

Kohlenhydrate und Kohlenhydrat-Stoffwechsel

Ziel dieses Versuches ist es, zum Einen durch qualitative Analysen ausgewählter Zucker Einblick in deren chemische Eigenschaften und deren Bedeutung zu erhalten, zum Anderen durch kinetische Messungen an einer "Teilstrecke" der Glycolyse Charakteristika dieses Energie erzeugenden Stoffwechselprozesses besser zu verstehen.

Stichworte zur Vorbereitung

Definition und Beispiele für: Aldosen, Ketosen, Hexosen, Pentosen, Triosen etc.

Struktur und Chemie der Zucker. Glucose: offenkettige Form, Harworth-Darstellung.

Definition und Beispiele für: Monosaccharide, Oligosaccharide, Polysaccharide.

Kohlenhydrate als Energiereserve und als Baustoffe: Stärke, Glycogen, Cellulose.

α - und β -glycosidische Bindung.

Kohlenhydratstoffwechsel: Aminozucker, Zuckeralkohole, On- und Uronsäuren, aerobe und anaerobe Glycolyse, Substratkettenphosphorylierung, Oxidation eines Thiohalbacetals, Phosphorolyse eines Thioesters und ATP-Synthese, Energieausbeute der Glycolyse. Beziehung der Glycolyse zu anderen Stoffwechselwegen.

Fructose- und Galactosestoffwechsel. Pentosephosphat-Weg.

Einführung

Als "Kohlenhydrate" bezeichnet man Polyhydroxyaldehyde und -ketone und ihre oligomeren und polymeren Verbindungen, die durch Hydrolyse wieder in ihre monomeren Bausteine, die "Zucker" (Glucose, Fructose, Galactose, Mannose etc.) zerlegt werden können. Von großer Bedeutung sind auch Zucker, bei denen Hydroxyl- oder Aldehydfunktionen zu Säurefunktionen oxidiert sind (Zuckersäuren) oder Zucker bei denen eine Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppen ersetzt ist (Aminozucker).

Dabei kommt der Glucose eine zentrale Bedeutung als Energieträger in allen pflanzlichen und tierischen Organismen zu.

Unter anaeroben Bedingungen können viele Einzeller, die weder zur Photosynthese noch zur Lithotrophie (Energiegewinnung durch Oxidation anorganischer Substanzen) befähigt sind, ihre Energie letztlich nur durch Glycolyse, den Abbau des C6-Körpers Glucose zu C3- oder C2-Körpern, erzeugen.

Einige Zellen und Gewebe höherer Organismen verwenden aus unterschiedlichen Gründen nur Glucose als alleinige Energiequelle und bauen diese glycolytisch - auch in Gegenwart von Sauerstoff - lediglich zu Lactat ab (Glaskörper, Zellen der Cornea, Erythrozyten).

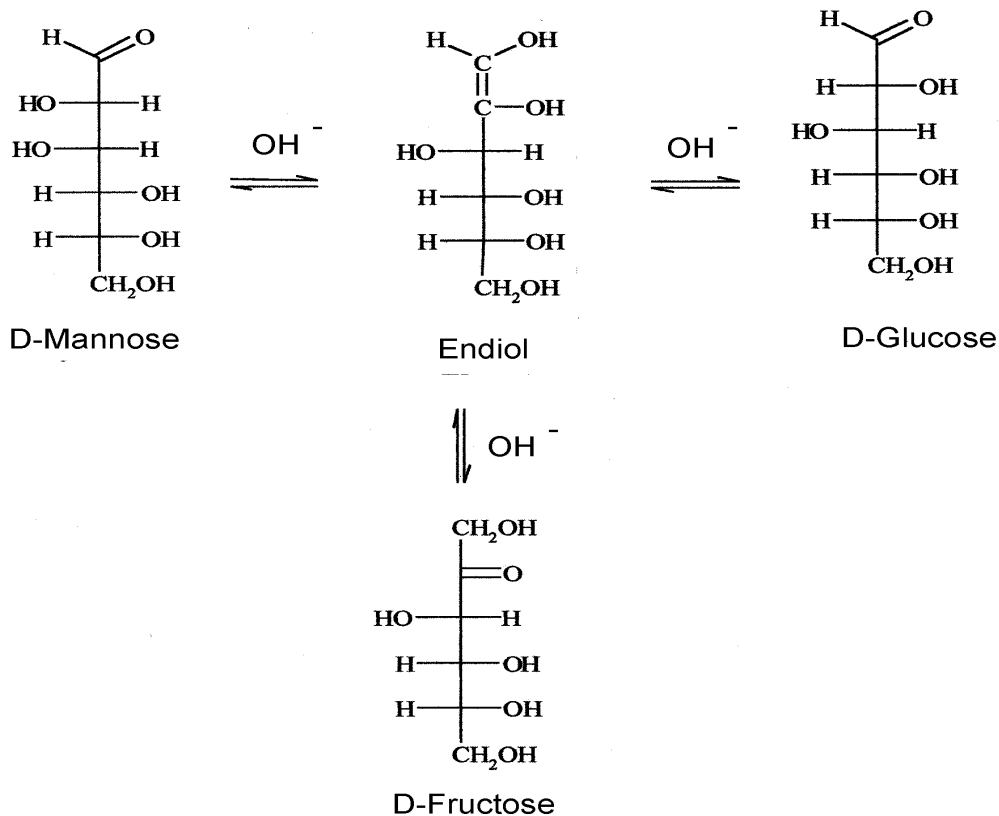
Versuch 1:

