

BIOCHEMIE des Stoffwechsels (772.113)

7. Einheit

Citrat- und Glyoxylat-Cyclus

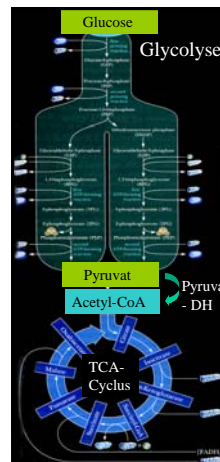
Bei der Umsetzung von Glucose zum Pyruvat (Glycolyse) bleibt der Hauptteil der im Glucosemolekül steckenden Energie ungenutzt. Wird allerdings Sauerstoff zugelassen, so kann die Zelle sämtliche Kohlenstoffatome der Glucose (oder eines anderen Substrats) vollständig zu CO_2 oxidieren und alle Elektronen, 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-Cyclus und Atmungskette.

Citrat-Cyclus

- Allgemeines
- Reaktionsfolge
- Thermodynamik und Regulation
- Amphibole Natur des Citrat-Cyclus
- Anaplerotische Reaktionen

Glyoxylat-Cyclus



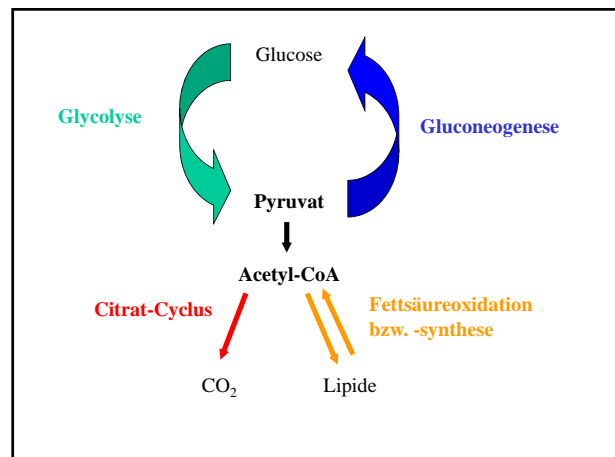
Aerobes Schicksal des Pyruvats: Oxidation von NADH in der Atmungskette der Mitochondrien.

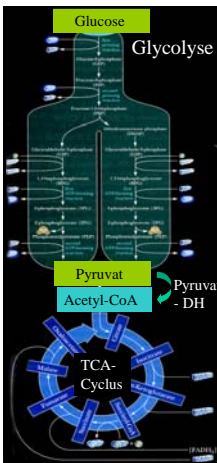
In diesem Fall unterliegt das Pyruvat der enzymatischen Decarboxylierung (**Pyruvat Dehydrogenase**; siehe 6. Einheit) unter Bildung von Acetyl-CoA, das in den sog. Citronensäure-Cyclus (Tricarbonsäure-Cyclus; TCA-Cyclus; Krebs-Cyclus) eingeschleust wird. Dort wird Acetyl-CoA oxidativ formal zu CO_2 abgebaut.

Der TCA-Zyklus ist verantwortlich für den größten Teil der Kohlenhydrat-, Fettsäure- und Aminosäureoxidation.

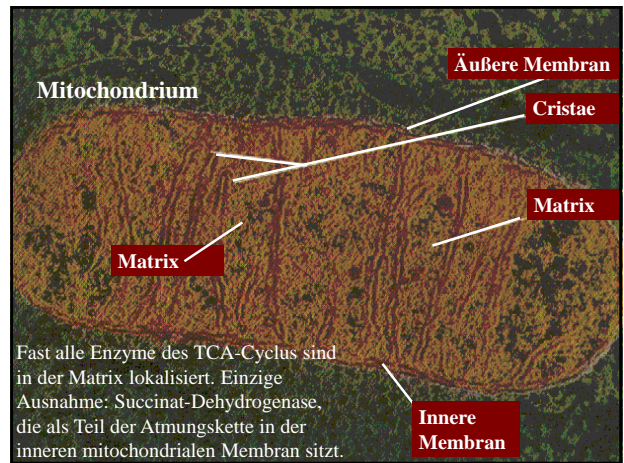
Citrat-Cyclus

Allgemeines

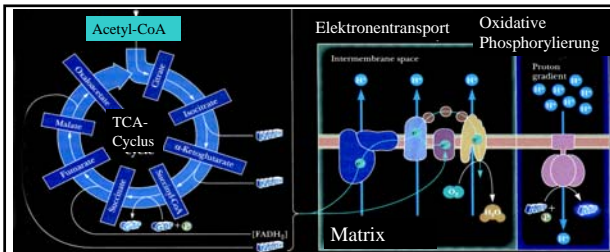




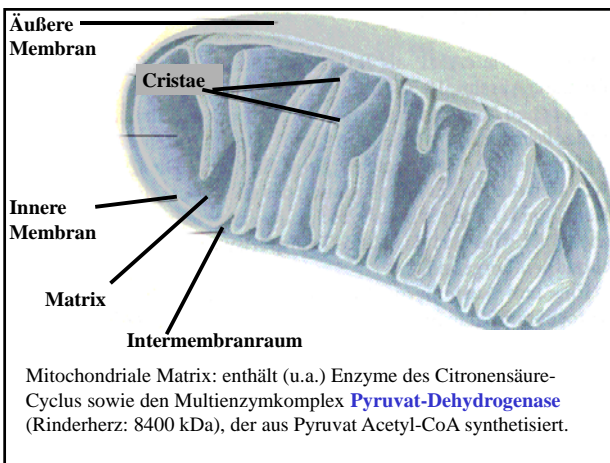
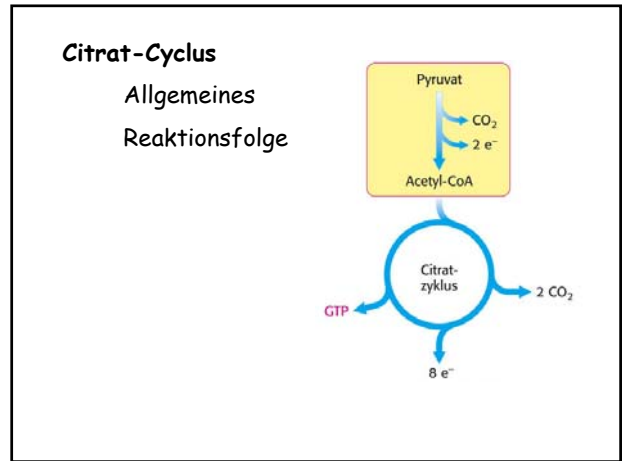
Historisches:
30er Jahre: Succinat, Malat und α -Ketoglutarat werden im Muskelgewebe durch Atmung oxidiert
1935 Albert Szent-Györgyi: Die Zellatmung wird durch katalytische Mengen von Succinat, Fumarat, Malat oder Oxalacetat drastisch beschleunigt. Reaktionsfolge: Succinat \rightarrow Fumarat \rightarrow 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



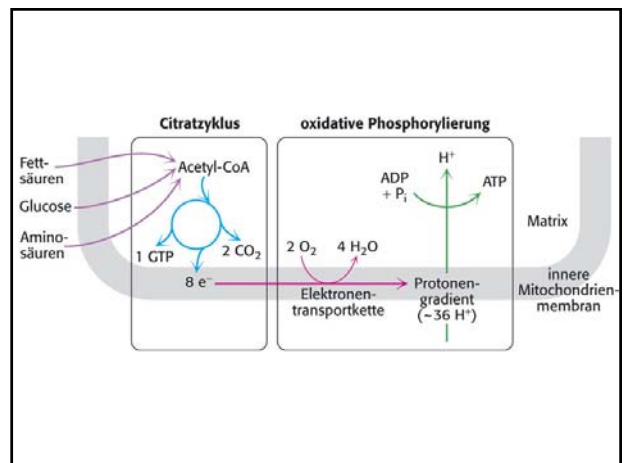
Fast alle Enzyme des TCA-Cyclus sind in der Matrix lokalisiert. Einzige Ausnahme: Succinat-Dehydrogenase, die als Teil der Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran sitzt.



