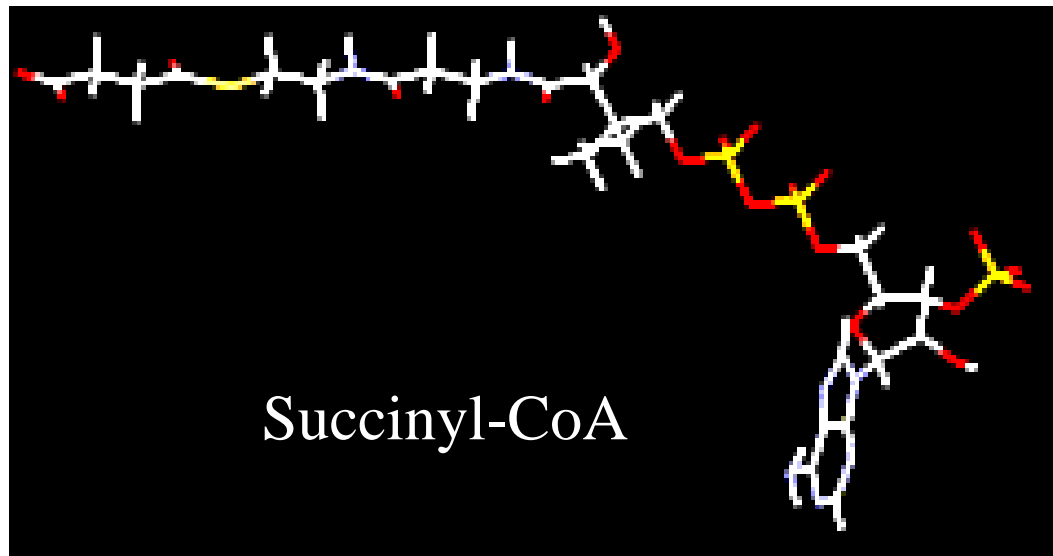
Enzym: Ligase

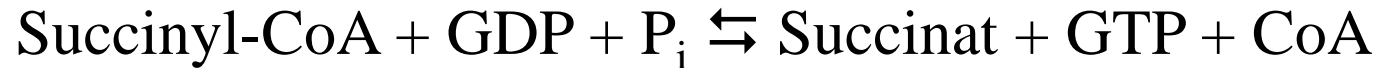
Succinyl-CoA-Synthetase (E.C. 6.2.1.5)
Succinat-Thiokinase

Untereinheitenstruktur: $\alpha\beta$ (34,5; 42,5) Schweineherz

Cofaktoren: GDP

(in Pflanzen und Bakterien: ADP)

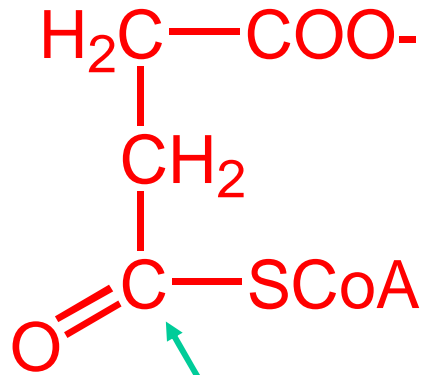




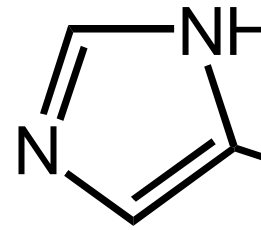
Substratkettenphosphorylierung: Hydrolyse des „energiereichen“ Thioesters (ΔG^{\ominus} = -32,6 kJ/mol) wird mit der Synthese von ATP gekoppelt (ΔG^{\ominus} = 30,5 kJ/mol).

Stufenweiser Reaktionsmechanismus:

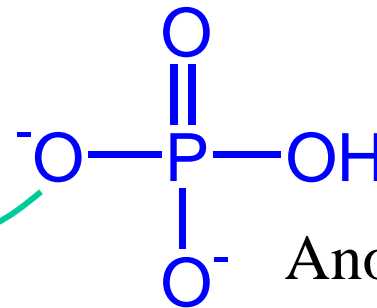
1. Bildung von Succinylphosphat („energiereiches“ gemischtes Anhydrid) und anschließend
2. Bildung eines Phosphoryl-His („energiereiches“ Enzymintermediat). Freisetzung von Succinat.
3. Übertragung der Phosphorylgruppe auf GDP unter Bildung von GTP



Succinyl-
CoA



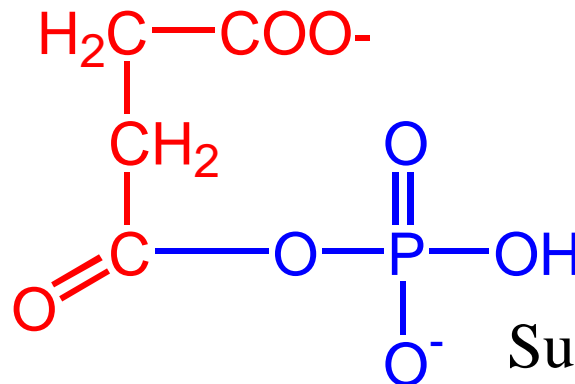
Histidin im
aktiven Zentrum



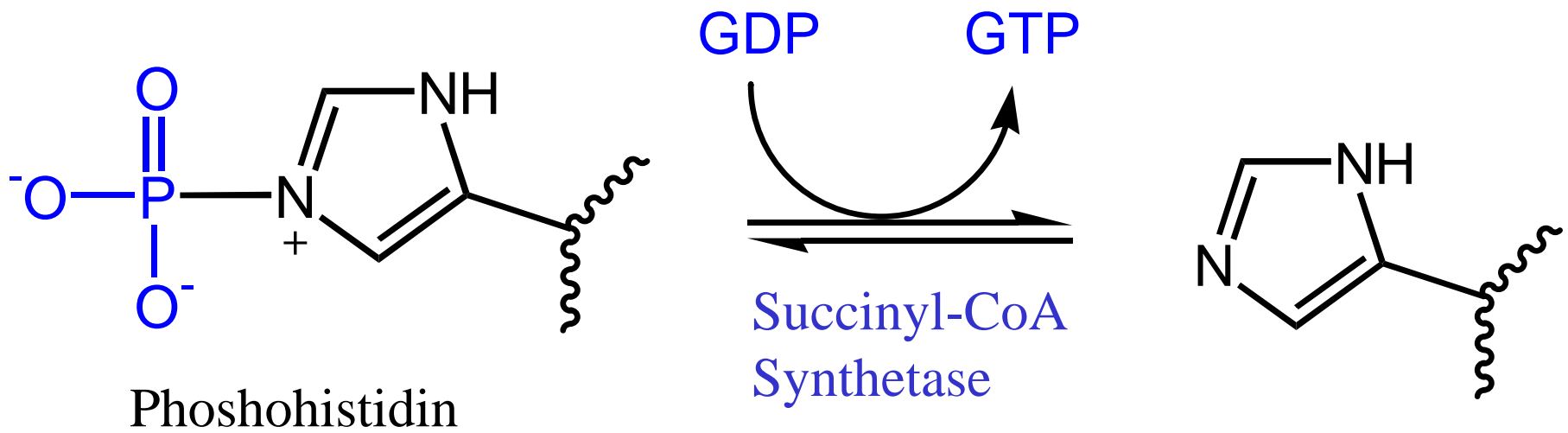
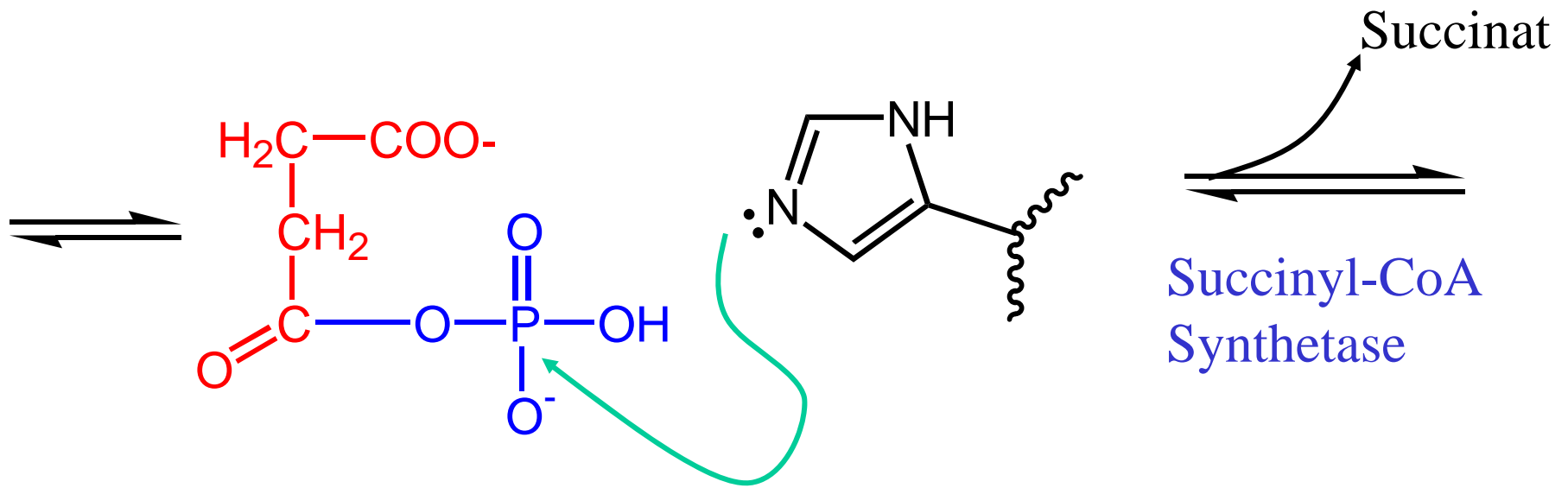
Anorganisches
Phosphat

CoASH

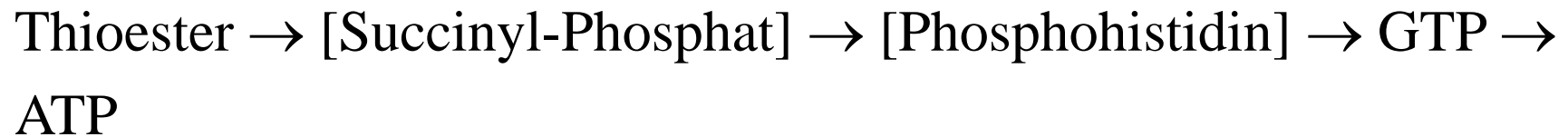
Succinyl-CoA
Synthetase



Succinylphosphat



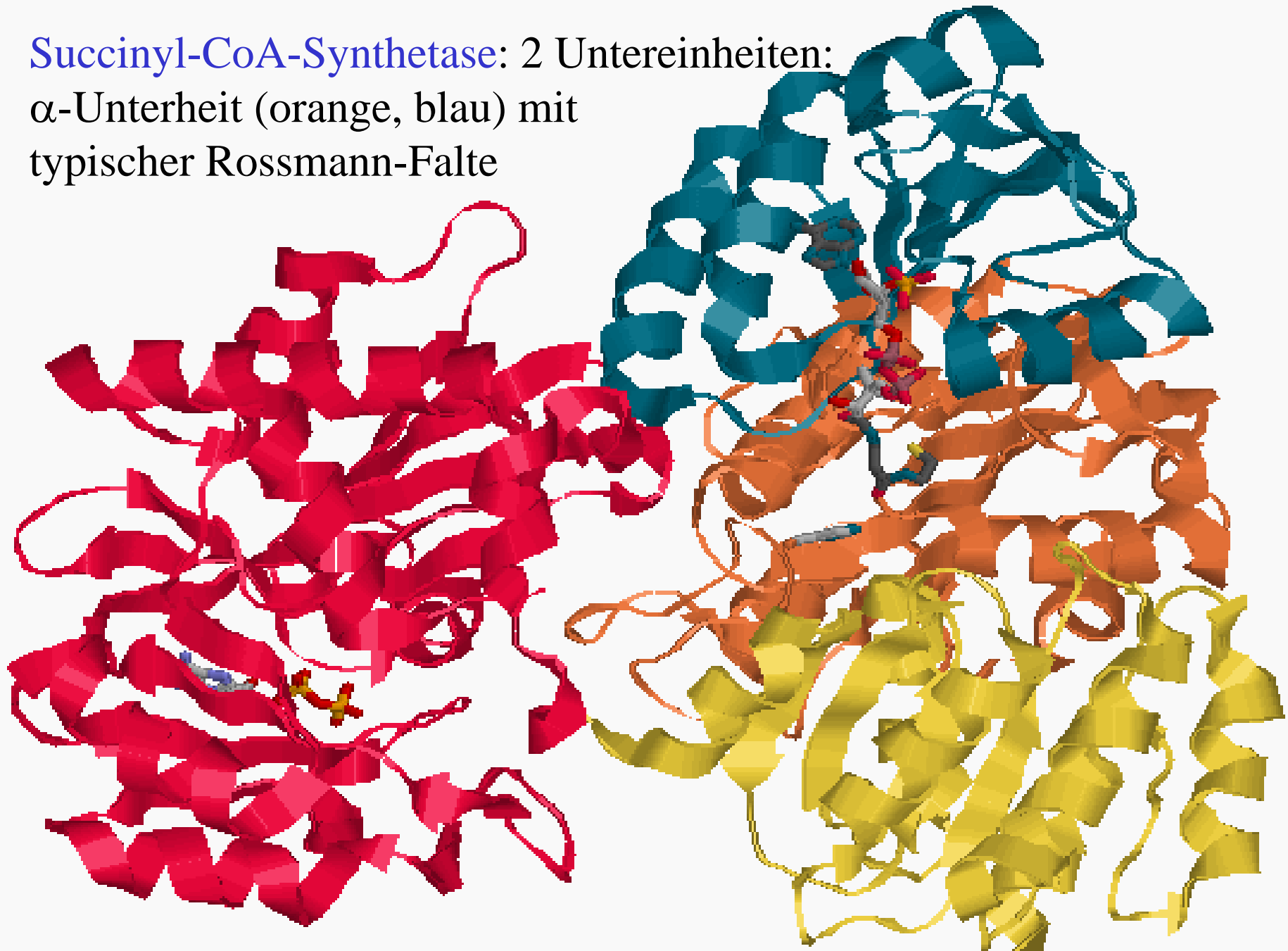
Die durch die **Succinyl-CoA Synthetase** katalysierte Reaktionsfolge “speichert” quasi die Energie des Thioesters:



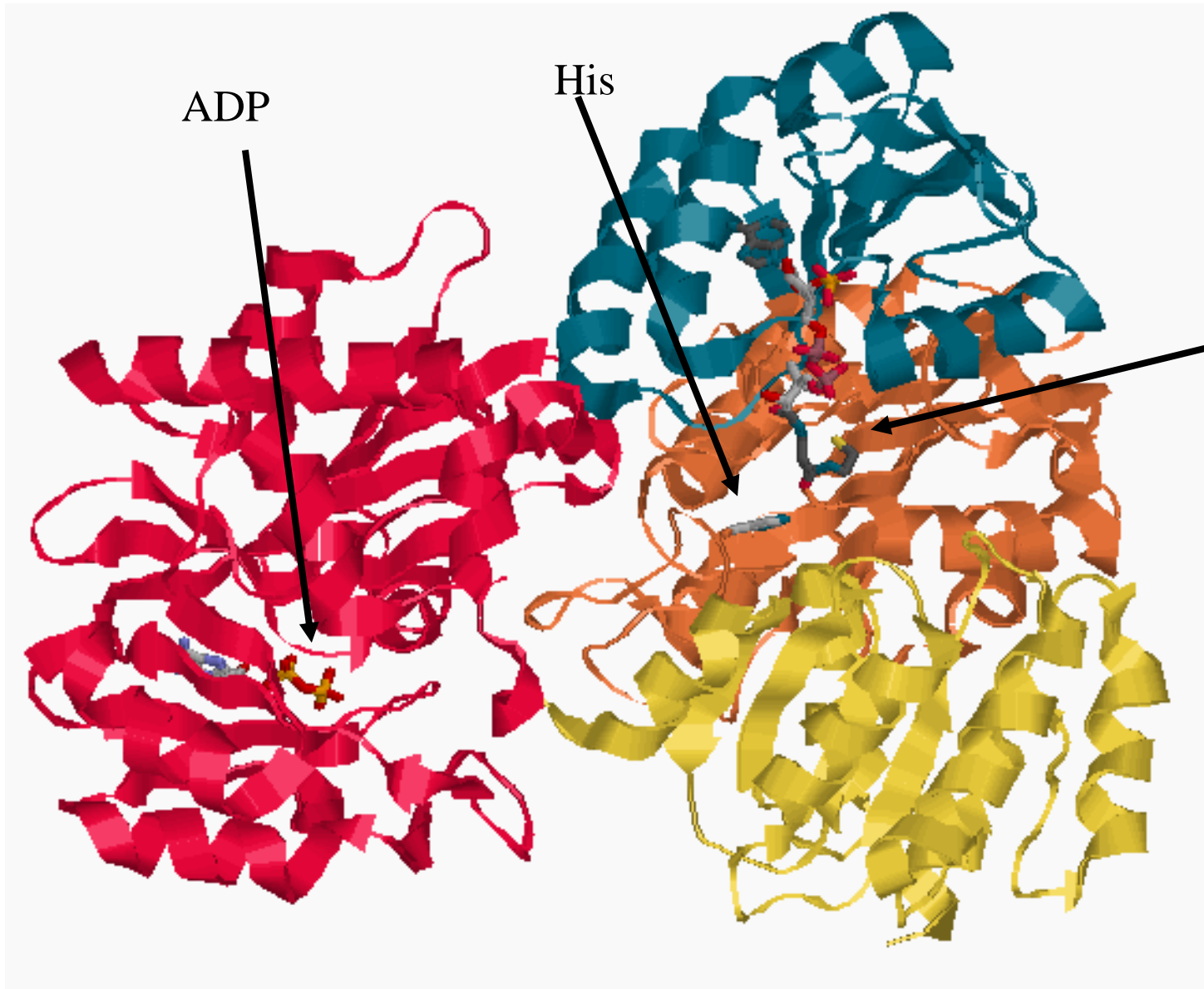
Das in Säugetieren gebildete Guanosintriphosphat, GTP, ist energetisch mit dem ATP gleichwertig und kann durch das ubiquitäre Enzym **Nucleosiddiphosphat-Kinase** in ATP umgewandelt werden:



Succinyl-CoA-Synthetase: 2 Untereinheiten:
 α -Untereinheit (orange, blau) mit
typischer Rossmann-Falte



β -Untereinheit (rot, gelb) bindet ADP (“ATP-grasp domain”)



ADP

His

CoA

Rossmann-Falte:

Bindung der
ADP-Domäne
des Succinyl-
CoA

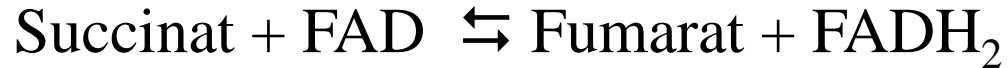
α -Untereinheit:



Rossmann-Falte

Citrat-Cyclus

6. Reaktion: Succinat-Dehydrogenase

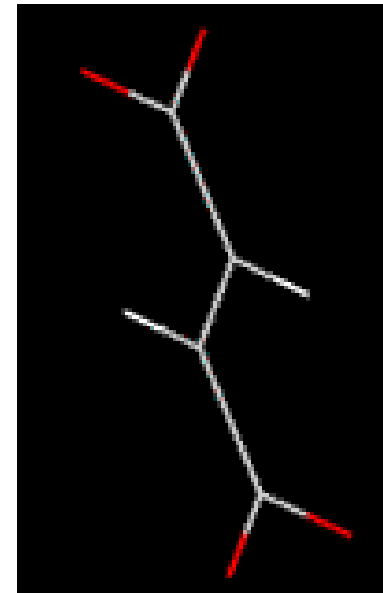
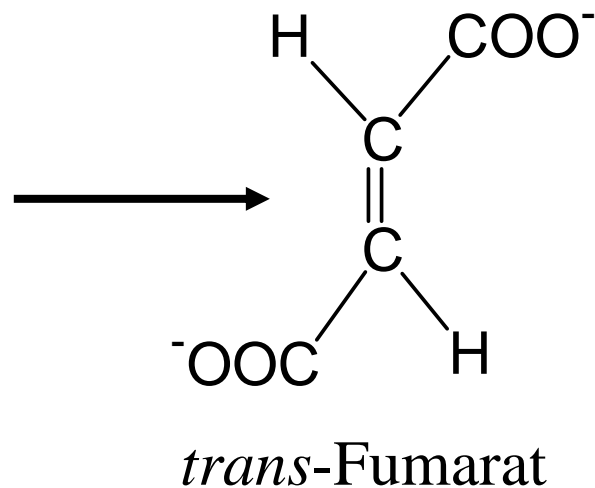
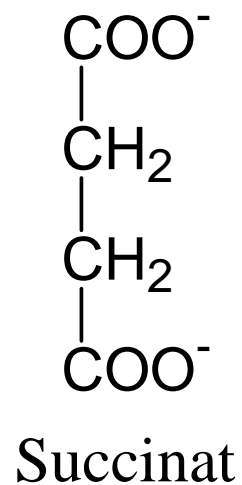