Reduzierende Wirkung von Aldosen und Ketosen

In alkalischer Lösung reagieren Aldosen (z.B. Glucose) und Ketosen (z.B. Fructose) mit verschiedenen Oxidationsmitteln, die dabei reduziert werden. Bei den sogenannten "Reduktionsproben" werden die Zucker durch leicht reduzierbare Metallionen oder Farbstoffe zu den entsprechenden "On-Säuren" oxidiert. (z.B. die Glucose zu Gluconsäure). So werden z.B. Cu^{2+} -Ionen zu unlöslichem Cu_2O (Fehling'sche Reaktion), Ag^+ -Ionen zu metallischem Silber (Silberspiegel an einer Glasoberfläche) oder verschiedene Farbstoffe zu ihren farblosen "Leuko"-Formen reduziert. Beispielsweise werden dunkelblaue Lösungen von Methyleneblau weitgehend entfärbt. (Es entsteht dabei das Leukomethyleneblau, welches allerdings durch Luftsauerstoff leicht wieder reoxidiert werden kann.)

Eine positive Reaktion wird bei einfachen Zuckern und bei Oligosacchariden beobachtet, sofern sie eine reduzierende Gruppe enthalten. Glycosidische Bindungen werden nicht oxidiert. Nicht reduzierend wirken daher Saccharose (die gleichzeitig ein Glucosid und ein Fructosid darstellt) und Trehalose, in der zwei halbacetalische Gruppen von zwei Glucosemolekülen ein Vollacetal bilden. Aus diesen Disacchariden entstehen erst nach hydrolytischer Spaltung reduzierende Zucker. Diese Spaltung kann im Falle von Saccharose durch die Invertase enzymatisch erfolgen.

Die verschiedenen Zucker sind unter basischen Bedingungen über ein gemeinsames Endiol ineinander überführbar. Als Beispiel für die Glucose/Fructose/Mannose-Umwandlung sei die "Lobry de Bruyn-van Ekenstein-Umlagerung" genannt:



In der Medizin wird häufig eine quantitative Bestimmung von Glucose benötigt. In der Praxis benutzt man dafür ein spezifisches Enzym (Glucoseoxidase), das nur Glucose oxidieren kann (siehe Versuch Organstoffwechsel).

Material

- 1%ige (v/v) Zuckerlösungen: Glucose, Fructose, Saccharose und Sorbitol
- Methylenblau-Lösung (1%ige wässrige Lösung)
- 0,02 N und 0,5 N Natronlauge (NaOH)
- Invertase-Lösung (1 mg/mL in 0,1 M Na-Acetat, pH 4,7)
- Inkubator (Temperatureinstellung 55 °C)

Durchführung

Fünf Reaktionsgefäße (1,5 mL) werden wie folgt nummeriert und mit den der Tabelle entsprechenden Lösungen versehen:

Gefäß-Nr.	1	2	3	4	5	6
50 µL	H ₂ O	Glucose	Fructose	Saccharose	Sorbitol	unbekannte Probe
5 µL	1%ige Methylenblau-Lösung - in alle Gefäße					
1000 µL	0,02 N NaOH - in alle Gefäße					

Die Gefäße werden verschlossen, kurz durchmischt und in den auf 55 °C temperierten Inkubator gestellt. Danach wird im Abstand von ca. 30 sec der jede Lösung mit dem Kontrollansatz (Nr. 1) verglichen. Bestimmt werden soll der Zeitpunkt maximaler Entfärbung für jeden Ansatz in dem eine Farbtonänderung erfolgt.

- Wie verhielt sich Gefäß Nr. 6 (unbekannte Probe - U)?

Das Experiment in gleicher Weise mit der 0,5 N NaOH-Lösung wiederholen.

- Achten Sie dabei auf Unterschiede in den Entfärbungsgeschwindigkeiten im Vergleich zum vorhergehenden Experiment (den Zeitpunkt der maximalen Entfärbung möglichst genau protokollieren!).
- Welcher Ansatz ist der Schnellste und wie ist das zu erklären?

Durchführung mit vorhergehender Invertase-Behandlung

Gefäß Nr.	1	2	3	4	5	6
50 µL	H ₂ O	Glucose	Fructose	Saccharose	Sorbitol	unbekannte Probe
10 µL	Invertase-Lösung in alle Gefäße					
5 min bei 55 °C inkubieren und danach hinzufügen:						
5 µL	1%ige Methylenblau-Lösung in alle Gefäße					
1000 µL	0,5 N NaOH in alle Gefäße					

- Welcher Ansatz reagiert im Vergleich zu vorhergehenden Experimenten anders?
- Falls Gefäß Nr. 6 (unbekannte Probe) vorher nicht entfärbt wurde, welches Verhalten zeigt sich jetzt?