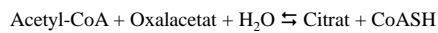
Im Citronensäure-Cyclus werden die (u.a. durch Pyruvat-Dehydrogenase) gebildeten Acetyl-CoA-Einheiten formal zu CO_2 oxidiert. Nettoreaktion:
 $3 \text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{GDP} + \text{Acetyl-CoA} + \text{P}_i + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{GTP} + \text{CoA} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+$
 Die gebildeten Reduktionsäquivalente werden anschließend in der Atmungskette mittels Sauerstoff, O_2 , reoxidiert.



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



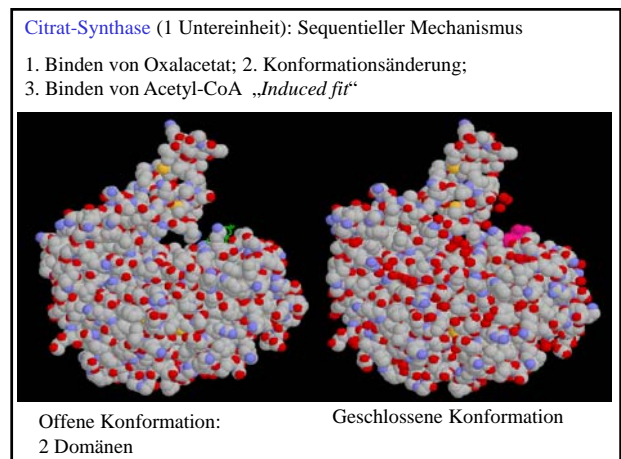
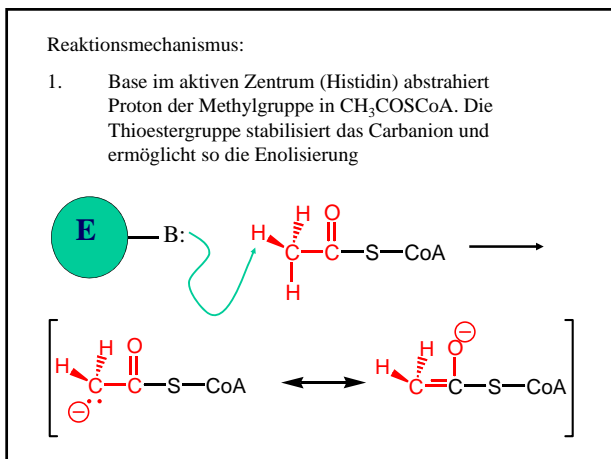
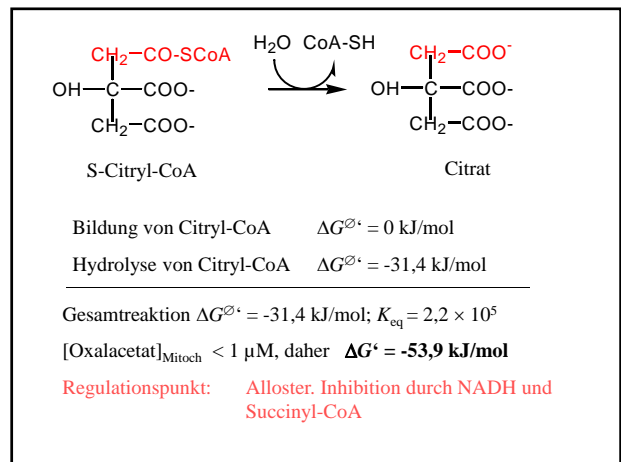
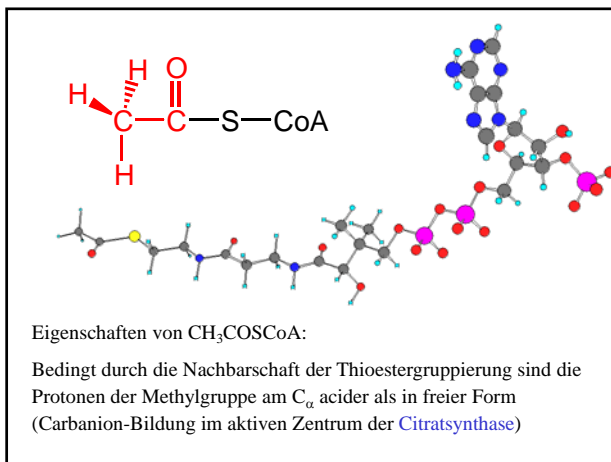
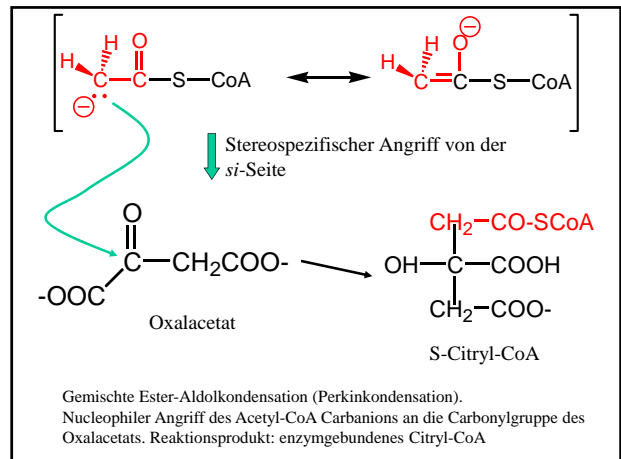
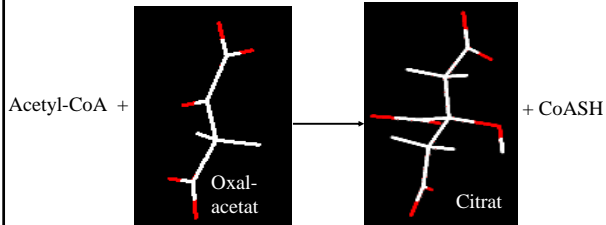
Citrat-Cyclus 1. Reaktion: Citrat-Synthase