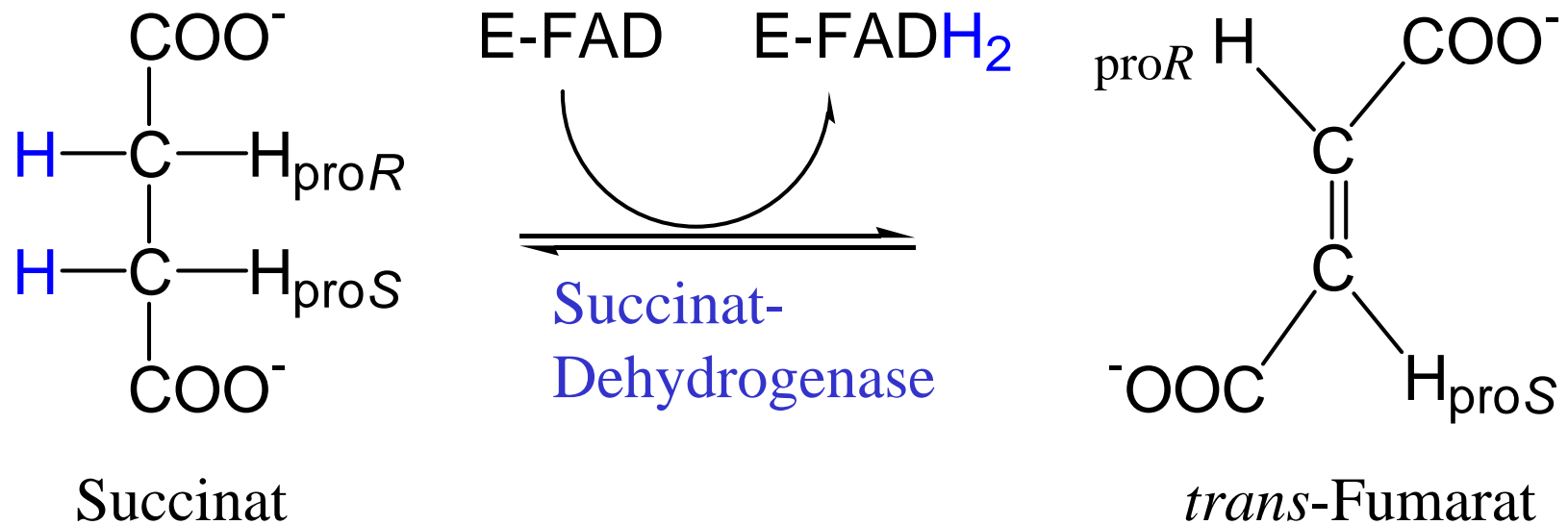
Enzym: Oxidoreductase

Succinat-Dehydrogenase (E.C. 1.3.5.1)

Heterodimer: $\alpha\beta$ (70, 27) Rinderherz

Cofaktoren: FAD (kovalent), Fe-S-Cluster



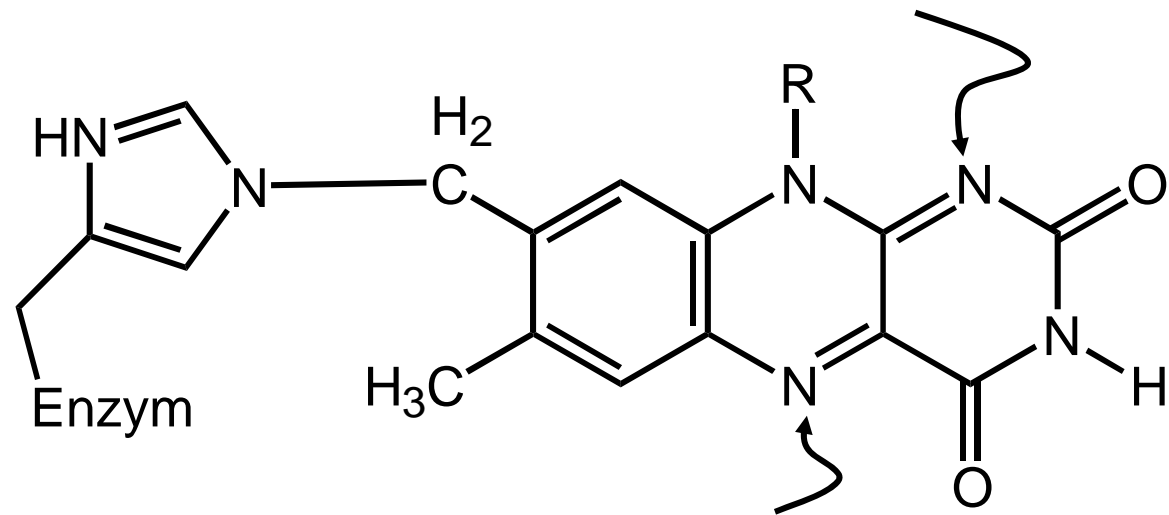


Oxidation von Succinat bedeutet die Abstraktion von Wasserstoffatomen entlang einer C-C-Bindung (**Einführung einer Doppelbindung**). Diese Reaktion ist nicht genug exergonisch um NAD^+ zu reduzieren. Daher fungiert FAD als Akzeptor.

Flavine sind bessere Oxidationsmittel als Nicotinamid-Nucleotide! Einführung einer Doppelbindung ist sehr wichtiger Reaktionstyp bei der Oxidation von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren.

NAD⁺ ist der Redox-Cofaktor für die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden bzw. Ketonen bzw. weiter zu Carbonsäuren, während FAD der Redox-Cofaktor für die Oxidation von Alkanen zu Alkenen ist.

Der Cofaktor FAD ist kovalent an Histidin der Succinat-Dehydrogenase gebunden.



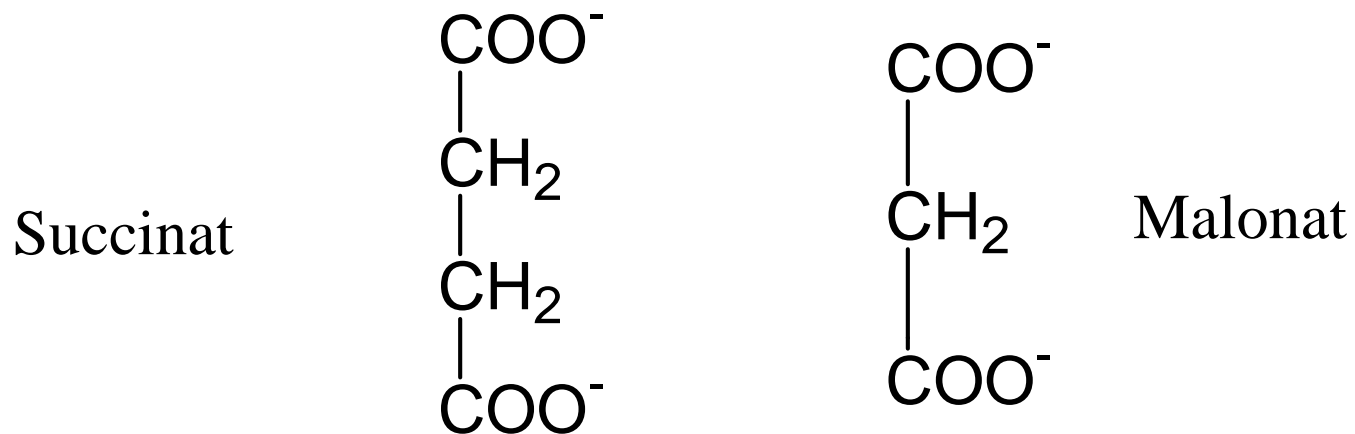
Succinat-Dehydrogenase ist das einzige Enzym des Citrat-Cyclus, das Membran-gebunden ist. Es ist Teil des sog. Komplex II (Succinat-Coenzym Q-Reduktase) der Atmungskette (siehe Einheit 8).

Daneben enthält Succinat-Dehydrogenase drei verschiedene Eisen-Schwefel-Cluster (siehe Einheit 8).

Elektronenfluss:

Succinat \rightarrow FAD \rightarrow FADH₂ \rightarrow Eisen-Schwefel-Cluster \rightarrow
Ubichinon (UQ) \rightarrow Ubichinol (UQH₂) \rightarrow \rightarrow \rightarrow O₂

Stark gehemmt wird **Succinat-Dehydrogenase** von Malonat, einem Strukturanalogen des Succinats (klassisches Beispiel für kompetitiven Hemmstoff)



Citrat-Cyclus

7. Reaktion: Fumarase

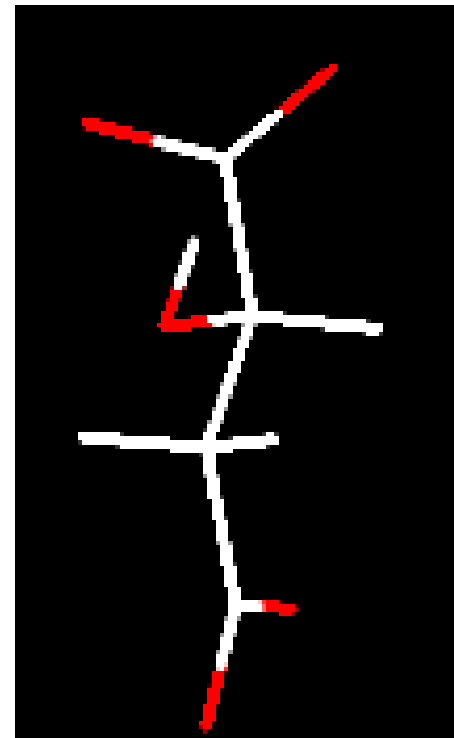
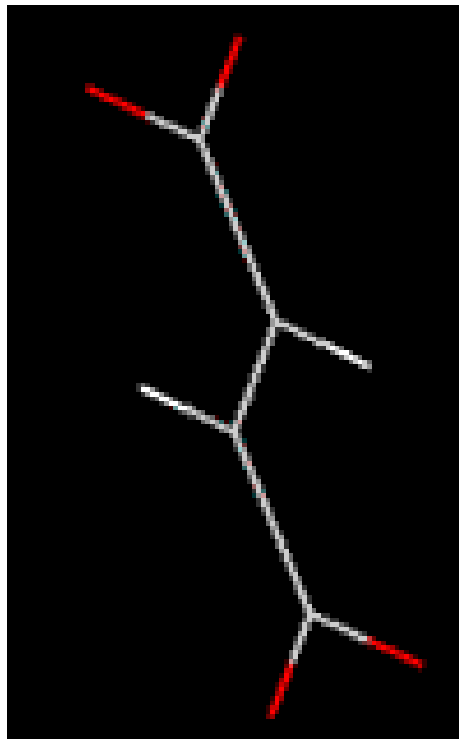


Enzym: Lyase

Fumarase (E.C. 4.2.1.2)

Homotetramer: α_4 (48,5) Schweineherz

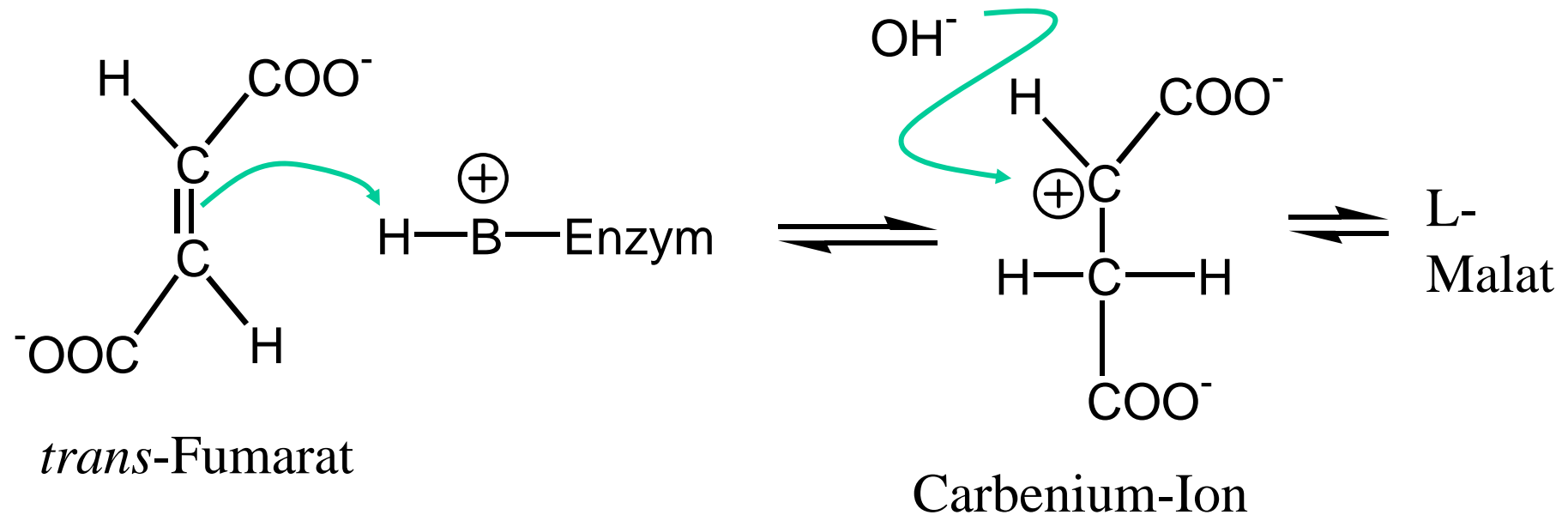
Fumarat

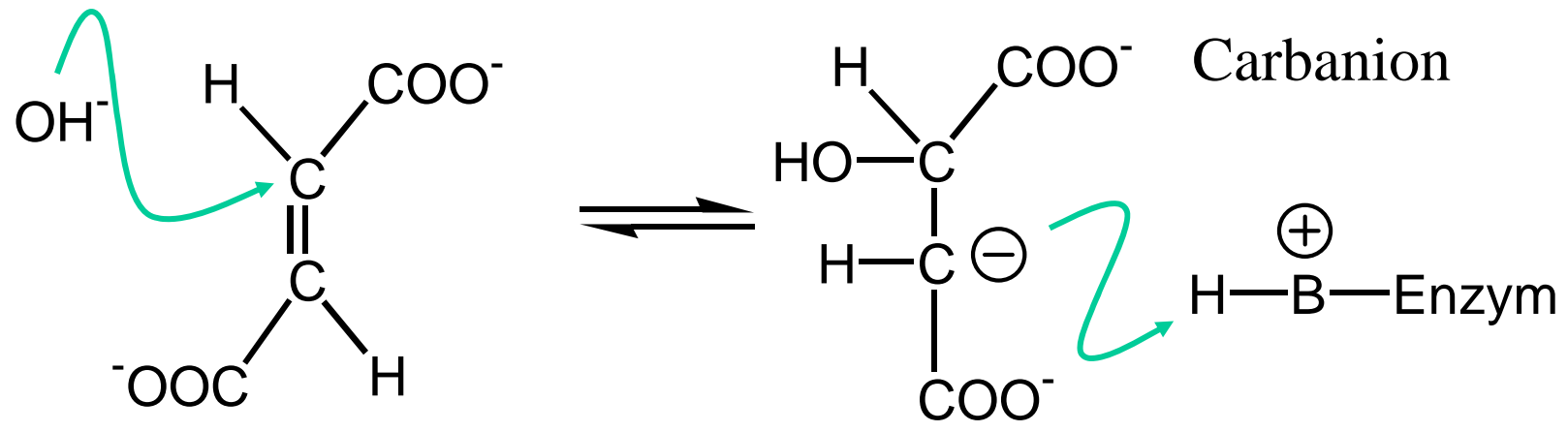


Malat

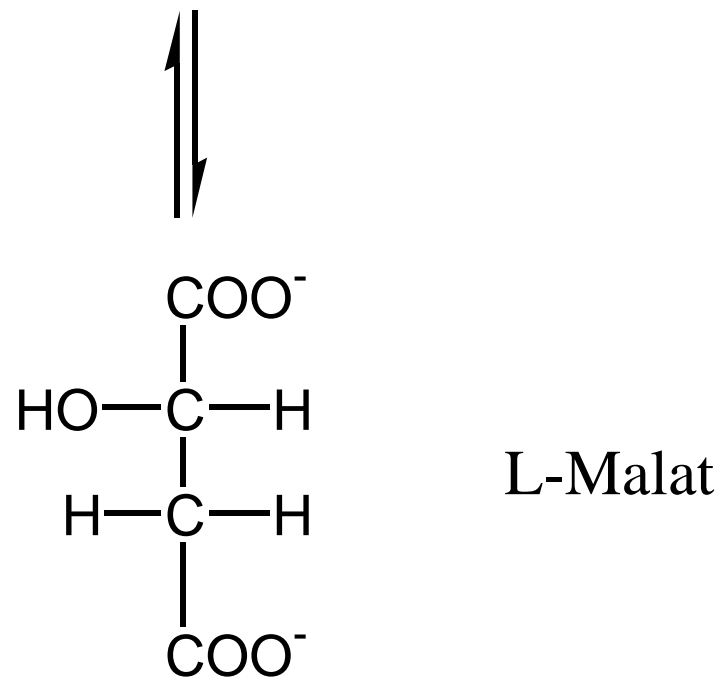
Fumarat wird durch stereospezifische Wasseranlagerung (*trans*-Addition) an die Doppelbindung in L-Malat umgewandelt. Eine ähnliche Reaktion wird durch **Aconitase** katalysiert (Anlagerung von Wasser an *cis*-Aconitat).

Der exakte Mechanismus der **Fumarase**-Reaktion ist noch unklar. Entweder erfolgt er durch Protonierung der Doppelbindung unter Bildung eines Carbenium-Ions oder durch Anlagerung von OH⁻ unter Bildung eines Carbanions.





trans-Fumarat



Citrat-Cyclus

8. Reaktion: Malat-Dehydrogenase



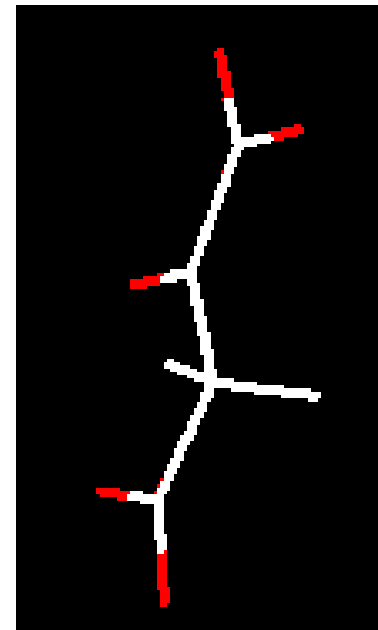
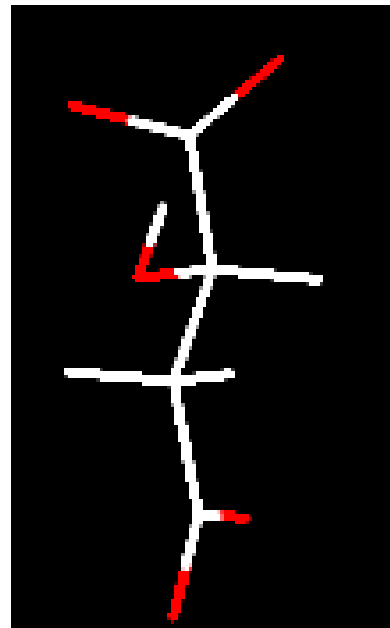
Enzym: Oxidoreductase

Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)

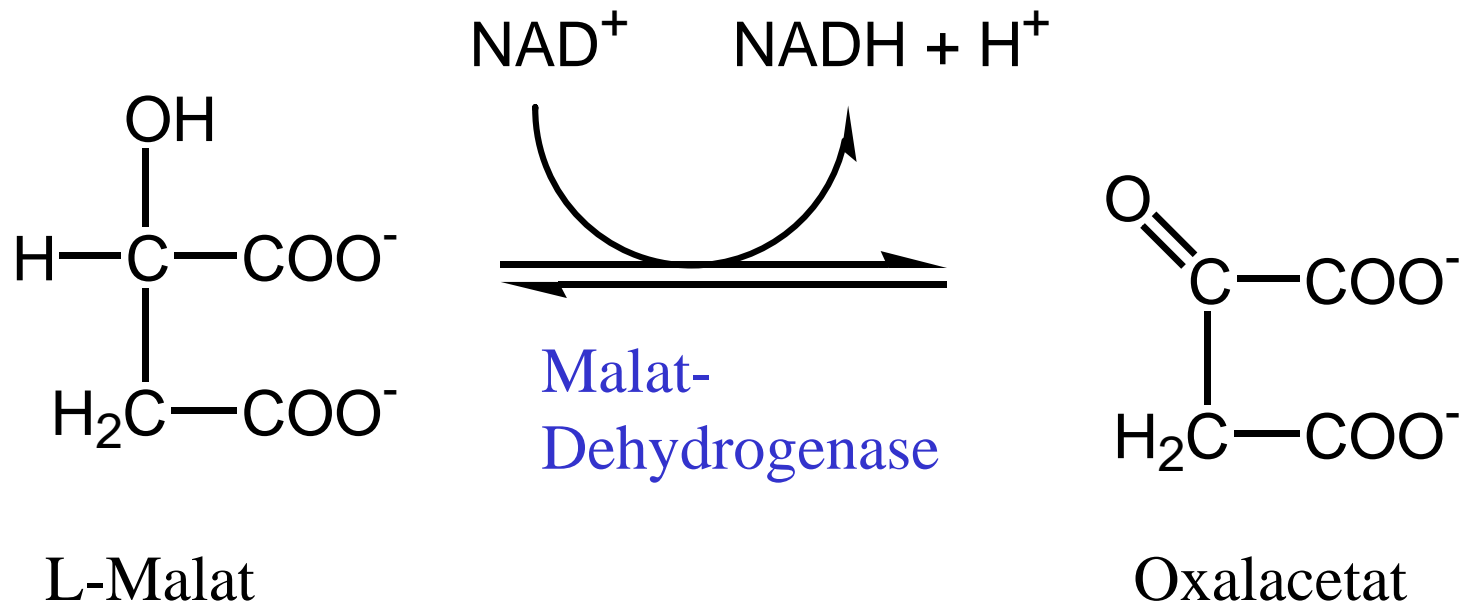
Homodimer: α_2 (35 kDa) (Schweineherz)

Cofaktoren: NAD^+

Malat



Oxalacetat



Die Reaktion ist endergonisch: $\Delta G^{\ominus\prime} = + 30 \text{ kJ/mol}$

Als Konsequenz ist die Konzentration von Oxalacetat in der mitochondrialen Matrix extrem gering. Die Reaktion wird jedoch durch die anschließende **Citrat-Synthase**-Reaktion vorwärts getrieben (Beispiel für gekoppelte Reaktionen, siehe auch Einheit 3).

