

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Professor G.W. Mayr

Regulation der Glykolyse durch Magnesium und Phosphat

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Andrea Stanke
aus Bonn

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.02.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Georg W. Mayr

Inhaltsverzeichnis

1.2 Abkürzungsverzeichnis	6
1.3 Abbildungsverzeichnis	7
1.4 Tabellenverzeichnis	9
2. Einleitung.....	10
2.1 Periphere Insulinresistenz und Diabetes Mellitus	13
2.2 Die Glykolyse	17
2.3 Wichtige Schlüsselenzyme der Glykolyse und bekannte Regulationsmechanismen	24
2.3.1 Hexokinase.....	24
2.3.2 Phosphofruktokinase 1 (PFK-1).....	28
2.3.2.1 Struktur und evolutionäre Entwicklung der PFK-1.....	29
2.3.2.2 Regulationsmechanismen der PFK-1	31
2.3.2.2.1 Allosterische Regulationsmechanismen	31
2.3.2.2.2 Regulation durch Interaktion mit dem Zytoskelett der Zelle	33
2.3.2.2.3 Regulation durch Phosphorylierungsreaktionen.....	34
2.3.2.2.4 PFK-1-Regulation durch Ionen	36
2.3.2.2.5 Regulation der PFK-1 durch Calcium und Calmodulin.....	37
2.3.3 Pyruvatkinase.....	38
2.3.3.1 Struktur und Isoenzyme	38
2.3.3.2 Regulation der Pyruvatkinase.....	39
2.3.4 Phosphoglyceratkinase.....	40
2.4 Magnesium als möglicher Regulator der Glykolyse im Skelettmuskel.....	41
3. Material und Methoden.....	46
3.1 Material	46
3.2 Methodik.....	51
3.2.1 Enzymatisch gekoppelter optischer Test.....	51
3.2.1.1 Herstellung des Reaktionspuffers	52
3.2.1.2 Berechnung der enzymatischen Aktivität.....	54
3.2.2 Bestimmung der K_m -Werte	54
3.2.2.1 K_m -Wert-Bestimmung Hexokinase für ATP, GTP und UTP	55
3.2.2.2 K_m -Wert-Bestimmung Phosphofruktokinase-1 für ATP, GTP und UTP.....	56
3.2.2.3 K_m -Wert-Bestimmung Phosphoglyceratkinase für ADP, GDP und UDP	57
3.2.2.4 K_m -Wert-Bestimmung Pyruvatkinase für ADP, GDP und UDP	58
3.2.3 Versuche zur Magnesiumabhängigkeit der glykolytischen Kinasen.....	59
3.2.3.1 Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase	60
3.2.3.2 Magnesiumabhängigkeit der Phosphofruktokinase-1.....	60
3.2.3.3 Magnesiumabhängigkeit der Phosphoglyceratkinase	61
3.2.3.4 Magnesiumabhängigkeit der Pyruvatkinase.....	61
3.2.3.5 Magnesiumabhängigkeit der Myokinase aus Kaninchenmuskel	62
3.2.3.6 Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase.....	62
3.2.3.7 Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel.....	63
3.2.4 Wirkung von ATP, GTP, UTP, ADP, GDP, UDP, AMP, GMP und UMP auf die Aktivität der PFK und Beeinflussung durch Magnesium	64
3.2.5 Einfluss von Phosphat auf die Phosphofruktokinase	65
3.2.6 Einfluss von Ammoniumphosphat auf die PFK-1.....	65
3.2.7 Aufreinigung und Analyse der PFK-1 aus Rattenmuskel	65
3.2.7.1 Extraktion und $(NH_4)_2SO_4$ -Fällung der PFK-1.....	65
3.2.7.2 Aufreinigung der PFK-1 über Q-Sepharose bei OM - 0,5 M Stufengradient.....	66
3.2.7.3 SDS-PAGE mit 10% Acrylamid zur Analyse der Q-Sepharose-Fractionen der PFK-1	67
3.2.7.4 Aktivitätstest des gereinigten Enzyms	67
3.2.8 „Whole-Glycolysis-Assay“.....	67

3.2.8.1 Entnahme der Rattenmuskelprobe	67
3.2.8.2 Herstellung des Glykolyseextraktes	67
3.2.8.3 Durchführung des „Whole-Glycolysis-Assays“	68
3.2.9 SDS-PAGE (=Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелелектро-forese)	69
3.2.10 HPLC (= Hight performance/ pressure liquid chromatography) ba sierte Nukleotidanalyse und -quantifizierung.....	72
3.3.11 Quantitative Proteinbestimmung des Glykolyseextraktes mittels BioRat.....	73
4. Ergebnisse	75
4.1. <i>Kinetik der glykolytischen Kinasen - Bestimmung der K_m-Werte</i>	75
4.2.1 Hexokinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
4.1.2 Phosphofruktokinase-1 aus <i>Rattenmuskel</i>	77
4.1.3 Phosphoglyceratkinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
4.1.4 Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel	79
4.2 <i>Versuche zur Magnesiumabhängigkeit der glykolytischen Kinasen</i>	81
4.2.1 Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
4.2.2 Magnesiumabhängigkeit der Phosphofruktokinase aus Kaninchen- und Rattenmuskel	82
4.2.3 Magnesiumabhängigkeit der Phosphoglyceratkinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
4.2.4 Magnesiumabhängigkeit der Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel	86
4.2.5 Magnesiumabhängigkeit der Myokinase aus Kaninchenmuskel	87
4.2.6 Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase aus Rattenmuskel.....	88
4.2.7 Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel	89
4.3 <i>Regulation der PFK-1-Aktivität durch Änderung des Verhältnisses zwischen Nukleotiden und Magnesiumüberschuss</i>	91
4.4 <i>Gesamtglykolysemessung</i>	97
4.4.1 Gesamtglykolyse-Assay mit Glykolyseextrakt aus Rattenmuskel	97
4.4.2 HPLC-Analytik des Gesamtglykolyse-Assays in Abhängigkeit zur Magnesiumkonzentration im Ansatz	100
4.4.3 Quantitative und qualitative Proteinbestimmung für Glykolyseextrakt aus Rattenmuskel mittels BioRad und 12,5%-SDS-PAGE.....	104
4.4.4 12,5%-SDS-PAGE des Glykolyseextraktes aus Rattenmuskel	104
4.4.5 HPLC-Analyse der Nukleotide des Glykolyseextrakts.....	106
4.4.6 Veränderung der Nukleotide im Glykolyseassay in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration.....	108
4.4.5 Berechnung der freien Magnesiumkonzentration im Glykolyseassay	116
4.5 <i>Regulierung von PFK-1- und Gesamtglykolyse-Aktivität durch Phosphat</i>	122
4.5.1 Regulierung der PFK durch AMP und Phosphat.....	122
4.5.2 Aktivierung der PFK-1 aus Rattenmuskel durch Ammoniumionen und Phosphat	124
4.5.3 Bestimmung der Phosphatabhängigkeit der Glykolyse mit Extrakt aus Rattenmuskel mittel HPLC-Analytik.....	125
5. Diskussion	128
5.1 <i>Kinetik der glykolytischen Kinasen - Bestimmung der K_m-Werte</i>	128
5.1.1 Hexokinase.....	129
5.1.2 Phosphofruktokinase-1.....	129
5.1.3 Phosphoglyceratkinase.....	130
5.1.4 K_m -Wert-Bestimmung Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel für ADP, GDP und UDP	131
5.1.5 Zusammenfassende Diskussion der Sensitivität der glykolytischen Kinasen für ATP/ADP, GTP/GDP und UTP/UDP	131
5.2 <i>Beeinflussung der PFK-1-Aktivität aus Rattenmuskel durch Veränderung des freien Magnesiums und Änderung des Nucleosidtriphosphat- zu -diphosphat-Verhältnisses</i>	132
5.3 <i>Effekte von Magnesium auf die Enzyme der Glykolyse</i>	135
5.3.1 Hexokinase.....	135

5.3.2 Phosphofruktokinase-1.....	138
5.3.3 Phosphoglyceratkinase.....	140
5.3.4 Pyruvatkinase.....	144
5.3.5 Myokinase.....	145
5.3.6 Effekte von Magnesium auf die Gesamtglykolyseaktivität.....	146
5.3.7 Aktivierung der Glykolyse initial nach Ruhephasen via AMP durch allosterische Regulation.....	148
5.4 Diskussion der Rolle von Phosphat in der Glykolyse.....	153
6. Zusammenfassung.....	156
7. Literaturverzeichnis.....	157
8. Danksagung.....	167
9. Lebenslauf.....	168
10. Eidesstattliche Erklärung.....	169

1.2 Abkürzungsverzeichnis

(NH₄)₂SO₄ Ammoniumsulfat	Kreatin-P Kreatin-Phosphat
1,3-BPG 1,3-Bisphosphoglycerat	LDH Laktat-Dehydrogenase
2Cl⁻ Chlorid	Mg²⁺ Magnesium
2-PG 2-Phosphoglycerat	MgADP Magnesium-Adenosindiphosphat
3GAP Glycerinaldehyd-3-Phosphat	MgATP Magnesium-Adenosintriphosphat
3-PG 3-Phosphoglycerat	MgCl₂ Magnesiumchlorid
Acetyl-CoA Acetyl-Coenzym A	MgGTP Magnesium-Guanosintriphosphat
ADP Adenosindiphosphat	MgUTP Magnesium-Uridintriphosphat
AMP Adenosinmonophosphat,	Na⁺ Natrium
ATP Adenosintriphosphat	NAD⁺ Nicotinamidadenindinukleotid, protoniert
BSA Bovines Serumalbumin	NADH Nicotinamidadenindinukleotid
Ca²⁺ Calcium	NADP⁺ Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, protoniert
CaM-Kinase Calmodulin-Kinase	NADPH Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat	NDP Nucleosiddiphosphat
CK Kreatin-Kinase	NH₄⁺ Ammonium-Ion
EC₅₀ mittlere effektive Konzentration	NTP Nucleosidtriphosphat
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	PEP Phosphoenolpyruvat
Fructose-1,6-BP Fructose-1,6- Bisphosphat	PFK-1 Phosphofruktokinase-1, PFKFB bifunktionelles Enzym (Phosphofruktokinase- 2/Fruktosebisphosphatase-2)
Fructose-6-P Fructose-6-Phosphat	PGK Phosphoglyceratkinase,
GA3P Glycerinaldehyd-3-Phosphat,	PG-Mutase Phosphoglyceratmutase
GA3PDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	P_i Phosphat-Ion
GDH Glutamatdehydrogenase	PK Pyruvatkinase, Pyruvatkinase
GDP Guanosindiphosphat	PK-A Proteinkinase A
Glucose-1-P Glucose-1-Phosphat	SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Glucose-6-P Glucose-6-Phosphat	SO₄ Sulfat
GLUT Glucose-Transporter	SP Phosphomonoester
GMP Guanosinmonophosphat	UDP Uridindiphosphat
GTP Guanosintriphosphat	UMP Uridinmonophosphat
H⁺ Wasserstoff-Ion	UTP Uridintriphosphat
H₂O Wasser, Wasser	V_{max} maximale Reaktionsgeschwindigkeit
HK Hexokinase	
HPLC Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie	
IMP Inosinmonophosphat	
K⁺ Kalium	
k_{cat} Wechselzahl	
KCl Kaliumchlorid	

1.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Magnesium-Rückresorption in der Niere, Übersicht aus de Baaij et al., 2015.	12
Abbildung 2.2 Mechanismus der Insulinfreisetzung bei erhöhtem Blutglucosespiegel.	15
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des ATP-Gewinns aus Glucose	16
Abbildung 2.4: Vereinfachte schematische Darstellung der Glykolyse	17
Abbildung 2.5: Erster Reaktionsschritt der Glykolyse	17
Abbildung 2.6: 2. Reaktionsschritt der Glykolyse	18
Abbildung 2.7: 3. Reaktionsschritt der Glykolyse	18
Abbildung 2.8: 4. Reaktionsschritt der Glykolyse	19
Abbildung 2.9: 5. Reaktionsschritt der Glykolyse	20
Abbildung 2.10: 6. Reaktionsschritt der Glykolyse	20
Abbildung 2.11: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion	21
Abbildung 2.12: 7. Reaktionsschritt der Glykolyse	22
Abbildung 2.13: 8. Reaktionsschritt der Glykolyse	22
Abbildung 2.14: 9. Reaktionsschritt der Glykolyse	23
Abbildung 2.15: 10. Reaktionsschritt der Glykolyse.	23
Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der Glykolyse sowie der Regulation wichtiger Schlüsselenzyme	24
Abbildung 2.17: Hexokinase-Reaktion.	25
Abbildung 2.18: Phosphofruktokinase-Reaktion	29
Abbildung 2.19: Struktur der PFK aus <i>E. coli</i> (Abbildung aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013)	31
Abbildung 2.20 aus Sola-Penna et al., 2010: Schematische Darstellung der Regulation der PFK	34
Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der Pyruvatkinasen-Reaktion sowie einiger Aktivatoren und Inhibitoren.	38
Abbildung 2.22: Schema der muskulären Energiebereitstellung (aus Moosburger, 1995)	44
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des enzymatisch gekoppelten enzymatischen Tests am Beispiel der Phosphofruktokinase-Reaktion	52
Abbildung 3.2: Reaktionsfolge Hexokinase-Assay	55
Abbildung 3.3: Reaktionsfolge PFK-1-PK/LDH-Assay	57
Abbildung 3.4: Reaktionsfolge PGK-Assay.	58
Abbildung 3.5: Reaktionsfolge Pyruvatkinase-Assay	59
Abbildung 3.6: Aldolase-GDH-Assay für PFK.	61
Abbildung 3.7: Assay Magnesiumabhängigkeit der Myokinase	62
Abbildung 3.8: Assay Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase	63
Abbildung 3.9: Reaktionsassay für Kreatinkinase.	64
Abbildung 3.10: 12,5%-SDS-PAGE der PFK-1 aus Kaninchenmuskel	71
Abbildung 3.11: 12,5%-SDS-PAGE für PFK-1 aus Rattenmuskelmuskel	71
Abbildung 3.12: Gradient des binären HPLC-Eluentensystems zur Nukleotidanalyse)	73
Abbildung 4.1: Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase	81
Abbildung 4.2: Aktivität der PFK bei konstantem Verhältnis von $MgCl_2$ zu ATP bei variiertem ATP-Konzentration	83
Abbildung 4.3: Aktivität der PFK bei Modulation des $MgCl_2/ATP$ -Verhältnisses unter Konstanthaltung der ATP-Konzentration bei 5mM im Ansatz	84
Abbildung 4.4: Magnesiumabhängigkeit der Phosphoglyceratkinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
Abbildung 4.5: Magnesiumabhängigkeit der Pyruvatkinase	86
Abbildung 4.6: Magnesiumabhängigkeit der Myokinase	87
Abbildung 4.7: Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase	89
Abbildung 4.8: Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase im CK/HK-Assay	90
Abbildung 4.9: Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase (blaue Kurve) vs. Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase (orange Kurve)	90
Abbildung 4.10: Hemmung der PFK-1 aus Rattenmuskel durch ATP-Zugabe und anschließende Reaktivierung der enzymatischen Aktivität durch Magnesiumzugabe	92
Abbildung 4.11: Hemmung der PFK-1 aus Rattenmuskel durch UTP	92

