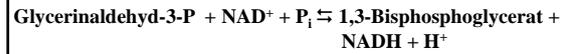


BIOCHEMIE des Stoffwechsels (772.113)

5. Einheit

Glycolyse (2)

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

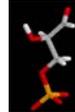


Enzym: Oxidoreductase

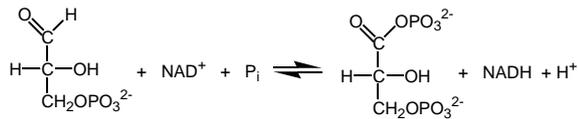
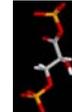
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
(E.C. 1.2.1.12)

Tetramer 4 × 37 kDa (Kaninchenmuskel)

Glycerinaldehyd-3-P



1,3-Bisphosphoglycerat



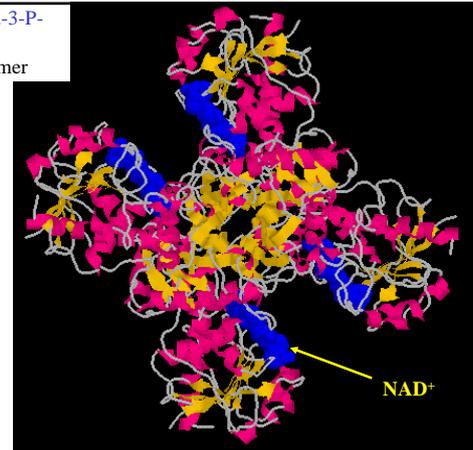
Aldehydoxidation: stark exergonisch

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

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

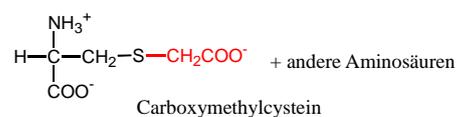
$$\Delta G' = -1,29 \text{ kJ/mol}$$

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

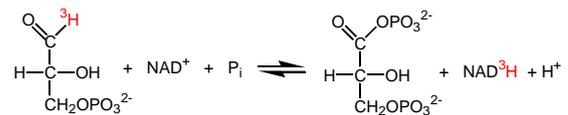


Mechanistische Untersuchungen:

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

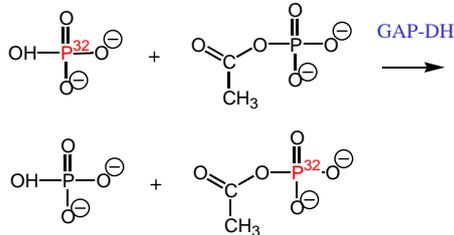


- B. ^3H aus 1- ^3H -GAP wird durch Glycerinaldehyd-3-P-DH auf NAD^+ übertragen (→ Reaktion verläuft über direkte Hydrid-Übertragung).



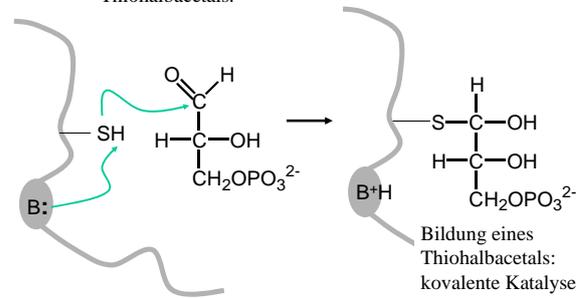
Mechanistische Untersuchungen:

- C. Die GAP-DH katalysiert (reversible) Isotopenaustauschreaktion von ^{32}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).



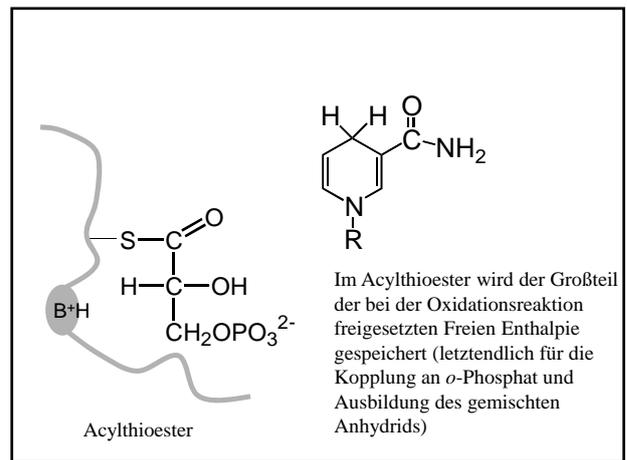
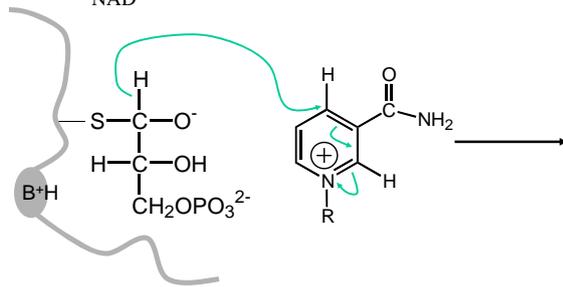
Reaktionsmechanismus

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

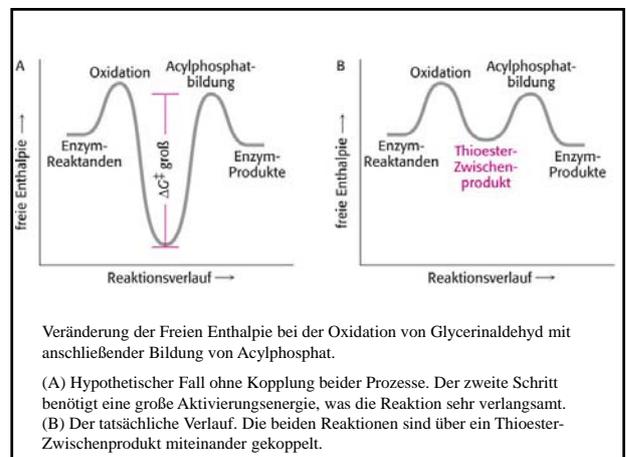
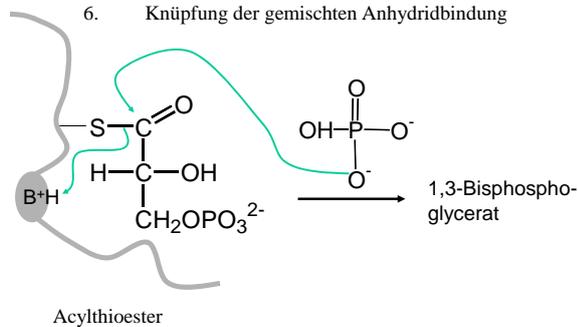


Reaktionsmechanismus

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

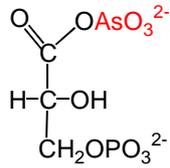


4. NAD^+ verdrängt NADH
5. Nucleophiler Angriff von P_i an das Thioester-Zwischenprodukt
6. Knüpfung der gemischten Anhydridbindung



Arsenat entkoppelt die Oxidationsreaktion von der Phosphorylierungsreaktion:

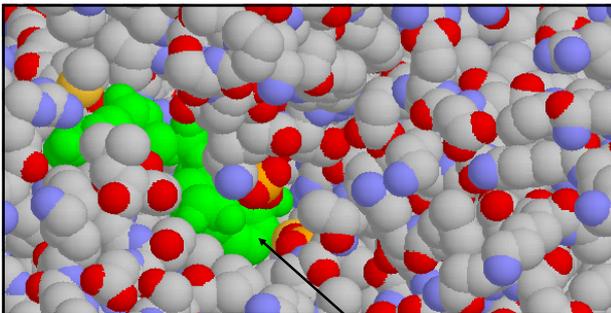
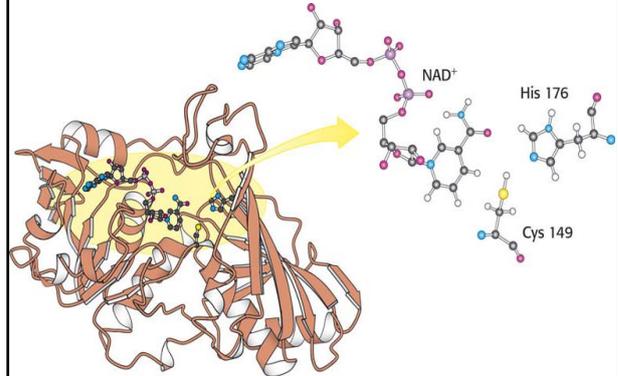
Arsenat (AsO_4^{3-}) ist anionisches Analogon zu Phosphat. Es reagiert mit **GAP-DH** unter Bildung von 1-Arseno-3-Phosphoglycerat:



Acyarsenate 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.