Beispiel: Eine typische mitochondriale Malat-Konzentration ist 0,22 mmol/L. Angenommen, das $[NAD^+]/[NADH]$ Verhältnis in Mitochondrien in 20 und die *Malat-Dehydrogenase* ($\Delta G^{\circ\prime} = 30$ kJ/mol) arbeitet am chem. Gleichgewicht ($\Delta G' = 0$), wie hoch ist dann die intramitochondriale Konzentration an Oxalacetat bei 25°C?

Malat-Dehydrogenase-Reaktion:



$$\Delta G^{\circ\prime} = 30 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT \ln K_{\text{eq}} = -(8,314 \text{ J/mol.K})(298) \times \ln \left\{ \frac{(1 \cdot Y)}{[(20)(2,2 \times 10^{-4})]} \right\}$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = (-30000 \text{ J/mol}) / (2478 \text{ J/mol}) = \ln(y / 4,4 \times 10^{-3})$$

$$y = (5,6 \times 10^{-6})(4,4 \times 10^{-3}) = [\text{Oxalacetat}] = \mathbf{0,024 \mu\text{M}}$$

Die so ungünstige Freie Enthalpie für die Umwandlung von Malat in Oxalacetat ist möglicherweise von großer Bedeutung für **fakultative Aerobier**. In fakultativen Aerobiern kann der Krebs-Cyclus in Abwesenheit von Sauerstoff nicht normal arbeiten (NADH und FADH₂ können in der Atmungskette nicht verbrannt werden). Trotzdem brauchen diese Organismen auch bei Sauerstoffmangel Zwischenprodukte für ihre Biosynthesen, die normalerweise vom Citrat-Cyclus bereitgestellt werden (siehe Kapitel amphibole Natur des Citrat-Cyclus). Dies wird ermöglicht, indem der erste Teil des Citrat-Cyclus bis zum α -Ketoglutarat oder Succinyl-CoA in Vorwärtsrichtung abläuft, während der letzte Teil, vom Succinyl-CoA bis zum Oxalat, in umgekehrter Richtung abläuft. So wird es diesen Organismen möglich, die nötigen Substrate für Synthesen zu liefern.

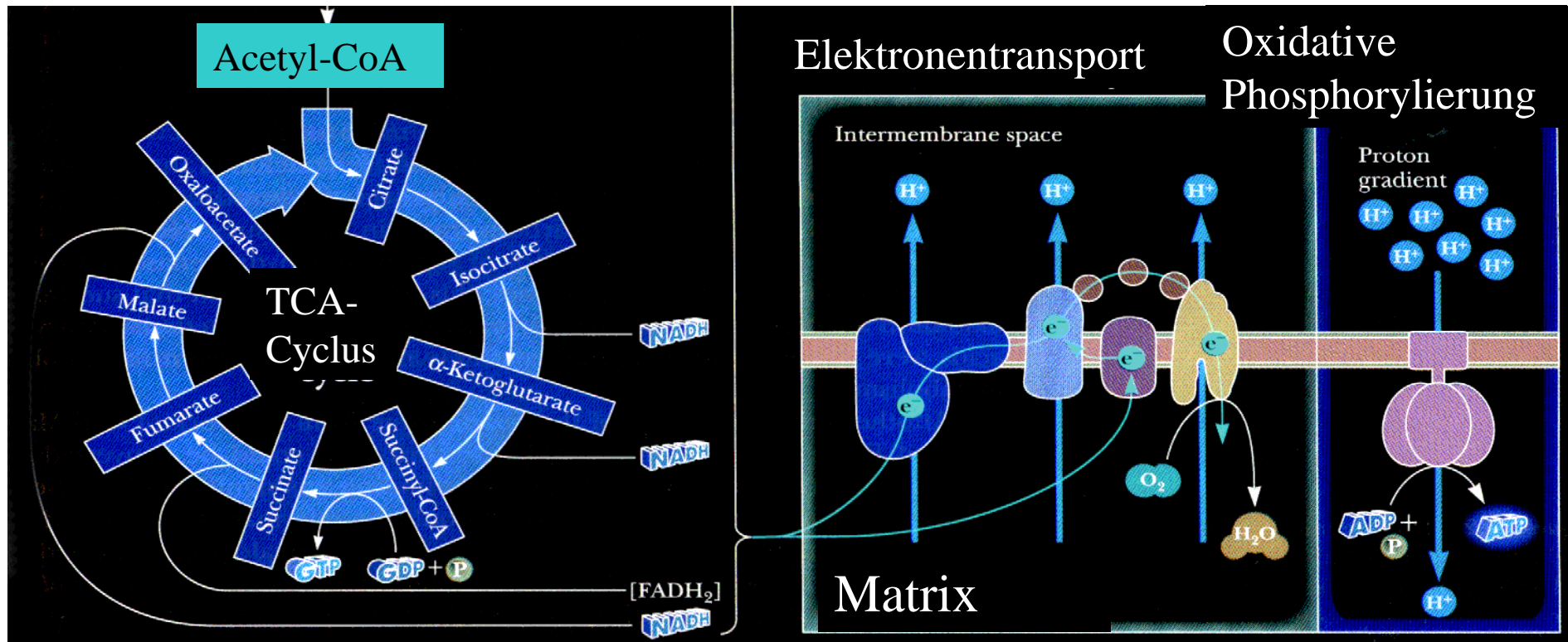
Bedeutung des Citronensäure-Cyclus für die ATP-Produktion:

Bilanz:

1. Pro Acetylgruppe entstehen formal 2 Moleküle CO₂
2. 4 Redox-Reaktionen: Es entstehen 4 Reduktionsäquivalente (3 NADH und 1 FADH₂), die letztendlich in der Atmungskette oxidiert werden (Reduktion des Sauerstoffmoleküls zu Wasser); siehe Einheit 8
3. Im Citrat-Cyclus entsteht eine energiereiche Verbindung: GTP oder ATP (abhängig vom Organismus)



Nettobilanz: $\Delta G^{\ominus \prime} = -40 \text{ kJ/mol}$



Nettoreaktion:

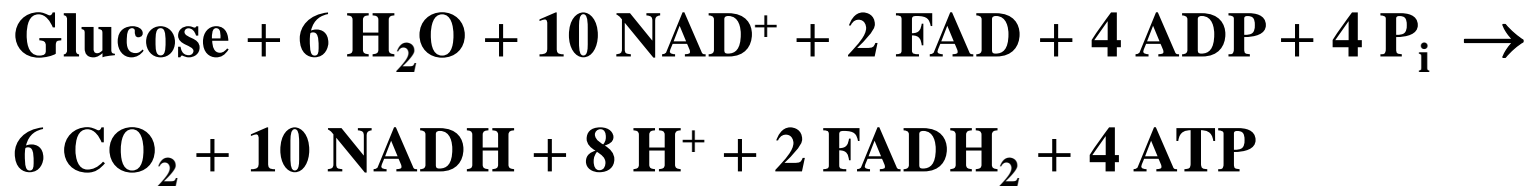


Die gebildeten Reduktionsäquivalente werden anschließend in der Atmungskette mittels molekularem Sauerstoff reoxidiert (Einheit 8)..

Zwischenbilanz Glycolyse und Citronensäure-Cyclus

Glycolyse: Pro Glucose entstehen **2 Pyruvat bzw. 2 Acetyl-CoA**

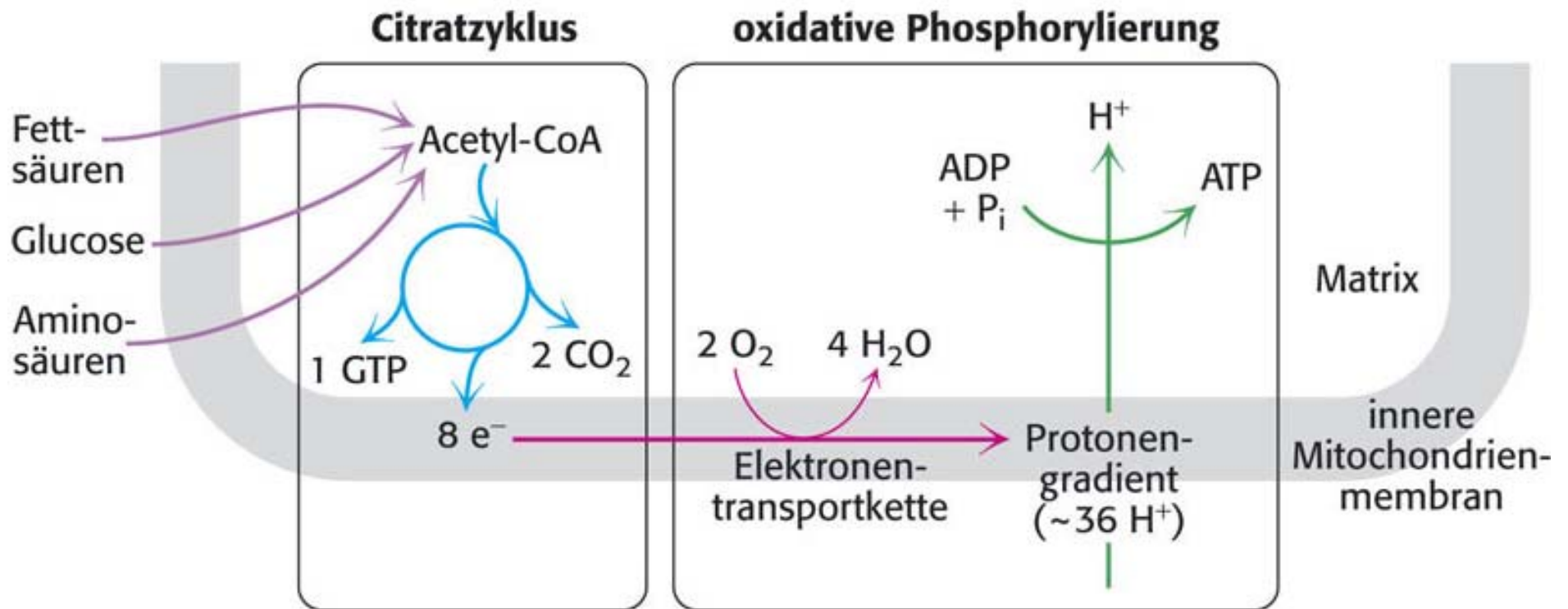
Nettoreaktion unter Kombination von Glycolyse und Citronensäure-Cyclus (inkl. **Pyruvat-Dehydrogenase**):



Kohlenstoffbilanz: Glucose \rightarrow 6 CO₂

ATP-Bilanz: 4 ATP durch Substratketten-
phosphorylierung gebildet, zwei in der
Glycolyse und zwei im Citrat-Cyclus
(GTP = ATP)

NADH-Bilanz: 2 (Glycolyse) + 2 (**Pyruvat-Dehydrogenase**) +
6 (Citrat-Cyclus) = 10



Molekularer Sauerstoff ist weder als Substrat noch als Produkt am Citrat-Cyclus beteiligt. Trotzdem verläuft der Cyclus nur unter AEROBEN Bedingungen. Das NAD^+ und FAD können in den Mitochondrien nur durch Elektronenübertragung auf letztendlich molekularen Sauerstoff, O_2 , regeneriert werden.

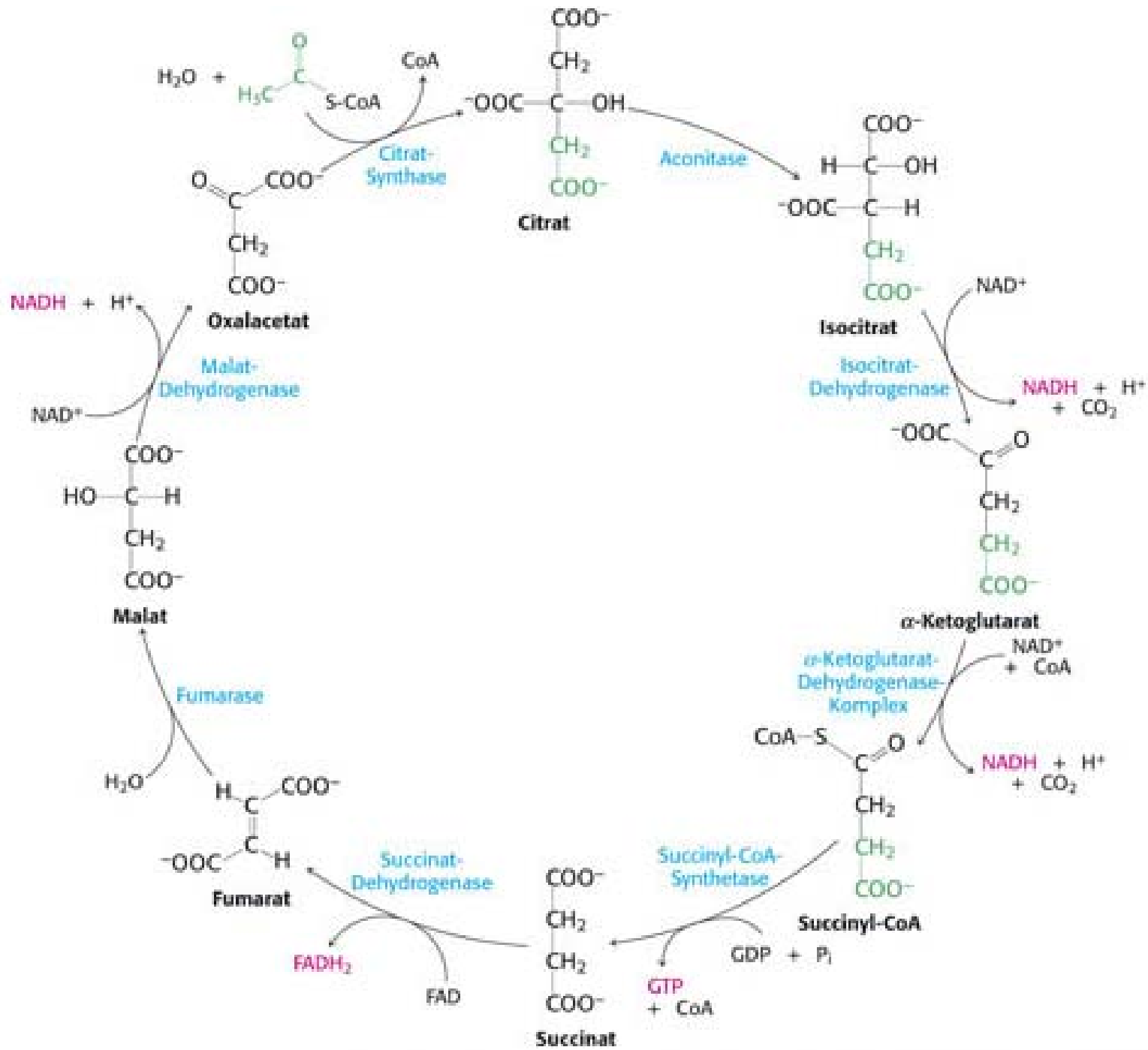
Während die Glycolyse also sowohl unter aeroben und anaeroben Bedingungen ablaufen kann, ist der **CITRAT-CYCLUS STRIKT AEROB**. Die Glycolyse kann anaerob ablaufen, weil NAD^+ auf vielfache Weise regeneriert werden kann (beim Menschen z.B. durch Überführung von Pyruvat in Lactat). Siehe Einheit 6.

Es muss festgehalten werden, dass die in einem Cyclus freigesetzten CO_2 -Moleküle nicht aus den Kohlenstoffen des Acetyl-CoA stammen. Eine Betrachtung der oben beschriebenen enzymatischen Mechanismen macht dies klar.

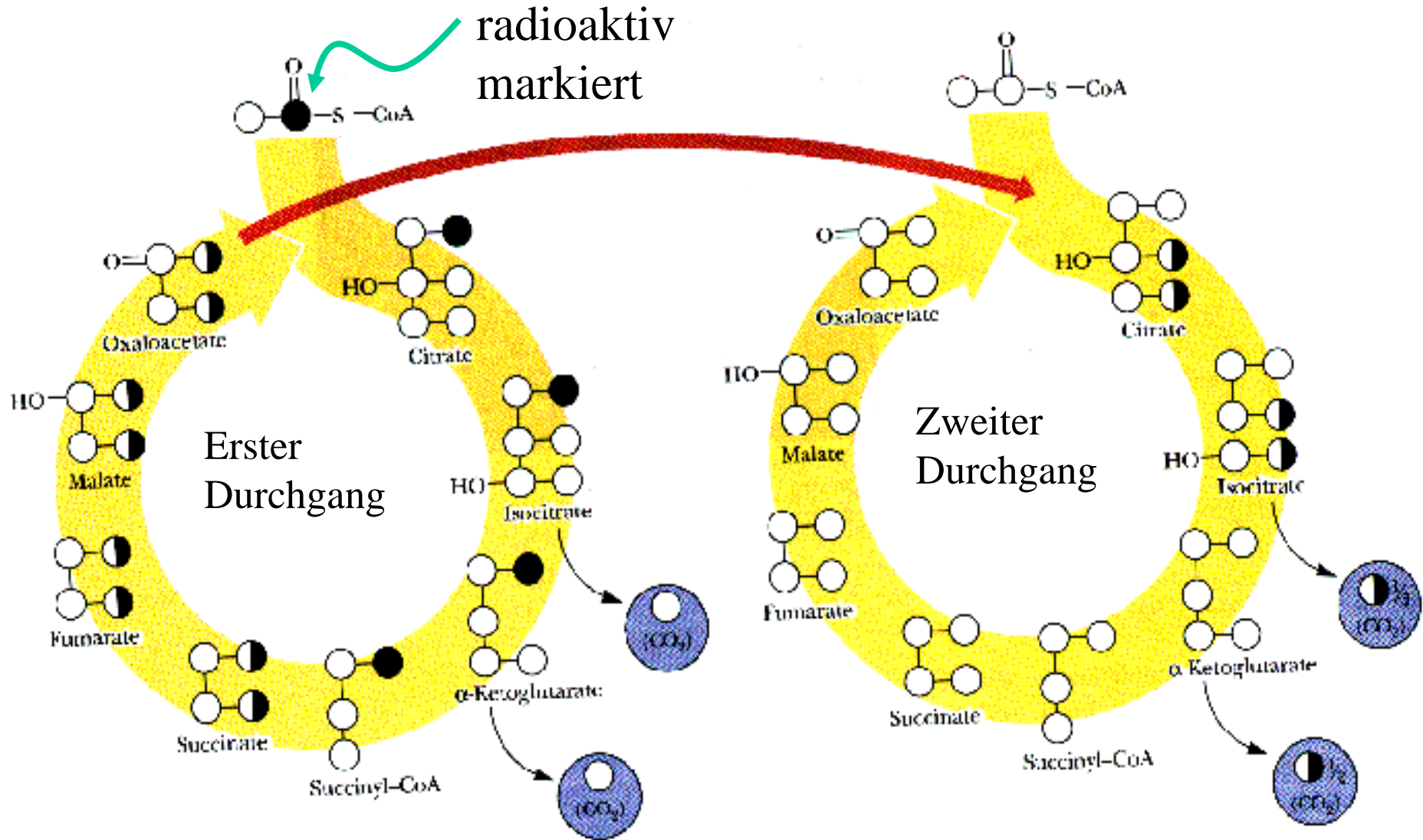
Eindeutig bewiesen kann dies durch selektive radioaktive Markierung werden.