Versuch 2:

Saure und enzymatische Hydrolyse der Stärke

In der Zusammensetzung der menschlichen Nahrung nehmen die Kohlenhydrate den ersten Rang ein. Das wichtigste Kohlenhydrat ist dabei die Stärke. Stärke besteht aus zwei Komponenten: der Amylose und dem Amylopektin. Abhängig von ihrer Herkunft sind die Anteile der beiden Komponenten unterschiedlich. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um Makromoleküle mit dem monomeren Bestandteil Glucose. In der Amylose sind die Glucoseeinheiten α -1,4-glycosidisch verknüpft. Im Amylopektin sind zusätzlich α -1,6-glycosidisch verknüpfte Glucosemoleküle enthalten. Amylopektin ist also im Gegensatz zu Amylose verzweigt. Bei der Verdauung der Stärke durch das Enzym α -Amylase, einer Endohydrolase, werden α -1,4-glycosidische Bindungen im Inneren der beiden Homoglykane gespalten. Als Abbauprodukte entstehen sogenannte Dextrine, die dann weiter zu Maltose, Isomaltose und Glucose abgebaut werden.

Im vorliegenden Versuch soll zum einen eine Gesamthydrolyse der Stärke durchgeführt werden. Zum anderen soll die enzymatische Spaltung mit α -Amylase des Speichels untersucht werden. Da glycosidische Bindungen säurelabil sind können durch Inkubation mit Salzsäure bei höherer Temperatur alle glycosidischen Bindungen gespalten werden. Der Fortgang der Spaltungen wird durch die Zunahme von reduzierenden Gruppen verfolgt. Dazu kann sowohl freie Glucose als auch endständige Glucosereste, mit 3,5-Dinitrosalicylat photometrisch nachgewiesen werden.

Saure Hydrolyse

Material

- Stärke-Lösung (8 mg/mL)
- Salzsäure (2 M HCl)
- Natronlauge (2 M NaOH)
- DNSA-Lösung (1% 3,5-Dinitrosalicylat/ 2% NaOH/ 20% Na/K-Tartrat (w/v))

Durchführung

10 Reaktionsgefäße (1,5 mL) werden wie folgt nummeriert und befüllt:

Gefäß-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H ₂ O [µL]	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stärke-Lsg. [µL]	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20
NaOH [µL]	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-
HCl [µL]	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
			Nach Inkubation bei 90 °C wird mit NaOH gestoppt							
Inkubationszeit [min]			3	6	9	15	20	30	45	60
NaOH [µL]			50	50	50	50	50	50	50	50

Zum Nachweis der Spaltung pipettiert man nach abkühlen der letzten Probe zu jedem Ansatz 50 µL DNSA-Lösung und erhitzt alle Proben 5 min bei 90 °C. Zum

Abstoppen wird mit eiskaltem H₂O jeweils auf jeweils 1 mL aufgefüllt und die verdünnten Lösungen (1-10) in Halbmikroküvetten geben um die Absorption bei 546 nm gegen H₂O zu messen.

Enzymatische Hydrolyse

Material

(siehe oben)
Kaliumphosphatpuffer 0,1 M; pH 6,9
Speichel

Durchführung

Unmittelbar vor dem Versuch wird ungefähr 0,5 mL Speichel gesammelt. Wenn die Versuchsreihe vorbereitet ist, wird der Speichel ca. 1:80 mit Phosphatpuffer pH 6,9 verdünnt. Reaktionsgefäße (1-10) werden wie folgt befüllt und inkubiert:

Gefäß-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H ₂ O [µL]	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stärke-Lsg. [µL]	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20
DNSA-Lsg. [µL]	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-
verd. Speichel [µL]	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
			Nach Inkubation bei Raumtemperatur wird mit DNSA-Lösung gestoppt !							
Inkubationszeit [min]			3	6	9	15	20	30	45	60
DNSA-Lsg. [µL]			50	50	50	50	50	50	50	50

Für die Farbreaktion werden alle Proben 5 min bei 90 °C inkubiert und danach mit eiskaltem H₂O auf 1 mL aufgefüllt. Nach dem Abkühlen werden die Absorptionen der Reaktionslösungen (1-10) in Halbmikroküvetten wieder bei 546 nm gegen H₂O bestimmt.

Glucose-Eichkurve

Material

Glucose-Eichlösung (5 mg/mL) [M_D-Glucose-Monohydrat: 198,17]
DNSA-Lösung (siehe oben)

Durchführung

Sechs Reaktionsgefäße werden mit Glucoselösung und Wasser wie folgt befüllt:

Gefäß-Nr.	1	2	3	4	5	6
Glucose [μL]	0	20	40	60	80	100
H₂O [μL]	100	80	60	40	20	0
DNSA-Lsg. [μL]	50	50	50	50	50	50

Berechnen sie die jeweilige Glucosekonzentration!