Abbildung 4.12: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch GTP und anschließende Reaktivierung durch Magnesium im Exzess	93
Abbildung 4.13: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch ADP-Zugabe, kaum Reaktivierung durch Mg-Zugabe	93
Abbildung 4.14: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch UDP, geringe Reaktivierung durch Mg-Zugabe	94
Abbildung 4.15: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch GDP	94
Abbildung 4.16: Aktivierung der PFK durch AMP und Magnesium.	95
Abbildung 4.17: Aktivierung von Rattenmuskel-PFK durch UMP und GMP	95
Abbildung 4.18: Funktionsweise des in-vitro-Glykolyseassays mit Enzymextrakt aus Rattenmuskel	97
Abbildung 4.19: Messung der Glykolyseaktivität unter Zugabe unterschiedlicher Magnesiummengen.	98
Abbildung 4.20: Glykolyseaktivität bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Magnesiumchlorid.	99
Abbildung 4.21: Gesamtglykolysemessung mit Muskelextrakt aus Rattenmuskel bei 5mM Phosphat und variierter Zugabe von MgCl zum Ansatz	100
Abbildung 4.22: Gesamtglykolysemessung mit Muskelextrakt aus Rattenmuskel bei 5mM Phosphat und variierter Zugabe von MgCl zum Ansatz, Messung bis Minute 40.	101
Abbildung 4.23: Glykolyserate in Millimol Laktat pro Minute bei Variation der Magnesiumkonzentration im Ansatz und 5mM Phosphat	102
Abbildung 4.24: Maximale Glykolyserate und Rate bei Minute 17,5 und 100 in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration im Ansatz	103
Abbildung 4.25: Zeit bis zum Erreichen der maximalen Glykolyserate nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe in Abhängigkeit zur Magnesiumzugabe zum Ansatz	103
Abbildung 4.26: Proteinbestimmung des Glykolyseextrakts mittels BioRad.	104
Abbildung 4.27: 12,5%-SDS-PAGE für Glykolyseextrakt aus Rattenmuskel und Locusta	105
Abbildung 4.28: HPLC-Analyse zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Nukleotide in Rattenmuskelextrakt	107
Abbildung 4.29: Adeninnukleotidkonzentration im Assay über die Zeit bei unterschiedlichen Magnesiumchloridkonzentrationen im Ansatz bei 5mM Phosphat	109
Abbildung 4.30: ATP-Konzentration im Ansatz über die Zeit bei Variation der Magnesiumkonzentration und 5mM Phosphat	109
Abbildung 4.31: ADP-Konzentration im Ansatz über die Zeit bei Variation der Magnesiumkonzentration und 5mM Phosphat.	110
Abbildung 4.32: ATP/ADP-Ratio bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen im Ansatz.	111
Abbildung 4.33 und 4.34: ATP/ADP-Ratio in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration im Ansatz zu unterschiedlichen Messzeitpunkten	112
Abbildung 4.34: ATP/ADP-Ratio 20min, 30min und 60min nach Glucose-6-P-Zugabe in Abhängigkeit zur Magnesiumkonzentration im Ansatz.	113
Abbildung 4.35: AMP-Konzentration im Ansatz über die Zeit bei Variation der Magnesiumkonzentration und 5mM Phosphat.	113
Abbildung 4.1 36: Schema AMP-abbauende Reaktionen	114
Abbildung 4.37: Näherung zur AMK-Kinase-Aktivität der Myokinase in Abhängigkeit zur AMP-Konzentration im Ansatz bei hohen Magnesiumkonzentrationen	114
Abbildung 4.38: ADP-Kinase-Aktivität der Myokinase in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration	115
Abbildung 4.39: Schematische Darstellung der Verdünnung der Bestandteile des Muskels im Glykolyseassay.	117
Abbildung 4.40: Aktivierung der PFK durch Phosphat und AMP.	123
Abbildung 4.41: Ammoniumphosphatabhängigkeit der PFK-1 bei 5mM ATP, 7mM MgCl ₂ und 75micromol Fructose-6-Phosphat im Ansatz.	124
Abbildung 4.42: Gesamtglykolysemessung bei Variation der Phosphatkonzentration im Ansatz	125
Abbildung 4.43: Glykolyserate in Abhängigkeit zur Phosphatkonzentration im Ansatz über die Zeit.	126
Abbildung 4.44: Glykolyserate bei Variation der Phosphatkonzentration im Ansatz und in Prozent der Steady State Rate	126
Abbildung 5.1: Kristallstrukturanalyse der PGK aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	143
Abbildung 5.2: Aktivierung der Glykolyse durch AMP mittels Myokinase-reaktion	149
Abbildung 5.3: Alternative Regulation der ADP-Kinase- und AMP-Kinase-Aktivität der Myokinase	151

1.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 3.1: Endkonzentrationen der Komponenten des Reaktionspuffers im Assay</i>	53
<i>Tabelle 3.2: Zusammensetzung des LMW-Markers von Pharmacia</i>	70
<i>Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Kinetik der Hexokinase aus Saccharomyces cerevisiae für ATP, GTP und UTP bei gesättigter Glucose-Konzentration.</i>	76
<i>Tabelle 4.2 Zusammenfassung der Kinetik der Phosphofruktokinase-1 aus Rattenmuskel für ATP, GTP und UTP bei gesättigter Fructose-6-Phosphat-Konzentration</i>	77
<i>Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Kinetik der Phosphoglyceratkinase aus Saccharomyces cerevisiae für ADP, GDP und UDP bei gesättigter Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Konzentration</i>	78
<i>Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Kinetik der Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel für ADP, GDP und UDP bei gesättigter Phosphoenolpyruvat-Konzentration im Ansatz.</i>	79
<i>Tabelle 4.5: Tabellarische Darstellung der Nukleotid-Konzentrationen nach quantitativer & qualitativer HPLC-Analyse des Muskelextraktes</i>	107
<i>Tabelle 4.6: Zusammensetzung des intrazellulären Magnesiums</i>	116
<i>Tabelle 4.7: Berechnung der freien Magnesium- und ATP-Konzentration nach Komplexierung von Magnesium durch ATP und ADP</i>	119
<i>Tabelle 4.8: Beispielberechnung der freien Magnesiumkonzentration nach Komplexierung durch Phosphomonoester</i>	120

2. Einleitung

Obwohl Magnesium im menschlichen Körper intrazellulär das am zweithäufigsten vorkommenden Kation darstellt und bereits im Jahre 1697 zur Behandlung unterschiedlichster körperlicher Beschwerden erstmalig therapeutische Erwähnung fand (Grew, 1697), erhielt es bisher in der medizinischen Diagnostik wenig Beachtung. Es wird nicht routinemäßig bei Blutuntersuchungen bestimmt und auch differentialdiagnostisch werden ein Magnesiummangel oder eine Überdosierung sehr selten in Betracht gezogen.

In den letzten Jahren häufen sich jedoch wissenschaftlichen Hinweise, welche die Wichtigkeit des Kations für unsere Gesundheit nahelegen. Es konnte unter anderem in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines erniedrigten Magnesium-Serumspiegels und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen (Liao, Folsom and Brancati, 1998; Abbott *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012) sowie von Diabetes Mellitus Typ 2 besteht (Ma *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2004; Sales and Pedrosa, 2006; Barbagallo and Dominguez, 2007; Bo and Pisu, 2008; Volpe, 2008; Hruby *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2016). Hieraufhin wurden zahlreiche Studien durchgeführt, in denen untersucht wurde, ob eine Supplementation von Magnesium entsprechend der empfohlenen Tagesdosis zur Besserung des Krankheitsverlaufs führen kann. Es wurden unterschiedlichste Endpunkte sowie verschiedene Kohorten gewählt, die Ergebnisse fielen dementsprechend heterogen aus (Kohvakka *et al.*, 1982; Gullestad *et al.*, 1994; De Lorges *et al.*, 1998; Rodriguez-Moran & Guerrero-Romero, 2003, Song *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2016, Ha-Na *et al.*, 2018).

Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei der Korrelation von Hypomagnesämie und dem vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und Diabetes Mellitus Typ II um einen kausalen Zusammenhang handelt und wenn ja, ob die Hypomagnesämie den Diabetes oder der Diabetes die Hypomagnesämie bedingt. Und wie verhält es sich mit den biochemischen Grundlagen des Ganzen?

Problematisch ist zunächst, dass es sich bei der gemessenen Magnesiumkonzentration lediglich um die Serumkonzentration handelt. Für den menschlichen Körper wird angenommen, dass sich etwa 60-65 % des

Magnesiums im Knochen befinden, 34 % intrazellulär im Weichteilgewebe und nur 1-2% in der Extrazellulärflüssigkeit (Wallach, 1982; Maguire and Cowan, 2002; Bo and Pisu, 2008; Jahnen-Dechent and Ketteler, 2012; de Baaij *et al.*, 2015). Durch Messung der Serumkonzentration kann also schwerlich eine Aussage über den Gesamtgehalt des Magnesiums gemacht werden, da dieses nur einen verschwindend geringen Anteil repräsentiert.

Aufgenommen wird Magnesium vor allem per parazellulärem Transport, hauptsächlich über den Dünndarm, sowie in geringeren Mengen transzellulär in Zäkum und Dickdarm (de Baaij *et al.*, 2015). In der Regel werden etwa 30 bis 50 Prozent des in der Nahrung enthaltenen Magnesiums absorbiert, bei Mangel ist jedoch eine Steigerung der Resorptionsrate auf bis zu 80 Prozent möglich. Insgesamt ist die Aufnahme wenig reguliert und hauptsächlich Angebotsabhängig. Gesteuert wird die Magnesiumhomöostase laut Baaij *et al.* (2015) hauptsächlich durch die Ausscheidung über die Nieren. Im Mittel werden 2,4g Magnesium pro Tag in den Glomeruli der Niere primär filtriert, 95-99% hiervon werden jedoch wieder rückresorbiert. Dies geschieht im proximalen Tubulus sowohl passiv über Aquaporin 1 (Quamme and Smith, 1984) als auch aktiv natriumgetrieben (Ikari, Kano and Suketa, 2002). Im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife findet der Hauptteil der Reabsorption von Magnesium statt (Hoenderop and Bindels, 2005; Lambers, Bindels and Hoenderop, 2006; Renkema *et al.*, 2008). Abhängig ist der parazelluläre Transport nicht nur vom lumenpositiven Potential, welches unter anderem durch den hier zu findenden $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter aufrechterhalten wird (Greger and Velázquez, 1987), sondern auch von der Durchlässigkeit der Tight-Junctions, deren Hauptkomponenten Proteine der Claudin-Familie sind (Konrad *et al.*, 2006; Günther, 2010). Ein geringer Teil des filtrierten Magnesiums wird im distalen Tubulus durch streng regulierten, transzellulären Transport rückresorbiert (Brunet *et al.*, 2005). Der Transport erfolgt durch TRPM6-Kanäle, deren Aktivität durch die intrazelluläre Magnesiumkonzentration reguliert wird (Voets *et al.*, 2004). Insulin bewirkt eine vermehrte Aktivität der Kanäle, wahrscheinlich über Phosphorylierungsreaktionen. Dieser Mechanismus könnte zu der beobachteten Hypomagnesämie bei Diabetikern beitragen. (Schrag *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2012). Eine Rolle spielen vermutlich auch Kalium-Kanäle wie ROMK

und Kv1.1 sowie die Magnesiumtransporter SLC41A1 und CNNM2 (de Baaij *et al.*, 2015).