Ist der Carbonyl-Kohlenstoff des Acetyl-CoA radioaktiv markiert, so tragen die freigesetzten CO_2 Moleküle im ersten Durchgang keine Radioaktivität, im zweiten Durchgang trägt die Hälfte der CO_2 Moleküle Radioaktivität usw.

Ist der Methyl-Kohlenstoff des Acetyl-CoA radioaktiv markiert, so sind die abgehenden CO_2 -Moleküle im ersten und zweiten Durchgang nicht radioaktiv. Erst im dritten Durchgang findet man Radioaktivität in Kohlendioxid usw.

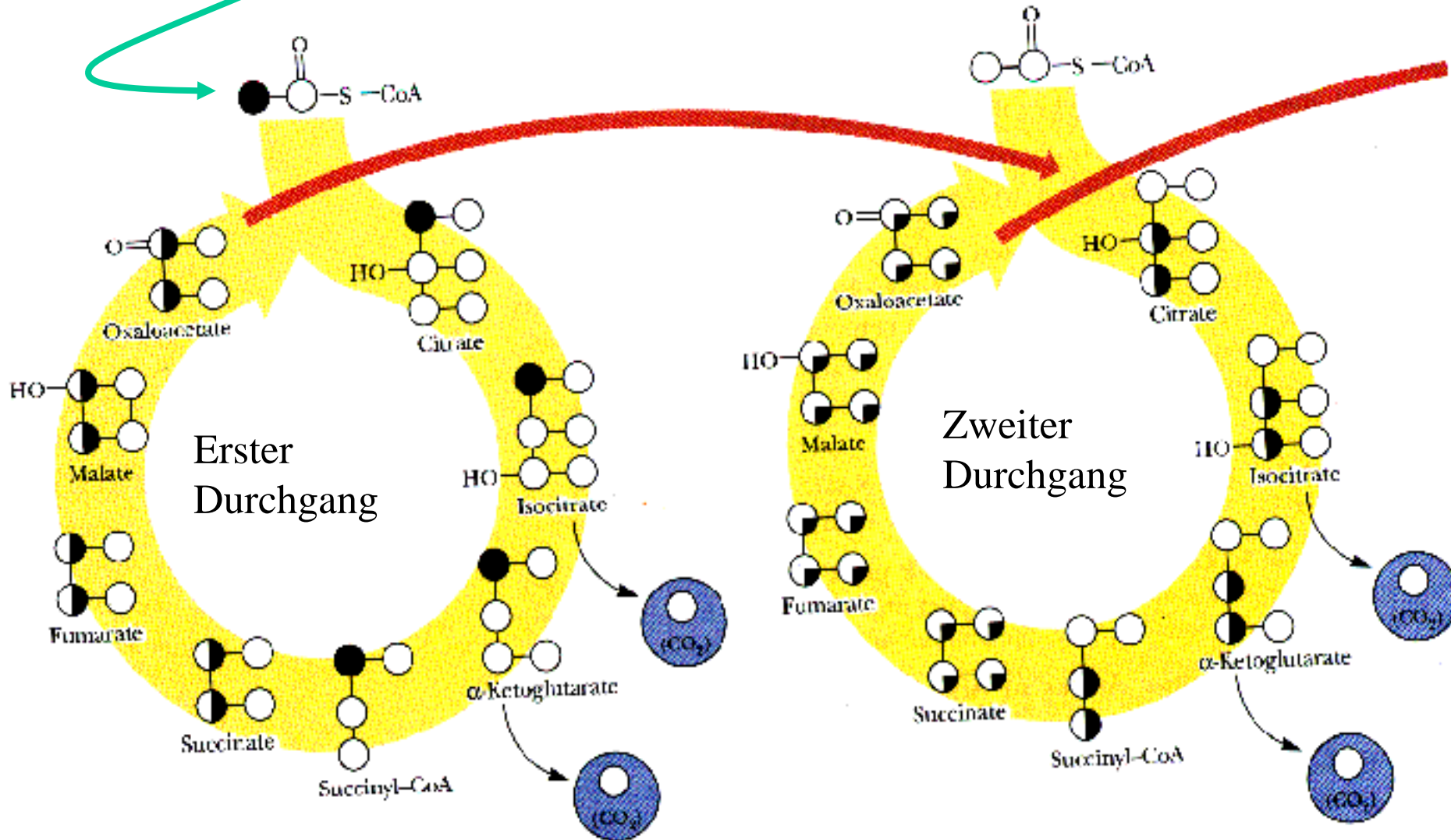


Kohlenstoffbilanz des Citronensäure-Cyclus:
Carbonyl-C-Atom des Acetyl-CoA markiert.

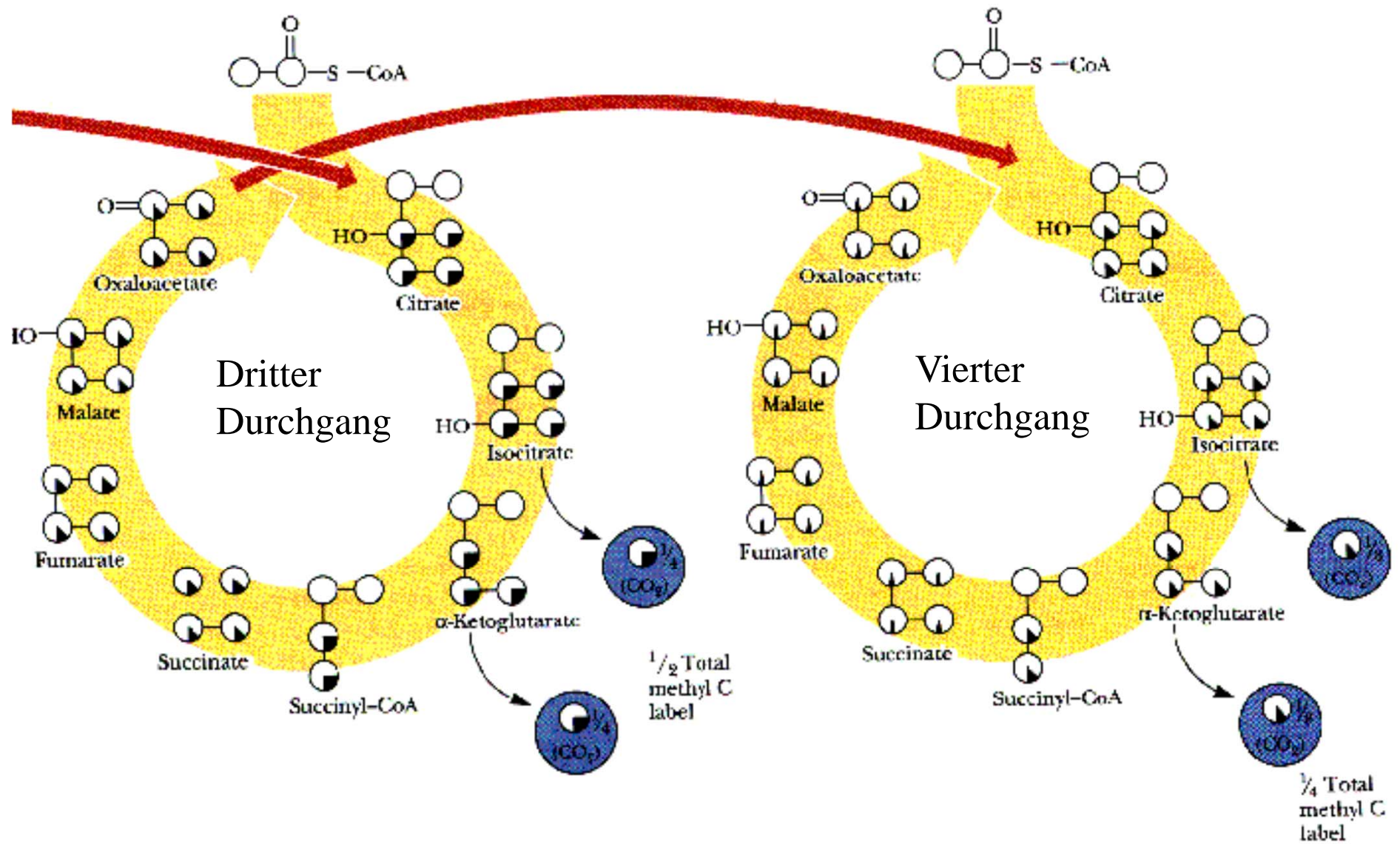


radioaktiv
markiert

Kohlenstoffbilanz des Citronensäure-Cyclus: Methyl-C-Atom des Acetyl-CoA markiert.



Kohlenstoffbilanz des Citronensäure-Cyclus: Methyl-C-Atom des Acetyl-CoA markiert.

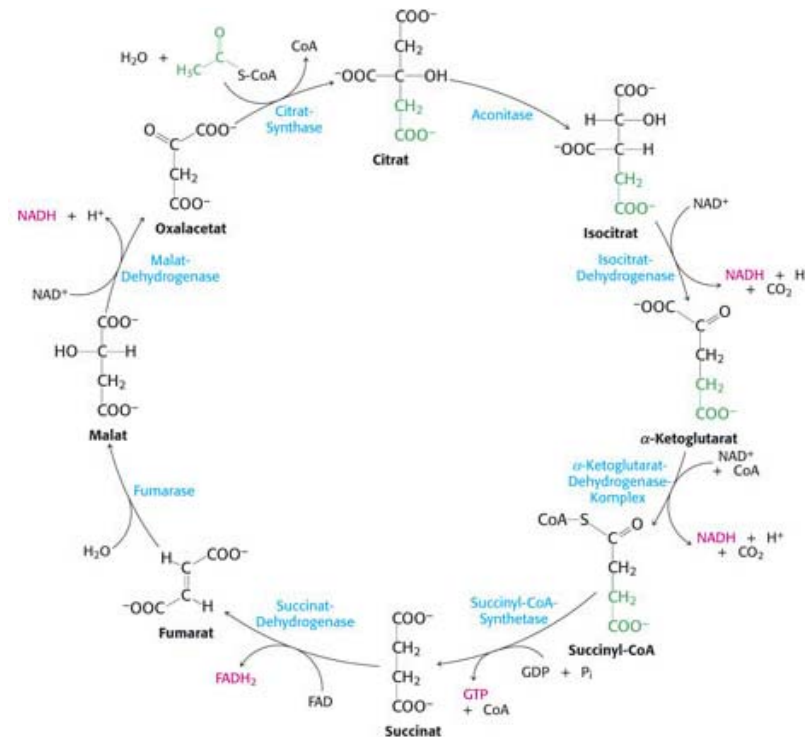


Citrat-Cyclus

Allgemeines

Reaktionsfolge

Thermodynamik und Regulation



Veränderung der Freien Enthalpie unter Standardbedingungen (ΔG°) und der (physiologischen) Freien Enthalpie ($\Delta G'$) bei den Reaktionen des Citrat-Cyclus.

Reaktion	Enzym	ΔG° (kJ/mol)	$\Delta G'$ (kJ/mol)
1	Citrat-Synthase	-31,5	negativ
2	Aconitase	≈ 5	≈ 0
3	Isocitrat-Dehydrogenase	-21	negativ
4	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	-33	negativ
5	Succinyl-CoA-Synthetase	-2,1	≈ 0
6	Succinat-Dehydrogenase	+ 6	≈ 0
7	Fumarase	-3,4	≈ 0
8	Malat-Dehydrogenase	+29,7	≈ 0

Die Umsatzrate im Citrat-Cyclus ist hinsichtlich des ATP-Bedarfs der tierischen Zelle genau angepasst. Regulation erfolgt durch Substratverfügbarkeit, Produkthemmung und kompetitive Rückkopplungshemmung.

Regulatorische Signale sind die Konzentrationen von Acetyl-CoA, Oxalacetat, Succinyl-CoA, ATP, NAD⁺ und NADH, Ca²⁺, Insulin

Inhibierung durch NADH Pyruvat-DH, Citrat-Synthase,
Isocitrat-DH, α -Ketoglutarat-DH

Inhibierung durch ATP Pyruvat-DH, Isocitrat-DH,
 α -Ketoglutarat-DH

Inhibierung durch Succinyl-CoA Citrat-Synthase,
 α -Ketoglutarat-DH

Inhibierung durch Acetyl-CoA

Pyruvat-Dehydrogenase

Aktivierung durch Acetyl-CoA

Pyruvat-Carboxylase
(Gluconeogenese, Einheit 9)

Aktivierung durch Ca^{2+}
(stimuliert auch Muskel-
kontraktion und Glycogen-
abbau)

Pyruvat-Dehydrogenase
(durch Aktivierung der
Phosphatase, Einheit 6)
Isocitrat-Dehydrogenase,
 α -Ketoglutarat-Dehydrogenase

Aktivierung durch Insulin

Pyruvat-Dehydrogenase
(durch Aktivierung der
Phosphatase)

Regulation der **Pyruvat-Dehydrogenase** ist in Säugetieren extrem wichtig, da aus Acetyl-CoA keine Glucose mehr synthetisiert werden kann. Sobald Acetyl-CoA gebildet ist, kann es nur mehr entweder im Citronensäure-Cyclus umgesetzt oder in der Fettsäure-Biosynthese verwendet werden. Regulation der **Pyruvat-Dehydrogenase** (allosterisch und kovalent) siehe 6. Einheit.

Regulation der Citrat-Synthase

1. Verfügbarkeit von Oxalacetat (im Gleichgewicht mit Malat):

$$K = \frac{[\text{Oxalacetat}][\text{NADH}]}{[\text{Malat}][\text{NAD}^+]}$$

[Oxalacetat] ist abhängig von Verhältnis [NADH/NAD⁺].

Hohe Atmungsraten: [NADH] nimmt ab und
[Oxalacetat] nimmt zu. Stimulation
der Citrat-Synthase

2. Hemmung durch NADH
3. Hemmung durch Citrat (Produkthemmung)
4. Hemmung durch Succinyl-CoA (kompetitive Rückkoppelungshemmung: Konkurrenz mit Acetyl-CoA)

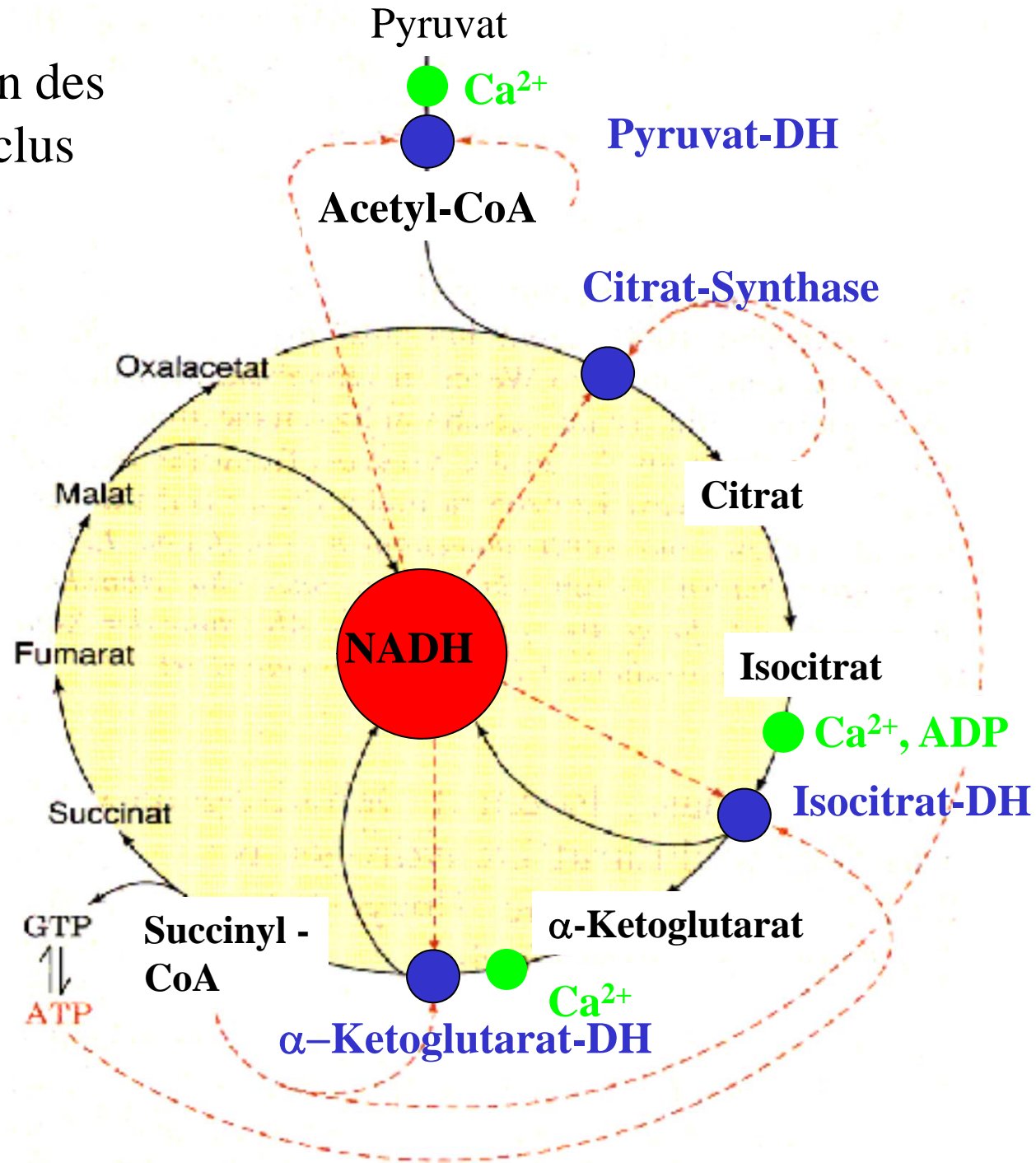
Regulation der Isocitrat-Dehydrogenase

1. Aktivierung durch ADP
2. Aktivierung durch Ca^{2+} (stimuliert auch Glycogenabbau und Muskelkontraktion)
3. Hemmung durch ATP und NADH

Regulation der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase

1. Produkthemmung: NADH, Succinyl-CoA
Aktivität steigt, wenn [NADH] sinkt
2. Aktivierung durch Ca^{2+}

Regulation des Citrat-Cyclus



Citrat-Cyclus

Allgemeines

Reaktionsfolge

Thermodynamik und Regulation

Amphibole Natur des Citrat-Cyclus

Der Citrat-Cyclus ist kataboler und anaboler Natur (**amphiboler Stoffwechselweg**)

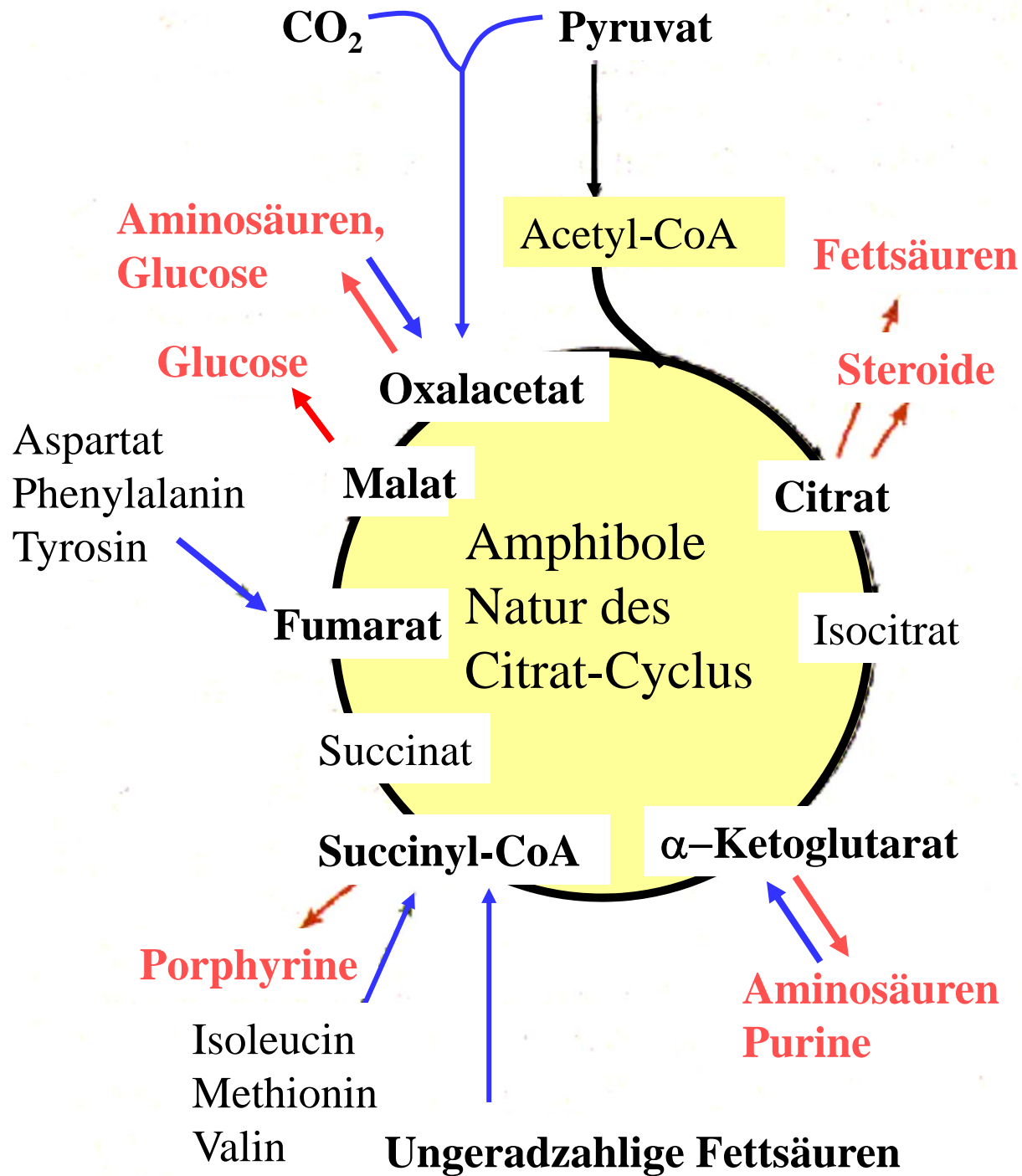
Katabole Natur: Oxidation der Kohlenstoffe der Substrate zu CO_2 unter Bildung von Reduktionsäquivalenten

Anabole Natur: Zwischenprodukte des Cyclus dienen als Ausgangssubstanzen für verschiedene Biosynthesen

Sämtliche Biosynthese-Wege, die Zwischenprodukte des Citronensäure-Cyclus verwerten, benötigen Freie Enthalpie, für deren Bereitstellung der Citronensäure-Cyclus essentiell ist. Die katabole Funktion des Cyclus muss aufrechterhalten bleiben. Werden Zwischenprodukte abgezogen, müssen sie nachgeliefert werden (Auffüllreaktionen oder **anaplerotische Reaktionen**).