Glucose [mM]						
---------------------	--	--	--	--	--	--

Danach werden alle Proben 5 min bei 90 °C inkubiert. Zum raschen Abkühlen werden alle Proben mit eiskaltem H₂O auf 1 mL Volumen gebracht, in Halbmikro-küvetten geben und jeweils die Absorption bei 546 nm gegen H₂O bestimmt.

Auswertung

Glucose-Eichkurve

- Tragen Sie auf Millimeterpapier oder mit Excell die korrigierten Absorptionen ΔA gegen die millimolare Glucosekonzentration auf (ΔA : y-Achse; c: x-Achse).

Saure & Enzymatische Hydrolyse

- Stellen Sie die ΔA -Werte beider Reaktionen in einem Diagramm gegen die Zeit Δt auf (ΔA : y-Achse; Δt : x-Achse). Wie lässt sich der unterschiedliche Verlauf zu Beginn erklären?
- Bestimmen Sie den mittleren Polymerisationsgrad PG, der die Anzahl der im Makromolekül durchschnittlich verknüpften Grundeinheiten angibt. In unserem Versuch ist dieser gegeben durch das Verhältnis der maximal freigesetzten Glucosemenge (Konzentration am Absorptionsmaximum der Sauren Spaltung) zu den jeweiligen Ausgangskonzentrationen reduzierender Enden (Nr. 2). Um den PG-Wert zu den einzelnen Messzeiten zu bestimmen, berechnen Sie aus den ΔA -Werten (t [min] = 0, 3, 6, etc.) und den Daten der Glucose-Eichgeraden die entsprechenden Konzentrationen reduzierender Enden.
- Tragen Sie für beide Reaktionen den PG-Wert gegen die Zeit [min] auf. Diskutieren Sie die Ergebnisse!

Versuch 3:

Reversible Teilreaktionen der Glycolyse

Die aus 11 enzymatischen Schritten bestehende Glycolyse ist insgesamt exergon und ein Teil der freiwerdenden Energie wird zur Synthese von ATP verwendet. Drei dieser Schritte (Schritt 1, 3 und 10) - die Hexokinase-, Phosphofruktokinase- und die Pyruvatkinase-Reaktion - sind stark exergon: das Gleichgewicht liegt bei diesen Reaktionen also weitgehend auf der Seite der Produkte: Glucose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat und Pyruvat. Alle anderen Schritte sind unter physiologischen Bedingungen energetisch betrachtet weitgehend reversibel und stehen somit auch der Gluconeogenese zur Verfügung.

Kinetische Experimente für diesen "mittleren, reversiblen" Bereich (von der Aldolase bis zur Phosphoglycerat-Kinase) sind Gegenstand dieses Versuchs.

Lehrbuch der Biochemie zur Hand nehmen !

Im Mittelpunkt unserer Experimente steht der Abschnitt der Glycolyse von der Triosephosphat-Isomerase (TIM) bis zur Phosphoglycerat-Kinase (PGK):

1. Isomerisierung der Triosen
2. Oxidation einer der Triosen durch NAD bei gleichzeitiger Produktion einer energiereichen Verbindung
3. Produktion von ATP mit Hilfe dieser energiereichen Verbindung