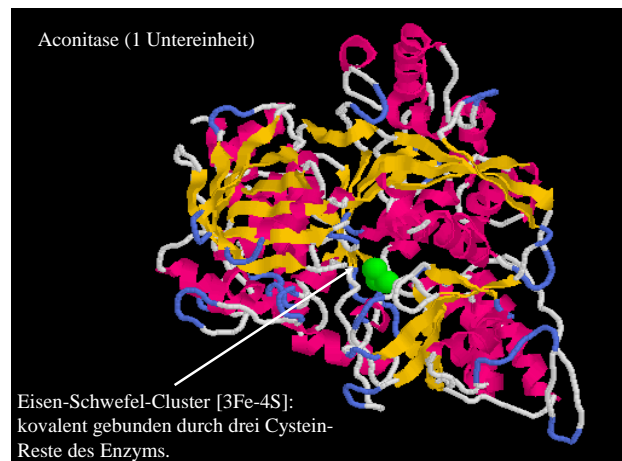
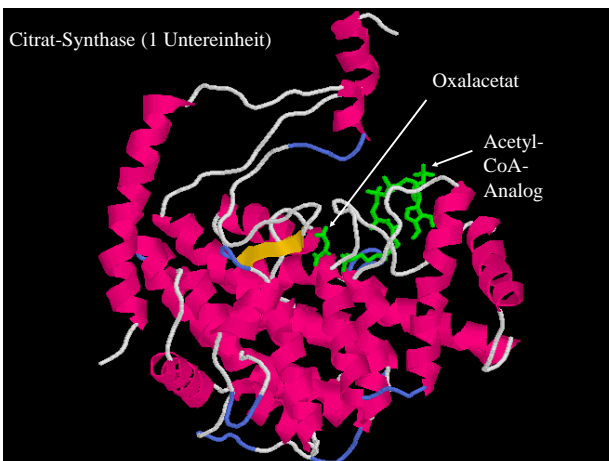
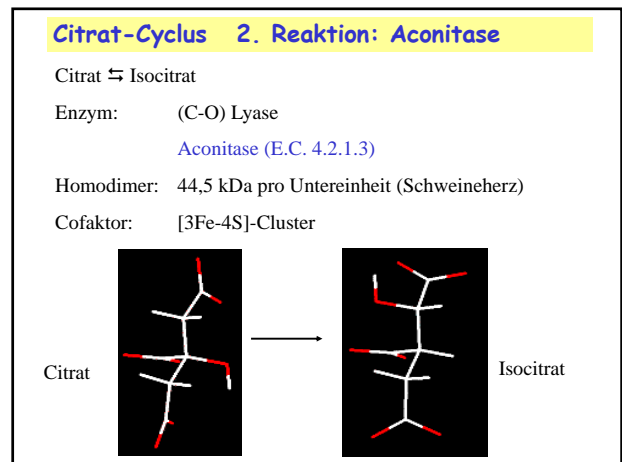
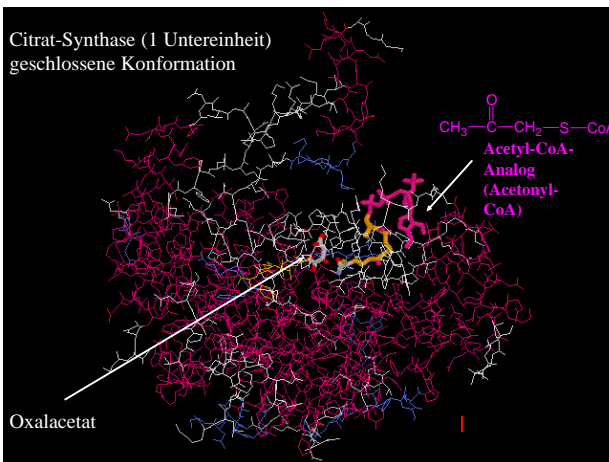
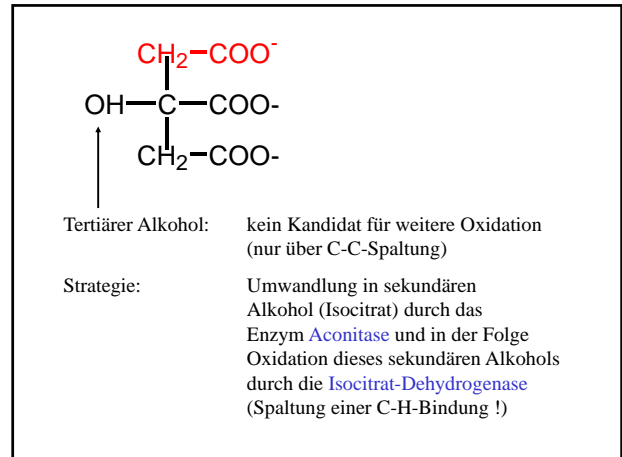
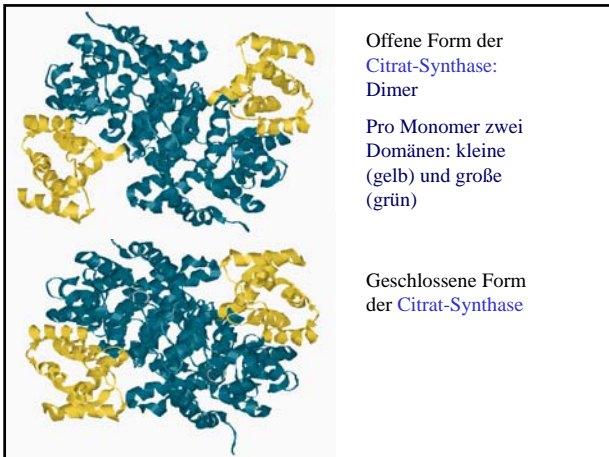


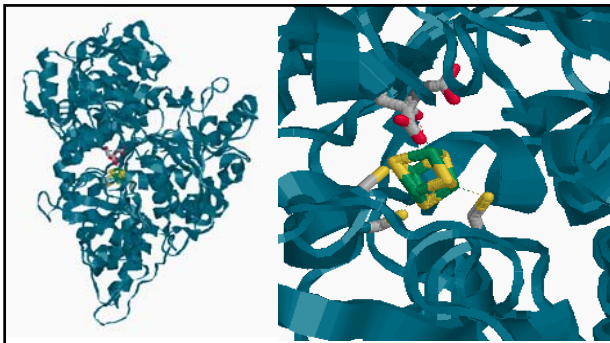
Enzym: (C-C) Lyase

Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7)

Homodimer: 49 kDa pro Untereinheit (Schweineherz)







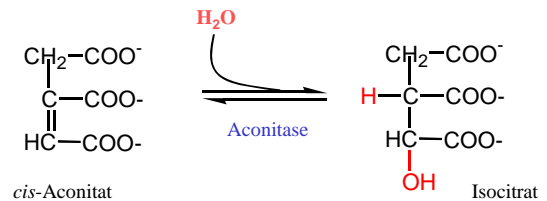
Der 4Fe-4S-Cluster (entsteht aus 3Fe-4S, siehe unten) ist Teil des aktiven Zentrums der **Aconitase**. Ein Eisen-Atom des Clusters bindet eine Carboxyl-Gruppe und Hydroxylgruppe des Substrats Citrat.

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

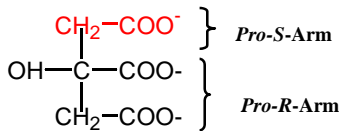
Nichtenzymatische Addition an *cis*-Aconitat würde vier Stereoisomere liefern.

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

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



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



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.

Rolle des Eisen-Schwefel-Clusters in Aconitase?

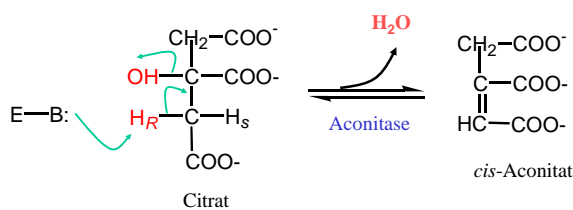
Eisen-Schwefel-Zentren sind oft an Elektronenübertragungsprozessen beteiligt, wo sie als Ein-Elektron-Donoren bzw. -Akzeptoren eingesetzt werden (siehe Einheit 8: Oxidative Phosphorylierung). In Enzymen, wie z.B. der **Aconitase**, können Eisen-Schwefel-Cluster aber auch andere Funktionen ausüben.

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-OH₂⁺, protonieren. Daraus kann ein Wasser-Molekül freigesetzt werden. Starke Säuren sind jedoch mit zellulären Bedingungen schwer vereinbar.

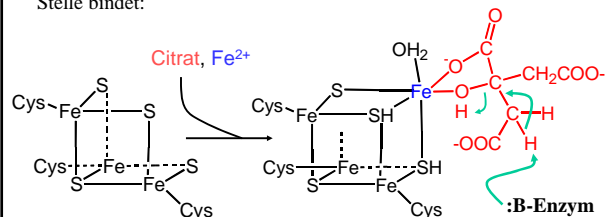
Bildung von *cis*-Aconitat durch Dehydratation:

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.

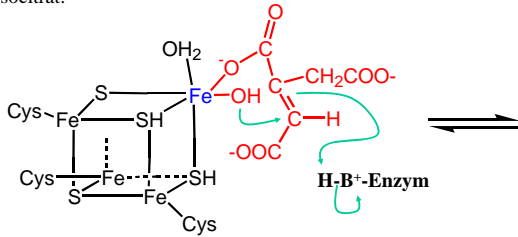


In **Aconitase** wird die Hydroxylgruppe an ein Metall-Ion eines der Eisen-Atome im Eisen-Schwefel-Zentrum koordiniert.