Stellen an denen Zwischenprodukte für anabole Stoffwechselwege abgezogen werden (**Citrat, α -Keto-glutarat, Succinyl-CoA, Malat, Oxalacetat**)

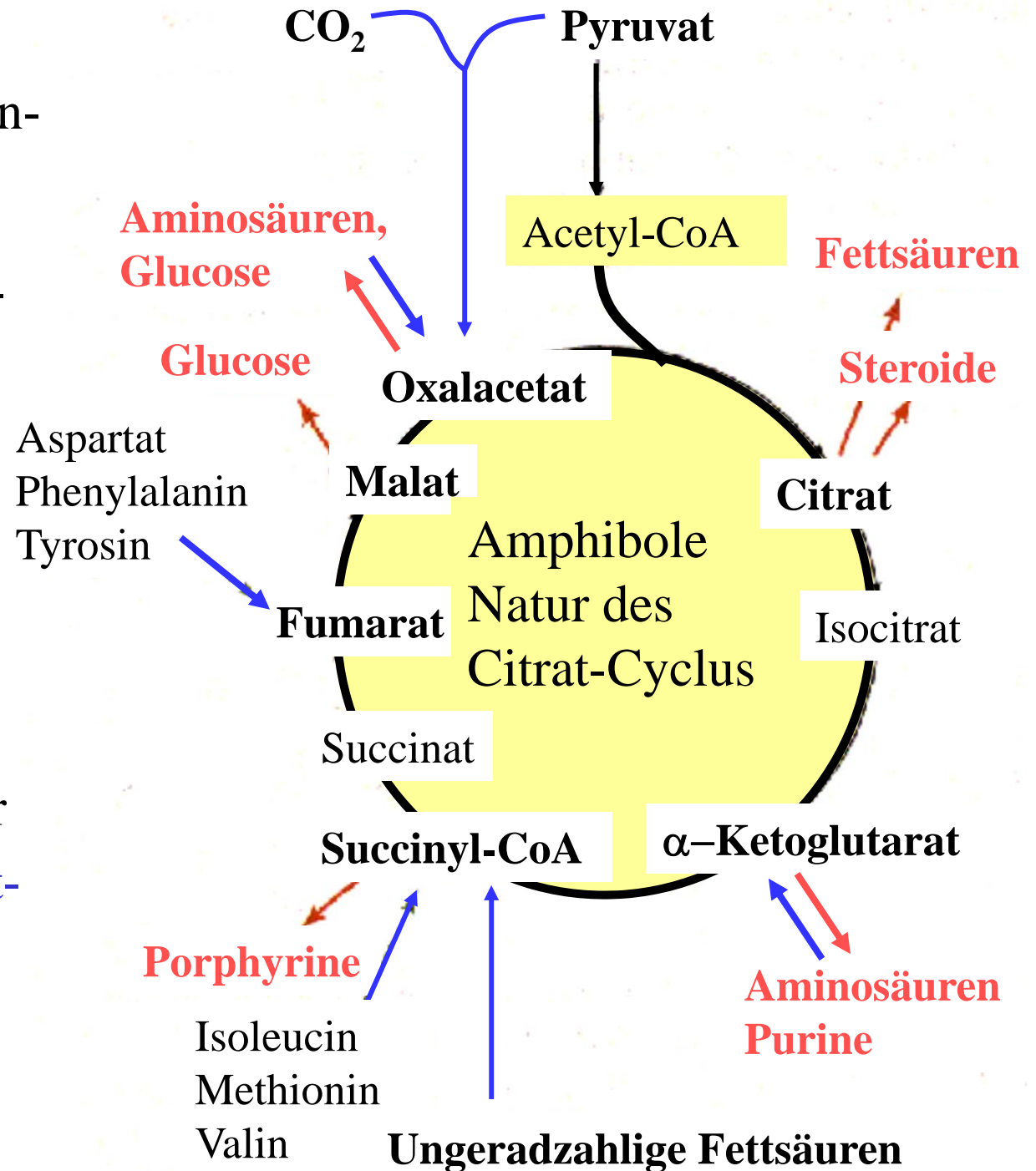
Stellen, an denen anaplerotische Reaktionen knapp gewordene Zwischenprodukte nachliefern (α -Keto-glutarat, Succinyl-CoA, Fumarat, Oxalacetat)



Lipid-Biosynthese

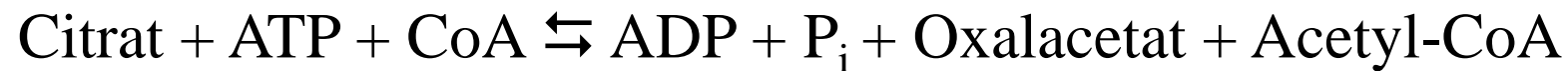
(Fettsäure- und Cholesterin-Biosynthese): Cytosol.

Acetyl-CoA (= Ausgangsstoff für Fettsäurebiosynthese) kann durch die Mitochondrienmembran nicht permeieren. Jedoch kann **Citrat** die Membran queren und wird auf cytosolischer Seite durch die **ATP-Citrat-Lyase** in Oxalacetat und **Acetyl-CoA** gespalten.



Das im Cytosol für Biosynthesen benötigte Acetyl-CoA entsteht durch Austausch von Zwischenprodukten des Citrat-Cyclus zwischen Mitochondrien und Cytosol.

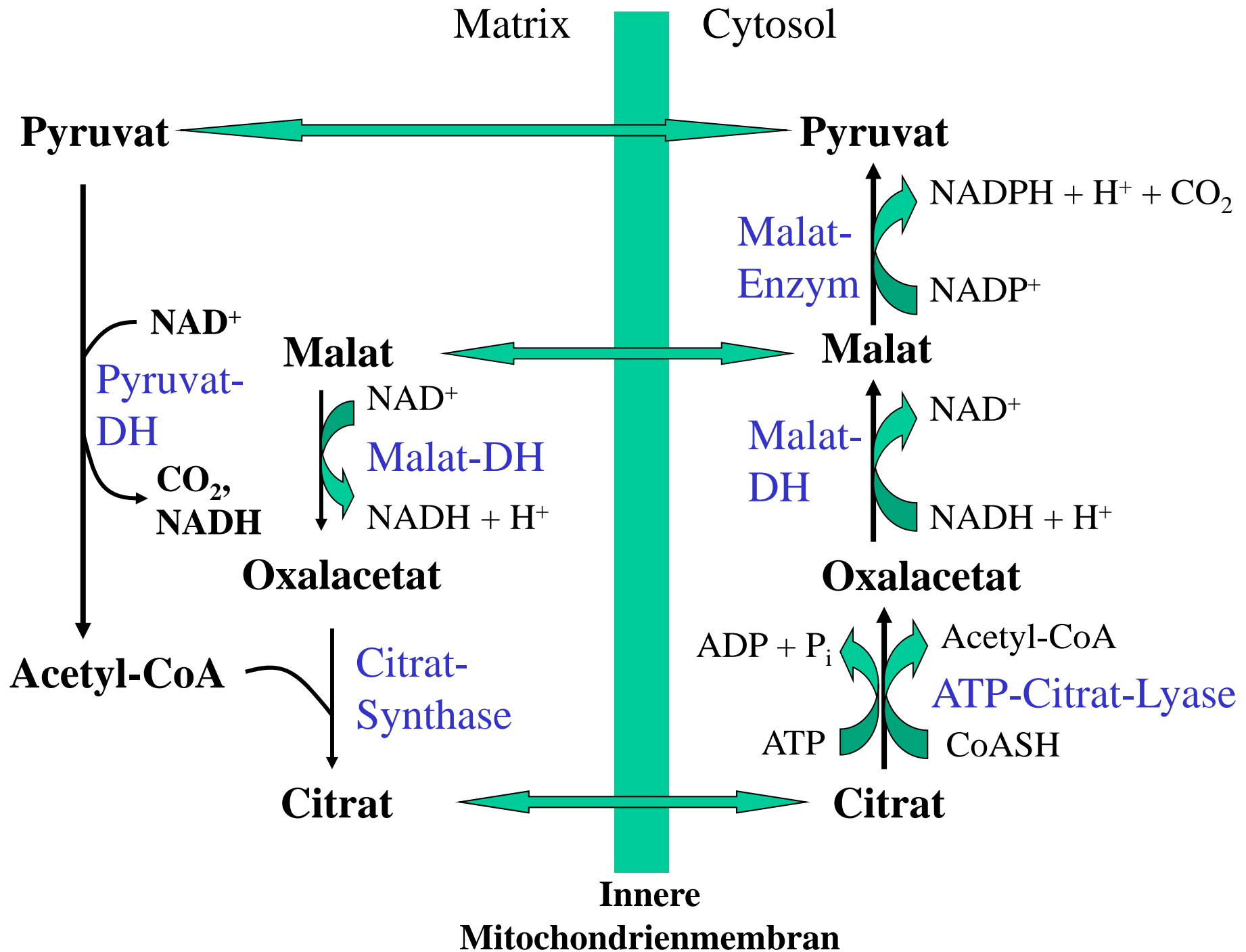
Citrat wird aus der Matrix der Mitochondrien ins Cytosol transportiert und dort durch **ATP-Citrat-Lyase** in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten. Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion ist günstig, weil dabei ATP in ADP gespalten wird:



Die Hauptmenge des Oxalacetats wird zu Malat reduziert.

Malat kann wieder von den Mitochondrien aufgenommen werden.

Oder Malat wird im Cytosol durch das **Malat-Enzym** zu Pyruvat und CO₂ oxidiert, wobei **NADPH** für (cytosolische) Biosynthesen gewonnen werden kann.

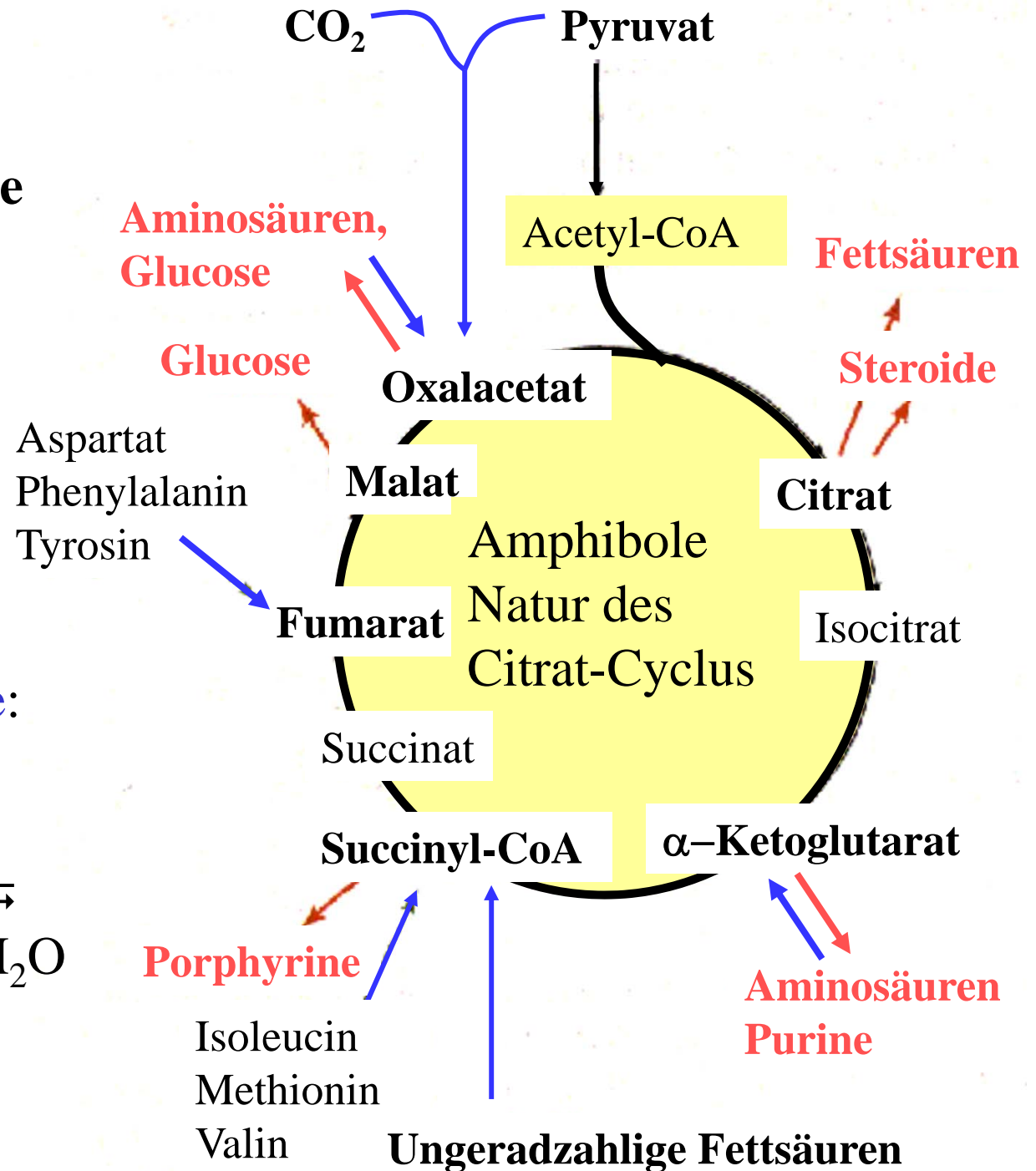
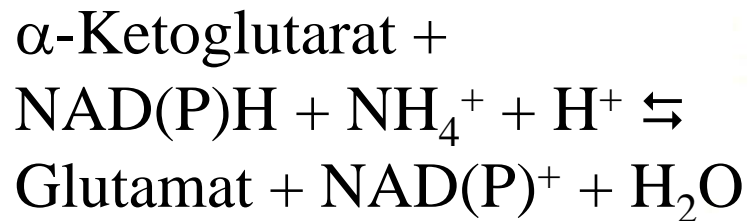


Aminosäure-Biosynthese

Verwendung von α -Ketoglutarat zur Synthese von Glutamat durch reduktive Aminierung:

Enzym:

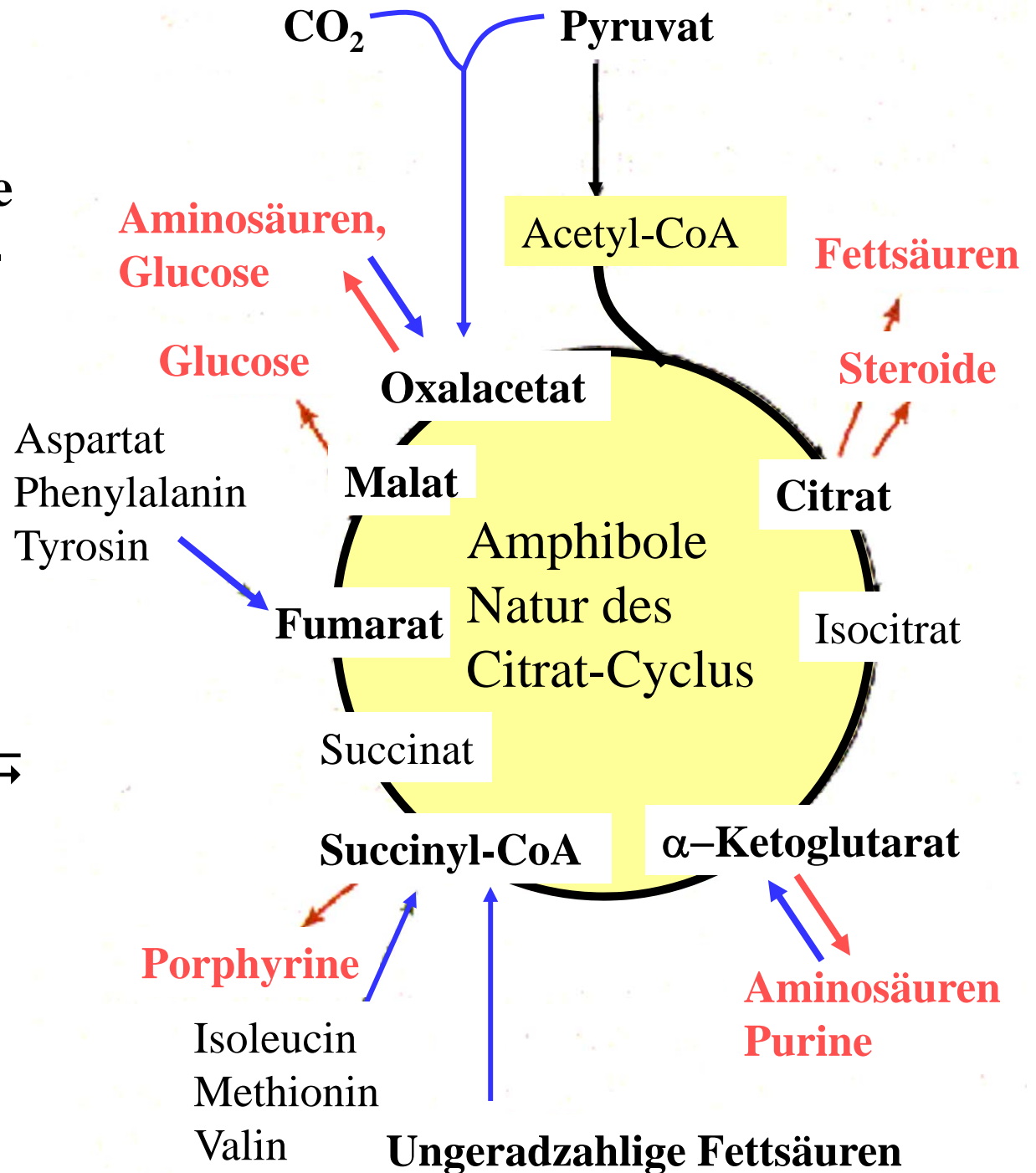
Glutamat-Dehydrogenase:



Aminosäure-Biosynthese
 Verwendung von α -Keto-
glutarat und **Oxalacetat**
 zur Synthese von
 Glutamat und
 Aspartat durch
 Transaminierungen:

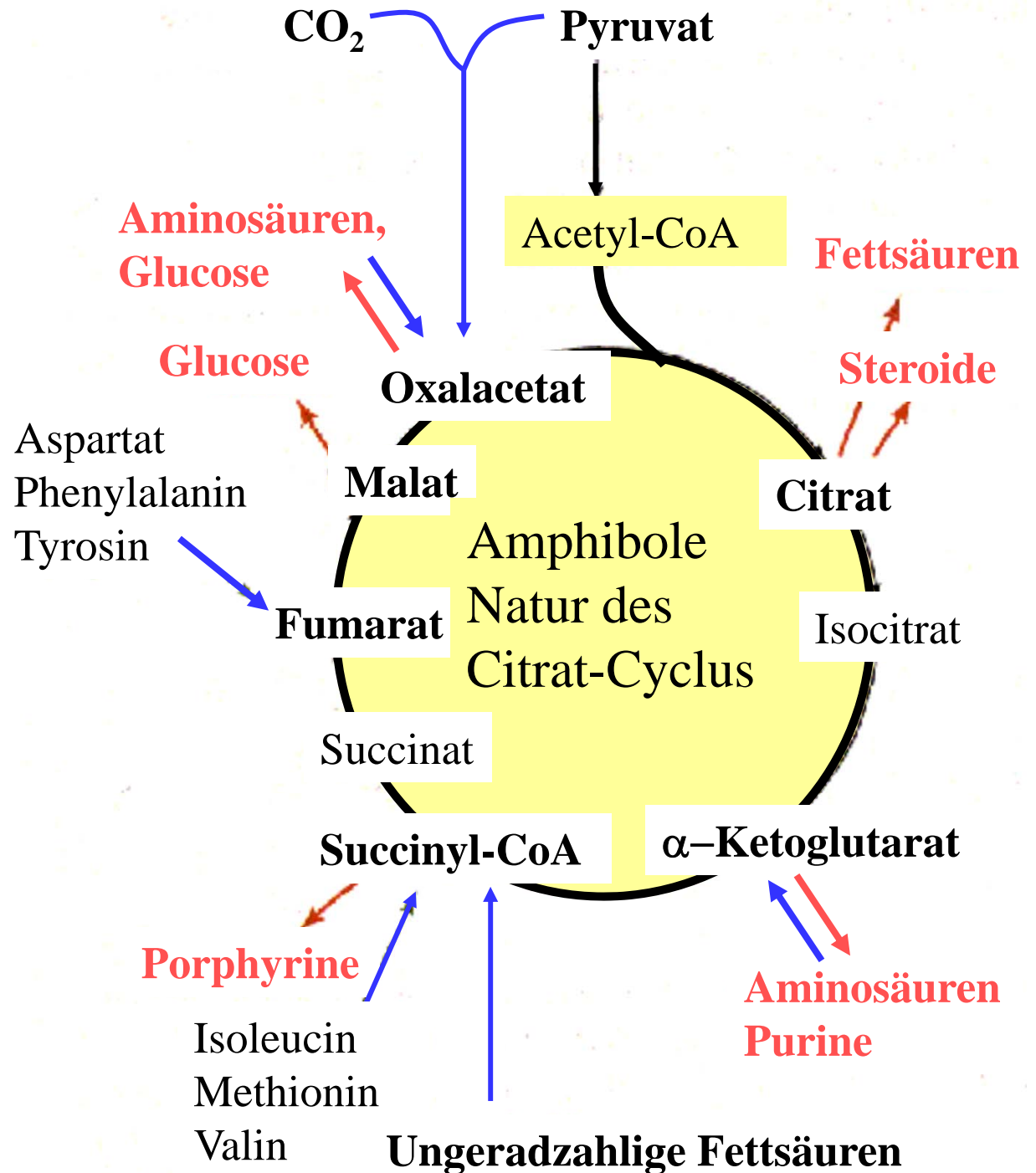
Glutamat-Transaminase:
 α -Ketoglutarat + Alanin \rightleftharpoons
 Glutamat + Pyruvat

Aspartat-Transaminase:
 Oxalacetat + Alanin \rightleftharpoons
 Aspartat + Pyruvat



**Porphyrin-
Biosynthese:**
Succinyl-CoA als
Ausgangssubstrat.

Erste Reaktion der
Porphyrinbiosynthese
ist nämlich die
Bildung von
 δ -Aminolävulinat aus
Succinyl-CoA und
Glycin durch das
Enzym
 **δ -Aminolävulinat-
Synthase**

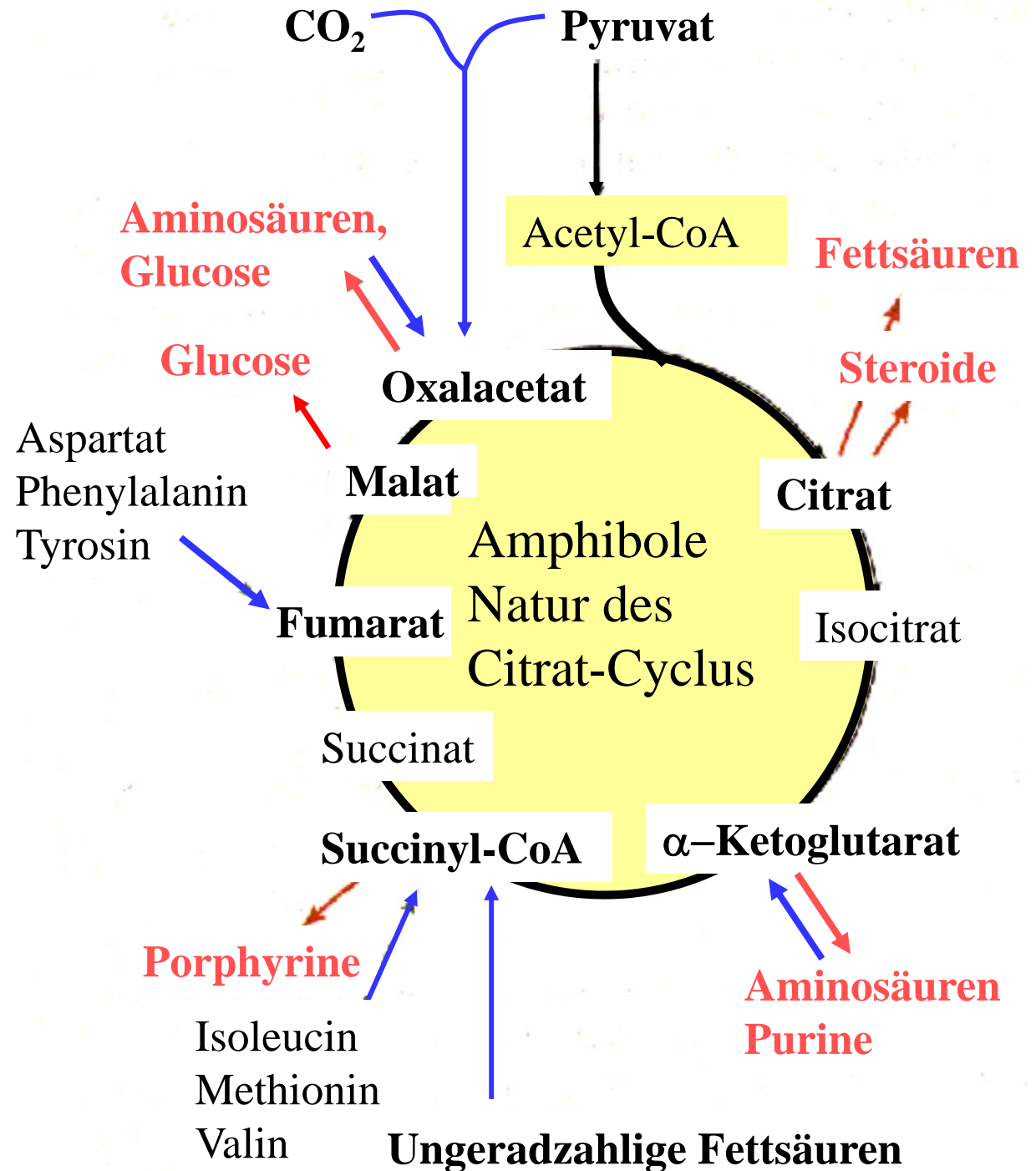


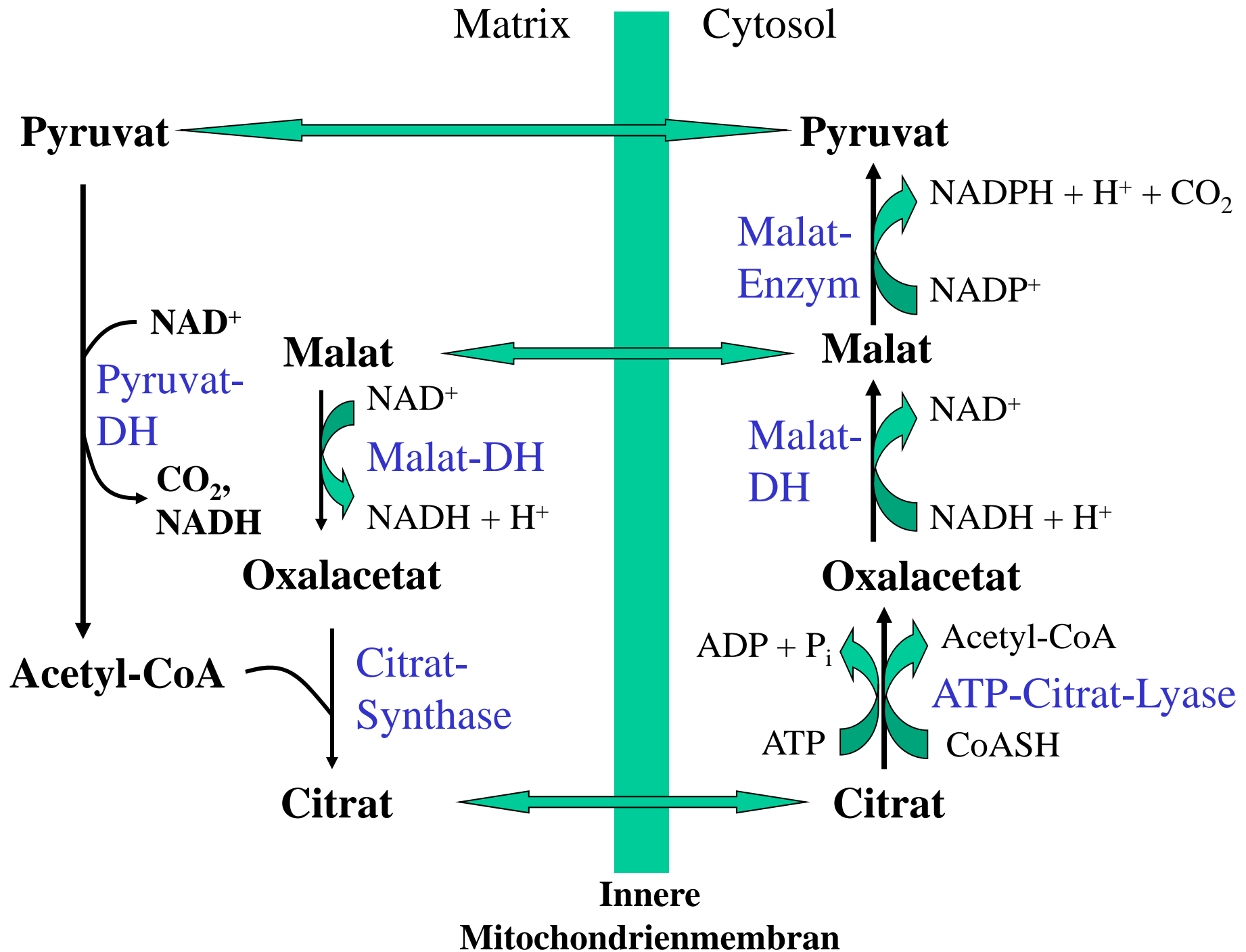
Glucose-Biosynthese

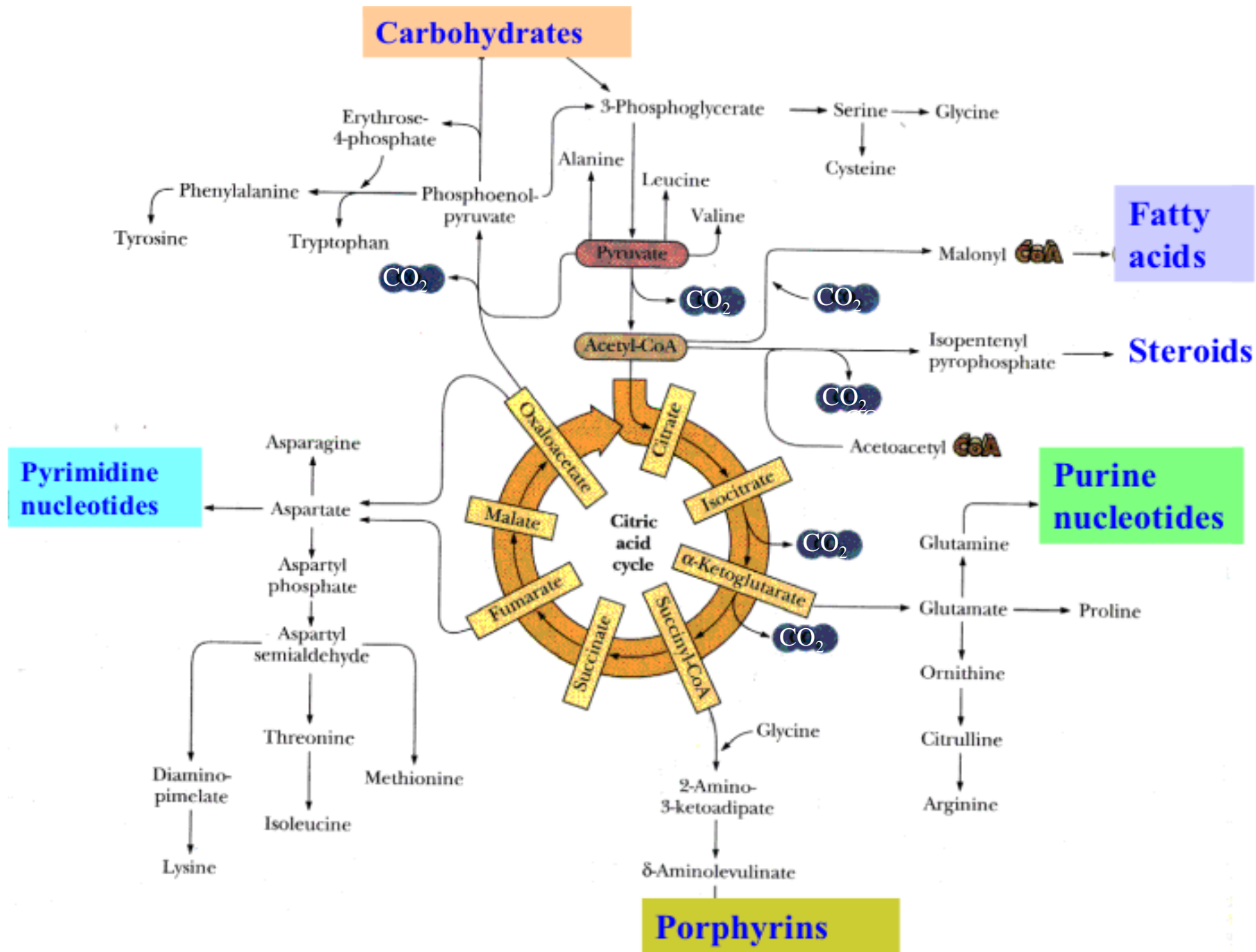
(siehe Gluconeogenese, Einheit 9):

Cytosolische Verwertung von durch die Mitochondrien-Membran transportiertem **Malat**.

Oxalacetat kann die innere mitochondriale Membran zwar nicht durchqueren, entsteht aber aus Malat im Cytosol durch **Malat-Dehydrogenase**.







Citrat-Cyclus

Allgemeines

Reaktionsfolge

Thermodynamik und Regulation

Amphibole Natur des Citrat-Cyclus

Anaplerotische Reaktionen

Sämtliche Biosynthese-Wege, die Zwischenprodukte des Citronensäure-Cyclus verwerten, benötigen Freie Enthalpie, für deren Bereitstellung der Citronensäure-Cyclus essentiell ist. Die katabole Funktion des Cyclus muss aufrechterhalten bleiben. Werden Zwischenprodukte abgezogen, müssen sie nachgeliefert werden: Auffüllreaktionen oder **anaplerotische** (griech. „auffüllen“) **Reaktionen**.

Das Pyruvat kann nach Aufnahme in die Mitochondrien mittels **Pyruvat-Dehydrogenase** entweder zu Acetyl-CoA oxidiert werden (“kataboles Schicksal”) oder in Oxalacetat mittels **Pyruvat-Carboxylase** (siehe Gluconeogenese, 9. Einheit) oder in Malat mittels **Malat-Enzym** umgewandelt werden.

Pyruvat-Carboxylase (Gluconeogenese, siehe 9. Einheit)

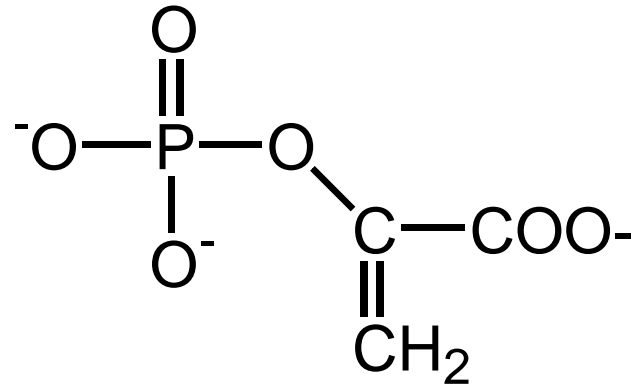


Misst über Acetyl-CoA (=Aktivator), ob Bedarf an Citronensäure-Zwischenprodukten besteht. **Pyruvat-Carboxylase** kommt nur in tierischen Zellen, jedoch nicht in Pflanzen vor (in Bakterien, Hefen und höheren Pflanzen kommt das Enzym **PEP-Carboxylase** vor).