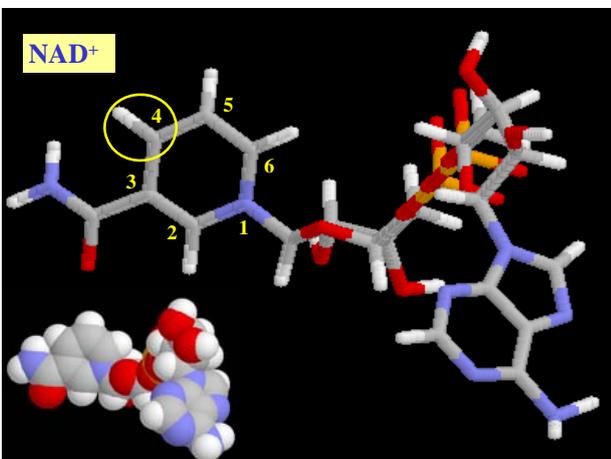
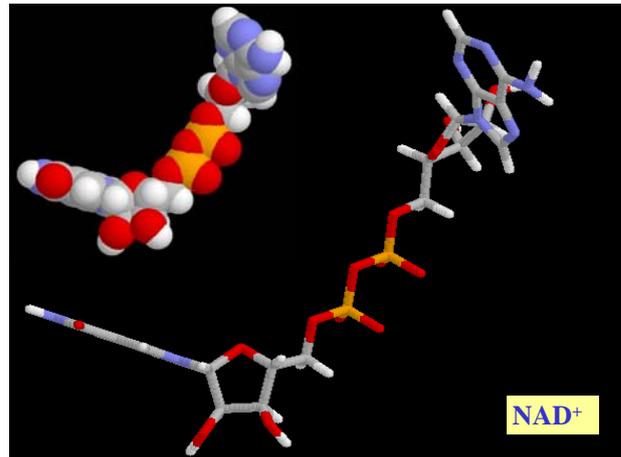
Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase (Mensch): Tetramer

Hier ist die Struktur eines Monomers dargestellt.



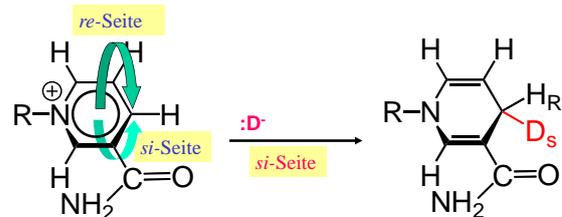
Blick von außen auf NAD^+ -Bindungsstelle

NAD^+



Markierungsversuche mit Deuterium:

GAP-DH überträgt Hydrid-Ion stets auf die *si*-Seite des Nicotinamidringes von 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



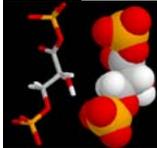
Enzym: Phosphotransferase

Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3)

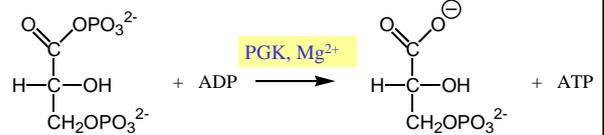
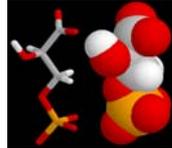
Monomer 64 kDa (Kaninchenmuskel)

Cofactor: Mg^{2+}

1,3-Bisphosphoglycerat

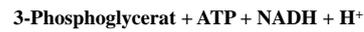
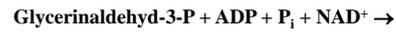


3-Phosphoglycerat



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

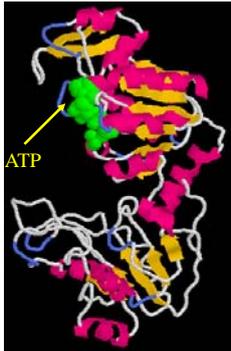
Reaktion 6 und 7 der Glycolyse sind gekoppelt (1,3-Bisphosphoglycerat als Intermediat):



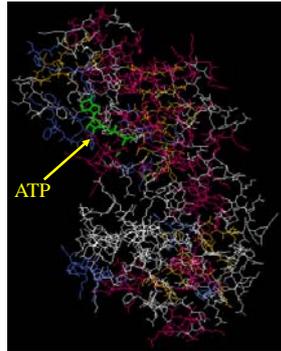
$$\Delta G_{6+7}^{\ominus'} = -12,6 \text{ kJ/mol}$$

SUBSTRATKETTENPHOSPHORYLIERUNG

Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe



Typische (zweilappige) Domänenstruktur (vgl. Hexokinase)

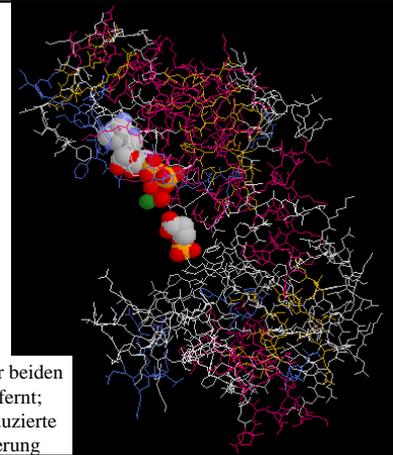


PGK-Komplex mit ATP und 1,3-BPG

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

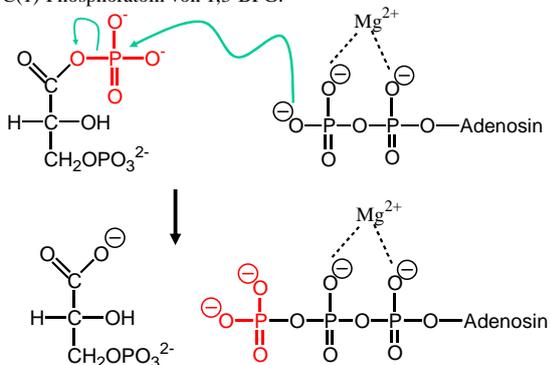
Domäne 2:
Bindungsstelle für 1,3-BPG

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 Glycolyse:

Synthese von 2,3-Bisphosphoglycerat in Erythrocyten

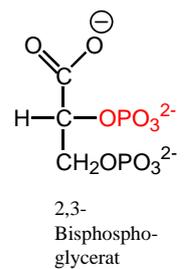
Glycerinaldehyd-3-Phosphat

GAP-DH \updownarrow
1,3-Bisphosphoglycerat

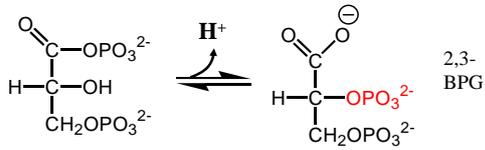
PGK \updownarrow
3-Phosphoglycerat

PGM \updownarrow
2-Phosphoglycerat

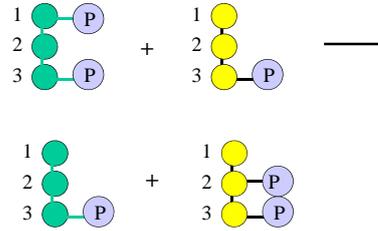
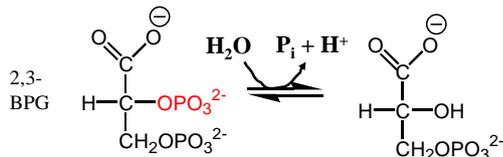
Bisphosphoglycerat-Mutase
 P_i
2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase



Bisphosphoglycerat-Mutase

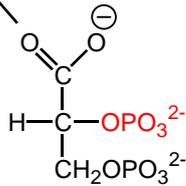


2,3-Bisphosphoglycerat-Phosphatase



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

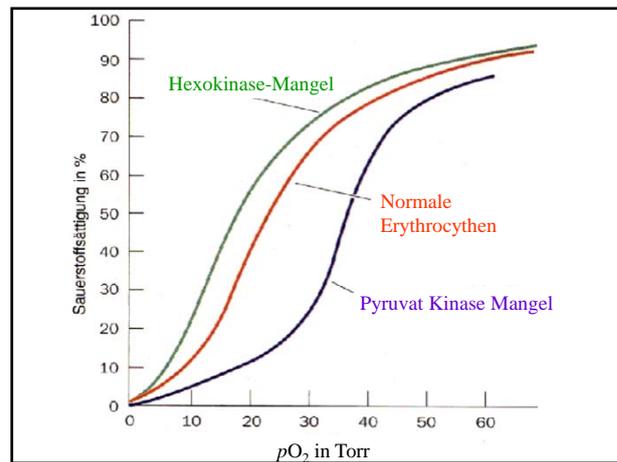


2,3 BPG ist wichtigster allosterischer Effektor des Hämoglobins; Bindung an Desoxyhämoglobin: Erniedrigung der Sauerstoffaffinität

Kopplung Glycolyse und Sauerstoffmetabolismus.