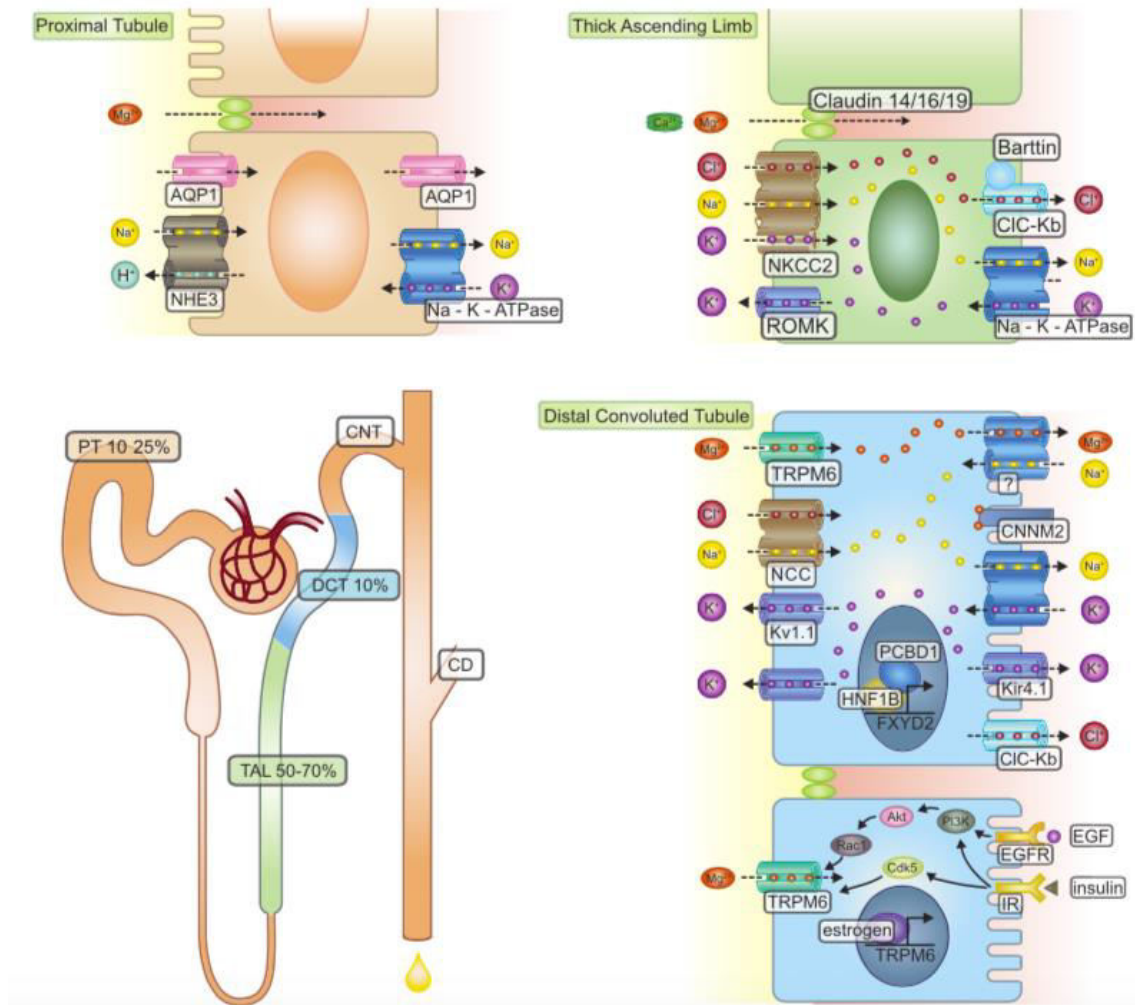


Abbildung 2.1 Magnesium-Rückresorption in der Niere, Übersicht aus de Baaij *et al.*, 2015. Im proximalen Tubulus (PT, proximal tubule) werden etwa 10-25% des zuvor im Glomerulus filtrierten Magnesiums rückresorbiert. Der Transport erfolgt via Aquaporin 1 (AQP1) und parazellulär durch Tight-Junctions zwischen den Zellen (Quamme and Smith, 1984). Für beide Mechanismen ist die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten entscheidend (de Baaij *et al.*, 2015). Der Großteil des Magnesiums wird jedoch im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife resorbiert (thick ascending limb, TAL) (circa 50-70%). Der parazelluläre Transport ist hier vom lumenpositiven Potential abhängig, welches durch den $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter sowie die apikale Sekretion von Kalium aufrechterhalten wird. Wichtig sind also auch im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife Tight-Junctions zwischen den Zellen für den Magnesiumtransport. Insbesondere die hierin enthaltenden Proteine 16 und 19 der Claudin-Familie scheinen eine Rolle zu spielen. Im distalen Tubulus (DCT, distal convoluted tubule) ist die Rückresorption des Magnesiums streng reguliert und erfolgt transzellulär über TRPM6-Kanäle. Deren Aktivität wird unter anderem über Insulin sowie auf Transkriptionsebene durch Östrogene (estrogen) reguliert. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die intrazelluläre Magnesiumkonzentration (de Baaij, Hoenderop and Bindels, 2015).

Die transzelluläre Aufnahme im Dickdarm erfolgt ebenfalls über TRPM6- und TRPM7-Kanäle, möglicherweise auch über CNNM4 als $\text{Na}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Austausch (Yamazaki *et al.*, 2013).

Es gibt bereits einige Erklärungsversuche hinsichtlich des Zusammenhangs von Hypomagnesämie und einer erhöhten Insulinresistenz. Schrag et al. und Nair et al. konnten zeigen, dass Patienten mit verminderter Insulin-Rezeptor-Aktivität zur Ausbildung eines Magnesiummangels neigen (Schrag *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2012). Suarez et al. führten Versuche durch, in denen Ratten, die über vier Tage mit magnesiumarmem Futter gefüttert wurden, eine Halbierung der Insulin-Sensitivität sowie der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors aufwiesen (Suárez *et al.*, 1995). Letztere ist unabdingbar, um die Insulinwirkung an peripheren Zellen zu gewährleisten. Fehlt diese Wirkung des Insulins oder ist sie abgeschwächt, kommt es zur Ausbildung des Krankheitsbildes eines Diabetes Mellitus Typ II. Hruby et al. konnten schließlich zeigen, dass eine Interaktion der β -Untereinheit des Insulinrezeptors mit Magnesiumionen stattfindet, welche einen positiven Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors zufolge hat. Ein Mangel an Magnesium führt somit zu einer Hemmung des Rezeptors (Hruby *et al.*, 2013).

Wir haben uns nun gefragt, ob es noch weitere mögliche Wege geben könnte, die Korrelation zwischen Magnesiummangel und einem vermehrten Auftreten von peripherer Insulinresistenz zu erklären. Hierzu ist es von Nöten, einen kleinen Exkurs in die Biochemie und Pathogenese des Diabetes zu wagen.

2.1 Periphere Insulinresistenz und Diabetes Mellitus

Prinzipiell kommt es bei allen Formen des Diabetes mellitus zu einem Mangel an Insulin, wodurch im Blut zirkulierende Glucose, welche aus der Nahrung aufgenommen wurde, nicht mehr in die Zellen aufgenommen werden kann. Es gibt unterschiedliche Typen von Diabetes, welche sich in ihrer Pathogenese unterscheiden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist insbesondere die Pathogenese des Typ 2 Diabetes von Interesse. Letzterer zeichnet sich vor allem durch einen relativen Insulinmangel aus. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zu einer Störung der zweigipfligen Insulin-Sekretion und dadurch zu einer postprandialen Hyperglykämie. Die Sekretion von Glucagon, dem hormonellen Gegenspieler des Insulins, ist konstant erhöht, wodurch der Blutglucosespiegel steigt (Herold, 2018). Zudem ist die Insulinwirkung an den peripheren Zellen, insbesondere des Fettgewebes sowie der Skelettmuskulatur,

stark herabgesetzt. Hier liegt eine Störung der Insulinrezeptorkaskade zugrunde. Dies führt dazu, dass Glucose nicht mehr ausreichend in die Zellen aufgenommen werden kann, der Blutglucosespiegel bleibt erhöht. Dies macht man sich zur Diagnostik der Erkrankung sowie zur Kontrolle des Therapieerfolgs zunutze. Zudem sind die schwerwiegenden Folgeerkrankungen des Diabetes wie diabetisches Fuß-Syndrom, Polyneuropathie, Mikro- und Markoangiopathie auf die erhöhten Glucose-Spiegel zurückzuführen (Herold, 2018). Es liegt daher im therapeutischen Interesse, diesen zu senken.

Eine sehr effektive Senkung der Glucose-Konzentration des Blutes wird durch eine vermehrte Aufnahme von Zucker in großen Gewebekompartimenten nach intrazellulär erreicht. Diese Aufnahme erfolgt über GLUT-Transporter, von denen viele verschiedene Unterformen bekannt sind. Skelettmuskulatur und Fettgewebe machen zusammen etwa vierzig Prozent der Gesamtkörpermasse aus. Die hier befindlichen GLUT-4-Transporter zeichnen sich durch ihre Insulinabhängigkeit aus (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014; Rassow *et al.*, 2016).

Wie könnte nun eine Steigerung der glykolytischen Aktivität zu einer Senkung des Blutglucosespiegels beitragen? Die Aufnahme von Glucose über GLUT-Transporter geschieht über passiven Transport (Mueckler & Thorens, 2013, Lacombe, 2014), das Zuckermolekül diffundiert also entlang eines Konzentrationsgradienten über GLUT in die Zelle. Wird intrazellulär verstärkt Glucose abgebaut, also deren Konzentration gesenkt, kommt es zu einer verstärkten Aufnahme. Zudem ist die Ausschüttung von Insulin und somit der Einbau der GLUT-4-Transporter in die Zellmembran der Skelettmuskel- und Fettzellen abhängig von der glykolytischen Aktivität in den β -Zellen der Pankreas: Bei Anstieg des Blutglucosespiegels kommt es zu einer vermehrten Aufnahme von Glucose über insulinunabhängige GLUT-Transporter. Dies führt zum Abbau des Zuckers mittels Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette (Abbildung 2.2). Hierbei wird ATP generiert, welches zur Schließung eines ATP-abhängigen Kaliumkanals führt. Dies wiederum hat die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle und somit die Ausschüttung von Insulin zur Folge. Die Glykolyse-Rate in den β -Zellen der Pankreas ist somit essentiell für die Insulinwirkung, welche wiederum zum Einbau von GLUT-4 in die Plasmamembranen von Muskel- und Fettzellen führt. Sind diese Transporter in

die Zellmembran eingebaut, kann – wieder entlang eines glykolysegetriebenen Konzentrationsgradienten – die verstärkte Aufnahme von Glucose in Skelettmuskulatur und Fettzellen und somit eine Senkung des Blutglucosespiegels erfolgen. Über diesen Mechanismus erfolgen 75% der insulinabhängigen Glucoseaufnahme über die Muskulatur (Vestergaard, 1999), weswegen insbesondere der in diesem Kompartiment stattfindende Glucosestoffwechsel für die Therapie des Diabetes Mellitus Typ II von größtem Interesse ist.

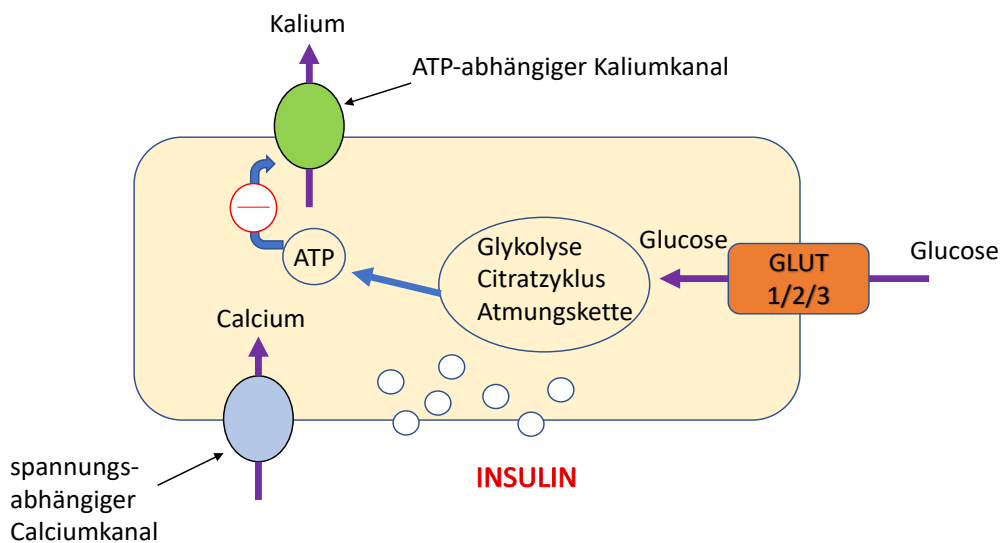


Abbildung 2.2 Mechanismus der Insulinfreisetzung bei erhöhtem Blutglucosespiegel. Bei Anstieg der Glucosekonzentration im Blut nach Nahrungsaufnahme kommt es durch passiven, dem Konzentrationsgefälle folgenden Transport über GLUT 1-, GLUT 2- und GLUT 3-Transporter zur Aufnahme des Zuckermoleküls in die β -Zellen der Pankreas. Im Anschluss erfolgt die Verstoffwechslung der Glucose über Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette, wobei ATP gebildet wird. Letzteres hemmt ATP-abhängige Kaliumkanäle in der Plasmamembran, woraufhin es über spannungsabhängige Calciumkanäle zum Einstrom von Calcium kommt. Dies wiederum führt zur Ausschüttung von Insulin in die Blutbahn. Es zeigt sich, dass die Glykolyse eine wichtige Schlüsselposition bei der Freisetzung des Hormons einnimmt.

Unter anaeroben Bedingungen wird in der Glykolyse aus Glucose zunächst Pyruvat und dann mittels Pyruvatdehydrogenase-Reaktion Laktat generiert. Ist jedoch Sauerstoff in der Zelle vorhanden, wird das entstandene Pyruvat dem Citratzyklus zugeführt und weiter verstoffwechselt. Die Energiebilanz der beiden unterschiedlichen Wege unterscheidet sich erheblich, so werden bei Anaerobie vier ATP pro Glucose gebildet, wobei allerdings zwei im Rahmen der Glykolyse „verbraucht“ werden. Unter aeroben Bedingungen entstehen hingegen etwa dreißig ATP pro aufgenommener Glucose (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014; Rassow *et al.*, 2016). Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird somit mehr Glucose

benötigt, um die gleiche Menge an Energieäquivalent zu gewinnen, zur optimalen „Entfernung“ von Glucose aus dem Blut scheint also vor allem eine vermehrte anaerobe – also sehr schnelle – Muskelarbeit sinnvoll zu sein.

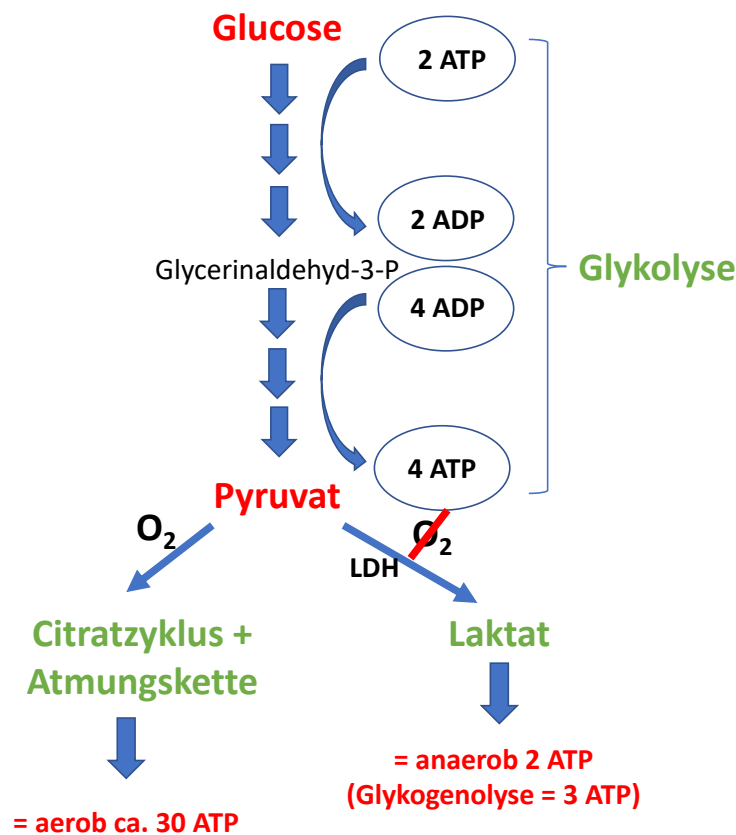


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des ATP-Gewinns aus Glucose unter aeroben Bedingungen unter Hinzunahme des Citratzyklus und der Atmungskette sowie unter anaeroben Bedingungen mittels Generierung von Laktat. Es zeigt sich, dass unter aeroben Bedingungen ein Vielfaches der Menge an ATP aus der gleichen Menge Glucose gewonnen werden kann.

Wie genau läuft der Abbau von Glucose in der Zelle ab? Könnte eine Steigerung vor allem der anaeroben glykolytischen Aktivität zur Senkung des Blutglucosespiegels genutzt werden? Um diesen Fragen nachzugehen, ist es von Nöten, sich mit den genauen Mechanismen der Glykolyse und der Regulation ihrer Schlüsselenzyme auseinander zu setzen, welche im Folgenden dargelegt werden.