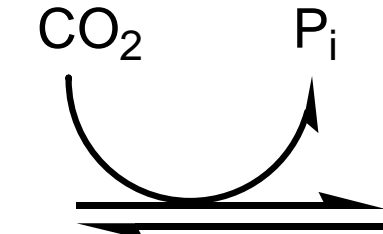
Malat-Enzym (Cytosol und Mitochondrien) von Tieren und Pflanzen:



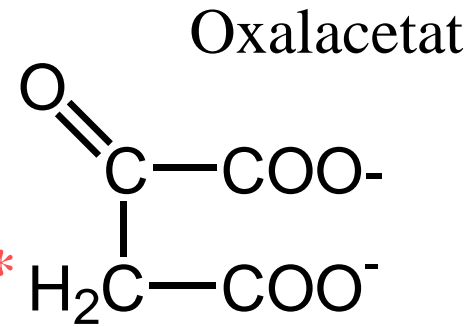
*nicht im tierischen Stoffwechsel



PEP

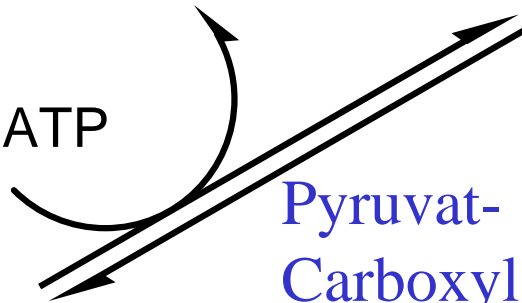


PEP-Carboxylase*



ADP + P_i

CO₂ + ATP



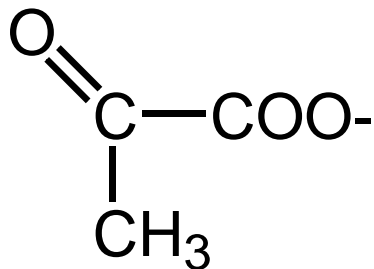
Pyruvat-Carboxylase

Malat-DH

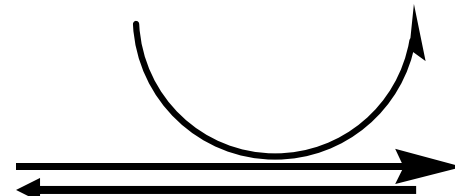
NAD⁺

Mitochondriale Matrix

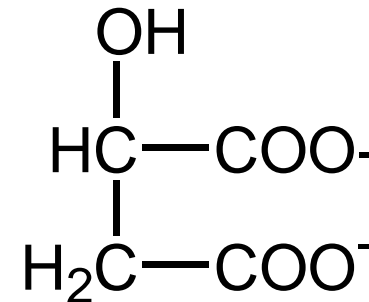
CO₂ + NADPH + H⁺ NADP⁺



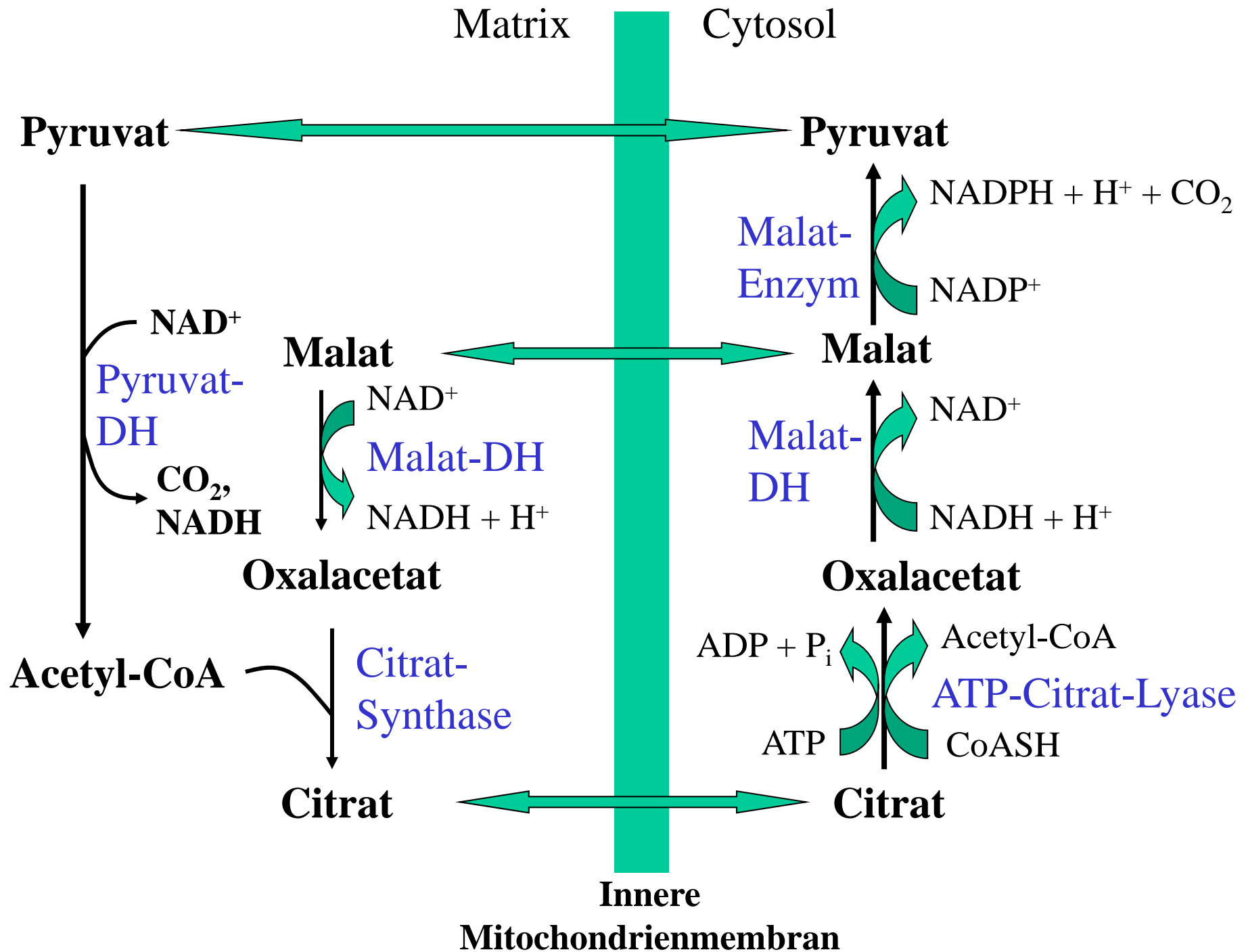
Pyruvat



Malat-Enzym



Malat



Folgende Abbau-Wege liefern ebenfalls Zwischenprodukte des Citronensäure-Cyclus:

Oxidation von Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen führt zur Produktion von **Succinyl-CoA**.

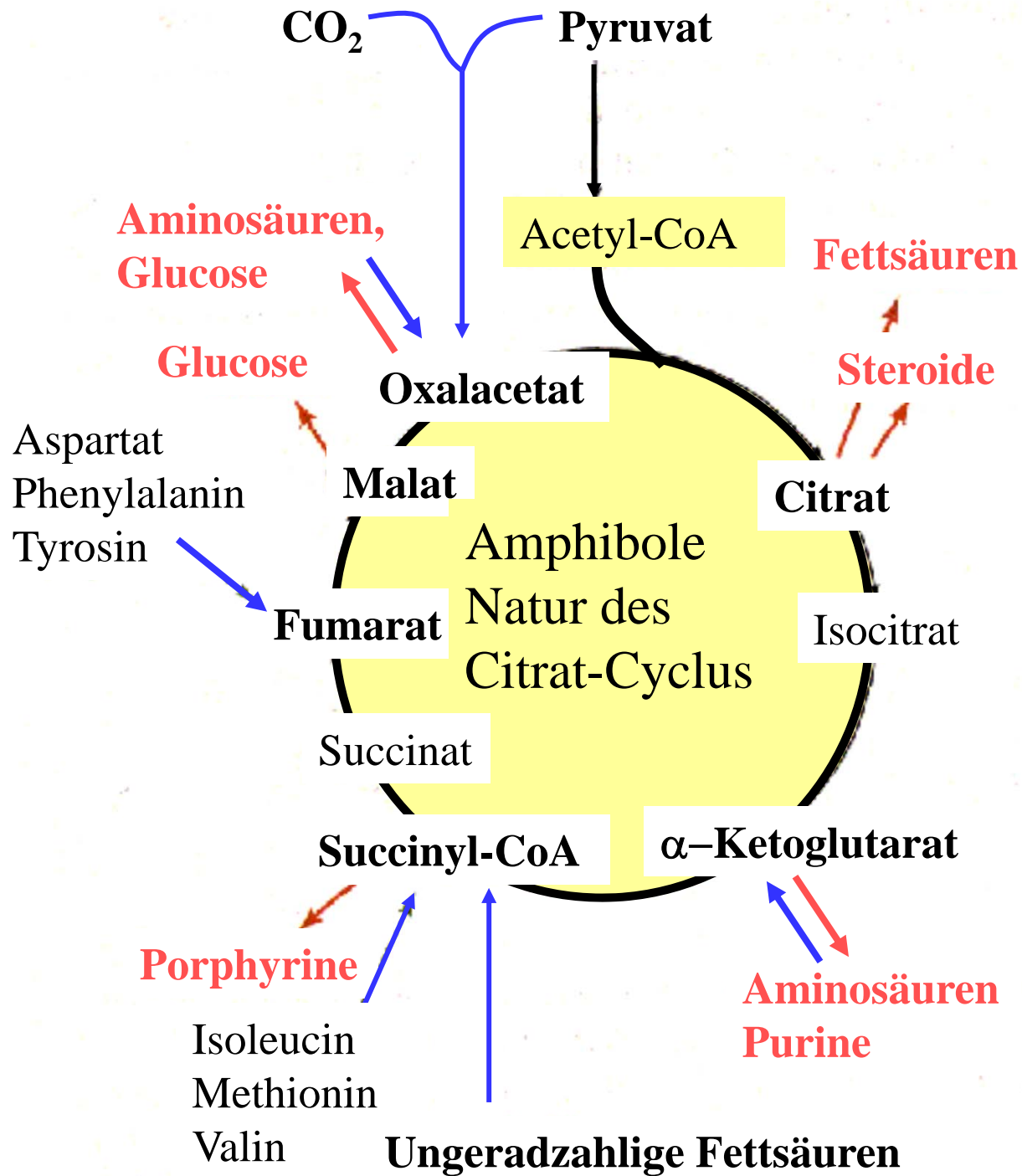
Abbau der Aminosäuren Isoleucin, Methionin und Valin führt zur Produktion von **Succinyl-CoA**.

Abbau der Aminosäuren Aspartat, Phenylalanin und Tyrosin liefert **Fumarat**.

Transaminierung und Desaminierung von Aminosäuren führen zur Produktion von **α -Ketoglutarat** und **Oxalacetat**. Reversible Reaktionen: Verbrauch oder Nachlieferung von Zwischenprodukten des Citronensäure-Cyclus je nach Bedarf

Stellen an denen Zwischenprodukte für anabole Stoffwechselwege abgezogen werden (**Citrat, α -Keto-glutarat, Succinyl-CoA, Malat, Oxalacetat**)

Stellen, an denen anaplerotische Reaktionen knapp gewordene Zwischenprodukte nachliefern (α -Keto-glutarat, Succinyl-CoA, Fumarat, Oxalacetat)



Citrat-Cyclus

Allgemeines

Reaktionsfolge

Thermodynamik und Regulation

Amphibole Natur des Citrat-Cyclus

Anaplerotische Reaktionen

Glyoxylat-Cyclus

Normalerweise ist mit der Kondensation des Acetyl-CoA mit Oxalacetat unter Citratbildung das “Schicksal” der Acetat-Kohlenstoffe besiegelt. In den Mitochondrien kommt es zur Oxidation und Freisetzung als CO_2 .

Der **Glyoxylat-Cyclus** (kommt nicht in tierischen Organismen vor!) bietet eine Alternative, die auch mit der Bildung von Citrat beginnt, aber dann **anabol zur C_4 -Ebene** und nicht katabol zur C_1 -Ebene (= CO_2) führt. Der Vergleich Glyoxylat-Cyclus mit Citrat-Cyclus zeigt, dass zwei der fünf Reaktionen des Glyoxylat-Cyclus für diesen spezifisch sind, während die anderen drei auch zum Citrat-Cyclus gehören.

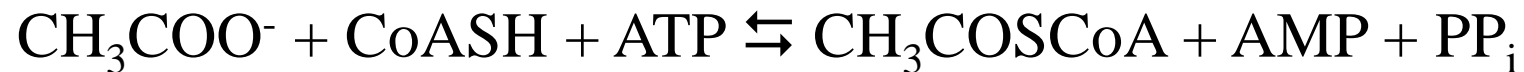
Der Glyoxylat-Cyclus umgeht die Decarboxylierungsschritte. Pro Umlauf werden zwei Acetyl-CoA Moleküle aufgenommen.

Bilanz: Zwei C_2 -Verbindungen (Acetat) werden zu einer C_4 -Verbindung (Succinat).

Der Glyoxylat-Cyclus ist ein essentieller Stoffwechselweg für jene **Prokaryoten, Protozoen** und **Algen**, die auf **C₂-Substraten** wie Acetat oder Ethanol wachsen.

Der Glyoxylat-Cyclus ist auch essentiell für Sämlinge (können keine Photosynthese betreiben) von fettspeichernden **Pflanzen**, die Zucker und andere Zellkomponenten aus **Acetyl-CoA** synthetisieren müssen, das beim Abbau von Speicherfetten gewonnen wird. In solchen Keimlingen (und vielen anderen eukaryotischen Organismen) sind die Enzyme des Glyoxylat-Cyclus und nahe verwandter Stoffwechselwege in speziellen Organellen, den sog. **Glyoxysomen** lokalisiert.

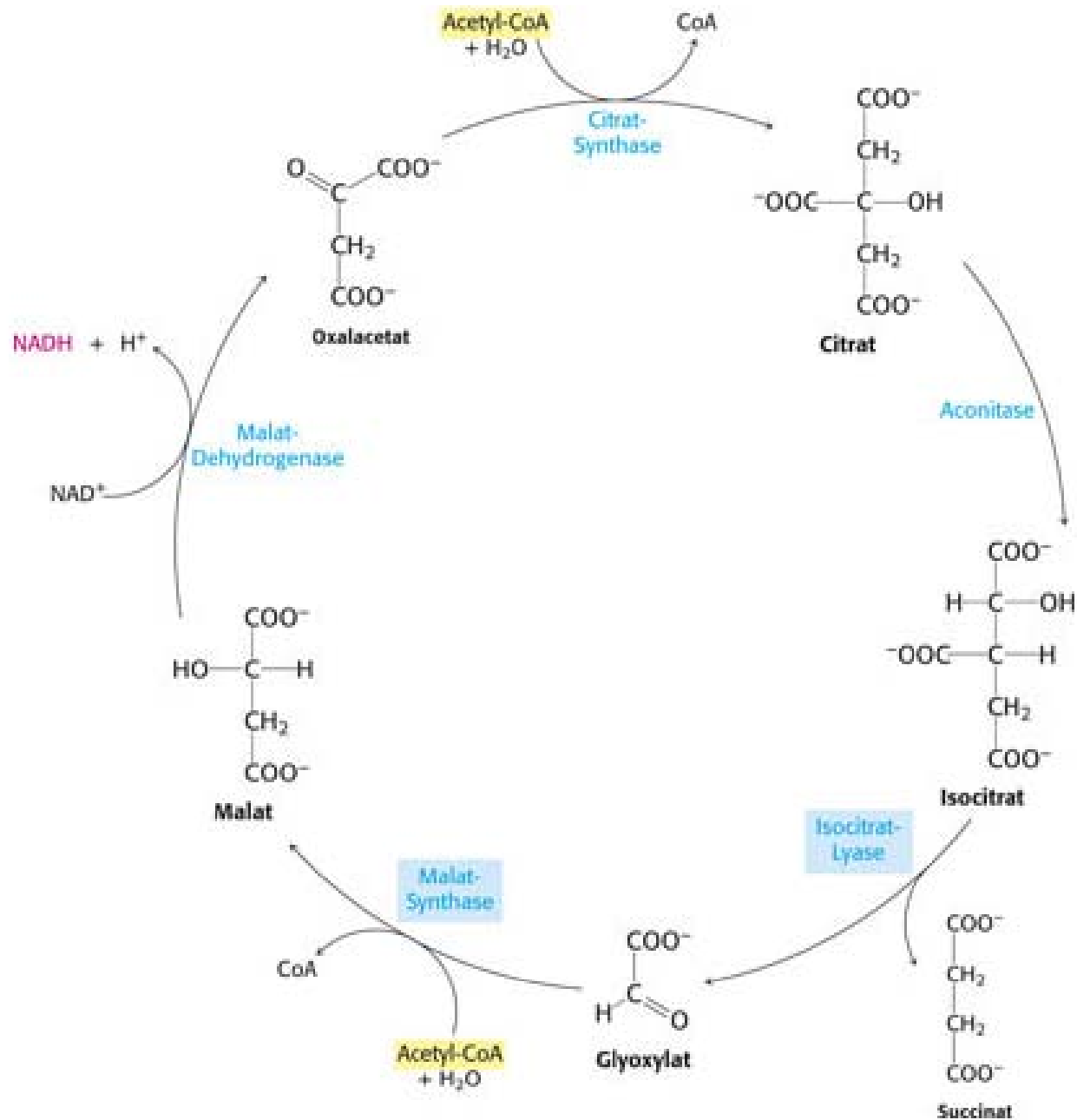
Wenn Acetat einem Organismus als Substrat dienen kann, dann ist nur die Aktivierung in Form des CoA-Derivats notwendig. Die entsprechende Reaktion wird durch die **Acetat-Thiokinase** unter ATP-Hydrolyse katalysiert:



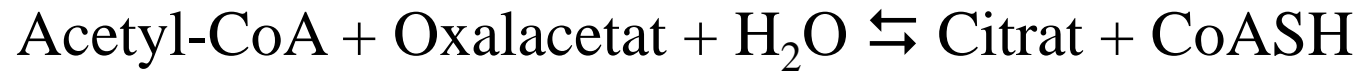
Wenn Ethanol Substrat ist, muss es oxidiert werden, zuerst zu Acetaldehyd und dann zu Acetat; beide Reaktionen sind NAD^+ -abhängig:



Auch andere C_2 -Substrate sind verwendbar, erfordern dann aber spezielle Reaktionsmechanismen (Enzyme) für die Umwandlung in Acetyl-CoA.



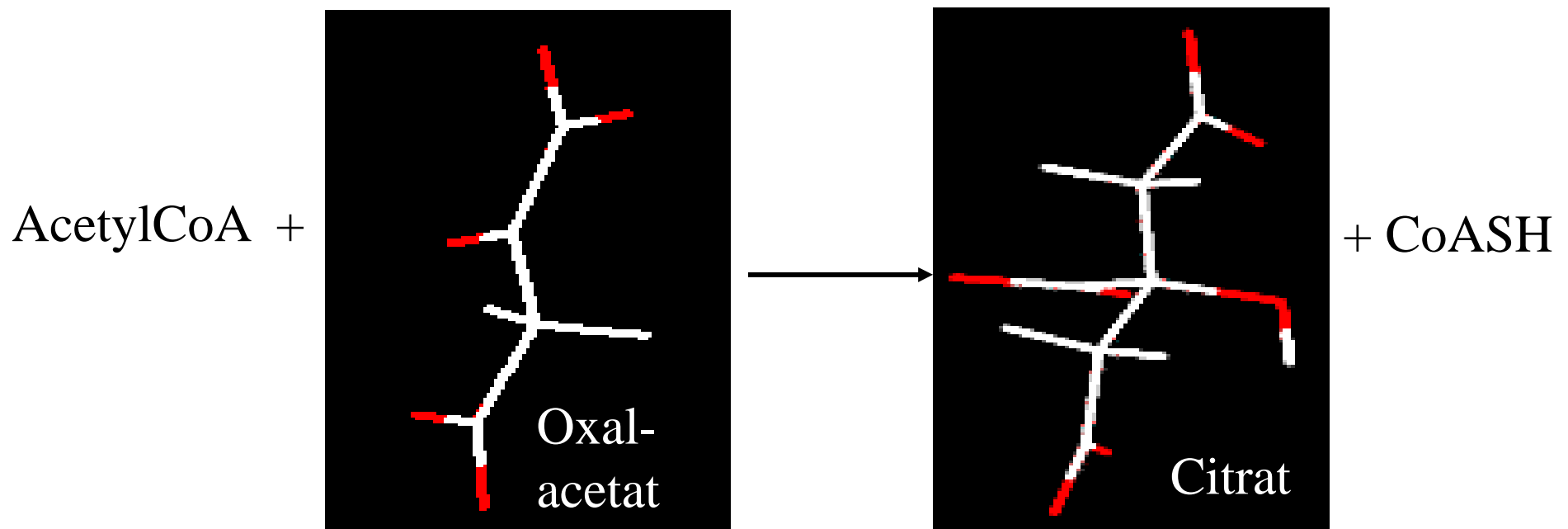
Glyoxylat-Cyclus 1. Reaktion: Citrat-Synthase



Enzym: (C-C) Lyase

Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7)

Lokalisation: Glyoxysomen; andere biochemische Eigenschaften als Enzym des Citrat-Cyclus



Glyoxylat-Cyclus

2. Reaktion: Aconitase

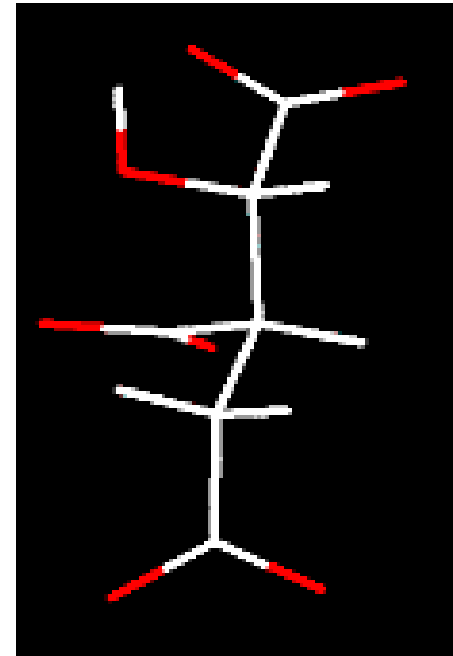
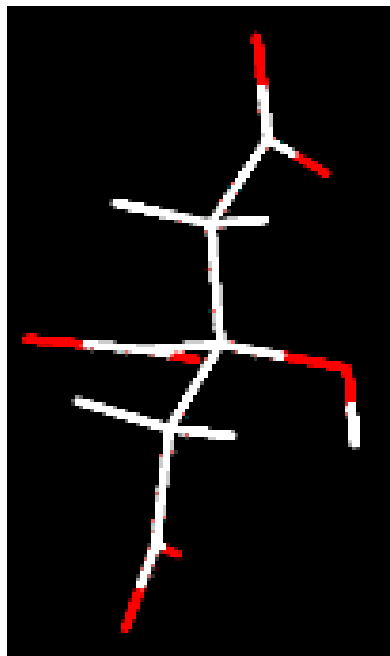
Citrat \rightleftharpoons Isocitrat

Enzym: (C-O) Lyase

Aconitase (E.C. 4.2.1.3)

Lokalisation: Glyoxysomen; andere biochemische Eigenschaften als Enzym des Citrat-Cyclus

Citrat



Isocitrat

Glyoxylat-Cyclus

3. Reaktion: Isocitrat-Lyase

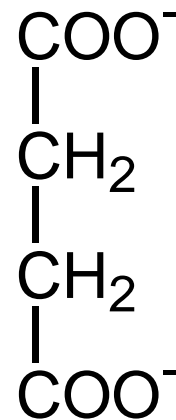
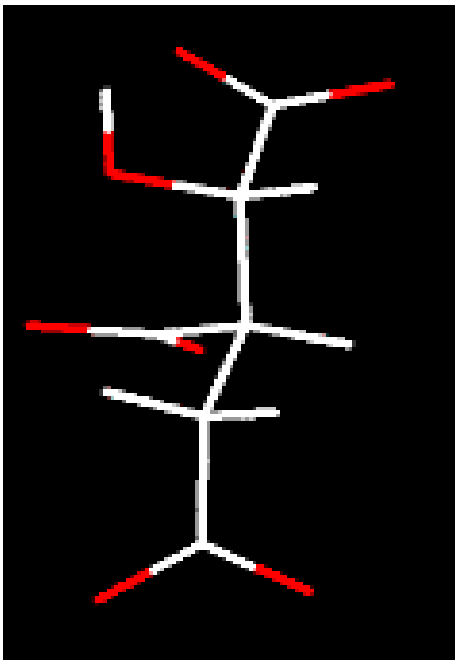
Isocitrat \rightleftharpoons Succinat + Glyoxylat

Enzym: (C-O) Lyase

Isocitrat-Lyase (E.C. 4.1.3.1.)