* **Hexokinase-Mangel** → 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 ⇌ 2-Phosphoglycerat

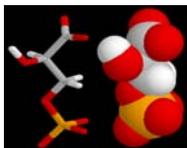
Enzym: Isomerase

Phosphoglycerat-Mutase (EC 5.4.2.1)

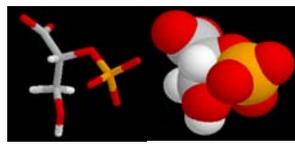
Dimer: 2 × 27 kDa (Kaninchenmuskel)

Cofactor: 2,3 -BPG

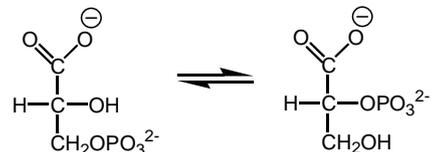
3-Phosphoglycerat



2-Phosphoglycerat



Phosphoglycerat-Mutase



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

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

Typ 1 Mutasen: Hefe, Säugetiere

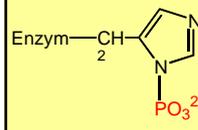
2,3-Bisphosphoglycerat als Cofaktor nötig

Experimentelle Daten:

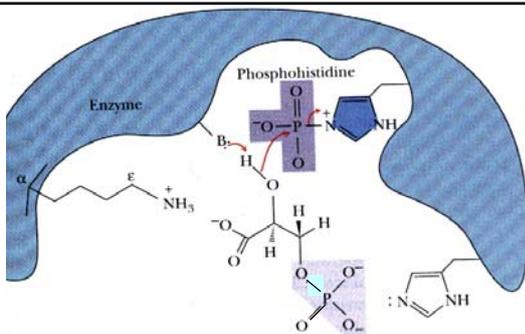
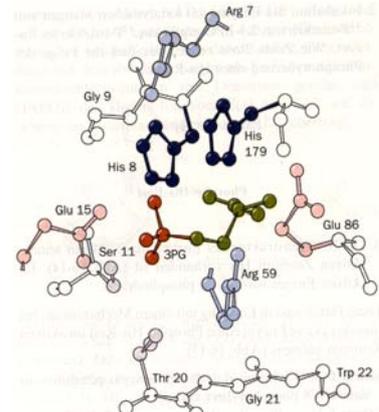
1. Für die Enzymaktivitäten sind katalytische Mengen von 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) erforderlich
2. Inkubation des Enzyms mit katalytischen Mengen von ^{32}P -markiertem 2,3-BPG ergibt ein ^{32}P -markiertes Enzym
3. Phosphoryliert wird ein im aktiven Zentrum sitzendes Histidin (H8)

Aktives Zentrum von Hefe-Phosphoglycerat-Mutase

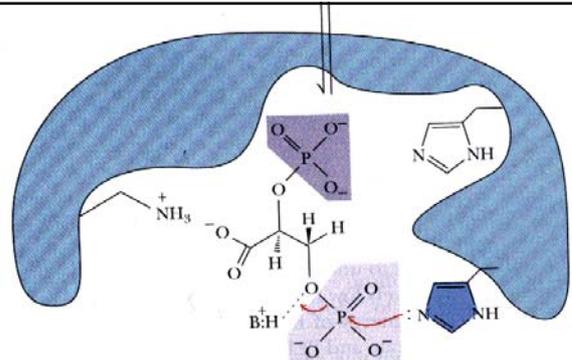
Aktives Enzym: **Histidin 8** ist phosphoryliert



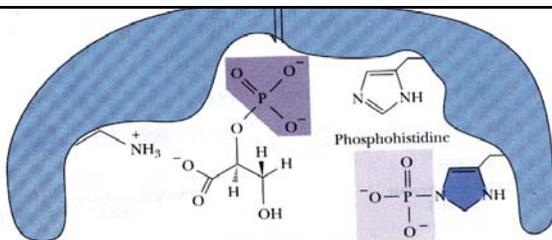
Phospho-His-Rest



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



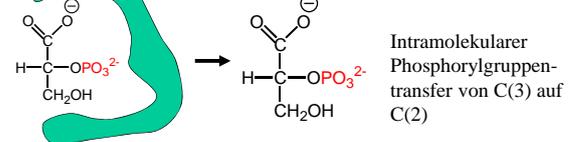
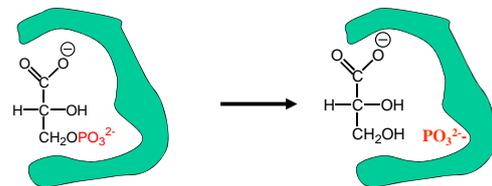
Schritt 3: Zersetzung des Komplexes unter Bildung des Produktes 2-PG, wobei das Enzym regeneriert wird.

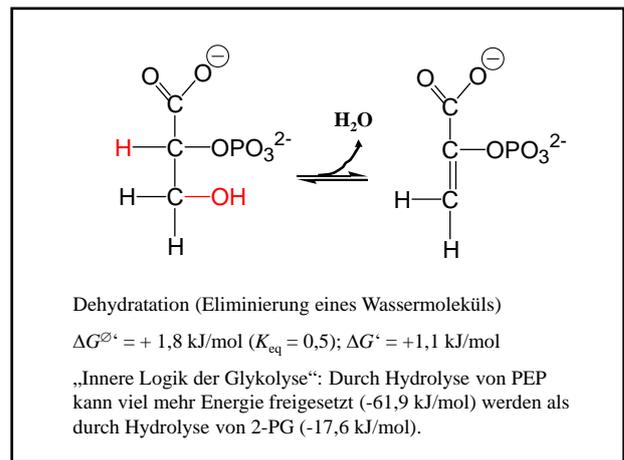
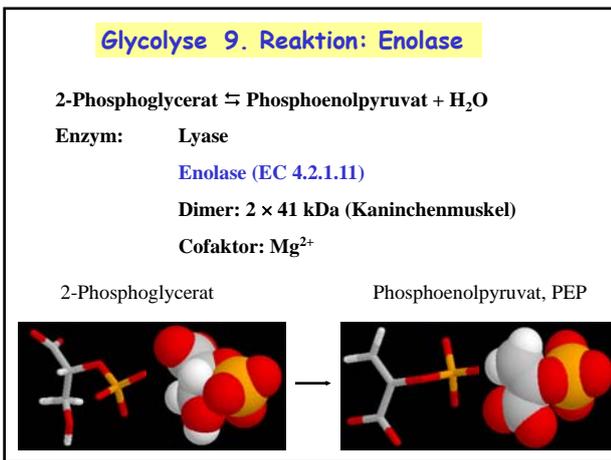
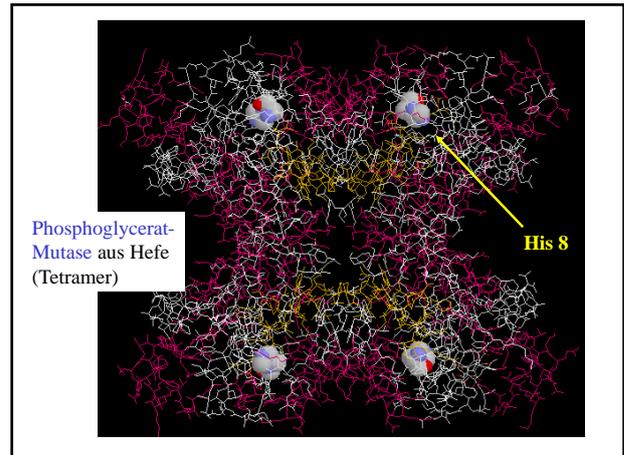
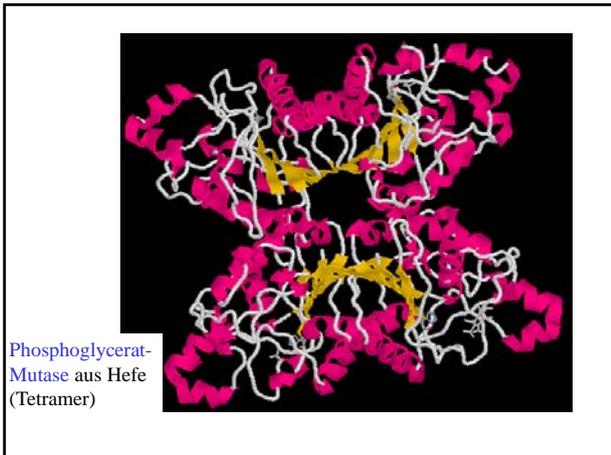
Die ursprüngliche Phosphorylgruppe des 3-PG landet also am C(2) des nächsten 3-PG, das diese Reaktion einght!