2.2 Die Glykolyse

Bei der Glykolyse handelt es sich um einen zentralen Stoffwechselweg, der zum enzymatischen Abbau von Glucose zu Pyruvat führt. Glucose stellt für die Mehrzahl von Lebewesen einen der wichtigsten Energielieferanten dar, wodurch der Glykolyse sowohl biochemisch als auch medizinisch und biologisch eine große Bedeutung zukommt. Die Reaktionsschritte der Glykolyse lassen sich grob in zwei Abschnitte unterteilen: Im ersten Abschnitt wird ATP verbraucht, im zweiten Abschnitt entsteht es.

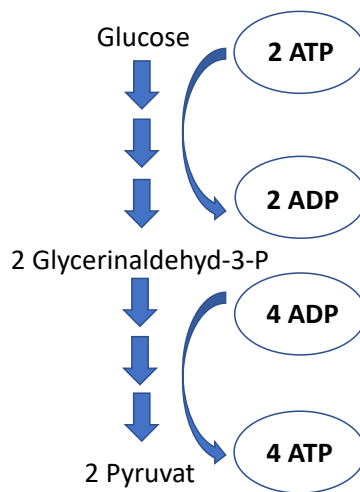


Abbildung 2.4: Vereinfachte schematische Darstellung der Glykolyse. Im ersten Abschnitt des Stoffwechselweges entsteht aus Glucose über mehrere Zwischenschritte Glycerinaldehyd-3-Phosphat, wobei zwei ATP zu ADP dephosphoryliert werden. Es handelt sich um den energieverbrauchenden Teil der Glucose-Spaltung. Im zweiten Abschnitt reagiert Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA3P) weiter zu Pyruvat, wobei zwei ADP zu zwei ATP phosphoryliert werden. Da aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle GA3P gewonnen werden, entstehen netto zwei ATP im Rahmen der anaeroben Glykolyse.

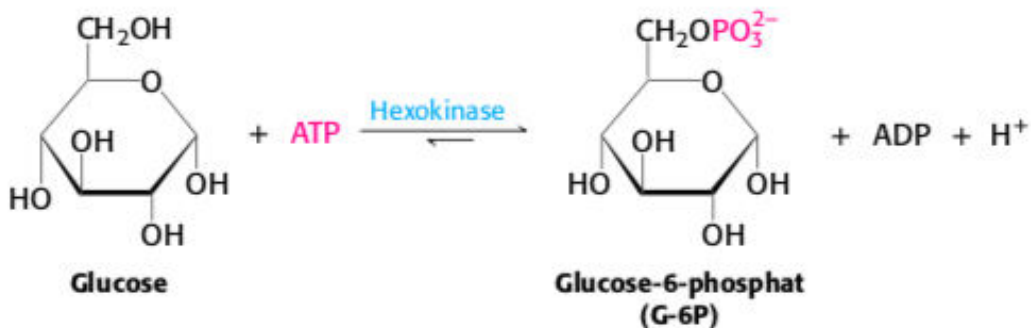


Abbildung 2.5: Erster Reaktionsschritt der Glykolyse: Glucose reagiert zu Glucose-6-Phosphat (aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013)

Der erste Schritt der Glykolyse aus aufgenommener Glucose ist eine als „Falle“ wirkende Phosphorylierungsreaktion, wobei an das C6-Atom der Glucose unter

Abspaltung von H^+ eine Phosphatgruppe angehängt wird. Es entsteht Glucose-6-Phosphat. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Hexokinase (HK).

Normalerweise kann ein Glucosemolekül mithilfe von GLUT-Proteinen sowohl in die Zelle hinein als auch wieder heraus gelangen, es folgt hierbei einzig und allein seinem Konzentrationsgradienten. Wurde allerdings ein Phosphat angehängt, ist diese Wanderung nicht mehr möglich, die Glucose ist sprichwörtlich in der Zelle „gefangen“, weshalb dieser Reaktionsmechanismus auch als „Glucosefalle“ bezeichnet wird (Rassow *et al.*, 2016).

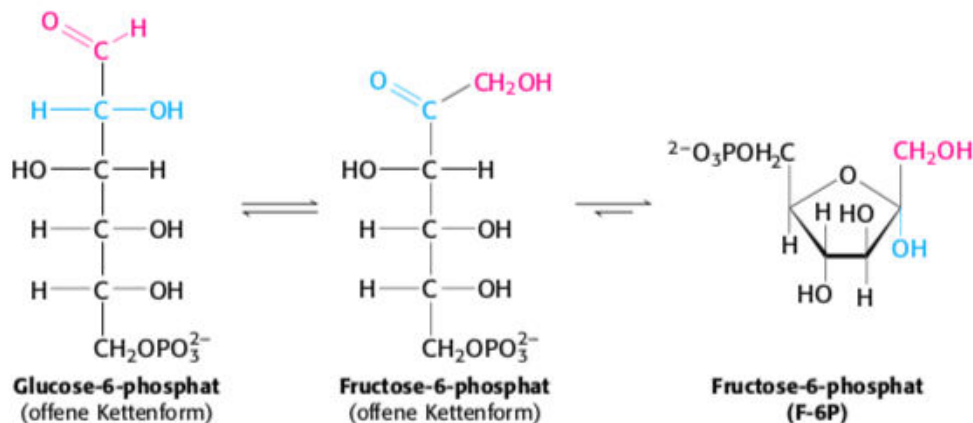


Abbildung 2.6: 2. Reaktionsschritt der Glykolyse: Isomerisierungsreaktion von Glucose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat katalysiert durch Hexophosphatisomerase (aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013)

Bei dem zweiten Schritt der Glykolyse handelt es sich um eine Isomerisierungsreaktion, katalysiert durch eine Isomerase. Hierbei wird Glucose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt. Eigentlich liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf Seiten des Edukts, jedoch wird Fructose-6-Phosphat durch Folgereaktionen stetig weiter umgesetzt, sodass das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produkts verlagert wird.

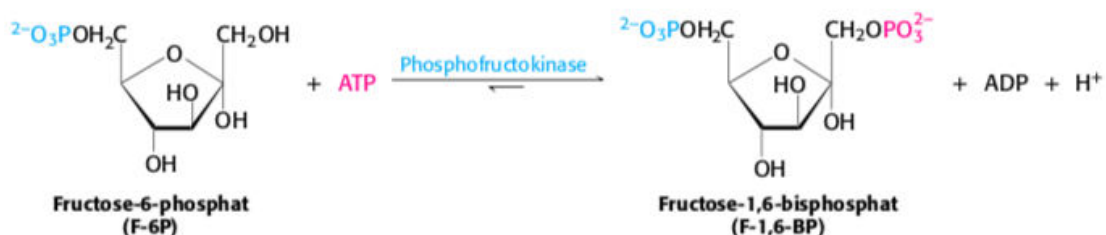


Abbildung 2.7: 3. Reaktionsschritt der Glykolyse: Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat durch Phosphofruktokinase-1. Hierbei kommt es

zur Spaltung einer Anhydridbindung des ATPs (Abbildung aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013)

Der dritte Schritt der Glykolyse wird durch Phosphofruktokinase 1 (Fructose-6-Phosphat-1-Kinase, PFK-1) katalysiert. Es handelt sich hierbei um eine weitere Phosphorylierungsreaktion, welche ebenfalls die Spaltung einer ATP-Anhydridbindung voraussetzt, um ausreichend Aktivierungsenergie bereit zu stellen. PFK-1 ist ein sehr komplexes Enzym, das auf vielfältige Art und Weise reguliert wird und die wichtigste Schlüsselreaktion der Glykolyse katalysiert. Ich habe diese Regulationsmechanismen im Zuge meiner Arbeit untersucht und werde daher im folgenden Kapitel genauer darauf eingehen.

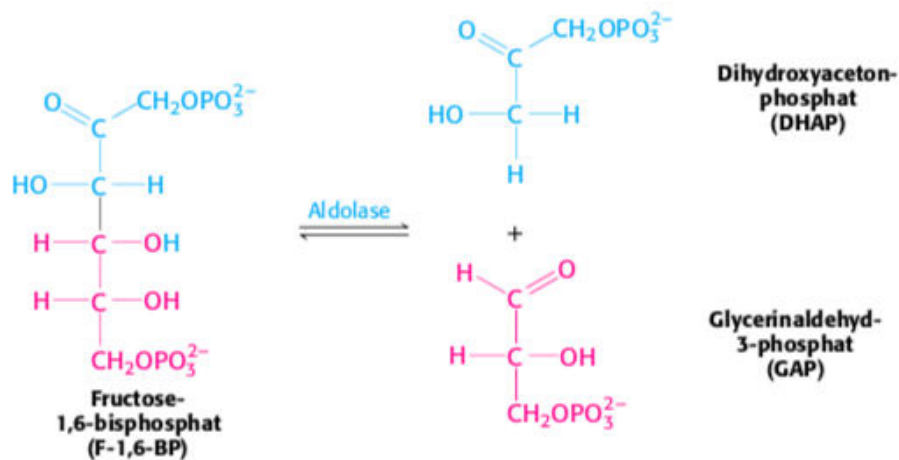


Abbildung 2.8: 4. Reaktionsschritt der Glykolyse: Aldolspaltung von Fructose-1,6-Bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat durch Aldolase A (Abbildung aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013)

Reaktionsschritt vier der Glykolyse stellt eine Aldolspaltung dar, die durch das Enzym Fructose-1,6-Bisphosphataldolase, oder kurz Aldolase A, unterstützt wird. Hierfür ist es nötig, dass bei Schritt drei zuvor die Carbonylgruppe des Glucose-6-phosphats von C-Atom 1 auf C-Atom 2 verschoben wurde (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014). Nun kann diese Carbonylgruppe mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysylrestes des Enzyms reagieren, wobei eine Schiff'sche Base entsteht. Anschließend erfolgt die Protonierung der Schiff-Base, wobei die C-C-Bindung zwischen C-3- und C-4-Atom des Fructose-1,6-Bisphosphats destabilisiert wird, sodass Glycerinaldehyd-3-Phosphat abgespalten werden kann. Am Enzym bleibt das Enolat-Anion des Dihydroxyacetonphosphats gebunden. Letzteres wird schlussendlich deprotoniert und hydrolytisch abgespalten (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014; Rassow *et al.*, 2016).

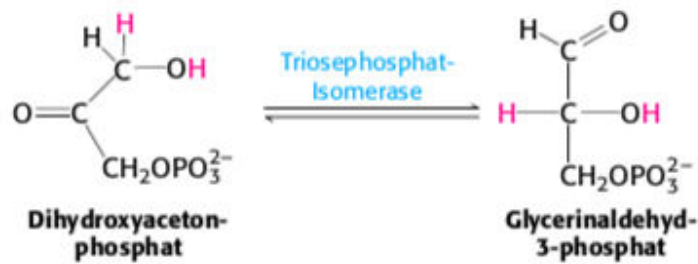


Abbildung 2.9: 5. Reaktionsschritt der Glykolyse: Isomerisierung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Abbildung aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013)

Mithilfe der Triosephosphat-Isomerase können Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat ineinander überführt werden. Allerdings wird ausschließlich Letzteres im zweiten Abschnitt der Glykolyse weiter verwertet und somit ständig aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Dies führt zu einer Verlagerung des Gleichgewichtes auf die Seite des Glycerinaldehyd-3-phosphats, wie bereits in Schritt zwei für die Bildung von Fructose-6-phosphat aus Glucose-6-phosphat beschrieben.

Durch die Triosephosphat-Isomerase-Reaktion wird der zweite Abschnitt der Glykolyse eingeleitet, in dem unter Gewinnung von 4 ATP und 2 NADH + H⁺ schlussendlich Pyruvat entsteht, welches anschließend entweder unter aeroben Bedingungen in den Citratzyklus eingeschleust oder unter anaeroben Bedingungen zu Laktat weiter verwertet werden kann. Es handelt sich um den energiegenerierenden Teil der Glykolyse.

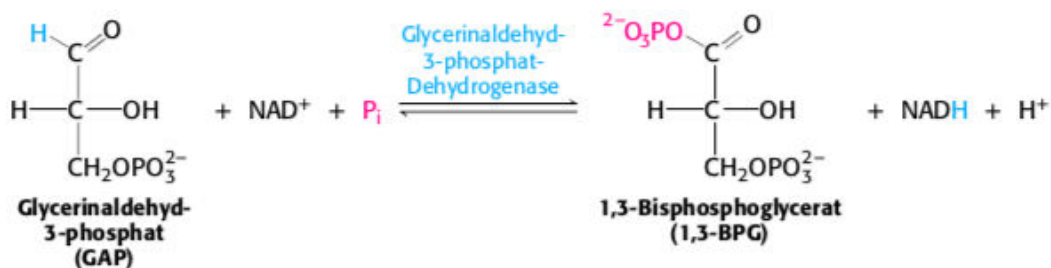


Abbildung 2.10: 6. Reaktionsschritt der Glykolyse: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasereaktion (Substratkettenphosphorylierung). Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (Abbildung aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013)

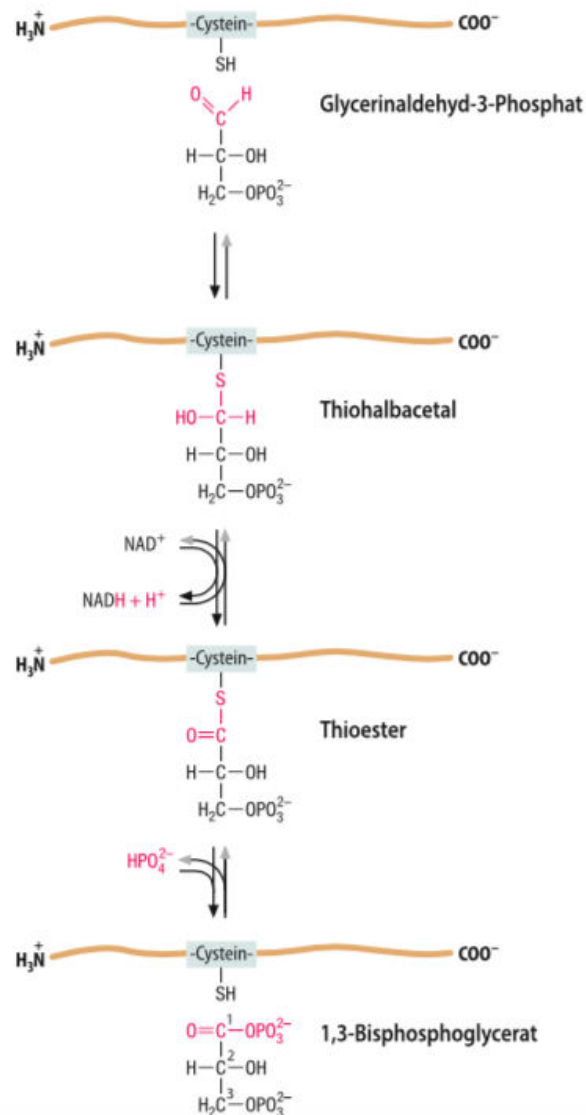


Abbildung 2.11: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion. Zunächst bindet Glycerinaldehyd-3-Phosphat an einen Cysteinyrest des Enzyms, welcher eine SH-Gruppe besitzt. Hierdurch wird es in passende Position gegenüber NAD^+ gebracht. Es bildet sich ein Thiohalbacetal durch Reaktion der SH-Gruppe des Enzyms mit der Aldehydgruppe des Substrats. Die Carbonylgruppe wandelt sich hierbei zu einer H-C-OH-Gruppe, die NAD^+ -abhängige Dehydrogenasen zur Katalyse von Reaktionen benötigen (Rassow et al., 2016). NAD^+ ist nicht-kovalent an das Enzym gebunden. Es dient der Oxidation des Thiohalbacetals unter Entstehung eines Thioesters, einer energiereichen Verbindung mit hohem Gruppenübertragungspotential. Durch phosphorolytische Spaltung des Esters wird schließlich 1,3-Bisphosphoglycerat gebildet, wobei die Energie der vorherigen Verbindung durch diese Art der Spaltung erhalten bleibt (Abbildung aus Löffler, Petrides and Heinrich, 2014).