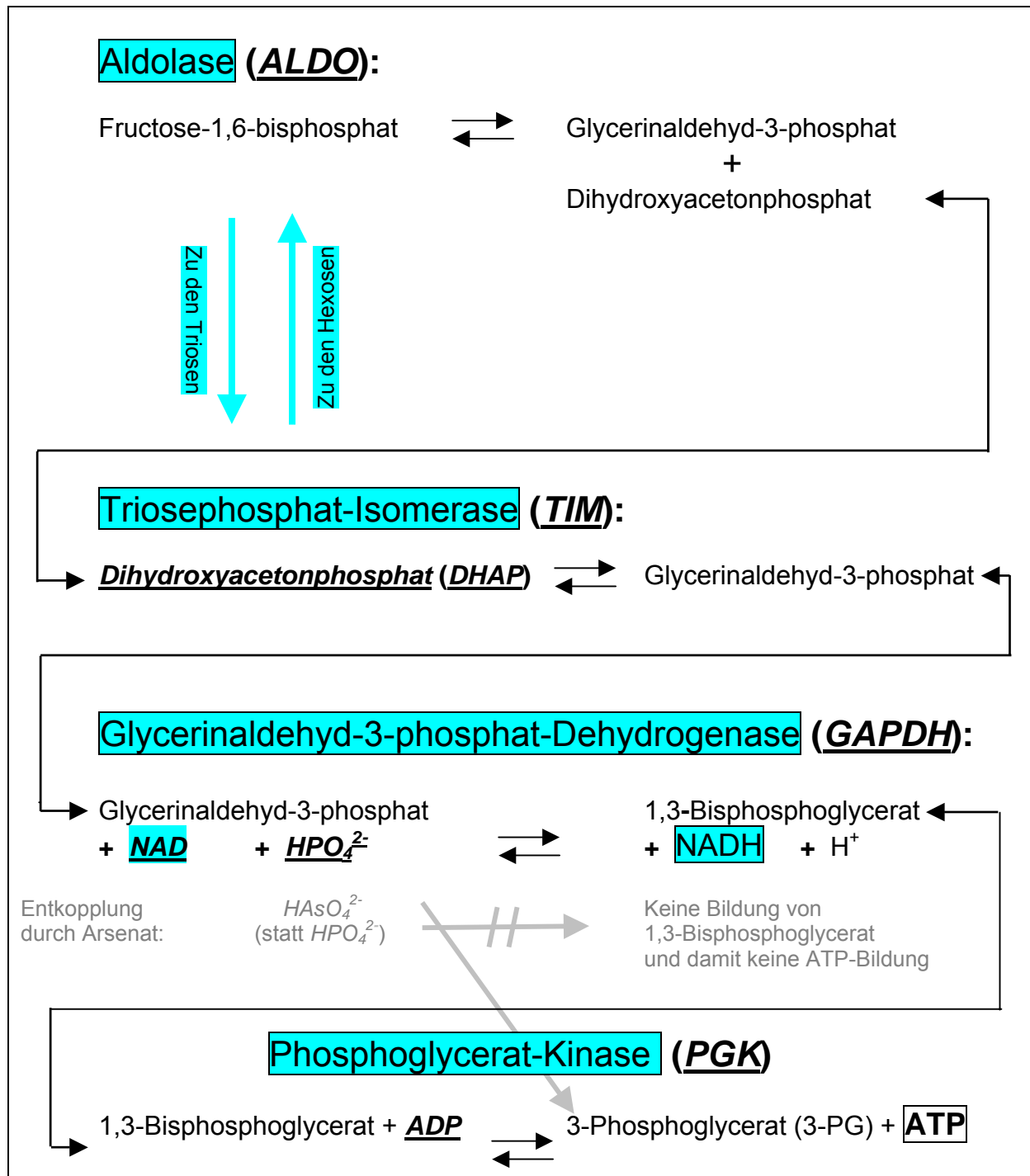
Diesen drei Schritten geht in der Glycolyse die Aldolase-Reaktion voraus, die folgende Übergänge katalysiert:

in Glycolyse-Richtung	⇒	von Hexosen zu Triosen
in Gluconeogenese-Richtung	⇒	von Triosen zu Hexosen

Der Einfluß dieser Gleichgewichtsreaktion auf die nachfolgenden Triose-Reaktionen soll ebenfalls untersucht werden.

Alle für diese Experimente zur Verfügung stehenden Substrate/Cosubstrate (Dihydroxyacetonphosphat, NAD, ADP und HPO_4^{2-}) und Enzyme (Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase) sind im nachfolgenden Schema *kursiv* und unterstrichen dargestellt.

Überblick: Reversible Teilreaktion der Glycolyse



Die Möglichkeit der einfachen photometrischen Verfolgung der **NADH**-Bildung ist die Basis für vielfältige und empfindliche kinetische Untersuchungen dieser Glycolyse-Teilstrecke. **NADH** besitzt im Gegensatz zu seiner oxidierten Form **NAD** ein Absorptionsmaximum bei 340 nm (Absorptionskoeffizient $\epsilon_{340} = 6200 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Wie das Schema zeigt, erfolgt einer der beiden ATP-Syntheseschritte der Glycolyse innerhalb dieser Reaktionskette. Wenn der GAPDH jedoch an Stelle von Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) Hydrogenarsenat (HAsO_4^{2-}) angeboten wird, entsteht nicht 1,3-Bisphosphoglycerat, sondern 1-Arseno-3-phosphoglycerat, das spontan zu 3-Phosphoglycerat hydrolysiert. Auf diese Weise wird die ATP-liefernde Reaktion der PGK von der NAD-verbrauchenden "entkoppelt". Die GAPDH-katalysierte Reaktion zeigt sich dadurch zudem vom ADP-Angebot der nachfolgenden PGK-Reaktion unbeeinflusst, sodass die NADH-Produktion ungehemmt und ungebremst abläuft.

Die Aktivität der GAPDH geht auf essentielle SH-Gruppen zurück, die durch das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) vor Oxidation geschützt werden können. Der Einsatz von Iodacetamid hingegen führt zu irreversiblen Modifikation der SH-Gruppen und damit zur Inaktivierung der GAPDH.