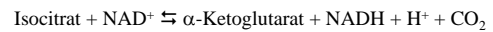
Gereinigte **Aconitase** enthält ein [Fe₃S₄]-Zentrum, in dem eine der vier Eisenpositionen frei ist. Dem Enzym fehlt ein Cystein-Rest, der normalerweise koordinativ an das vierte Eisen binden würde. Das Enzym wird durch Fe²⁺ aktiviert, das an die freie Stelle bindet:



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:



Citrat-Cyclus 3. Reaktion: Isocitrat-Dehydrogenase

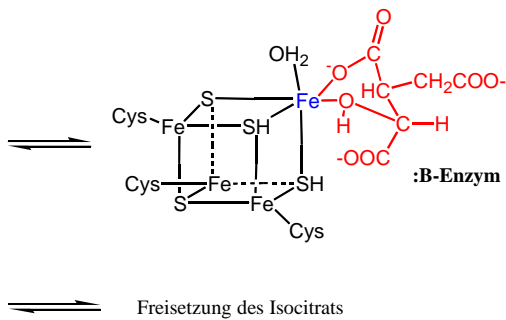


Enzym: Oxidoreductase

Isocitrat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42)

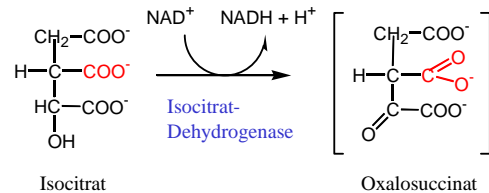
Untereinheitenstruktur: $\alpha_2\beta\gamma$ (Mensch)

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



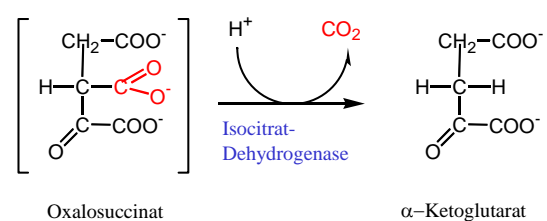
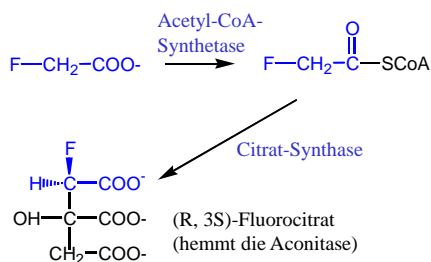
Erste oxidative Decarboxylierung im TCA-Cyclus.
Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat unter Abspaltung von CO_2 und Bildung von NADH .

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



Hemmung des TCA-Zyklus durch **Fluoroacetat** (Rattengift):
 LD_{50} 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.



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

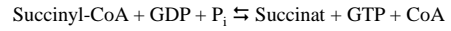
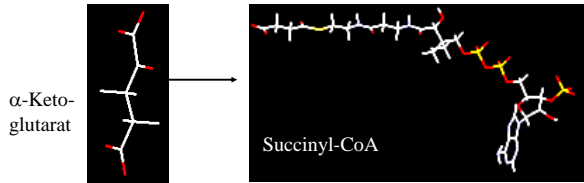


Enzym: Oxidoreductase

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

Untereinheitenstruktur: Multienzymkomplex (E₁)₆(E₂)₂₄(E₃)₆

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



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

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

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 (E₁)

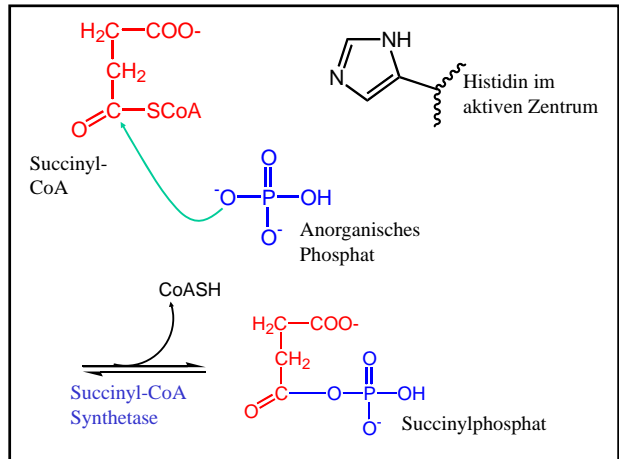
Dihydrolipoyl-Transsuccinylase (E₂)

Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E₃) (ident mit E₃ in Pyruvat-Dehydrogenase)

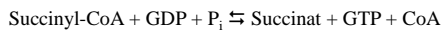
Produkt wieder „energiereicher“ Thioester: Succinyl-CoA.

Reaktion insgesamt exergonisch: $\Delta G^{\circ\prime}$ 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

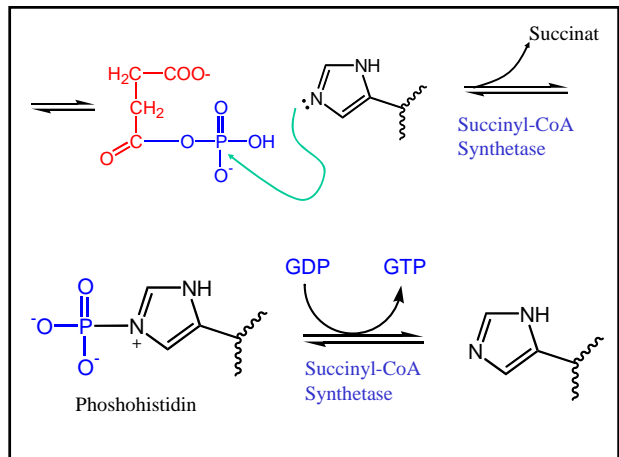
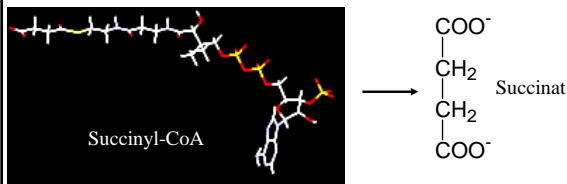
Succinyl-CoA-Synthetase (E.C. 6.2.1.5)

Succinat-Thiokinase

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

Cofaktoren: GDP

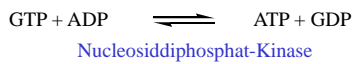
(in Pflanzen und Bakterien: ADP)



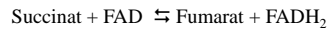
Die durch die **Succinyl-CoA Synthetase** katalysierte Reaktionsfolge "speichert" quasi die Energie des Thioesters:

Thioester → [Succinyl-Phosphat] → [Phosphohistidin] → GTP → ATP

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



Citrat-Cyclus 6. Reaktion: Succinat-Dehydrogenase

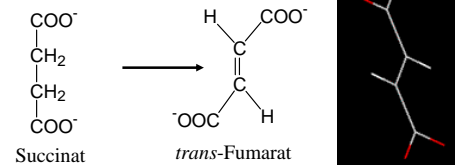


Enzym: Oxidoreductase

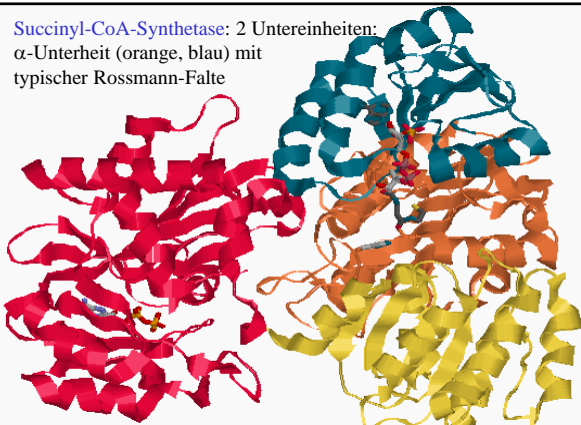
Succinat-Dehydrogenase (E.C. 1.3.5.1)

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

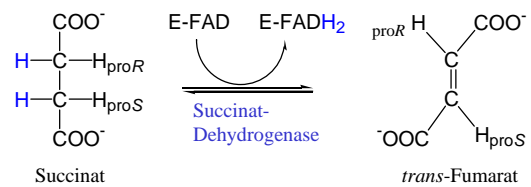
Cofaktoren: FAD (kovalent), Fe-S-Cluster



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

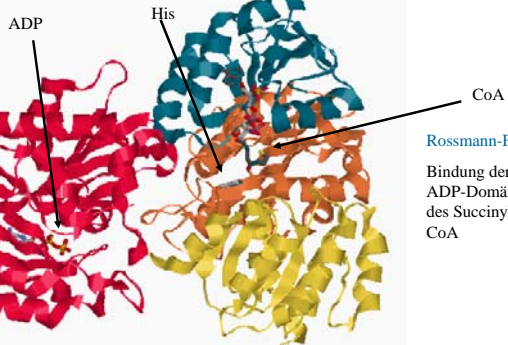


β -Untereinheit (rot, gelb) bindet ADP ("ATP-grasp domain")



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.