Die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat erfolgt in zwei Teilreaktionen (Reaktionsablauf siehe Abbildung 2.11). Schließlich wird 1,3-Bisphosphoglycerat gebildet. Die beiden Phosphatgruppen des 1,3-Bisphosphoglycerats unterscheiden sich sehr stark anhand der Energie ihrer Bindungen: Das Phosphat an C1 ist durch eine gemischte

Phosphorsäureanhydridbindung gebunden, jenes an C3 stellt einen einfachen Phosphorsäureester dar.

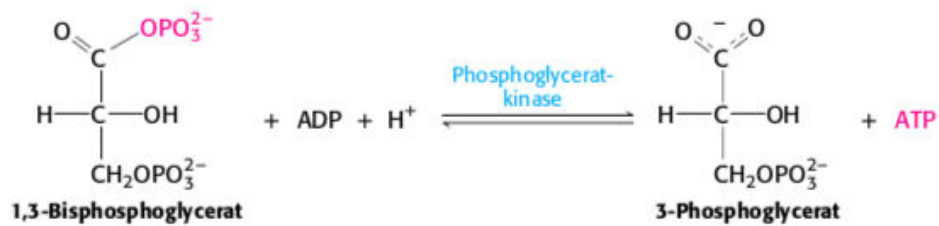


Abbildung 2.12: 7. Reaktionsschritt der Glykolyse: Bildung von 3-Phosphoglycerat aus 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert durch Phosphoglyceratkinase. Hierbei wird im Rahmen der Substratkettenphosphorylierung erstmalig ATP aus ADP generiert (Abbildung aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013).

In Schritt sieben wird nun zum ersten Mal ATP aus ADP gebildet, und zwar im Zuge einer sogenannten „Substratkettenphosphorylierungsreaktion“. 1,3-Bisphosphoglycerat reagiert unter Katalyse durch 3-Phosphoglycerat-Kinase zu 3-Phosphoglycerat, wobei die energiereiche gemischte Phosphorsäureanhydridbindung gespalten wird, welche in Reaktionsschritt sechs entstand. Die hierbei freiwerdende Energie kann zur Synthese von ATP genutzt werden.

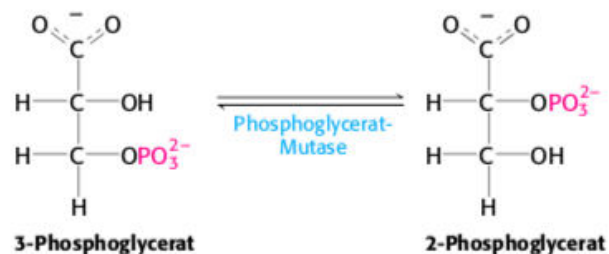


Abbildung 2.13: 8. Reaktionsschritt der Glykolyse: Isomerisierungsreaktion von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat katalysiert durch Phosphoglyceratmutase (aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013).

Schritt acht stellt eine Isomerisierungsreaktion von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat dar. Katalysiert wird die Reaktion durch Phosphoglyceratmutase im Gleichgewicht.

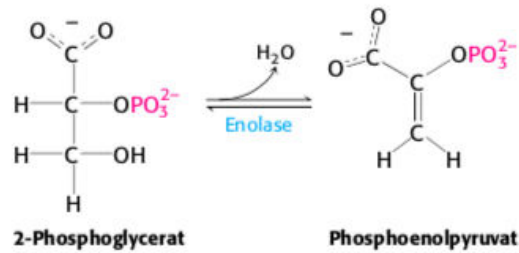


Abbildung 2.14: 9. Reaktionsschritt der Glykolyse: Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert durch Enolase (aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013).

Das nachfolgende Enzym Enolase ermöglicht nun nämlich erst die Reaktion von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat, wobei Wasser abgespalten wird. Hierbei wird die Energie innerhalb der Verbindung umverteilt: Das Phosphat an Position zwei bildet nun eine Enol-Phosphat-Form.

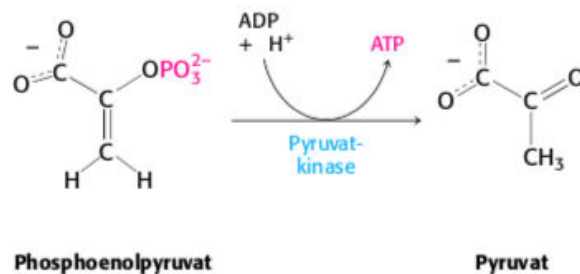


Abbildung 2.15: 10. Reaktionsschritt der Glykolyse: Keto-Enol-Umlagerung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat durch Pyruvatkinase. Hierbei wird zudem ATP aus ADP generiert.

Unter dem Einfluss der Pyruvatkinase wird im letzten Schritt der Glykolyse Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat gebildet und zwar unter Bildung von ATP durch die Übertragung der Phosphatgruppe des Phosphoenolpyruvats auf ADP. Die Netto-Energie für diese Phosphat-Übertragungsreaktion stammt zum größten Teil aus der Keto-Enol-Umlagerung, dem Schritt neun der Glykolyse (Zeeck, Axel; Zeeck, Sabine; Grond, 2017). So wird durch diese Reaktion der Nutzen der Isomerisierung des Phosphats in Reaktion acht deutlich.

2.3 Wichtige Schlüsselenzyme der Glykolyse und bekannte Regulationsmechanismen

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich mich mit der Regulation der Glykolyse durch Magnesium und Phosphat beschäftigt. Entscheidend ist hierfür die Aktivierung und Hemmung der Schlüsselenzyme dieses Stoffwechselweges. Aufgrund dessen werde ich im Folgenden genauer auf die in der Literatur bekannten Regulationsmechanismen dieser Enzyme eingehen.

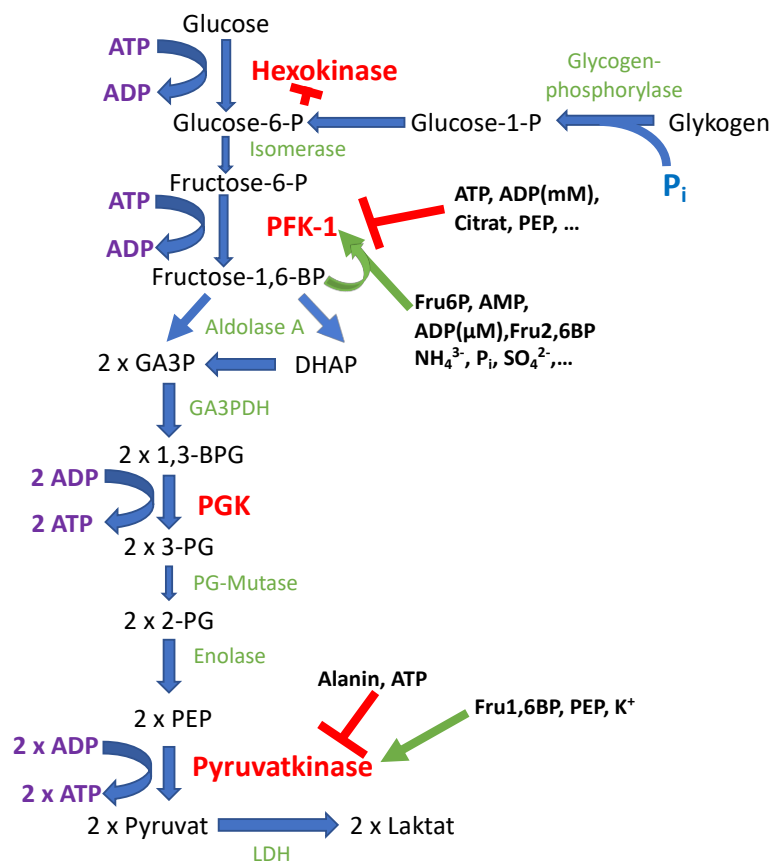


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der Glykolyse sowie der Regulation wichtiger Schlüsselenzyme. Glucose-6-P = Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-P = Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-BP = Fructose-1,6-Bisphosphat, GA3P = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, PEP = Phosphoenolpyruvat, Glucose-1-P = Glucose-1-Phosphat, PFK-1 = Phosphofruktokinase-1, GA3PDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, PG-Mutase = Phosphoglyceratmutase, LDH = Laktat-Dehydrogenase

2.3.1 Hexokinase

Die Familie der Hexokinasen besteht aus 4 Isoenzymen (I, II, III & IV), die sich hinsichtlich ihrer zellulären sowie gewebspezifischen Lokalisation, ihrer katalytischen Eigenschaften sowie ihrer Regulationsmechanismen unterscheiden. In den meisten Zellen des menschlichen Körpers dominieren die

Isoenzyme I bis III. Eine Ausnahme bilden lediglich die Hepatozyten der Leber sowie die β -Zellen der Pankreas. Hier findet sich Hexokinase IV, auch als *Glucokinase* bezeichnet mit einem Molekulargewicht von 50kDa. Sie weist einen deutlich höheren K_m -Wert für Glucose auf, die Enzym-Substrat-Affinität ist um das 50-fache niedriger im Vergleich zu den übrigen Hexokinasen (Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; Tymoczko, 2013).

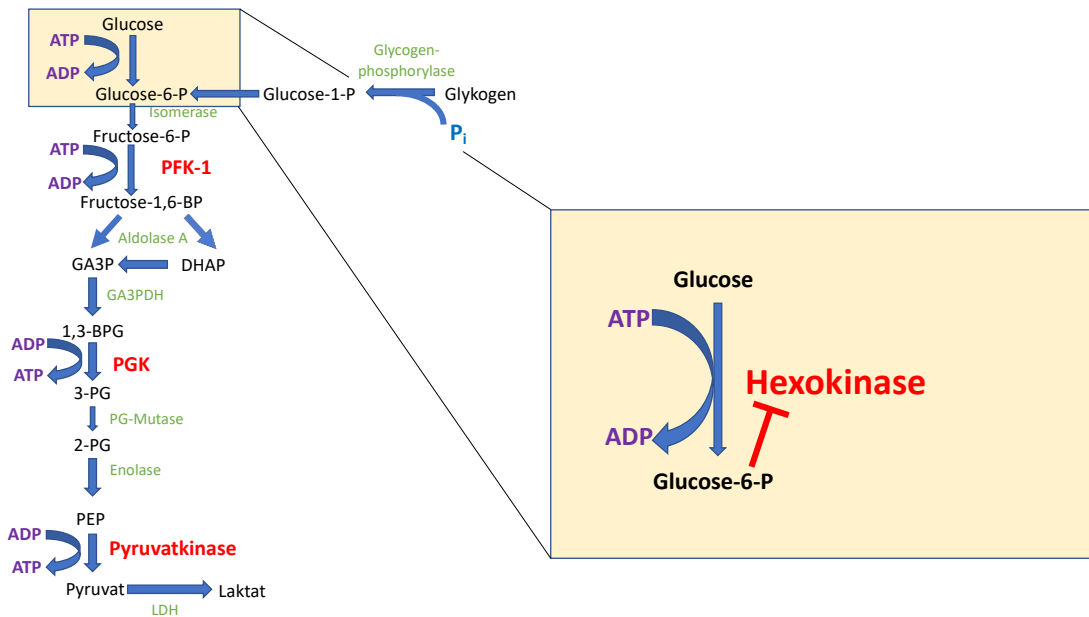


Abbildung 2.17: Hexokinase-Reaktion. In der ersten Reaktion der Glykolyse wird an das C-6-Atom der Glucose ein Phosphatrest angehängt, welcher von ATP abgespalten wurde, wodurch zusätzlich ADP entsteht. Glucose-6-P wirkt wiederum hemmend auf Hexokinase

Diese haben eine molekulare Masse von circa 100 kDa und weisen einen K_m -Wert für Glucose von etwa 0,1mmol/l auf. Zudem werden sie durch Glucose-6-phosphat in physiologischen Konzentrationen gehemmt. Aufgrund dieses Feedback-Hemmmechanismus führt eine Akkumulation von Glucose-6-Phosphat zu einer Inhibition der Hexokinase. In der Folge kommt es durch Ausfallen der Glucose-Fallen-Funktion zu einer Erhöhung des Blutglucose-Spiegels. Ein Regulationsmechanismus, der für Glucokinase nicht zu beobachten ist (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014): In den Hepatozyten wird Glucose in Form von Glykogen gespeichert. Diese Speicherung ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn Glucose im Übermaß im Blut zirkuliert. Durch den höheren K_m -Wert der Glucokinase wird gewährleistet, dass erst ab einer bestimmten Konzentration Glucose in die Hepatozyten aufgenommen und dort gespeichert wird.

Die β -Zellen der Pankreas sind für die Ausschüttung von Insulin zuständig. Dieses Hormon sorgt unter anderem für die verstärkte Aufnahme von Glucose in Fett- und Muskelzellen und verursacht dadurch eine Senkung des Blutzuckerspiegels. Um ein Absinken der Blutglucose unter kritische Werte zu verhindern, ist auch hier statt Hexokinase Glucokinase als erstes Enzym der Glykolyse zu finden (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014; Rassow *et al.*, 2016). Glucokinase dient dort als Glucosesensor.

Der Energiegehalt von Glucose-6-Phosphat ist höher, als derjenige der Glucose. Um den Ablauf dieser Reaktion möglich zu machen, wird der Phosphattransfer daher energetisch mit der Spaltung einer Anhydridbindung von ATP gekoppelt, das Gesamt- ΔG wird somit negativ.