Material

- TRIS-Puffer 0,1 M - pH 7,7
- Enzymlösungen: TIM, PGK, GAPDH (je ca. 1000 U/mL)
- Stammlösungen der Substrate/Cosubstrate:
Phosphat (0,5 M), NAD (40 mM), ADP (10 mM), DHAP (10 mM)
- DTT-Lösung (1 M Dithiothreitol)
- Arsenat-Lsg. (100 mM)
- Iodacetamid-Lsg. (0,5 M)

Durchführung

Alle gekoppelten Reaktionen (Ansatz 1-4) werden nacheinander in Küvetten durchgeführt und gegen H_2O bei 340 nm im Photometer gemessen. Die Enzyme und Substrate werden dazu in einer Ecke der Küvette pipettiert und mit dem TRIS-Puffer nach unten gespült. Nach dem sich die die Anfangsabsorption eingestellt hat wird mit dem letzten Substrat gestartet. Dazu nimmt man 200 μL Reaktionsansatz zur Seite, setzt das fehlende Substrat an einer Ecke ab und spült dieses mit dem Reaktionsansatz nach unten. Gleichzeitig wird die Uhr gestartet und die Absorption alle 10 sec notiert bis die Gleichgewichtseinstellung erreicht ist.

Ansatz 1 Äquimolare Ausgangskonzentrationen der Substrate (ohne Aldolase)

1 μL	DTT 1 M	<i>Berechnen Sie die Konzentrationen aller <u>Substrate</u> bei Reaktionsstart !</i>
2 μL	TIM (2 U/2 μL)	
2 μL	GAPDH (2 U/2 μL)	
2 μL	PGK (2 U/2 μL)	
5 μL	ADP 40 mM	
20 μL	NAD 10 mM	
20 μL	Phosphat 0,5 M	
500 μL	TRIS-Puffer 0,1 M - pH 7,7	
Das System ca. 2 min bei 340 nm beobachten und die Anfangsabsorption A_S notieren!		Reaktion (+ Zeitmessung)
5 μL	DHAP 40 mM	mit der Zugabe starten !!

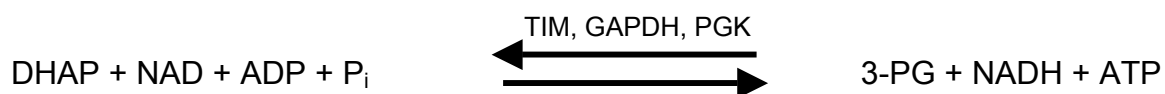
- Berechnen Sie aus der Absorptionsdifferenz ($A_E - A_S$) die Konzentration des gebildeten NADH (A_S = Absorption bei Reaktionsstart; A_E = Absorption nach Reaktionsende).

- Wieviel eingesetztes NAD wurde zu NADH reduziert?
- Versuchen Sie die Anfangsgeschwindigkeit ("Anfangssteigung") aus der Absorptionsänderung in den ersten 60 Sekunden zu ermitteln.

Statt mit Dihydroxyacetonphosphat können die Reaktionen auch mit ADP, NAD oder einem der Enzyme gestartet werden, d.h. die Abfolge der Zugaben kann selbstverständlich geändert werden. Die messbare Reaktion (d.h. die NADH-Bildung) startet erst dann wenn das System komplett ist.

Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K und der Gibbs' freien Standardenthalpie ΔG° .

Für die Reaktion



gilt bei obigen, äquimolaren Ausgangsbedingungen für die drei Quotienten:

$$[\text{3-PG}] / [\text{DHAP}] = [\text{NADH}] / [\text{NAD}] = [\text{ATP}] / [\text{ADP}]$$

Gilt zu Beginn als auch bei Gleichgewichtseinstellung der Reaktion!

Das Massenwirkungsgesetz lautet daher:

$$K = \frac{[\text{3-PG}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{ATP}]}{[\text{DHAP}] \cdot [\text{NAD}] \cdot [\text{ADP}]} \cdot \frac{1}{[\text{P}_i]} \quad \text{oder} \quad K = \left(\frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}]} \right)^3 \cdot \frac{1}{[\text{P}_i]}$$

Aus dem $[\text{NADH}]/[\text{NAD}]$ -Quotient lässt sich demnach leicht die Gleichgewichtskonstante unter den gegebenen Bedingungen ausrechnen, da sich die relativ hohe Phosphat-Konzentration $[\text{P}_i]$ während der Reaktion praktisch nicht ändert.

Diese Gleichgewichtskonstante entspricht dem Produkt der drei einzelnen Gleichgewichtskonstanten der TIM-, GAPDH- und der PGK-Reaktion:

$$K = K_{\text{TIM}} \cdot K_{\text{GAPDH}} \cdot K_{\text{PGK}}$$

Vergleichswerte für die Konstanten dieser drei Teilreaktionen sind im Internet vom amerikanischen National Institute of Standards and Technology (NIST) veröffentlicht. (siehe http://xpdn.nist.gov/enzyme_thermodynamics/enzyme1.pl unter EC 5.3.1 (TIM), EC 1.2.1 (GAPDH) und EC 2.7.2 (PGK); achten Sie darauf ob die Konstante sich auf die Hin- oder Rückreaktion bezieht: $K = 1/K'$).