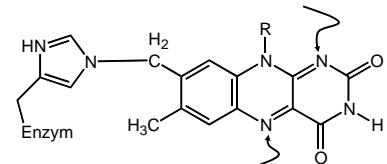
Flavine sind bessere Oxidationsmittel als Nicotinamid-Nucleotide! Einführung einer Doppelbindung ist sehr wichtiger Reaktionstyp bei der Oxidation von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren.



α -Untereinheit:
Rossmann-Falte

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.



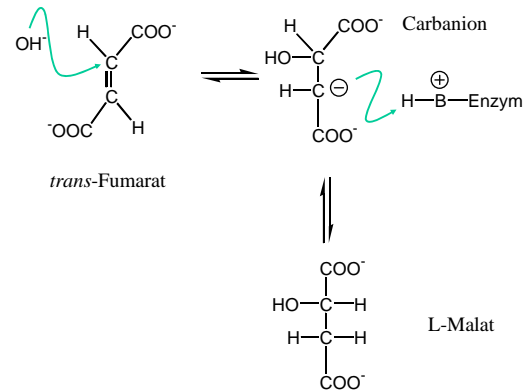
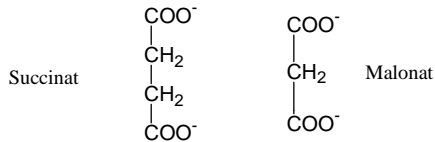
Succinat-Dehydrogenase ist das einzige Enzym des Citrat-Cyclus, das Membran-gebunden ist. Es ist Teil des sog. Komplex II (**Succinat-Coenzym Q-Reduktase**) der Atmungskette (siehe Einheit 8).

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

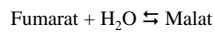
Elektronenfluss:

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

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



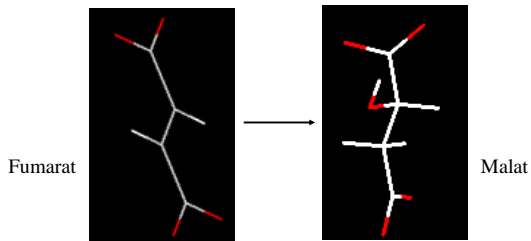
Citrat-Cyclus 7. Reaktion: Fumarase



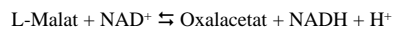
Enzym: Lyase

Fumarase (E.C. 4.2.1.2)

Homotetramer: α₄ (48,5) Schweineherz



Citrat-Cyclus 8. Reaktion: Malat-Dehydrogenase

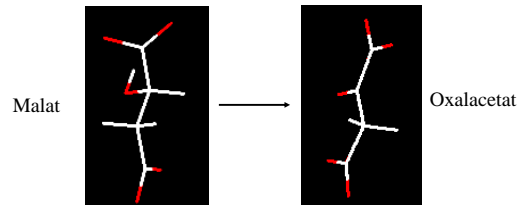


Enzym: Oxidoreductase

Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)

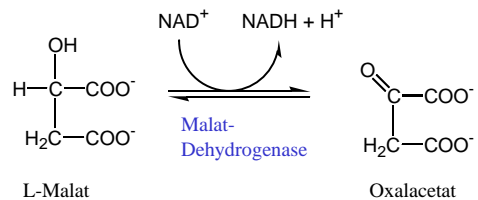
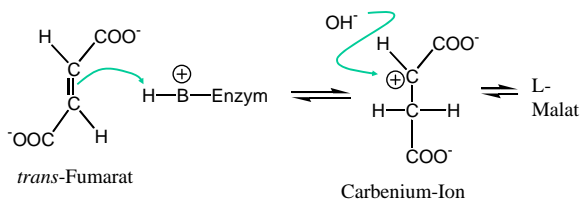
Homodimer: α₂ (35 kDa) (Schweineherz)

Cofaktoren: NAD⁺



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.

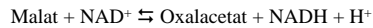


Die Reaktion ist endergonisch: ΔG^{0'} = + 30 kJ/mol

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** ($\Delta G^{\circ} = 30$ kJ/mol) arbeitet am chem. Gleichgewicht ($\Delta G^{\circ} = 0$), wie hoch ist dann die intramitochondriale Konzentration an Oxalacetat bei 25°C?

Malat-Dehydrogenase-Reaktion:

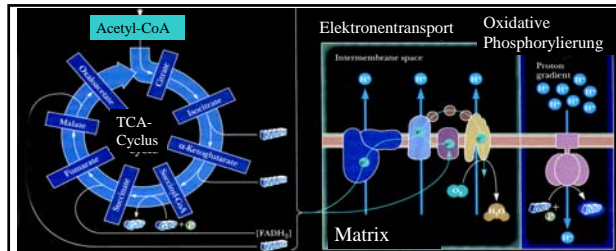


$$\Delta G^{\circ} = 30 \text{ kJ/mol}$$

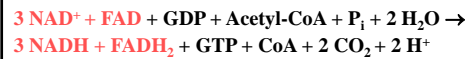
$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{\text{eq}} = -(8,314 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(298) \times \ln \left\{ \frac{(1, Y)}{(20)(2,2 \times 10^{-4})} \right\}$$

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

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



Nettoreaktion:



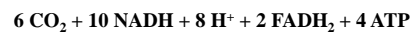
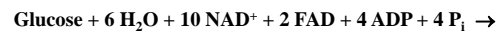
Die gebildeten Reduktionsäquivalente werden anschließend in der Atmungskette mittels molekularem Sauerstoff reoxidiert (Einheit 8).

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.

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

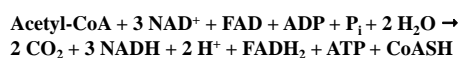
ATP-Bilanz: 4 ATP durch Substratkettenphosphorylierung gebildet, zwei in der Glycolyse und zwei im Citrat-Cyclus (GTP = ATP)

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

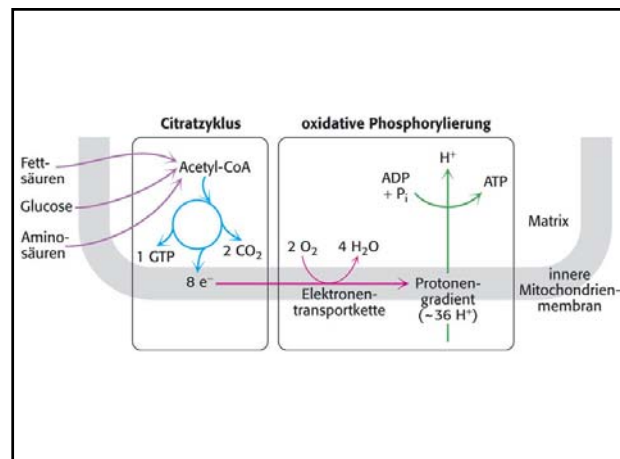
Bedeutung des Citronensäure-Cyclus für die ATP-Produktion:

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)



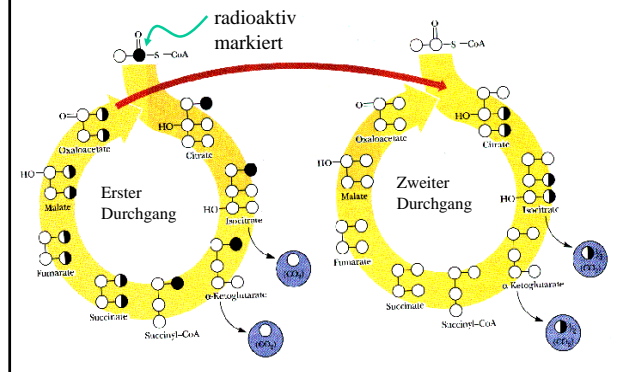
$$\text{Nettobilanz: } \Delta G^{\circ} = -40 \text{ kJ/mol}$$



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, O₂, 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.