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





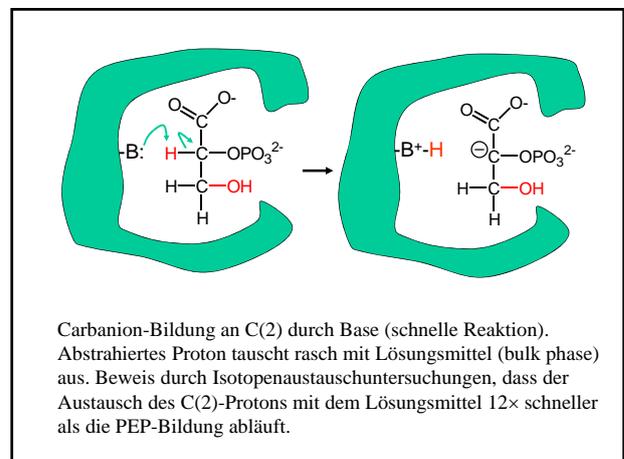
Inhibierung der Enolase durch Fluorid:

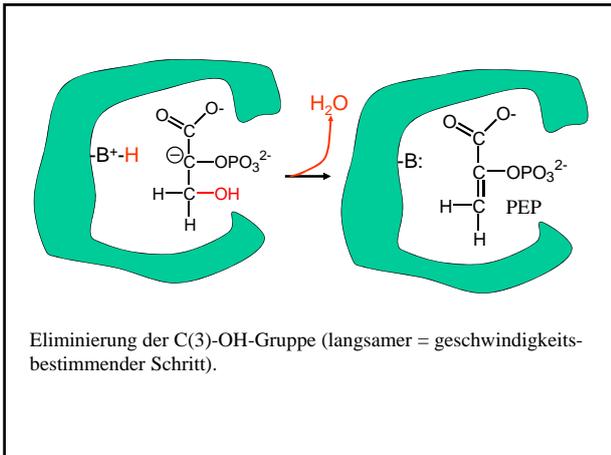
Anwendung in der Kariesprophylaxe. Durch Hemmung der bakterieller Enolase durch Fluorid wird der Abbau von Zucker in organische Säuren durch Bakterien in den Plaques verhindert. Säuren würden den Zahnschmelz [Hydroxyapatit (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)] auflösen. Hemmung der **Enolase**. Konsequenz: Akkumulation von 2-PG und (durch **PG-Mutase** Aktivität) von 3-PG.

[F⁻ wird aber auch in den Apatit des Zahnschmelzes eingebaut; der Ersatz von OH⁻ durch F⁻ 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.





Glycolyse 10 Reaktion: Pyruvat-Kinase

Phosphoenolpyruvat + ADP + H⁺ ⇌ Pyruvat + ATP

Enzym: **Phosphotransferase**
Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40)

Tetramer: 4 × 57 kDa (Kaninchenmuskel)

Cofactor: Mg²⁺, K⁺

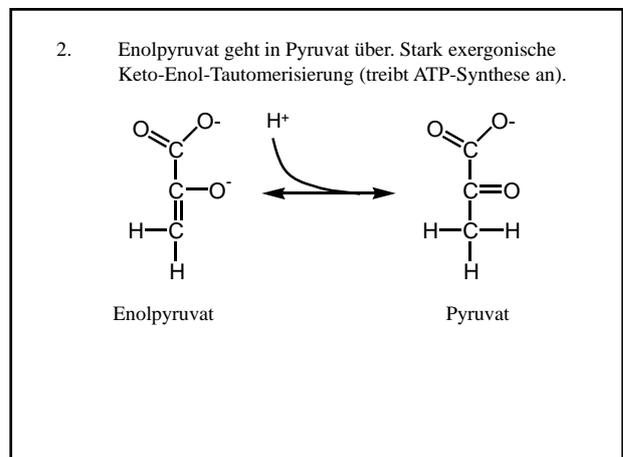
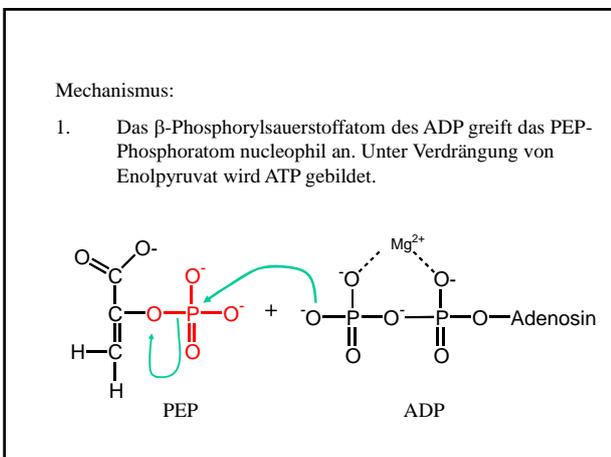
Phosphoenolpyruvat → Pyruvat

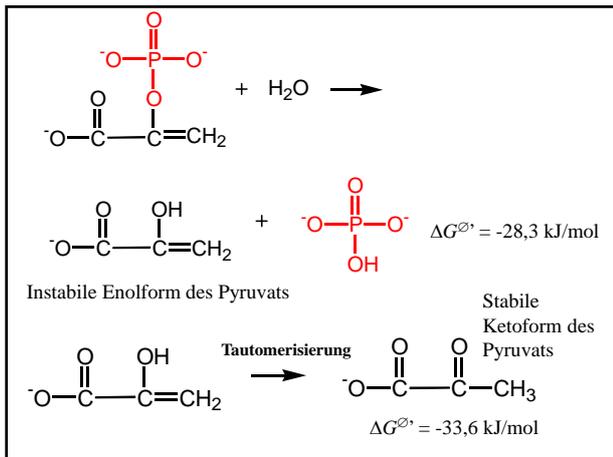
	$\Delta G^{\ominus'}$ (kJ/mol)
Phosphoenolpyruvat ²⁻ + H ₂ O → Pyruvat ⁻ + HPO ₄ ²⁻	-62,2
ADP ³⁻ + HPO ₄ ²⁻ + H ⁺ → ATP ⁴⁻ + H ₂ O	+30,5
Phosphoenolpyruvat²⁻ + ADP³⁻ + H⁺ → Pyruvat⁻ + ATP⁴⁻	-31,7

$K_{eq} = 363000$; $\Delta G'$ (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!



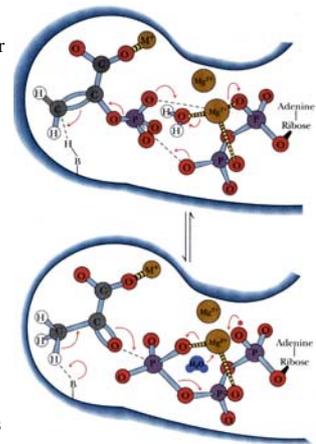


Pyruvat-Kinase-Reaktion:

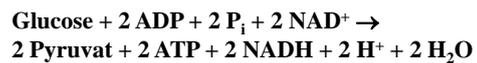
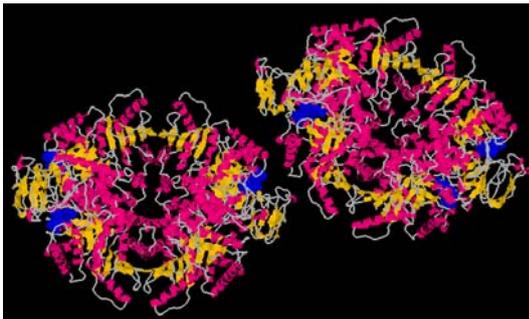
Phosphorylgruppen-Transfer von PEP auf ADP

4 Stufen:

- Koordinativ zu ADP gebundenes Wasser wird durch die Phosphorylgruppe des PEP ersetzt
- Mg²⁺ dissoziiert vom α-P des ADP ab
- Transfer der Phosphorylgruppe
- Protonierung der Enolform 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 β-Barrels mit fast deckungsgleichem Rückgrat

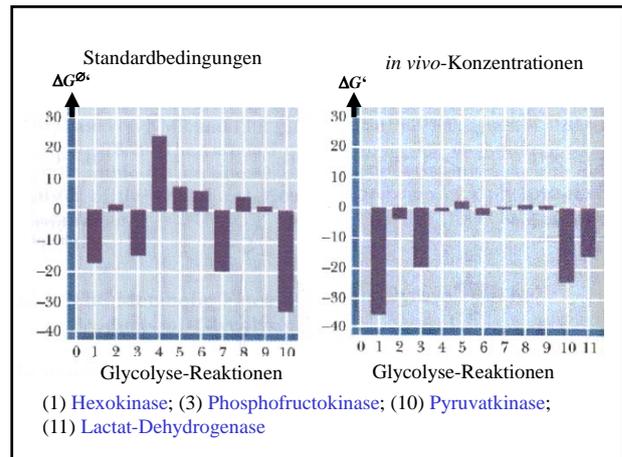
Inhaltsverzeichnis Glycolyse

- Glucosetransport
- Abfolge der chemischen Umwandlungen der Glucose in Pyruvat (10 Reaktionen)
- Mechanismen der einzelnen Reaktionen
- Thermodynamik und Regulation

Reaktionen und Thermodynamik der Glycolyse

Reaktion	Enzym	$\Delta G^{\circ\prime}$ kJ/mol	K_{eq} 25°C	ΔG° kJ/mol
α -D-Glucose + ATP ⁴⁻ ⇌ Glucose-6-Phosphat + ADP ³⁻ + H ⁺	Hexokinase	-16,7	850	-33,9
Glucose-6-Phosphat ⇌ Fructose-6-Phosphat	Glucosephosphat Isomerase	+1,67	0,51	-2,92
Fructose-6-Phosphat + ATP ⁴⁻ ⇌ Fructose-1,6-Bisphosphat + ADP ³⁻ + H ⁺	Phosphofructo- kinase	-14,2	310	-18,8
Fructose-1,6-bisphosphat ⇌ Dihydroxyacetonphosphat + Glycerinaldehyd-3-P	Aldolase	+23,9	6,4 × 10 ⁻⁵	-0,23