- Berechnen Sie daraus K und vergleichen Sie die Ergebnisse.
 - Aus der Gleichgewichtskonstanten kann ferner noch die Gibbs' freie Standardenthalpie berechnet werden : $\Delta G^\circ = - R \cdot T \cdot \ln K$.
- (Allgemeine Gaskonstante $R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; $T = \text{absolute Temperatur [K]}$)

Siehe Rechenbeispiel am Ende dieser Praktikumsvorschrift !

Ansatz 2 Äquimolare Ausgangskonzentrationen der Substrate (mit Aldolase)

5 µL	ALDO (5 U/5 µL)	<i>Berechnen Sie die Konzentrationen aller Substrate bei Reaktionsstart !</i>
1 µL	DTT 1 M	
2 µL	TIM (2 U/2 µL)	
2 µL	GAPDH (2 U/2 µL)	
2 µL	PGK (2 U/2 µL)	
5 µL	DHAP 40 mM	
20 µL	NAD 10 mM	
20 µL	Phosphat 0,5 M	
500 µL	TRIS-Puffer 0,1 M - pH 7,7	
Das System ca. 2 min bei 340 nm beobachten und die Anfangsabsorption A_s notieren!		Reaktion (+ Zeitmessung)
5 µL	ADP 40 mM	<u>mit</u> der Zugabe starten !!

- Wie wirkt sich im Vergleich zum sonst identischen Experiment (Ansatz 1) die zugesetzte Aldolase aus?
- Achten Sie auf eventuell andere Anfangsgeschwindigkeiten.
- Wie wäre eine geringere Geschwindigkeit der NADH-Bildung zu erklären?

Ansatz 3 Entkopplung der GAPDH-Reaktion durch Arsenat-Lsg.

1 µL	DTT 1 M	<i>Berechnen Sie die Konzentration der Substrate bei Reaktionsstart !</i>
2 µL	TIM (2 U/2 µL)	
2 µL	GAPDH (2 U/2 µL)	
10 µL	NAD 10 mM	
50 µL	DHAP 40 mM	
500 µL	TRIS-Puffer 0,1 M - pH 7,7	
Das System ca. 2 min bei 340 nm beobachten und die Anfangsabsorption A_s notieren!		Reaktion (+ Zeitmessung)
20 µL	Arsenat 100 mM	<u>mit</u> der Zugabe starten !!

- Rechnen Sie hier nach, ob unter diesen Bedingungen das eingesetzte NAD vollständig zu NADH reduziert wurde.

Ansatz 4 Inhibition der GAPDH-Reaktion durch Iodacetamid

Wiederholen Sie das vorhergehende Experiment (Ansatz 3) und geben Sie nach den ersten 5 Werten 5 µL Iodacetamid hinzu.

- Beobachtung?

Fragen

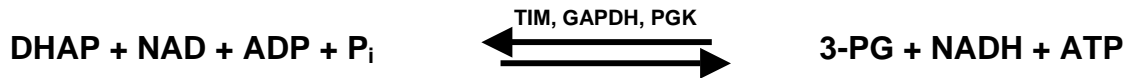
1. Wie verhält sich die, aus den Bausteinen Glucose und Fructose bestehende Saccharose bei den sogenannten Reduktionsproben, wie z. B. bei der Fehling'schen Probe?
2. Ist die Verknüpfung zwischen den Bausteinen der Saccharose α -glycosidischer oder β -glycosidischer Natur? Oder beides? Erklärung?
3. Was versteht man unter pyranosiden und furanosiden Formen der Zucker?
4. Wie entstehen sie aus der offenkettigen Form?
5. Was ist ein Halbacetal?
6. Glucose und Fructose: Wo überwiegt die furanoside, wo die pyranoside Form?
7. Bei der phosphorolytischen Spaltung von Glycogen entsteht Glucose-1-phosphat, welches dann zu Glucose-6-phosphat isomerisiert werden kann. Wie unterscheiden sich die beiden Zuckerphosphate bezüglich Energieinhalt und Art der Phosphatbindung?
8. Wie heißt das Enzym, welches diese Isomerisierung katalysiert? Wo liegt das Gleichgewicht?
9. Im Verlauf der Glycolyse spielen Hexose- und Triosephosphate mit sehr unterschiedlichen Energieinhalten (freier Energie der Hydrolyse) eine Rolle: Beschreiben Sie die Unterschiede zwischen normalen Phosphorsäureestern, den Gemischtsäureanhydriden und Enolester.
10. Welche Bedeutung haben letztere bei der ATP-Synthese?
11. Was versteht man unter "*Gruppenübertragungspotential*"?
12. Nennen Sie Einzelheiten der GAPDH -Reaktion. Welche Rolle spielen *essentielle* SH-Gruppen des Enzyms? Skizzieren Sie die Oxidation des Thiohalbacetals zum Thioester durch NAD und die anschließende phosphorolytische Spaltung des Thioesters.
13. Was versteht man unter "*Substratkettenphosphorylierung*"?
14. Welche Auswirkungen auf das Enzym haben Alkylierungsmittel, die SH-Gruppen der GAPDH in stabile Thioether umwandeln?
15. Beschreiben Sie den Unterschied zwischen Hemmung und Entkopplung der Substratkettenphosphorylierung.
16. Welche Schritte der Glycolyse sind irreversibel?
17. In welchem Zellkompartiment findet die Glycolyse statt?
18. Welche Zellen und Gewebe des Menschen gewinnen ihre Energie ausschließlich durch Glycolyse? Nennen Sie die Gründe für den Verzicht auf den energetisch viel ergiebigeren vollständigen Abbau der Glucose zu CO_2 und H_2O .
19. Angenommen, ΔG° für $\text{DHAP} + \text{NAD} + \text{ADP} + \text{P}_i \leftrightarrow \text{3-PG} + \text{NADH} + \text{ATP}$ wäre positiv, unsere Reaktion also endergon (unter Standardbedingungen !), warum würde trotzdem zumindest zu Beginn 3-PG, NADH und ATP gebildet?
Betrachten Sie dazu die Gleichung:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{[\text{3-PG}][\text{NADH}][\text{ATP}]}{[\text{DHAP}][\text{NAD}][\text{ADP}][\text{P}_i]} \right)$$