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



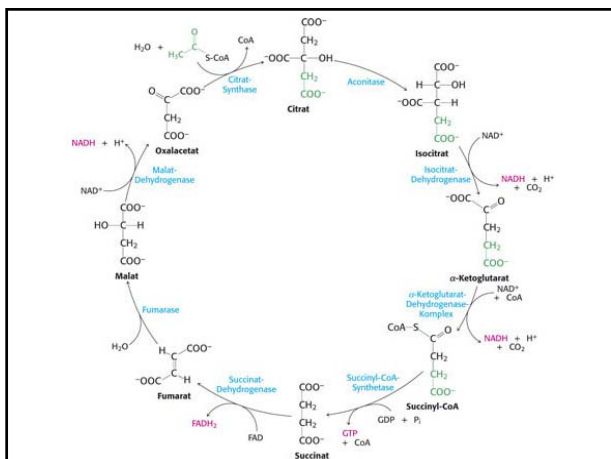
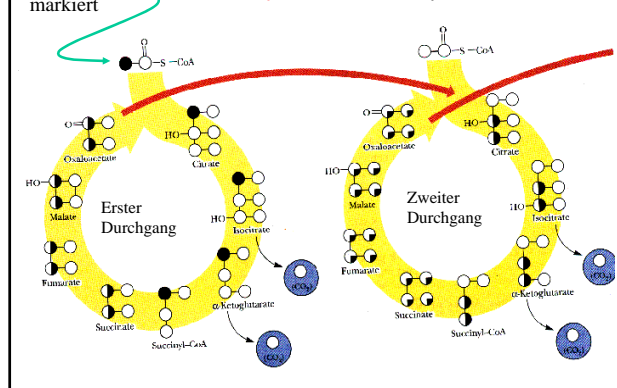
Es muss festgehalten werden, dass die in einem Cyclus freigesetzten CO₂-Moleküle nicht aus den Kohlenstoffen des Acetyl-CoA stammen. Eine Betrachtung der oben beschriebenen enzymatischen Mechanismen macht dies klar.

Eindeutig bewiesen kann dies durch selektive radioaktive Markierung werden.

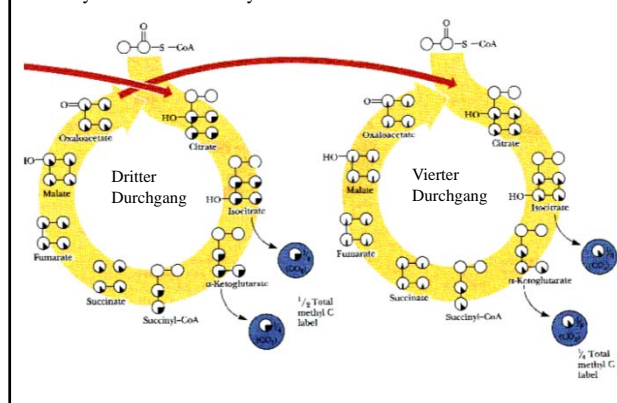
Ist der Carbonyl-Kohlenstoff des Acetyl-CoA radioaktiv markiert, so tragen die freigesetzten CO₂ Moleküle im ersten Durchgang keine Radioaktivität, im zweiten Durchgang trägt die Hälfte der CO₂ Moleküle Radioaktivität usw.

Ist der Methyl-Kohlenstoff des Acetyl-CoA radioaktiv markiert, so sind die abgehenden CO₂-Moleküle im ersten und zweiten Durchgang nicht radioaktiv. Erst im dritten Durchgang findet man Radioaktivität in Kohlendioxid usw.

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



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

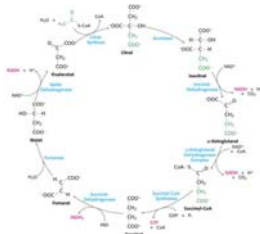


Citrat-Cyclus

Allgemeines

Reaktionsfolge

Thermodynamik und Regulation



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.

Veränderung der Freien Enthalpie unter Standardbedingungen ($\Delta G^{\ominus'}$) und der (physiologischen) Freien Enthalpie ($\Delta G'$) bei den Reaktionen des Citrat-Cyclus.

Reaktion	Enzym	$\Delta G^{\ominus'}$ (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

Regulation der Citrat-Synthase

- Verfügbarkeit von Oxalacetat (im Gleichgewicht mit Malat):

$$K = \frac{[\text{Oxalacetat}][\text{NADH}]}{[\text{Malat}][\text{NAD}^+]}$$
 [Oxalacetat] ist abhängig von Verhältnis $[\text{NADH}/\text{NAD}^+]$.
 Hohe Atmungsraten: [NADH] nimmt ab und [Oxalacetat] nimmt zu. Stimulation der Citrat-Synthase
- Hemmung durch NADH
- Hemmung durch Citrat (Produktthemmung)
- Hemmung durch Succinyl-CoA (kompetitive Rückkoppelungshemmung: Konkurrenz mit Acetyl-CoA)

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

Regulatorische Signale sind die Konzentrationen von Acetyl-CoA, Oxalacetat, Succinyl-CoA, ATP, NAD^+ und NADH, Ca^{2+} , Insulin

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

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

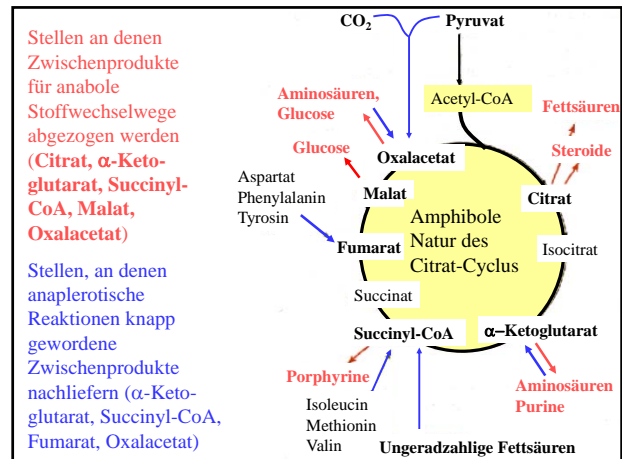
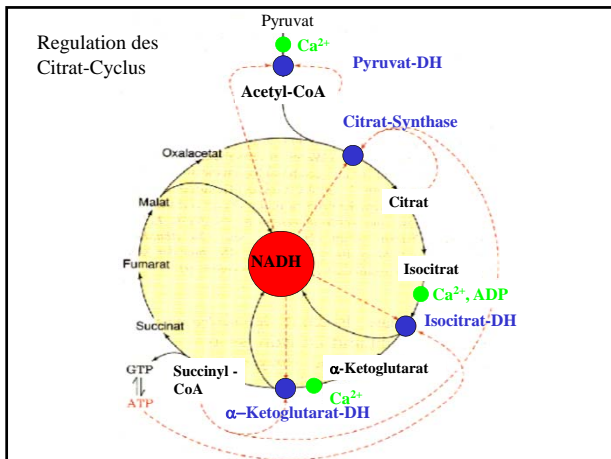
Inhibierung durch Succinyl-CoA Citrat-Synthase, α -Ketoglutarat-DH