Reaktion	Enzym	ΔG° kJ/mol	K_{eq}	ΔG° kJ/mol
Dihydroxyacetonphosphat \rightleftharpoons Glycerinaldehyd-3-P	Triosephosphat- Isomerase	7,56	0,0472	2,41
Glycerinaldehyd-3-P + P_i + NAD^+ \rightleftharpoons 1,3- Bisphosphoglycerat + $NADH + H^+$	Glycerinaldehyd-3-P- Dehydrogenase	+6,3	0,0786	-1,29
1,3-Bisphosphoglycerat + ADP^3 \rightleftharpoons 3-Phosphoglycerat + ATP^4	Phosphoglycerat- Kinase	-18,9	2060	+0,1
3-Phosphoglycerat \rightleftharpoons 2-Phosphoglycerat	Phosphoglycerat- Mutase	+4,4	0,169	+0,83
2-Phosphoglycerat \rightleftharpoons Phosphoenolpyruvat + H_2O	Enolase	+1,8	0,483	+1,1
Phosphoenolpyruvat + $ADP^3 + H^+$ \rightleftharpoons Pyruvat + ATP^4	Pyruvat- kinase	-31,7	$3,63 \times 10^5$	-23
Pyruvat + $NADH + H^+$ \rightleftharpoons Lactat + NAD^+	Lactat- Dehydrogenase	-25,2	$2,63 \times 10^4$	-14,8



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.

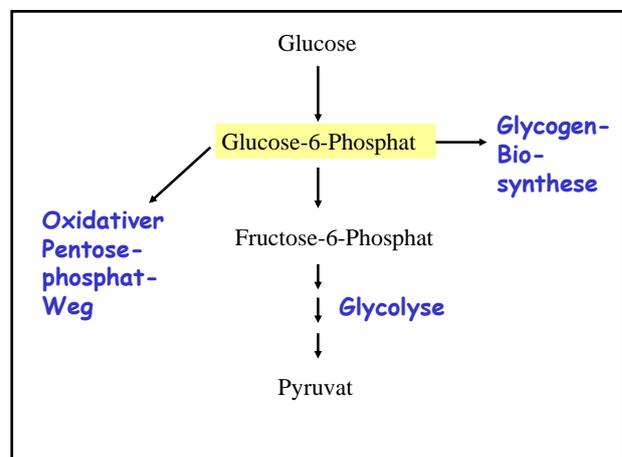
Die Aufgabe der **Glucokinase** besteht darin, Glucose-6-phosphat für die Synthese von Glycogen zu liefern, einer Glucose-Speicherform. Die Expression von **Glucokinase** wird durch Insulinausschüttung gesteigert.

Das eigentliche Schrittmachenzym 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**).

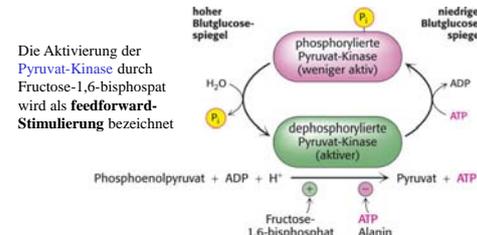
L-Typ (Isoform): Leber; M-Typ (Isoform): Muskel, Gehirn.

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 Ca^{2+} führt zur Phosphorylierung der **Pyruvat-Kinase**.



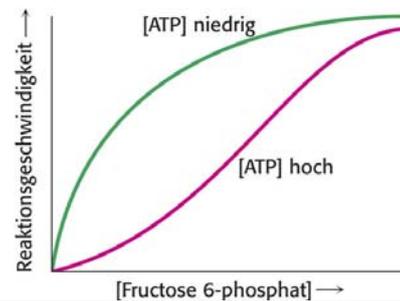
Phosphofruktokinase

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 verbunden 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.

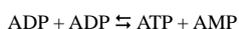


ATP, ADP und AMP modulieren also die Aktivität des Schrittmacher-Enzyms **Phosphofruktokinase** (PFK):

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:



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

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: $[\text{ATP}] = 1850 \mu\text{M}$, $[\text{ADP}] = 145 \mu\text{M}$, $[\text{AMP}] = 5 \mu\text{M}$. Gesamtadenylatkonzentration: $2000 \mu\text{M}$

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

$$\begin{aligned} \text{ATP: } 8\% \text{ hydrolysiert: } & [\text{ATP}] = 1850(0,92) = 1702 \mu\text{M} \\ & [\text{AMP}] + [\text{ADP}] = 2000 - 1702 = 298 \mu\text{M} \\ & [\text{AMP}] = 298 \mu\text{M} - [\text{ADP}] \end{aligned}$$

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

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

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)

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

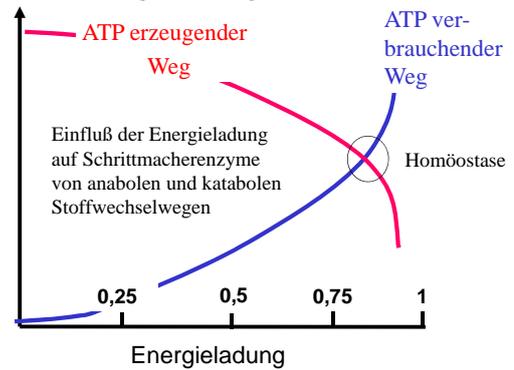
Energieladung = 0 nur AMP

Energieladung = 1 nur ATP

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

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

Relative Reaktionsgeschwindigkeit

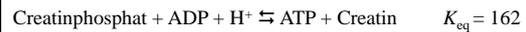


Katabole Stoffwechselwege werden durch eine hohe Energieladung gehemmt, **anabole Stoffwechselwege** (verbrauchen ATP) werden dagegen angeregt!
Die Energieladung einer Zelle ist gepuffert.

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:

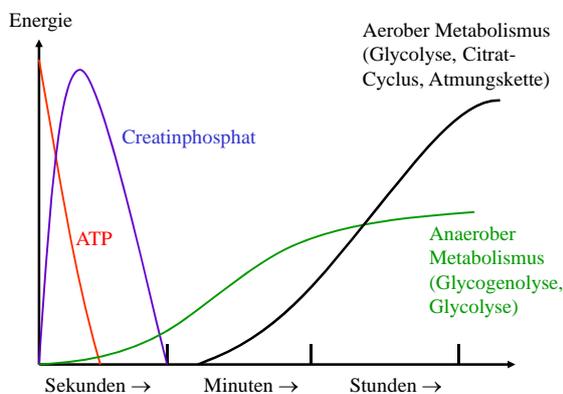
$$[\text{ATP}] = 4 \text{ mM}, [\text{ADP}] = 0,013 \text{ mM}, [\text{Creatinphosphat}] = 25 \text{ mM}, [\text{Creatin}] = 13 \text{ mM}$$

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



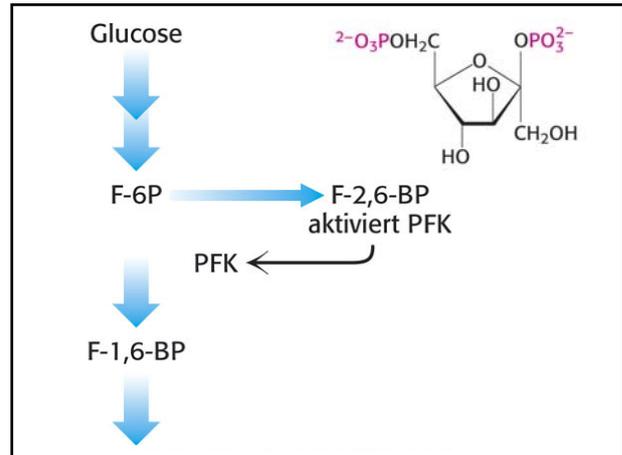
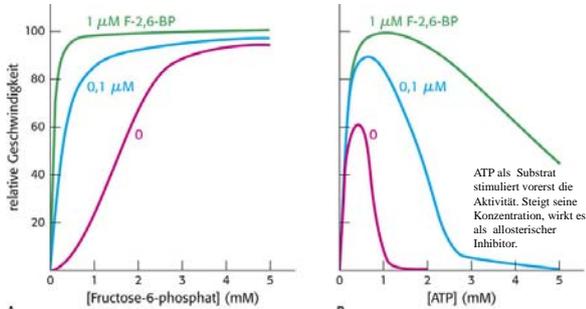
Da die Glycolyse auch Moleküle produziert, die in Biosynthesen verwendet werden, wird **Phosphofruktokinase** auch durch andere, nicht in der Glycolyse vorkommende Metaboliten reguliert.