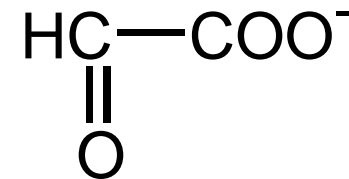
Enzym kommt nur in Pflanzen und Mikroben vor,
die auf C₂-Verbindungen wachsen können

Isocitrat



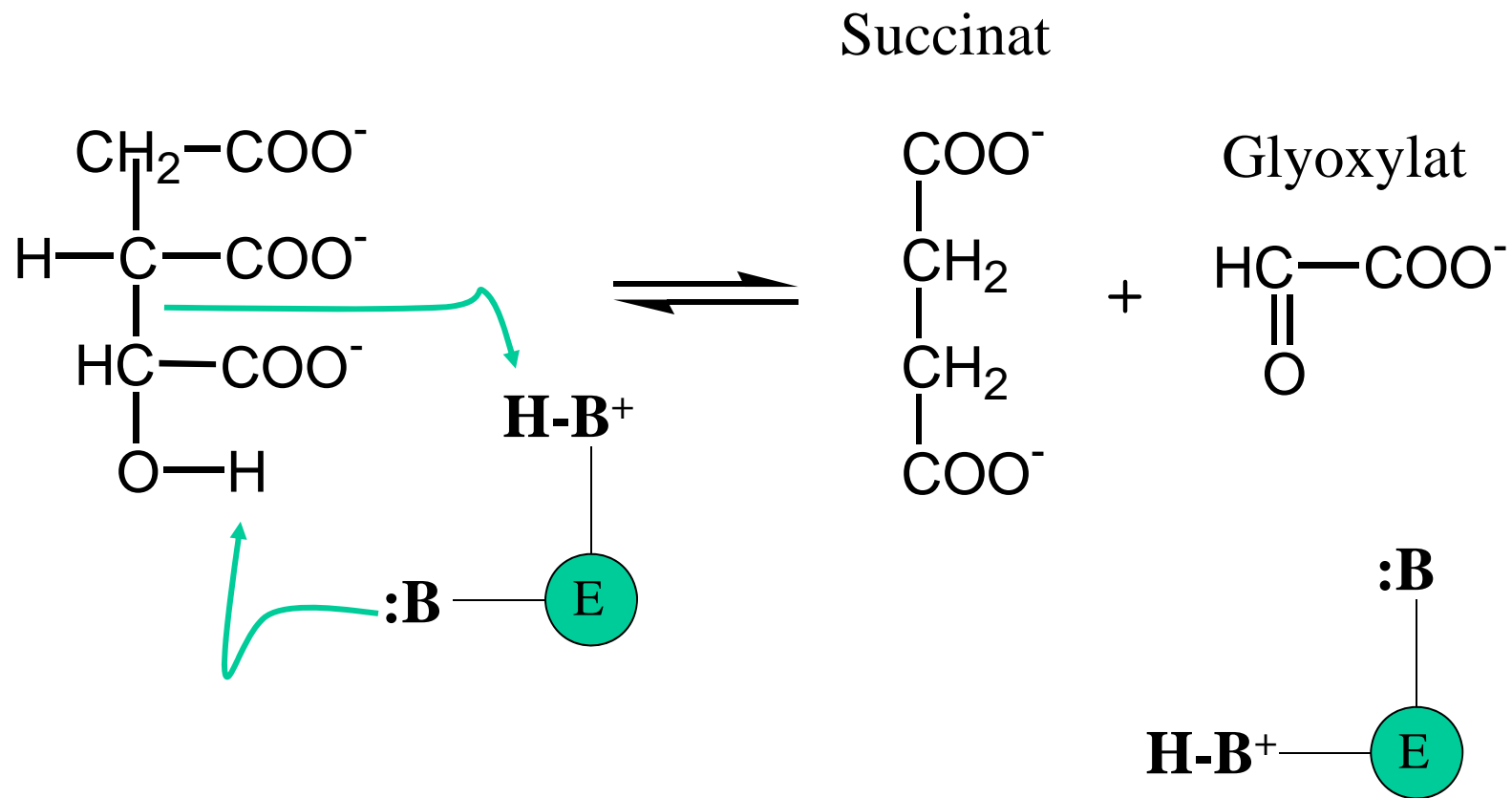
Succinat

+



Glyoxylat

Isocitrat-Lyase katalysiert die Aldol-Kondensation (bzw. Spaltung von Isocitrat) von Succinat und Glyoxylat (ähnlicher Mechanismus wie bei der **Aldolase** der Glycolyse).



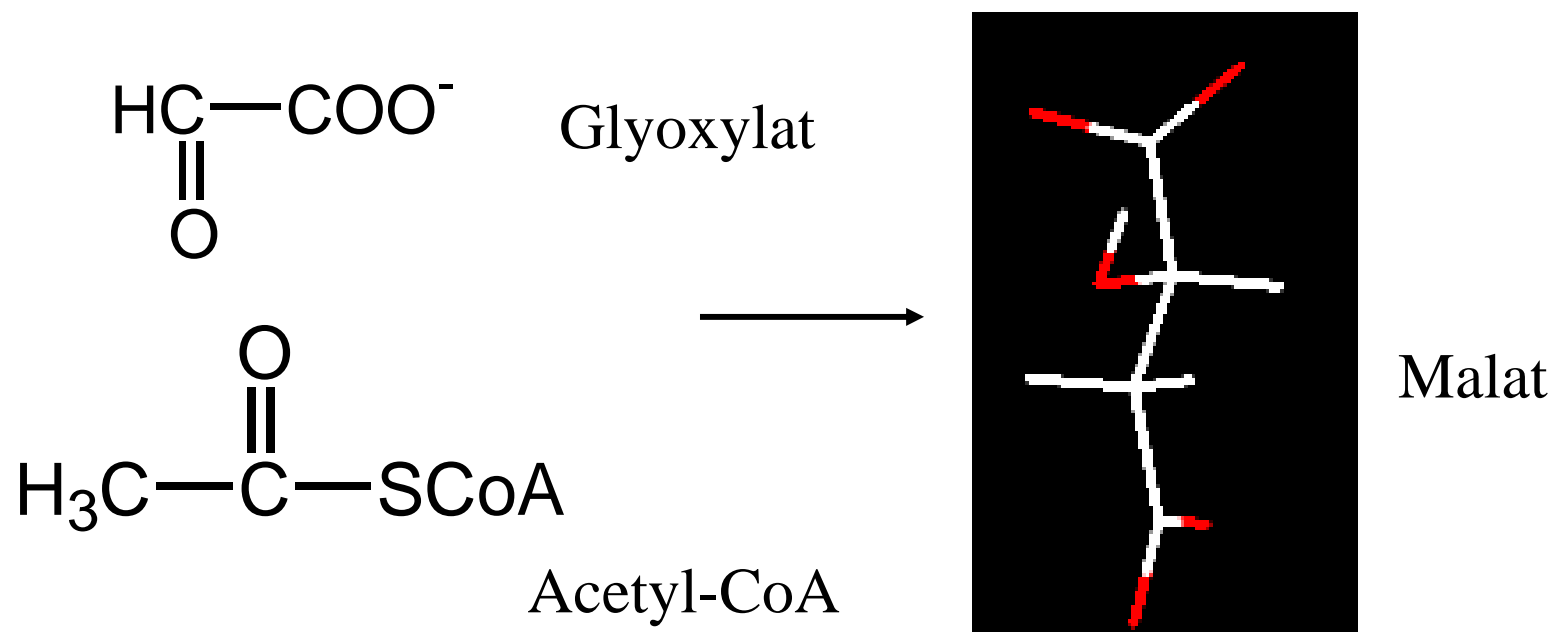
Glyoxylat-Cyclus 4. Reaktion: Malat-Synthase



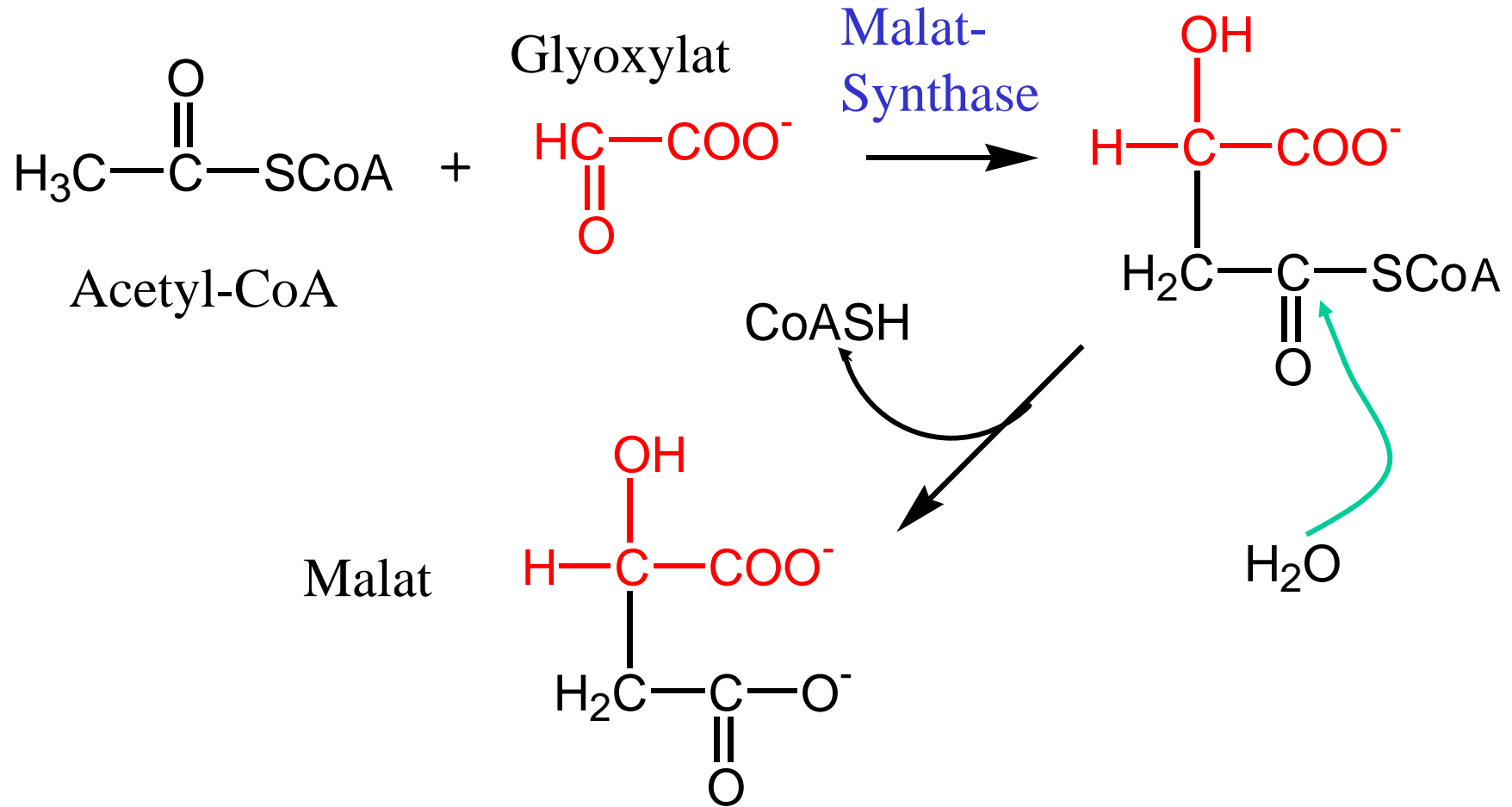
Enzym: Transferase (Glyoxylat-Transacetylase)

Malat Synthase (E.C. 2.3.3.9.)

Enzym kommt nur in Mikroben und Pflanzen vor,
die auf C_2 -Verbindungen wachsen können



Das Glyoxylat wird also zum zweiten Akzeptor für ein weiteres Acetyl-CoA, das in den Cyclus eintritt.



Glyoxylat-Cyclus

5. Reaktion: Malat-Dehydrogenase

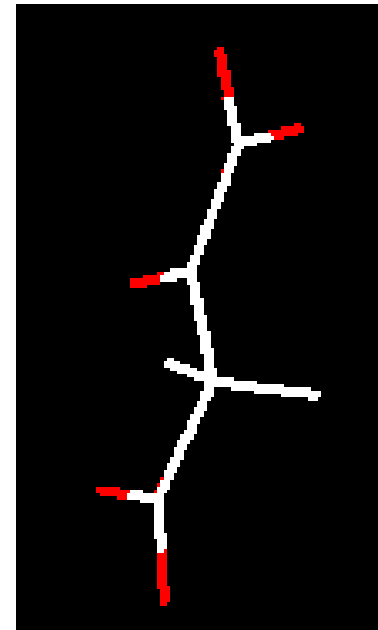
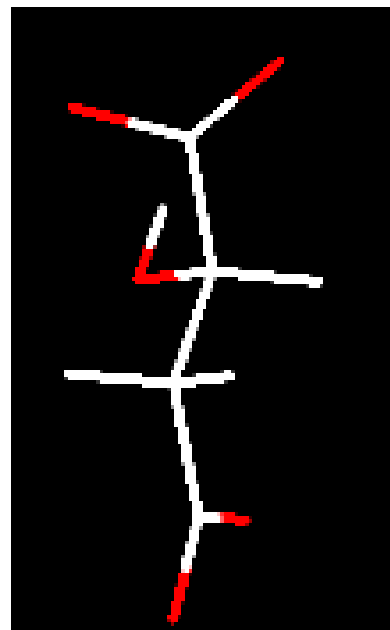


Enzym: Oxidoreductase

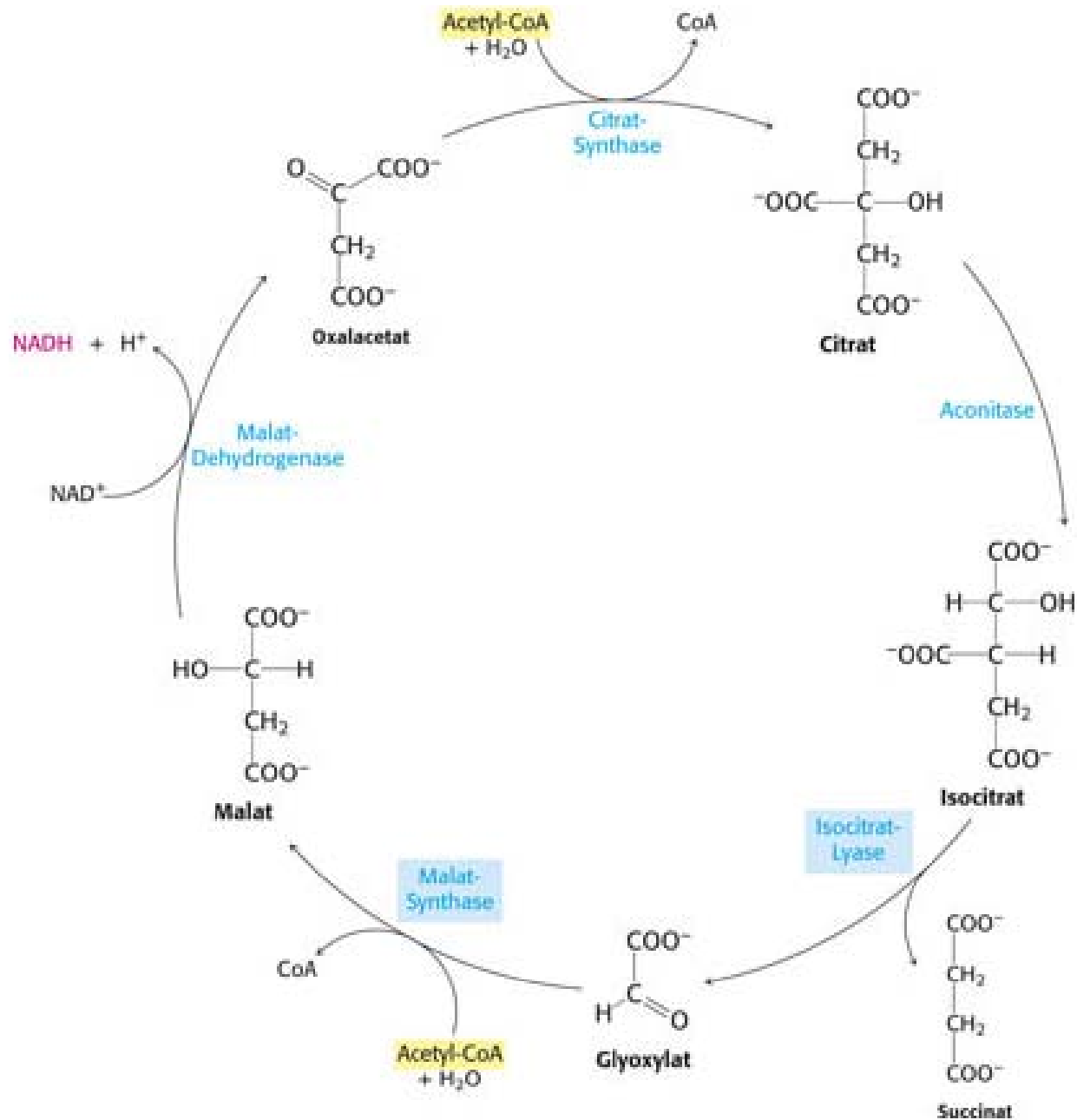
Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)

Lokalisation: Glyoxysomen; andere biochemische Eigenschaften als das Enzym des Citrat-Cyclus

Malat



Oxalacetat



Summengleichung für den Glyoxylat-Cyclus:



Der Glyoxylat-Cyclus ist also jener Cyclus, mit dem die Biosynthese komplexer Moleküle ausgehend von C₂-Einheiten beginnt, und Succinat ist das unmittelbare Produkt, von dem aus andere Verbindungen synthetisiert werden.

Für einen Organismus, der auf C₂-Substrate angewiesen ist, ist der **Gluconeogenese-Weg** (siehe Einheit 9), die Zuckersynthese aus Succinat, äußerst wichtig. Von der Hexose ausgehend, stehen der Zelle dann alle anderen Synthesewege offen. In Organismen ohne Glyoxylat-Cyclus (z.B. Mensch) ist eine Gluconeogenese nur aus Substraten mit mindestens 3 Kohlenstoffatomen (z.B. Pyruvat, Lactat, Alanin) möglich (siehe Einheit 9).

Der Glyoxylat-Cyclus ermöglicht es also Organismen aus Fetten Zucker zu synthetisieren, weil Acetyl-CoA das Endprodukt des Fettsäureabbaus ist.

Die Bedeutung des Glyoxylat-Cyclus für die Gluconeogenese aus C₂-Verbindungen oder Fettsäuren. Dieser Stoffwechselweg umfasst Reaktionsfolgen, die in Pflanzenzellen in den Fettkörpern, den Glyoxysomen, den Mitochondrien und dem Cytoplasma lokalisiert sind.