20. Erläutern Sie die Unterschiede zwischen freier Enthalpie ΔG und freier Standardenthalpie ΔG° . Welche Rolle spielen die Konzentrationen der Stoffe? Welchen Wert nimmt ΔG an, wenn die Reaktion zum Stillstand gekommen ist und damit ihr Gleichgewicht erreicht hat?

(Siehe auch Taschenatlas der Biochemie 3. Auflage S. 16f).

Beispiel für die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K und der Gibbs' freien Standardenthalpie ΔG° der Reaktion:



Berechnung der NAD-Startkonzentration (Versuch 3; 1. Aufgabe):

Das Gesamtvolumen in der Küvette betrug 557 μL .

Darin enthalten: 20 μL 10 mmol/L NAD (\Rightarrow eine 1:27,85 Verdünnung)

$$[\text{NAD}]_{\text{Start}} = 10 \text{ mmol/L} / 27,85 = 0,359 \text{ mmol/L} \Rightarrow \underline{[\text{NAD}]_{\text{Start}} = 0,359 \text{ mmol/L}}$$

Am Filterphotometer wurden bei 366 nm die Absorptionen bei Start (A_S) und Ende (A_E) der Reaktion gemessen: $A_S = 0,1 \rightarrow A_E = 0,6$

$$\Delta A = A_E - A_S = 0,6 - 0,1 \Rightarrow \underline{\Delta A = 0,5}$$

Nach Lambert-Beer ergibt sich $[\text{NADH}]_{\text{Ende}}$ ($d = 1 \text{ cm}$; $\epsilon_{366} = 3300 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):

$$[\text{NADH}]_{\text{Ende}} = 0,5 \cdot 1 \text{ cm} / \text{span style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> $3300 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ = $1,515 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$$

$$\Rightarrow \underline{[\text{NADH}]_{\text{Ende}} = 0,151 \text{ mmol/L}}$$

$$\text{NAD-Endkonzentration } [\text{NAD}]_{\text{Ende}} = [\text{NAD}]_{\text{Start}} - [\text{NADH}]_{\text{Ende}}$$

$$\Rightarrow \underline{[\text{NAD}]_{\text{Ende}} = 0,208 \text{ mmol/L}}$$

Als Gleichgewichtseinstellung ergibt sich demnach folgender NADH/NAD-Quotient:

$$[\text{NADH}]/[\text{NAD}] = 0,151 \text{ mmol/L} / 0,208 \text{ mmol/L} \Rightarrow \underline{[\text{NADH}]/[\text{NAD}] = 0,726}$$

Die Phosphatkonzentration zu Beginn der Reaktion ergibt sich ebenfalls aus der Verdünnung (20 μL 0,5 mol/L Phosphat in 577 μL Küvettenvolumen).

$$[\text{P}_i] = 0,5 \text{ mol/L} / 27,85 = 0,018 \text{ mol/L} \Rightarrow \underline{[\text{P}_i] = 0,018 \text{ mol/L}}$$

Da sich die Phosphatkonzentration während der Reaktion jedoch nur im submillimolaren Bereich ändern kann $[\text{P}_i]$ als konstant angesehen werden.

Damit berechnet sich die Gleichgewichtskonstante $K = ([\text{NADH}]/[\text{NAD}])^3 / [\text{P}_i]$ zu:

$$K = (0,726)^3 / 0,018 \text{ mol/L} \Rightarrow \underline{K = 21,26}$$

Nach der Formel $\Delta G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K$ beträgt demnach die Gibbs' freie Standardenthalpie für diese Teilreaktion der Glycolyse:

$$\Delta G^\circ = -8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \cdot 300 \text{ K} \cdot \ln 21,26 \Rightarrow \underline{\Delta G^\circ = -7,6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}}$$