Regulation der Isocitrat-Dehydrogenase

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

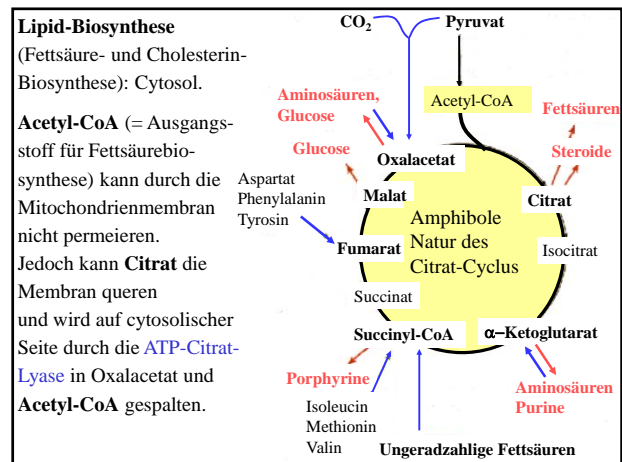
Regulation der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase

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



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

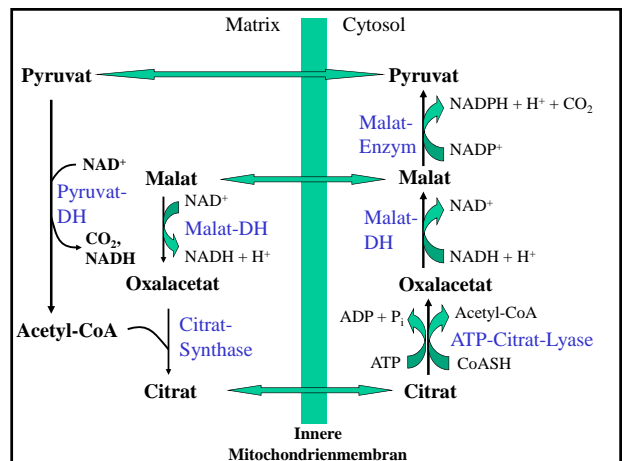
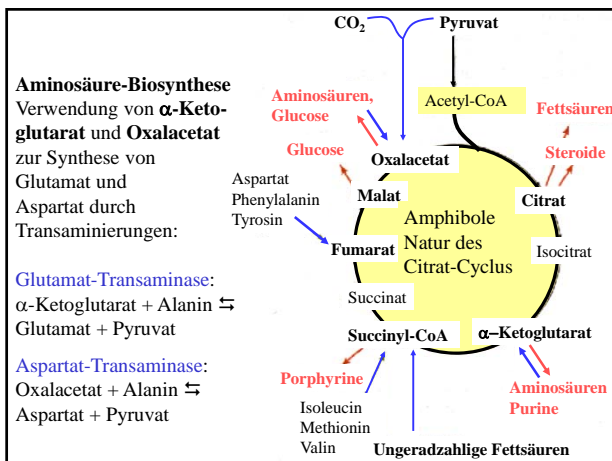
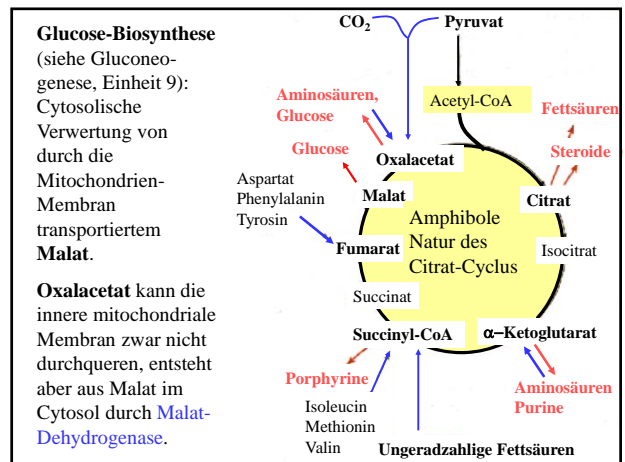
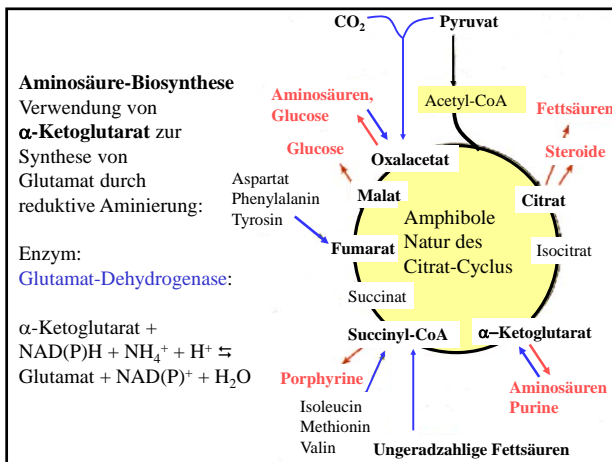
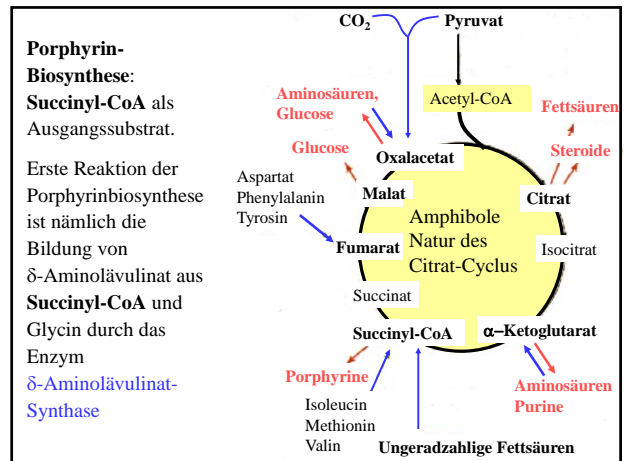
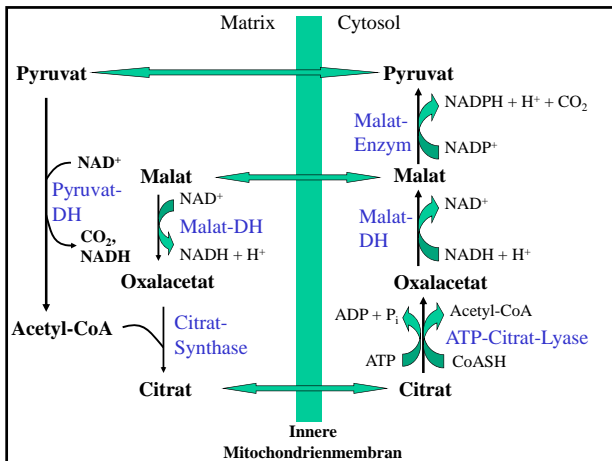
Sämtliche Biosynthese-Wege, die Zwischenprodukte des Citronensäure-Cyclus verwerten, benötigen Freie Enthalpie, für deren Bereitstellung der Citronensäure-Cyclus essentiell ist. Die katabole Funktion des Cyclus muss aufrechterhalten bleiben. Werden Zwischenprodukte abgezogen, müssen sie nachgeliefert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

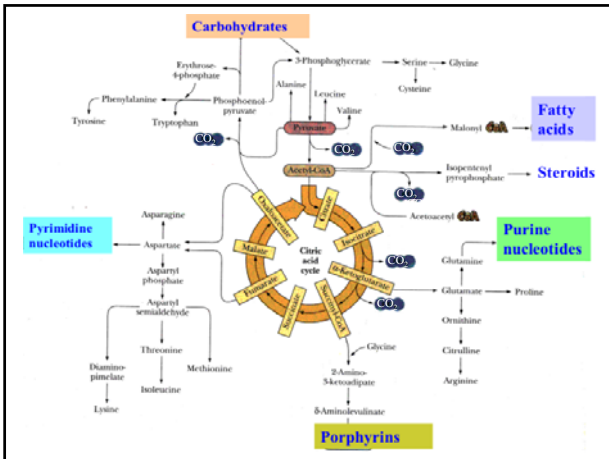
Das im Cytosol für Biosynthesen benötigte Acetyl-CoA entsteht durch Austausch von Zwischenprodukten des Citrat-Cyclus zwischen Mitochondrien und Cytosol.