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

β-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 μM) wird die sigmoidale Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration hyperbolisch (A). Fructose-2,6-bisphosphat hebt den Hemmeffekt von ATP auf.



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

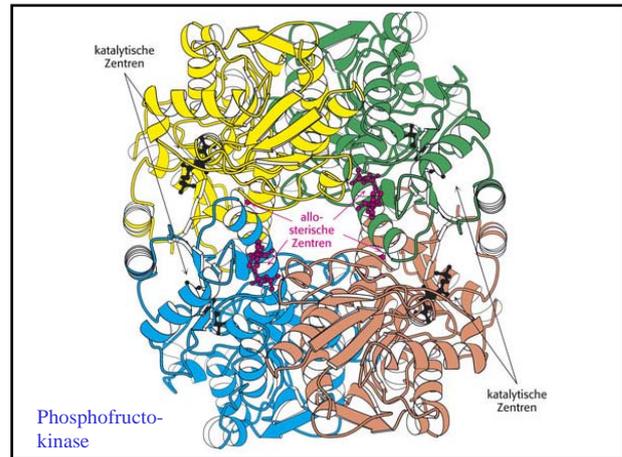
Die allosterischen Eigenschaften der Phosphofruktokinase lassen sich durch das **Symmetrie-Modell der Allosterie** erklären:

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 koordinierten Reaktion. Das Holoenzym liegt entweder in *R* oder in *T* vor.



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^+

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

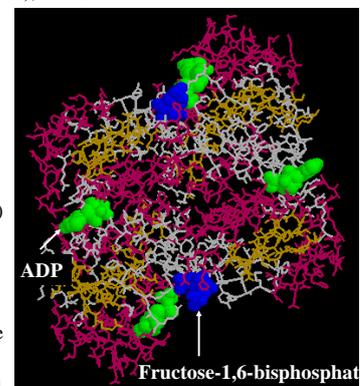
Das Enzym kann in 2 Konformationen, die miteinander im Gleichgewicht stehen, vorliegen: $R \rightleftharpoons T$

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).



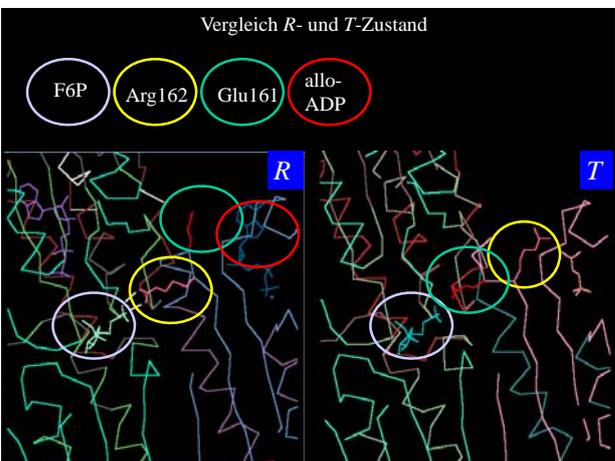
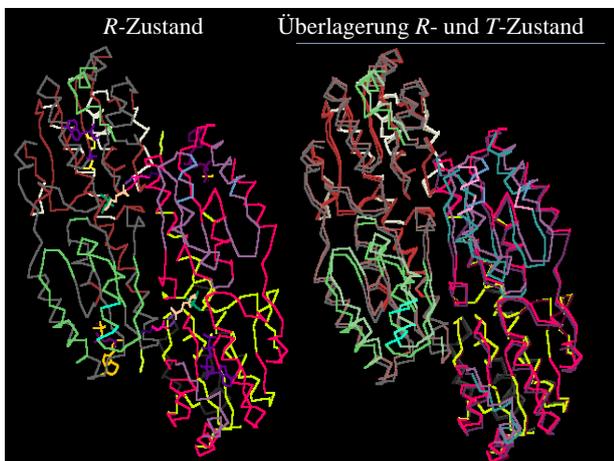
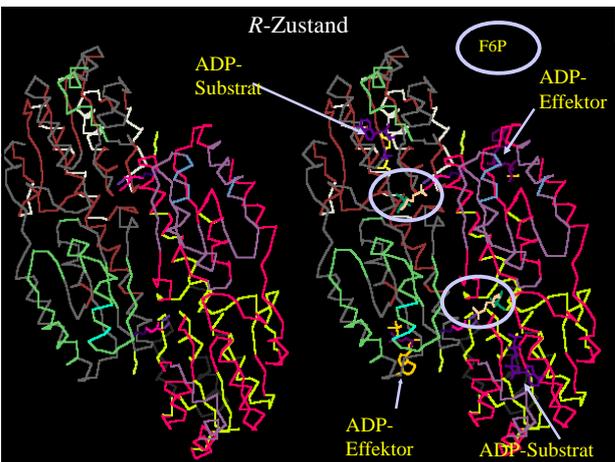
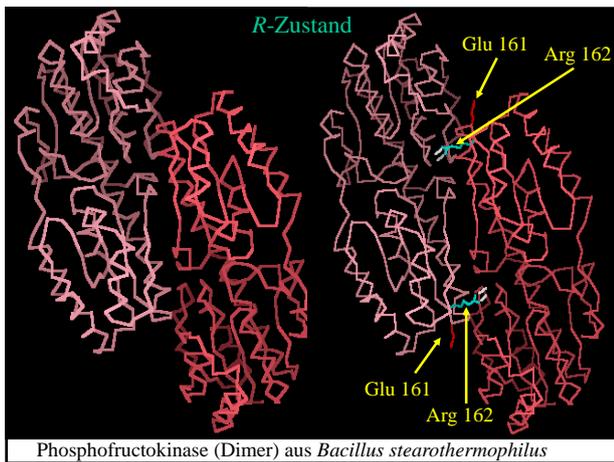
Fructose-6-Phosphat:	Hohe Affinität für den <i>R</i> -Zustand, niedrige Affinität für den <i>T</i> -Zustand. Bindungsstelle: Substratbindungsstelle <u>Homotropischer Effekt</u> : Binden von F6P erhöht die Affinität von weiteren F6P Molekülen.
ATP, Reaktionsprodukt ADP:	Substratbindungsstelle
AMP, ADP (Aktivatoren):	Allosterische Bindungsstelle <u>Positiver heterotropischer Effekt</u> : Binden von AMP oder ADP verschiebt Gleichgewicht Richtung <i>R</i> -Zustand
ATP, Citrat	Allosterische Bindungsstelle; verschieben Gleichgewicht Richtung <i>T</i> -Zustand; <u>negativer heterotroper Effekt</u>

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:

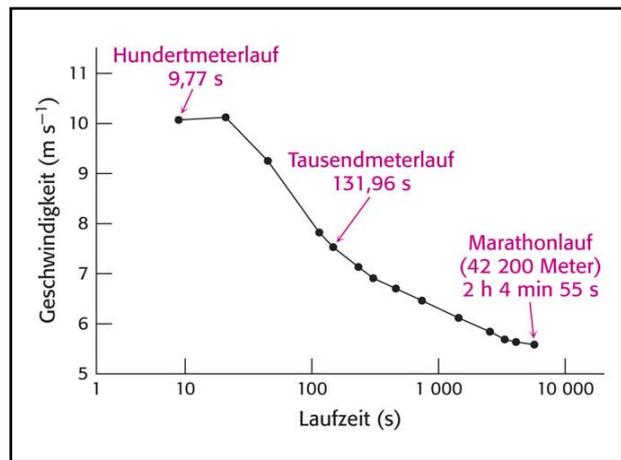
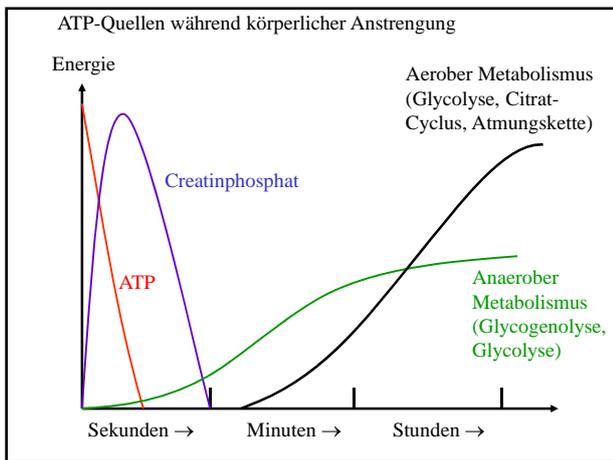
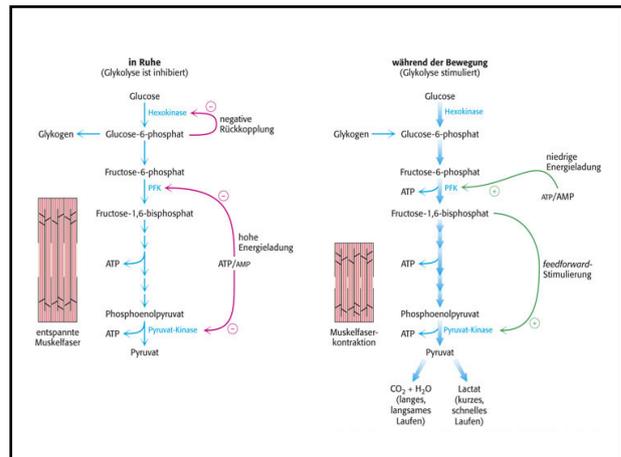
R-Zustand: Arginin (positive Guanidiniumgruppe) ist Teil der Bindungsstelle für F6P (negative Phosphatgruppe)