Es ist bekannt, dass Hexokinase nur aktiv werden kann, wenn Magnesium oder andere zweiwertig Metallionen wie Mangan vorhanden sind (Magnani *et al.*, 1988). Das Enzymprotein besteht aus zwei Domänen, die sich im Zuge der Bindung von Glucose aufeinander zubewegen, es kommt also zu einer Konformationsänderung bei Substratkontakt mit einhergehender Affinitätserhöhung. Hierbei dreht sich ein Teil um 12° relativ gegenüber dem Anderen, was schließlich zu einer Umhüllung des Zuckermoleküls durch das Enzym führt. Einzig die am C6-Atom befindliche Hydroxylgruppe, welche anschließend die Phosphorylgruppe des ATPs übernehmen wird, liegt frei. Hierdurch wird die Umgebung der Glucose unpolarer, wodurch die sich anschließende Reaktion zwischen der hydrophilen Hydroxylgruppe des Kohlenhydrates und der Phosphorybosylgruppe des ATPs begünstigt wird (Berg, Stryer and Tymoczko, 2013).

Hexokinase I (HK I) findet sich ubiquitär im menschlichen Körper, wobei eine besonders hohe Konzentration des Enzyms im Gehirn anzutreffen ist (Wilson, 2003). Die Feedback-Hemmung der HK I durch Glucose-6-Phosphat kann durch anorganisches Phosphat $>1\text{mM}$ antagonisiert werden. Hierin unterscheidet sich Hexokinase I von Hexokinase II und III: Letztere werden ebenfalls durch ihr Produkt per Feedback-Mechanismus gehemmt, diese Hemmung kann jedoch nicht aufgehoben werden. Die konzentrationsabhängige Wirkung von Phosphat auf HK I führte zu der Schlussfolgerung, dass zwei unterschiedliche Bindungsstellen für das Ion vorhanden sein müssten (Wilson, 2003). Wilson *et al.* (2003) stellten die Theorie auf, dass Hexokinase I eher eine

katabole, Energie-generierende Rolle habe, Hexokinase II und III hingegen anabole Funktionen übernehmen: die Konzentration von organischem Phosphat steigt, wenn das Energieniveau der Zelle sinkt (Lowry et al., 1964), Hexokinase I wird so durch Antagonisierung der Glucose-6-Phosphat-Hemmung aktiviert und es wird über eine vermehrte glykolytische Aktivität mehr ATP gebildet. Hexokinase II und III hingegen könnten als anabole Enzyme Metabolite für Glykogen- und Lipid-Synthese generieren (Wilson, 2003).

Auf zellulärer Ebene ist Hexokinase I in Mitochondrien-Nähe lokalisiert (Sui and Wilson, 1997). Das Enzym interagiert mit Porin, einem Molekül, welches Poren in der Membran bildet, die dem Transport von Metaboliten über die äußere Mitochondrienmembran dienen. Hexokinase II findet sich vor allem in Insulin-sensitiven Geweben, beispielsweise Skelettmuskulatur und Fettgewebe (Printz et al., 1995; Mandarino et al., 1995; Wilson, 2003). Passend hierzu konnte nachgewiesen werden, dass die Expression sowie die Aktivität des Enzyms durch Insulin stimuliert wird (Vogt et al., 2000). Außerdem ließ sich eine erhöhte Konzentration von Hexokinase-II-mRNA sowie eine vermehrte enzymatische Aktivität nach Muskeltraining in fast-twitch-Muskulatur von Ratten nachweisen (Weber & Pette, 1990; Hofmann & Pette, 1994; O'Dohery et al., 1996).

Hexokinase III zeichnet sich dadurch aus, dass sie als einziges Mitglied der Hexokinasen-Familie durch eine erhöhte Glucosekonzentration (ab ca. 1 mmol/l) gehemmt wird. Diese Hemmung kann allerdings durch ATP antagonisiert werden (Wilson, 2003). Hierbei bleibt die Relevanz dieses Mechanismus *in vivo* allerdings unklar, da die Konzentration von ATP stets hoch genug ist, um die Hemmung durch Glucose zu verhindern (Wilson, 2003). Radojković & Ureta (1987) wiesen des Weiteren nach, dass HK III gegenüber den anderen Hexokinasen die höchste apparente Affinität zu Glucose, allerdings die niedrigste zu ATP und die schwächste Hemmung durch Glucose-6-Phosphat aufweist.

Es wurden zwei unterschiedliche Isoformen der HK IV beobachtet, welche gleiche kinetische Eigenschaften, aber unterschiedliche Funktionen aufweisen. Sie werden durch das gleiche Gen kodiert, durch anschließendes Splicing entstehen allerdings die unterschiedlichen Formen des Enzyms (Roncero et al., 2000). Die neuronale Version ähnelt hierbei der pankreatischen Form, was De Bacher et al. (2016) die Hypothese aufstellen ließ, dass Glukokinase in

Neuronen ebenfalls eine Glucose-Sensing-Funktion übernehmen und somit zur Regulation der Energie-Homöostase beitragen könnte: Sie findet sich im ventromedialen Nucleus des Hypothalamus, dem Zentrum der zentralnervösen Regulation des Glucose-Gleichgewichtes.

Nahezu alle lebenden Organismen besitzen Hexokinase. Prokaryotische Formen haben hierbei eine Molmasse im Bereich von 50 kDa. Dies führte zu der Annahme, dass die 100 kDa schweren Hexokinasen I-III durch Fusion von prokaryotischen Vorgängerenzymen entstanden. Sie weisen zudem Sequenz-Repetitionen sowie große Ähnlichkeiten zwischen den N- und C-terminalen Hälften sowie gegenüber HK-Isoenzymen anderer Spezies auf (Bork et al., 1993; Wilson, 1995; Cárdenas et al., 1998; Wilson, 2003). Die Inhibition durch Glucose-6-Phosphat lässt sich bereits in niederen Eukaryonten wie Seesternen und Parasiten beobachten (White & Wilson, 1989; Thielens et al., 1994), was zu der Annahme führte, dass dieser Regulationsmechanismus sich bereits vor der Genduplikation entwickelte (Wilson, 2003).

2.3.2 Phosphofruktokinase 1 (PFK-1)

Wie bereits in 2.2 im allgemeinen Kapitel zur Glykolyse beschrieben, handelt es sich bei Phosphofruktokinase-1 (PFK-1) um das glykolytische Schlüsselenzym, welches den entscheidenden Schritt der Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat katalysiert. Aufgrund dieser Funktion gilt es als wichtigstes Target für Regulationsprozesse. Daher habe ich mich bei meinen Untersuchungen zu möglichen Glykolyse Regulationsmechanismen hauptsächlich auf dieses Enzym fokussiert. Durch die zentrale Rolle im glykolytischen Stoffwechsel agiert PFK-1 des Weiteren als „Modulator“ bei langsamen Glucosekonzentrationsschwankungen im Blut und setzt diese in einen gleichmäßigen glykolytischen Fluss um (Lenzen, 2014).

2.3.2.1 Struktur und evolutionäre Entwicklung der PFK-1

In Säugetieren wird PFK-1 durch drei unterschiedliche Gene kodiert, die jeweils für die Expression einer Isoform des Enzyms verantwortlich sind (Dunaway *et al.*, 1988):

- PFK-M (Muskel; im Menschen 85,2 kDa),
- PFK-L (Leber; im Menschen 85 kDa) und
- PFK-P (Blutplättchen; im Menschen 85,6 kDa) (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010; Mor, Cheung and Vousden, 2011)

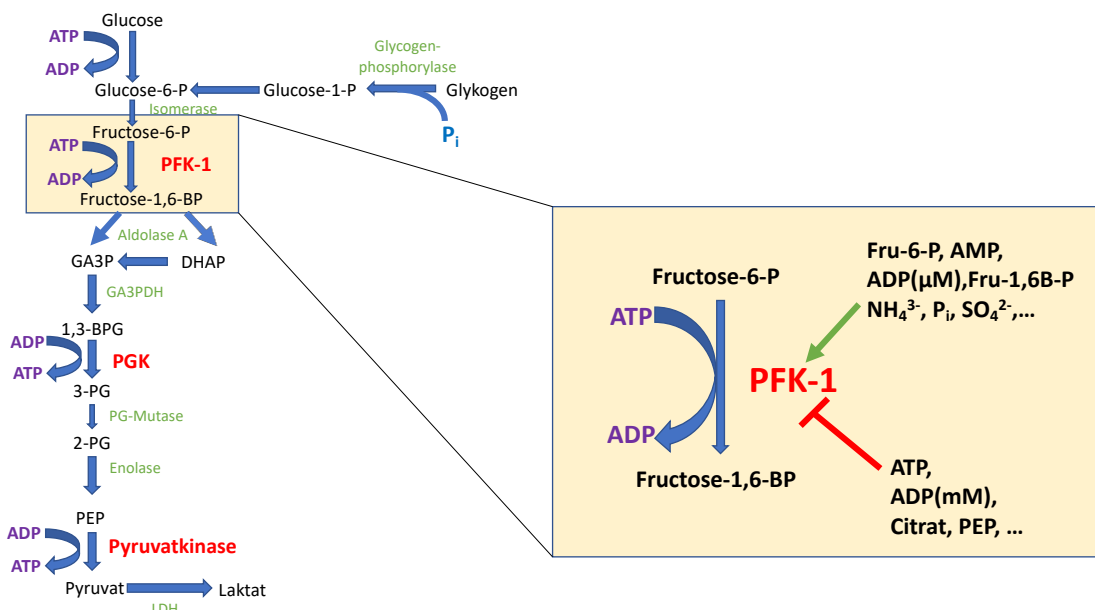


Abbildung 2.18: Phosphofruktokinase-Reaktion. PFK-1 katalysiert die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat. Hierbei wird ein ATP zu ADP umgewandelt. Gehemmt wird diese wichtige Schlüsselreaktion der Glykolyse unter anderem durch ATP, ADP, Citrat und Phosphoenolpyruvat. Eine Aktivierung des Enzyms erfolgt beispielsweise durch sein Produkt Fructose-6-Phosphat, durch AMP, micromolare Konzentrationen von ADP, durch Fructose-1,6-Bisphosphat und viele weitere Effektoren (2.3.2.2).

Hierbei ist PFK-M auf dem humanen Chromosom 12 (Howard, Akots and Bowden, 1996), PFK-L auf Chromosom 21 und PFK-P auf Chromosom 10 lokalisiert (Vora *et al.*, 1983; Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010). PFK-M und PFK-L stimmen in 68,6% der Aminosäuren überein, PFK-M und PFK-P in 70,3 % und PFK-L und PFK-P in 66,6 %. Hinsichtlich der Verteilung der Isoformen beim Menschen ist bekannt, dass Skelettmuskulatur ausschließlich PFK-M exprimiert, in allen anderen Geweben finden sich alle drei Formen in unterschiedlich starker gewebsspezifischer Ausprägung (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010). Daraus folgt, dass PFK-M als einziger Enzymtyp in allen Geweben zu finden ist.

Das Enzym besteht aus Protomeren, die sich zu Dimeren und schließlich zu Tetrameren zusammenschließen. Auch die Bildung höherer Oligomere ist möglich. Das Gleichgewicht zwischen diesen unterschiedlichen Organisationszuständen der PFK, vor allem jenes zwischen Dimeren und Tetrameren, korreliert direkt mit der Aktivität des Enzyms. Bei Säugetieren stellen Tetramere die aktive Form dar. Allosterisch regulierende Liganden beeinflussen mithilfe dieses Mechanismus die Aktivität der PFK, indem sie entweder die tetramere oder die dimere Konformation stabilisieren (Mayr, 1984; Buschmeier, Meyer and Mayr, 1987a; Banaszak *et al.*, 2011; Schöneberg *et al.*, 2013).

Man geht heute allgemein davon aus, dass die eukaryotische PFK – und somit auch die humane – durch konsekutive Genduplikationen und Mutationen aus der prokaryotischen Form hervorgegangen ist (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010). Bei diesen Vorgängen sind zusätzliche, regulatorische Bindestellen entstanden, zum Beispiel für ATP und Fructose-2,6-Bisphosphat. Die N-terminale Domäne des eukaryotischen Enzyms hat hierbei die katalytische Funktion konserviert, wohingegen der C-Terminus neue regulatorische Funktionen übernahm (Banaszak *et al.*, 2011).

Die Phosphofruktokinase-Untereinheiten des Säugetierenzym (ca. 80 kDa) enthalten zwei Sequenzwiederholungen (α - und β -Domänen), die beide jeweils homolog zu einer bakteriellen Untereinheit sind (Banaszak *et al.*, 2011).

Die Kontaktstellen zwischen α - und β -Domänen bilden die Bindungsstellen für aktivitätsregulierende Liganden. Interaktion der verschiedenen Domänen der Untereinheiten führt zur Ausbildung von Dimeren. Zur Tetramerisierung sind Interaktionen von Sekundärstruktur-Elementen von Nöten (Banaszak *et al.*, 2011).

Sehr gut untersucht ist die Phosphofruktokinase aus Hefen, welche bis zu drei unterschiedliche Iso-Protomere enthält. Dimere bilden wiederum höhere Oligomere. Es wurden in allen untersuchten Hefe-Spezies α - sowie β -Untereinheiten gefunden, welche einander sehr ähnlich sind (Kopperschläger, 1994; Schröter and Kopperschläger, 1996; Bär, Schellenberger and Kopperschläger, 1997; Reuter *et al.*, 2000; Kirchberger *et al.*, 2002).

2.3.2.2 Regulationsmechanismen der PFK-1

Die Regulation der Aktivität der Säugtier-PFK geht meist mit einer Beeinflussung des Dimer/Tetramer-Gleichgewichtes durch unterschiedliche Regulatoren einher. Hierbei ist die tetramere Form die aktive, die dimere Form die inaktive.

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Regulationsmechanismen sollen einen Überblick über die Regulation des Enzyms geben, es wird kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben.