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:

$$\text{Citrat} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i + \text{Oxalacetat} + \text{Acetyl-CoA}$$

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 CO_2 oxidiert, wobei NADPH für (cytosolische) Biosynthesen gewonnen werden kann.





Pyruvat-Carboxylase (Gluconeogenese, siehe 9. Einheit)

$$\text{Pyruvat} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + \text{P}_i$$

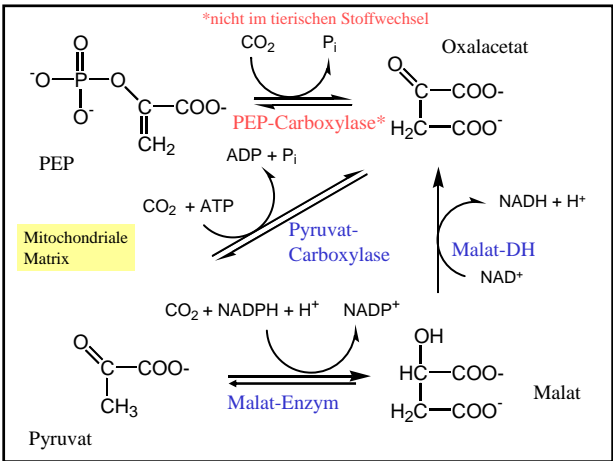
Misst über Acetyl-CoA (=Aktivator), ob Bedarf an Citronensäure-Zwischenprodukten besteht. **Pyruvat-Carboxylase** kommt nur in tierischen Zellen, jedoch nicht in Pflanzen vor (in Bakterien, Hefen und höheren Pflanzen kommt das Enzym **PEP-Carboxylase** vor).

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

$$\text{Pyruvat} + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Malat} + \text{NADP}^+$$

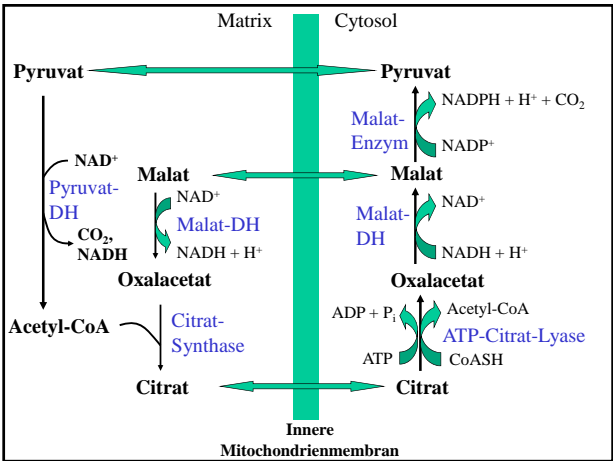
Citrat-Cyclus

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.



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**.

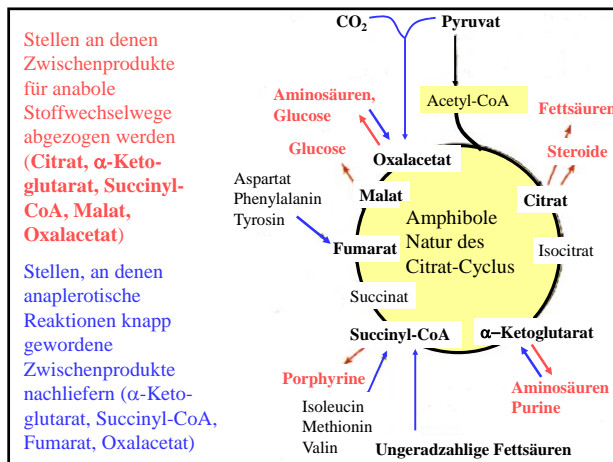
Transaminierung und Desaminierung von Aminosäuren führen zur Produktion von **α -Ketoglutarat** und **Oxalacetat**. Reversible Reaktionen: Verbrauch oder Nachlieferung von Zwischenprodukten des Citronensäure-Cyclus je nach Bedarf

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 C_2 -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.

Citrat-Cyclus

Allgemeines

Reaktionsfolge

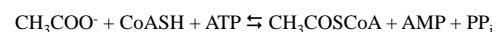
Thermodynamik und Regulation

Amphibole Natur des Citrat-Cyclus

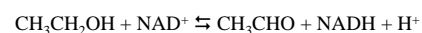
Anaplerotische Reaktionen

Glyoxylat-Cyclus

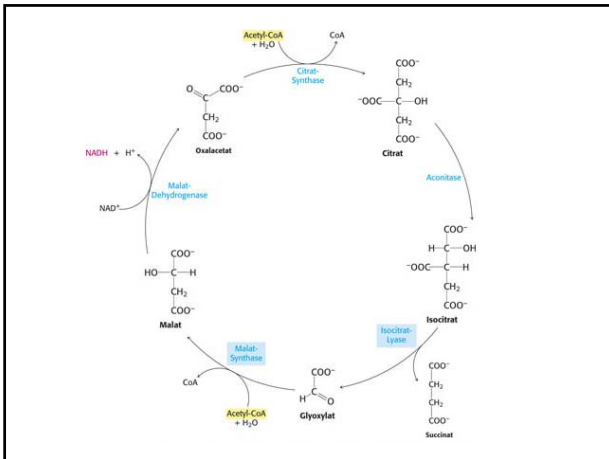
Wenn Acetat einem Organismus als Substrat dienen kann, dann ist nur die Aktivierung in Form des CoA-Derivats notwendig. Die entsprechende Reaktion wird durch die **Acetat-Thiokinase** unter ATP-Hydrolyse katalysiert:



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 3. Reaktion: Isocitrat-Lyase

Isocitrat ⇌ 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

Glyoxylat-Cyclus 1. Reaktion: Citrat-Synthase

Acetyl-CoA + Oxalacetat + H₂O ⇌ Citrat + CoASH

Enzym: (C-C) Lyase

Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7)

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

AcetylCoA + Oxalacetat → Citrat + CoASH

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

Glyoxylat-Cyclus 2. Reaktion: Aconitase

Citrat ⇌ 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 4. Reaktion: Malat-Synthase

Acetyl-CoA + Glyoxylat + H₂O ⇌ Malat

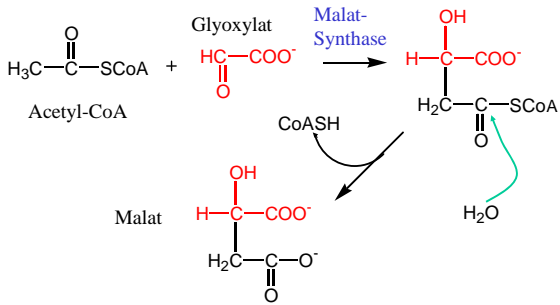
Enzym: Transferase (Glyoxylat-Transacetylase)

Malat Synthase (E.C. 2.3.3.9.)

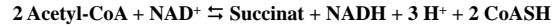
Enzym kommt nur in Mikroben und Pflanzen vor, die auf C₂-Verbindungen wachsen können

Glyoxylat + Acetyl-CoA → Malat

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



Summengleichung für den Glyoxylat-Cyclus:

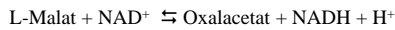


Der Glyoxylat-Cyclus ist also jener Cyclus, mit dem die Biosynthese komplexer Moleküle ausgehend von C₂-Einheiten beginnt, und Succinat ist das unmittelbare Produkt, von dem aus andere Verbindungen synthetisiert werden.

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.

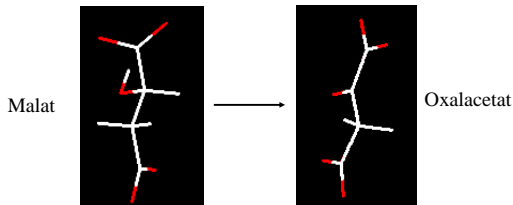
Glyoxylat-Cyclus 5. Reaktion: Malat-Dehydrogenase



Enzym: Oxidoreductase

Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)

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



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.