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



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

Enzym	Inhibitoren	Aktivatoren
Hexokinase	G6P	
Phosphofruktokinase	ATP, Citrat, H ⁺	ADP, AMP, F2,6P, F6P, NH ₄ ⁺ , P _i
Pyruvatkinase	ATP, niedriger Blutglucosespiegel, Anstieg des intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegels (→ Phosphorylierung)	FBP



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 Glycolyse

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:

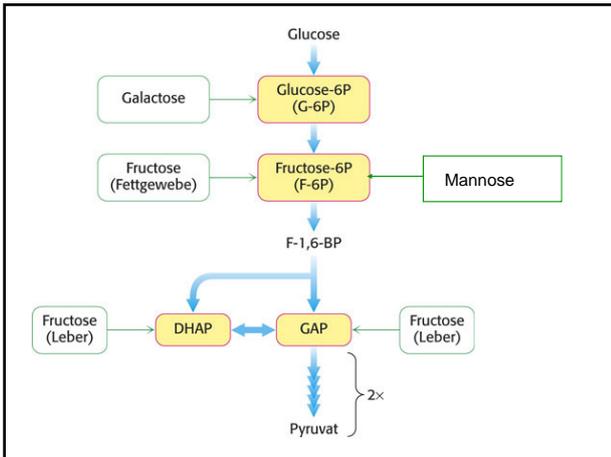
Saccharose (Haushaltszucker): Glucose und Fructose

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.



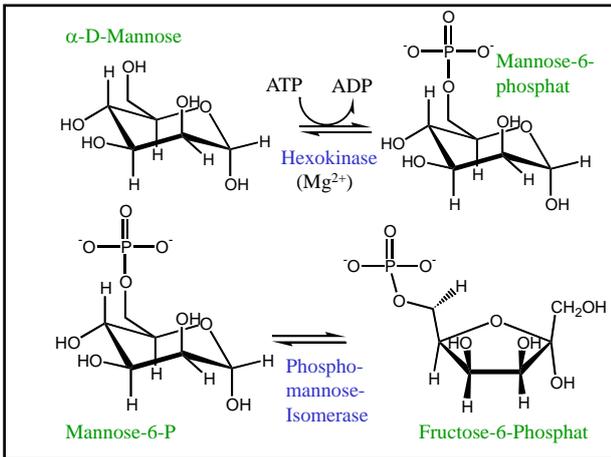
Mannose

Mannose: Verdauung von Glycoproteinen, Glycolipiden und Polysacchariden

α -D-Glucose

α -D-Mannose

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



Galactose

α -D-Glucose

α -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)

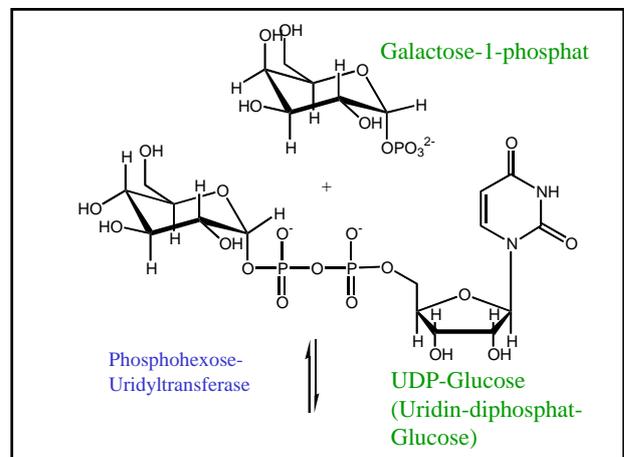
Die Reaktion beginnt mit einer Phosphorylierung der Galactose am C-1, katalysiert durch die **Galactokinase**, einem Leberenzym:

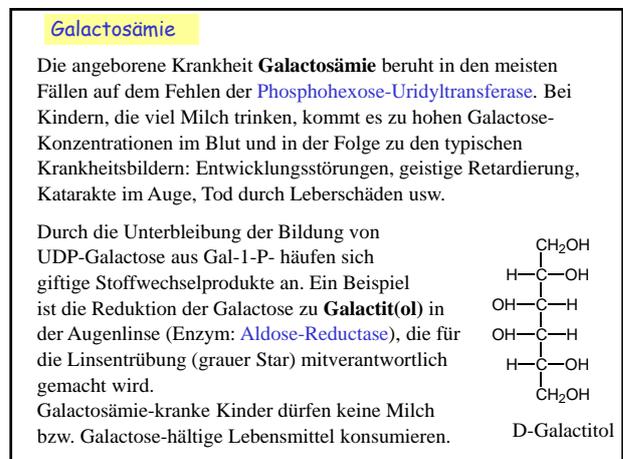
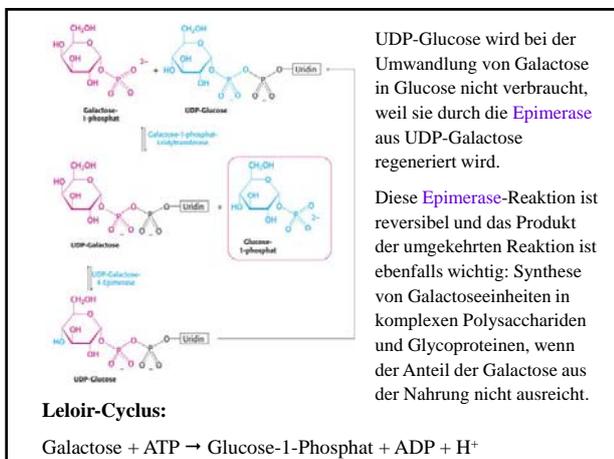
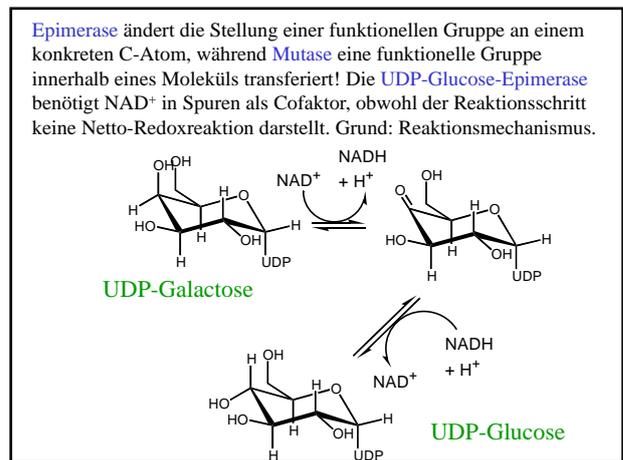
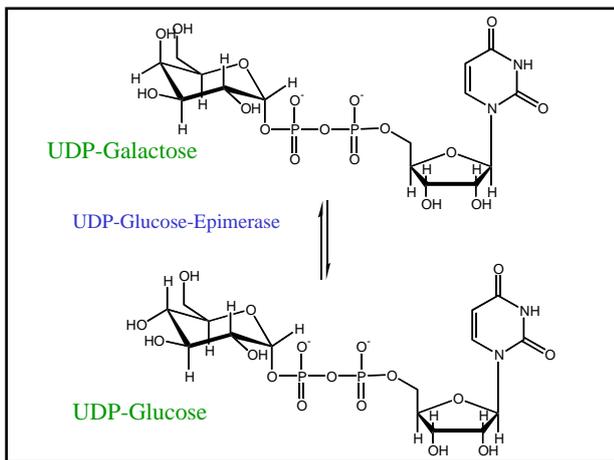
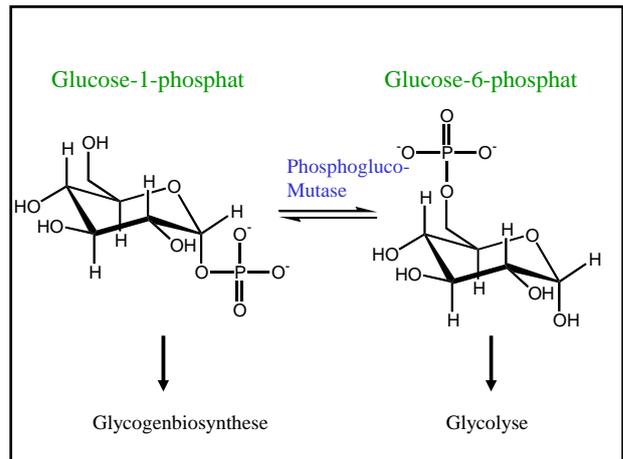
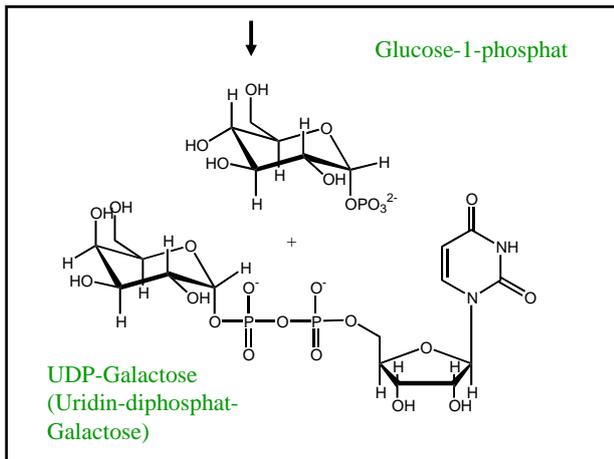
α -D-Galactose