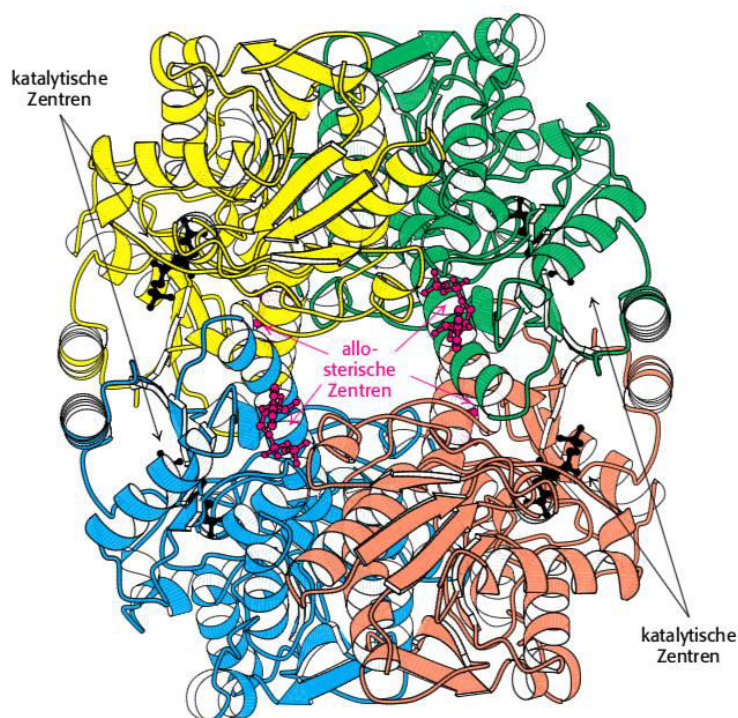


Abbildung 2.19: Struktur der PFK aus *E. coli* (Abbildung aus Berg, Stryer and Tymoczko, 2013). Deutlich erkennbar ist die räumliche Trennung der allosterischen und katalytischen Zentren des Enzyms. Es handelt sich um ein Tetramer mit vier identischen Untereinheiten.

2.3.2.2.1 Allosterische Regulationsmechanismen

Je nach Organ beziehungsweise Gewebe und entsprechender Funktion unterscheiden sich die vorhandenen PFK-Isoenzyme in ihrer allosterischen Regulation. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich die regulatorischen Eigenschaften der muskulären Phosphofruktokinase-1 untersucht, aus diesem Grunde werde ich mich auf dieses Isoenzym fokussieren, jedoch auch einige Unterschiede zur Leber-Form erläutern.

In der Muskulatur dient der Glucose-Stoffwechsel der Deckung des muskulären ATP-Bedarfs. Die Aktivität der PFK wird daher hauptsächlich über den Energiezustand sowie den pH-Wert der Zelle reguliert. Repräsentiert wird das Energiepotential über das ATP/AMP-Verhältnis, bei verstärkter muskulärer Arbeit kommt es zu einem Absinken des ATPs und zu einer Zunahme von AMP (Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; Tymoczko, 2013; Löffler, Petrides and Heinrich, 2014). Letzteres wirkt daher als Aktivator der PFK-1, freies ATP führt hingegen eine Hemmung herbei (Passeguet and Lowry, 1964; Löffler, Petrides and Heinrich, 2014). Worin liegt dies begründet? Bei schnellem Verbrauch von ATP kann durch Adenylatkinase – beziehungsweise Myokinase, wie die Muskel-Isoform des Enzyms genannt wird – aus 2 ADP jeweils 1 AMP und 1 ATP gebildet werden. Aus ADP kann also ATP synthetisiert werden, AMP wird zum Signal eines niedrigen zellulären Energiepotentials (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014)

Im Rahmen einer verstärkten anaeroben Glykolyse kommt es zum Anfall von Laktat und somit zum Absinken des pH-Werts. Um die Muskelzelle vor einer Schädigung durch zu starke Azidose zu schützen, verstärkt ein niedriger pH-Wert die Hemmung durch freies ATP (Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; Tymoczko, 2013). Letzteres ist als MgATP Substrat der PFK-1. Möglich ist dies durch das Vorhandensein zweier unabhängiger Bindestellen, einer katalytischen mit einem K_d -Wert von ca. 0,15mM und einer zweiten, inhibitorischen mit einem K_d -Wert für Mg-freies ATP von ca. 2,5mM (Sola-Penna et al., 2010).

In der Leber dient die Glykolyse vorrangig der Aufrechterhaltung eines konstanten Blutglucosespiegels. Der stärkste, bekannte Aktivator der Leber-PFK ist Fructose-2,6-Bisphosphat. Es wird durch die Phosphofruktokinase-Domäne des bifunktionellen Enzyms Phosphofruktokinase-2/Fruktosebisphosphatase 2 (PFKFB) gebildet, wenn die Konzentration von Glucose im Blut ansteigt. Ist der Glucose-Spiegel hingegen niedrig, kommt es zur Ausschüttung von Glucagon, welches mittels cAMP-Proteinkinase-A-Signalweg eine Phosphorylierung der Leber-PFK-FB herbeiführt. Dies bedingt die Aktivierung der Phosphatase-Funktion des Enzyms und somit die Spaltung von Fructose-2,6-Bisphosphat. Im letzten Schritt der Glykolyse entsteht Pyruvat, welches mithilfe der Pyruvatdehydrogenase aerob zu Acetyl-CoA

reagiert. Letzteres wiederum reagiert, katalysiert durch Citrat-Synthase, zu Citrat. Dieser Schritt ist bereits Teil des Citratzyklus. Citrat hat ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der PFK in Leber und Muskel (Berg, Stryer and Tymoczko, 2013; Löffler, Petrides and Heinrich, 2014; Rassow *et al.*, 2016). Ein sinkender pH-Wert hat hier hingegen keinerlei Auswirkung (Berg, Stryer and Tymoczko, 2013).

Bei der Hemmung der PFK durch Citrat und ATP handelt es sich um eine Feedback-Hemmung. Dieser Mechanismus dürfte insbesondere im Muskel bei Aerobie und Verfügbarkeit von freien Fettsäuren eine Rolle spielen: Es kommt durch β -Oxidation der Fettsäuren zu einer vermehrten Bildung von Acetyl-CoA. Daher macht es Sinn, über die Citratbildung aus Letzterem die PFK so weit abzuschalten, dass kein zusätzliches Acetyl-CoA aus Pyruvat, also aus der Glykolyse mehr gebildet wird.

In diesem Sinne agiert auch Laktat pH-unabhängig als Hemmstoff des Enzyms. Es reduziert die Affinität zu MgATP/Fructose-6-Phosphat und stabilisiert die Dimer-Form der Phosphofruktokinase. Antagonisiert werden kann dies dementsprechend durch tetramerisierende Bedingungen (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S. Coelho, *et al.*, 2010). Auch Phosphoenolpyruvat hat einen hemmenden Einfluss, insbesondere auf Muskel-Typ-PFK (Bloxham and Lardy, 1973).

2.3.2.2.2 Regulation durch Interaktion mit dem Zytoskelett der Zelle

Muskeltyp-PFK (PFK-M) assoziiert unter bestimmten Bedingungen reversibel mit Zellkomponenten wie Aktin-Filamenten, Mikrotubuli und dem integralen Anionen-Membrantransporter Band 3. Dies hat wiederum Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms: Die Bindung an F-Actin stabilisiert die tetramere Form und führt somit eine Aktivierung herbei, Interaktionen mit Mikrotubuli und Band 3 hingegen stabilisieren die Dimere Version und verursachen daher eine Inhibition. Assoziation und Dissoziation zwischen PFK-M und Zellkomponenten sind durch verschiedene Effektoren dynamisch reguliert, wodurch ein wichtiger Beitrag zur Regulation der Glykolyseaktivität geleistet werden kann (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010). Beispielsweise wird die Assoziation der PFK-M mit Band 3 in Erythrozyten durch den Gehalt an O_2 in der Zelle reguliert: Es besteht ein Wettbewerb zwischen Desoxyhämoglobin und PFK um die Bindungsstelle. Ist das O_2 -Level niedrig, verdrängt

Desoxyhämoglobin PFK-M von Band 3. Da eine Bindung des Enzyms an Letzteres zu einer Hemmung desselben führt, bewirkt eine Dissoziation folglich eine Verminderung dieser Hemmung, was einer Aktivierung gleichkommt. Folge ist eine vermehrte Aktivität der Glykolyse. Die Assoziation zwischen PFK und F-Actin hingegen erhöht die Effizienz der Glykolyse (Liu *et al.*, 2010; Sola-Penna, Da Silva, Wagner S. Coelho, *et al.*, 2010).

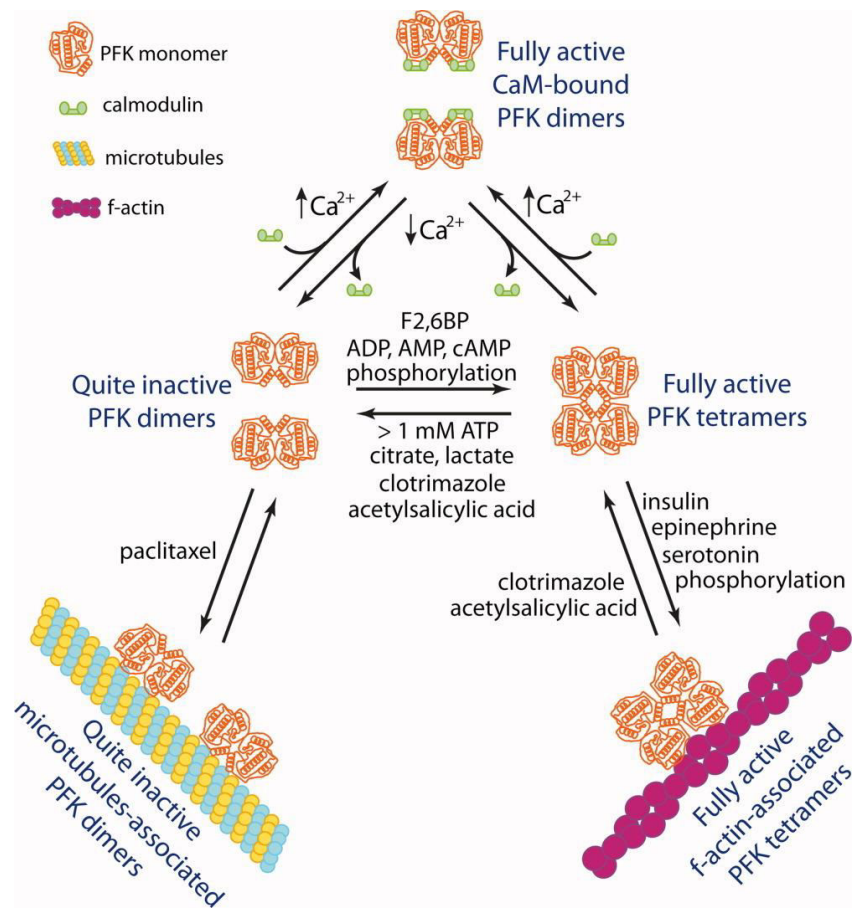


Abbildung 2.20 aus Sola-Penna *et al.*, 2010: **Schematische Darstellung der Regulation der PFK.** Die Regulation der PFK-Aktivität erfolgt per Beeinflussung des Dimer/Tetramer-Gleichgewichts durch Stabilisierung aktiver Tetramere mittels aktivierende Metabolite (Fru-2,6-BP, ADP, AMP, cAMP, Phosphorylierung) und inaktiver Dimere durch hemmende Metabolite (ATP, Citrat, Laktat). Zudem ist eine Aktivierung durch Begünstigung der Bindung von Tetrameren an f-Actin beobachtet worden. Diese wird durch Insulin, Adrenalin und Serotonin über Phosphorylierungsreaktionen vermittelt. Umgekehrt führt ein Abdiffundieren zu einer Hemmung. Inaktive Dimere binden hingegen an Microtubuli, wodurch der inaktive Zustand stabilisiert wird. Medikamentös wird dies in der Behandlung von Tumoren genutzt (Paclitaxel), wo durch Hemmung der PFK der Tumorstoffwechsel zu drosseln versucht wird. Eine Besonderheit stellt die Regulation der PFK durch Calmodulin dar: Kommt es zu einer Bindung lediglich an die High-Affinity-Bindestelle des Enzyms, so entstehen aktive Dimere. Wird Calmodulin zusätzlich an der Low-Affinity-Bindestelle gebunden, kommt es hingegen zu einer starken Inhibition der Dimere.

2.3.2.2.3 Regulation durch Phosphorylierungsreaktionen

Muskeltyp-PFK wird zusätzlich durch Phosphorylierungsreaktionen reguliert. Diese erfolgen durch verschiedene Proteinkinasen (PK) an Serin, Threonin oder Thyrosinresten. Es kommt hierdurch nicht zu einer direkten Aktivitätssteigerung, allerdings wird die Aktivierung des Enzyms durch Fructose-6-Phosphat moduliert, die Kooperativität der Bindung dieses Substrats wird gesenkt (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010). Zusätzlich wird die Empfindlichkeit gegenüber einer Inhibition durch ATP gesenkt, was Sola-Penna *et al.* sich durch eine Stabilisierung der tetrameren PFK-Form im Zuge der Phosphorylierung erklärten (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010). Auch die Regulation der Oligomersierung durch andere Liganden wird beeinflusst (Cai *et al.*, 1997). So führt zum Beispiel eine Phosphorylierung durch PK-A dazu, dass PFK-M nicht mehr durch einen Laktatanstieg inhibiert werden kann. Im Zuge einer Adrenalinausschüttung, beispielsweise bei physikalischer Anstrengung, kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase A und hierdurch zur Phosphorylierung der PFK-M, wodurch der hemmende Effekt des anfallenden Laktats auf das Enzym vermindert wird (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010).

Auch andere Hormone, wie Insulin oder Serotonin, können Phosphorylierungen der PFK-M herbeiführen und somit zu einer Aktivierung der Glykolyse beitragen (Gomes Alves and Sola-Penna, 2003; Coelho, Costa and Sola-Penna, 2007).

Das phosphorylierte Enzym weist eine verstärkte Affinität zu F-Actin auf, wodurch wiederum die Aktivität der PFK unterstützt wird (Luther and Lee, 1986). Daher führt ein Anstieg der Hormone Adrenalin, Insulin und Serotonin auch zu einer vermehrten Bindung von PFK an das Zytoskelett (Luther and Lee, 1986; Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010).

Harrahy *et al.* beschreiben zudem eine adrenalinabhängige Phosphorylierung eines Serinrestes für Kaninchenherzmuskel-PFK (Harrahy *et al.*, 1997).

Mahrenholz *et al.* führten Versuche mit PFK aus Schafsherz durch, wobei sie aus den Ergebnissen auf mindestens zwei Stellen schlossen, an denen PFK durch CaM-Kinase phosphoryliert werden kann, die mit den Phosphorylierungsstellen der PK-A nicht identisch zu sein schienen (Mahrenholz, Lan and Mansour, 1991). Ergebnis einer Phosphorylierung an diesen Stellen war eine erhöhte Sensibilität des Enzyms gegenüber Inhibition

durch ATP, außerdem eine leichte Erhöhung des K_m für Fructose-6-Phosphat (Mahrenholz, Lan and Mansour, 1991).