ATP → ADP
Mg²⁺

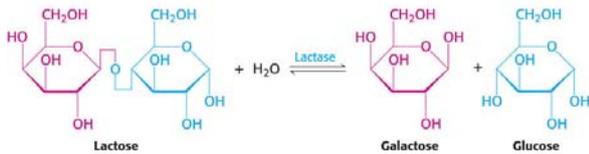
Galactose-1-phosphat

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





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:

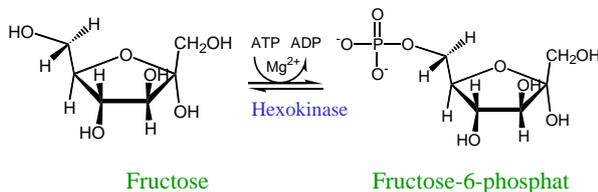


Die Abnahme der **Lactase**-Konzentration beginnt schon bei Kleinkindern nach dem Abstillen und setzt sich im Erwachsenenalter fort. Die Abnahme kann aber je nach Bevölkerungsgruppen unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

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

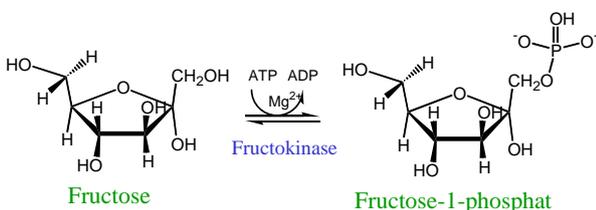
Fructose wird vor allem durch die Aufnahme und Hydrolyse von Saccharose in den Stoffwechsel eingeführt. Sie kann direkt in die Glycolyse eintreten, da die Fructose, ebenso wie Glucose und Mannose, am C-6 durch die **Hexokinase** phosphoryliert werden kann:



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.

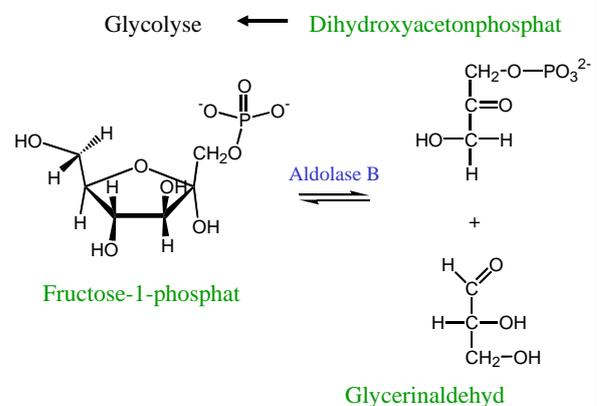
Auch im Muskel ist Glucose der bevorzugte Brennstoff, der durch **Hexokinase** umgesetzt wird. Während Leber und Muskulatur mehr Glucose als Fructose phosphorylieren, erhält das Fettgewebe mehr Fructose als Glucose. Deshalb wird die Entstehung von Fructose-6-phosphat dort nur unwesentlich kompetitiv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

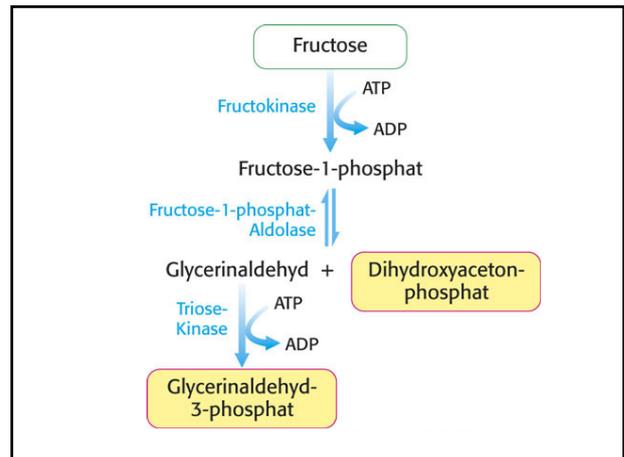
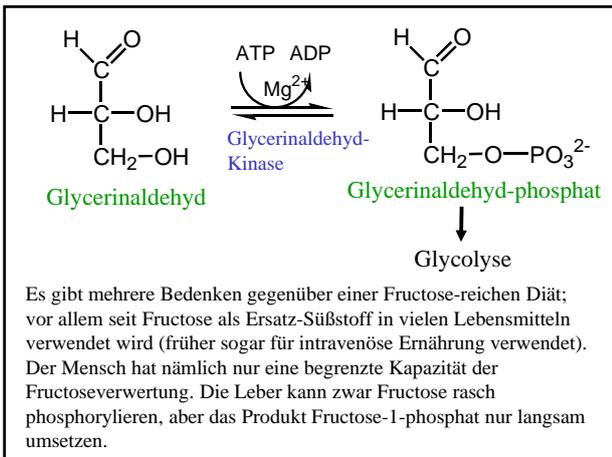
In der Leber von Säugetieren gibt es einen alternativen Weg, bei dem die Phosphorylierung durch das Enzym **Fructokinase** am C-1 erfolgt.



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

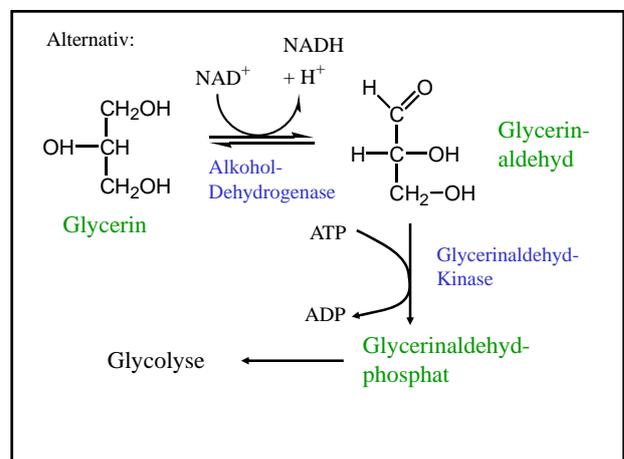
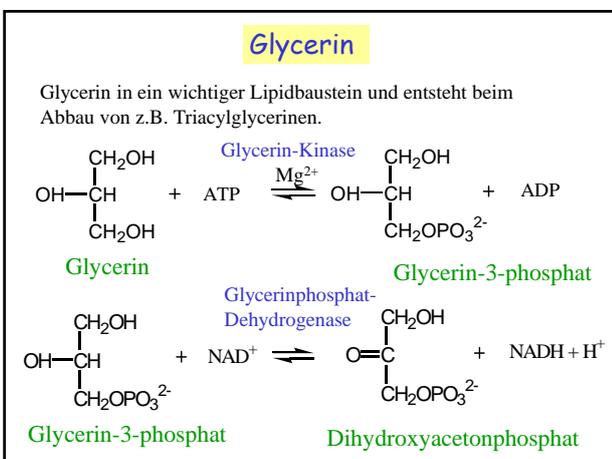
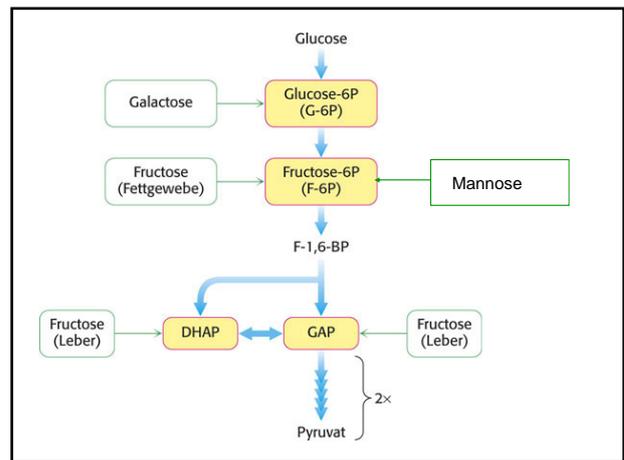
Typ A (Muskel): Spezifisch für Fructose-1,6-bisphosphat
 Typ B (Leber): Verwertet auch Fructose-1-phosphat





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.



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