2.3.2.2.4 PFK-1-Regulation durch Ionen

Sugden & Newsholm haben in einer Arbeit von 1975 den Effekt von Ammonium (NH_4^+), Phosphat (P_i) und Kaliumionen (K^+) auf PFK aus unterschiedlichen Tiergeweben untersucht. Verwendet wurden Enzyme aus Nerven- und Muskelgewebe von Vertebraten und Nicht-Vertebraten. Hierbei zeigte sich bei einer K^+ -Konzentration von 100mM ein aktivierender Effekt von Ammonium und Phosphat auf die PFK aus Muskelgewebe von Nicht-Vertebraten, für das Enzym aus Vertebraten-Muskel konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden.

Die Autoren untersuchten des Weiteren die Effekte von K^+ , NH_4^+ und P_i auf die Interaktion zwischen Phosphofruktokinase und Fructose-6-Phosphat, ATP und AMP. Es zeigte sich eine aktivierende Wirkung von Ammoniumionen und Phosphat auf alle untersuchten PFKs bei inhibitorischen ATP-Konzentrationen (Sugden and Newsholme, 1975).

Bei Krämpfen oder Ischämie kommt es zu einem Anstieg der Ammonium-Konzentration in Nervenzellen. Eine mögliche Regulation der enzymatischen Aktivität der PFK durch NH_4^+ , wäre daher laut Sugden & Newsholm bei Säugetieren wohl eher im Nervengewebe von Bedeutung (Sugden and Newsholme, 1975).

Die Phosphatkonzentration nimmt sowohl im Muskel- als auch im Nervengewebe bei kataboler Stoffwechsellage zu. Dies ist unter anderem durch die erhöhte kontraktile Aktivität, den vermehrten Ionen-Transport und entstehende Anoxie bedingt (Passonneau and Lowry, 1962; Karpatkin, Helmreich and Cori, 1964; Regen *et al.*, 1964; Helmreich and Cori, 1966; Rolleston and Newsholme, 1967; Opie, Owen and Mansford, 1971). Somit könnten Phosphat und Ammoniumionen laut Sugden & Newsholm (1975) vor allem während anaerober Muskelarbeit eine Aktivierung der PFK über diesen Mechanismus herbeiführen. Mögliche Quelle für Phosphat könnte laut den beiden Autoren die ATP- und Kreatin-Phosphat-Hydrolyse für Phosphat sowie für NH_4^+ entstehendes AMP darstellen (Sugden and Newsholme, 1975). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Phosphat und Ammonium auf die PFK-Aktivität mit PFK aus Rattenmuskel sowie auf die Gesamtglykolyseaktivität untersucht, um oben beschriebene Beobachtungen zu reproduzieren und weiter zu charakterisieren.

2.3.2.2.5 Regulation der PFK-1 durch Calcium und Calmodulin

Phosphofruktokinase-1 ist ein Calmodulin-Bindeprotein. Sie besitzt zwei Calmodulin-Bindestellen pro Protomer, die eine unterschiedlich starke Bindeaffinität besitzen: Der K_d der High-Affinity-Bindungsstellen für Calmodulin liegt bei circa 3nM, jener der Low-Affinity-Bindestellen bei circa 1 μ M (Mayr, 1984; Buschmeier, Meyer and Mayr, 1987b).

Abhängig ist die Bindung zwischen Calmodulin (CaM) und PFK von der vorhandenen intrazellulären Calciumkonzentration: eine erhöhte Konzentration von Calcium (Ca^{2+}) führt zu einer vermehrten, eine niedrige Konzentration zu einer verminderten Bindung. Der resultierende Effekt ist wiederum von der Zahl der gebundenen Calmodulin-Moleküle pro PFK-Protomer abhängig: sind beide Bindestellen besetzt, erfolgt eine starke Inhibition des Enzyms, da die dimere Enzymform stabilisiert wird (Mayr, 1984; Buschmeier, Meyer and Mayr, 1987b). Kommt es ausschließlich zu einer Interaktion mit der High-Affinity-Bindungsstelle, ist wohl eine Dissoziation der vorhandenen Tetramere zu Dimeren die Folge, die allerdings in diesem Falle – mit einem gebundenen Calmodulin pro Tetramer – nicht inhibiert sind und eine katalytische Aktivität ähnlich derer der Tetramere aufweisen (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010).

Die Calmodulin-gebundenen, aktiven Dimere können von allosterischen Regulatoren nicht beeinflusst werden, daher ist keine Inhibition durch diese möglich (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S. Coelho, *et al.*, 2010). Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Bindung von Calmodulin an PFK führt, wodurch inhibitorische Effekte ausgeschaltet werden. Dies macht CaM zu einem wichtigen Aktivator der Glykolyse. Es kommt laut Sola-Penna et al. (2010) sogar zu einer effizienteren Unterdrückung der inhibitorischen Effekte von ATP, Citrat und Laktat, als durch Fructose-2,6-Bisphosphat, da die Antagonisierung der Inhibition bei Letzterem in einer Verschiebung des Tetramer-/Dimer-Gleichgewichtes zugunsten der Tetramere besteht. Es entsteht also eine Konkurrenz zwischen agonistischer und antagonistischer Wirkung. Calmodulin hingegen aktiviert Dimere, es besteht also in dem Sinne keine Konkurrenz der aktivierenden und inaktivierenden Effekte (Sola-Penna, Da Silva, Wagner S Coelho, *et al.*, 2010).

2.3.3 Pyruvatkinase

Das dritte wichtige Schlüsselenzym der Glykolyse ist die Pyruvatkinase. Wie bereits in 2.2 beschrieben, katalysiert dieses Enzym die Reaktion von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat. Hierbei wird zudem eine Phosphorylgruppe auf ADP übertragen, sodass ATP entsteht. Es handelt sich also um die erste ATP-generierende Reaktion der Glykolyse, wobei das hohe Phosphorylgruppenübertragungspotential des PEP genutzt wird (Berg, Stryer and Tymoczko, 2013).

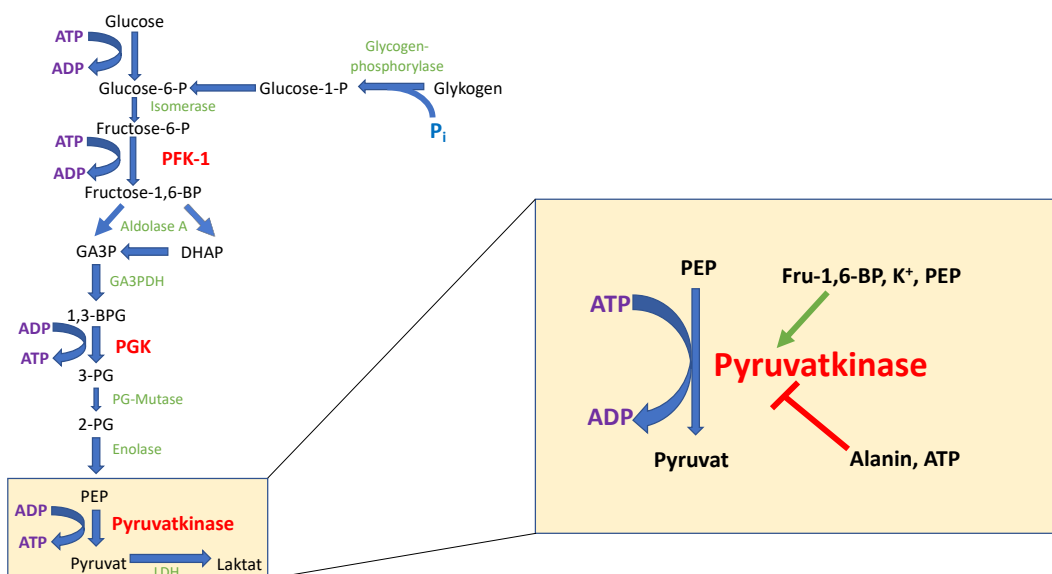


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der Pyruvatkinasen-Reaktion sowie einiger Aktivatoren und Inhibitoren.

2.3.3.1 Struktur und Isoenzyme

In Säugetieren existieren vier PK-Isoenzyme, welche jeweils Tetramere aus etwa 60 kDa schweren Untereinheiten bilden (Valentini *et al.*, 2002). Beim Menschen werden die erythrozytäre R-Form, die L-Form, welche sich in Leber und Nieren findet, sowie das Isoenzym M1 unter anderem in Muskel, Gehirn, Herz, Leukozyten und Thrombozyten exprimiert (Fothergill-Gilmore and Michels, 1993). In fetalem Gewebe findet sich zudem die M2-Form der Pyruvatkinase (Imamura and Tanaka, 1982). Die genetische Information für die Isoenzyme der PK befindet sich auf den Genen PK-LR und PK-M2 auf Chromosom 1 und 15.

Das L-Isoenzym unterscheidet sich von der erythrozytären R-Form hinsichtlich seiner N-terminalen Domäne, hierdurch wird die allosterische Regulation durch Phosphorylierungen ermöglicht. ATP, ein alkalischer pH-Wert und Alanin hemmen dieses Isoenzym. Ein Gen (PKLR) codiert für beide Transkripte, welche durch alternatives Splicen entstehen. Die Transkripte werden gewebsspezifisch unterschiedlich exprimiert.

PK-M1 und PK-M2 entstehen ebenfalls durch alternatives Splicing aus einem mRNA-Transkript (Breitbart, Andreadis and Nadal-Ginard, 1987; Fothergill-Gilmore and Michels, 1993) von Gen PK-M2 und unterscheiden sich lediglich in 56 Aminosäureresten, die PK-M1 fehlen (Noguchi, Inoue and Tanaka, 1986a; Takenaka *et al.*, 1989).

PK-M2 wird durch Phosphoenolpyruvat und Fructose-1,6-Bisphosphat aktiviert (Hall and Cottam, 1978) und weist große Ähnlichkeiten zum Hefe-Enzym auf (Hunsley and Suelter, 1969a, 1969b). Die N-terminale Region des R-Isoenzym ist länger (Noguchi *et al.*, 1987).

2.3.3.2 Regulation der Pyruvatkinase

Pyruvatkinase benötigt ein monovalentes und zwei divalente Kationen pro Untereinheit, um aktiv sein zu können (Baek and Nowak, 1982a; Bollenbach and Nowak, 2001). Boyer *et al.* konnten zeigen, dass es sich bei dem monovalenten Kation physiologisch um Kalium handelt. Das divalente Kation ist aller Wahrscheinlichkeit nach Magnesium, eine Aktivierung durch Zink und Mangan ist *in vitro* jedoch ebenfalls möglich (Boyer, Lardy and Phillips, 1942; Oriá-Hernández *et al.*, 2005). Da bei Säugetier-Muskel-PK und Hefe-PK mit Magnesium als divalentem Kation der höchste k_{cat} und somit die größte enzymatische Aktivität erreicht wird, ist dies wahrscheinlich das physiologisch relevante Ion (Mildvan and Cohn, 1966; Reuben and Cohn, 1970; Cottam and Mildvan, 1971).

Pyruvatkinase aus Hefe ist ein Tetramer aus identischen 54-kDa-Untereinheiten, wobei jede Untereinheit wiederum in vier Domänen unterteilt werden kann (N-, A-, B- und C-Domäne). In den allosterisch regulierten PKs ist die C-Domäne wahrscheinlich für die Kommunikation der verschiedenen Domänen untereinander verantwortlich und enthält die Fructose-Bisphosphat-

Bindestelle (Noguchi, Inoue and Tanaka, 1986b). Magnesium bindet mit positiver Kooperativität an den Hefe-PK-PEP-Enzym-Substrat-Komplex.

Fructose-1,6-Bisphosphat in micromolaren Konzentrationen aktiviert die R-, L- und M2-Isoformen der Pyruvatkinase (Hall and Cottam, 1978; Jill D. Dombrauckas, Bernard D. Santarsiero and Mesecar, 2005). Studien mit Mangan konnten zeigen, dass Letzteres die allosterische Interaktion zwischen Fructose-1,6-Bisphosphat und der PEP-Bindestelle vermittelt (Bollenbach and Nowak, 2001).

Auch Phosphoenolpyruvat sowie mono- und bisphosphorylierte Zucker haben einen aktiverenden Effekt auf die Aktivität der Pyruvatkinase (Hall and Cottam, 1978; Fothergill-Gilmore and Michels, 1993).

Kumar & Barth (2010) kamen zu dem Schluss, dass Muskel-PK vier Metallionen Bindestellen aufweist, welche mit mono- und divalenten Kationen besetzt werden (Kumar and Barth, 2010).

Das L-Isoenzym der PK wird zusätzlich durch Phosphorylierungsreaktionen reguliert. Diese erfolgt hormonell durch Glucagon über cAMP und Proteinkinase A oder durch Katecholamine, Vasopressin und Angiotensin II mittels Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Proteinkinase an Serin-Resten des N-Terminus. Die phosphorylierte Form der PK-L zeigt eine geringe Affinität gegenüber PEP sowie eine Hemmung durch ATP und Alanin. Phosphoenolpyruvat bleibt damit für die Gluconeogenese zur Verfügung. Diesen Regulationsmechanismus gibt es dementsprechend nur in Geweben mit Gluconeogenese-Aktivität wie Leber und Nieren (Berg, Stryer and Tymoczko, 2013; Löffler, Petrides and Heinrich, 2014).

2.3.4 Phosphoglyceratkinase

Bei der Phosphoglyceratkinase (PGK) handelt es sich zwar ebenfalls um eine Kinase, jedoch kann die Reaktion von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat in beide Richtungen gleichgut ablaufen. Auch dieses Enzym benötigt MgATP beziehungsweise MgADP, um aktiv zu sein (Ponce, Roth and Harkness, 1971). Flachner et al. und andere Autoren stellten mehrere Theorien über die essentielle Rolle des Metallions im MgATP-Komplex auf (Miziorko and Eckstein, 1984; Herschlag and Jencks, 1990; Davies *et al.*, 1994; Tari *et al.*,

1997; Beáta Flachner *et al.*, 2004). Phosphoglyceratkinase besitzt zwei Domänen: die C-terminale Domäne bindet das Nukleotid, also MgATP oder MgADP (Banks *et al.*, 1979; Davies *et al.*, 1994), die N-terminale Domäne bindet 3-Phosphoglycerat oder 1,3-Bisphosphoglycerat (Harlos, Vas and Blake, 1992).

2.4 Magnesium als möglicher Regulator der Glykolyse im Skelettmuskel

Laughlin & Thompson untersuchten, ob die Glykolyse-Aktivität in humanen Erythrozyten durch Magnesium reguliert werden könnte (Laughlin and Thompson, 1996). Es war bereits bekannt, dass Magnesium einen essentiellen Kofaktor für die Reaktionen der Kinasen der Glykolyse darstellt (Laughlin and Thompson, 1996; Page, Salem and Laughlin, 1998). Die Forscher konnten in ihrer Arbeit nicht nur die zuvor bereits beschriebene Abhängigkeit der Gesamt-Glykolyse von freiem Magnesium, sondern auch die der PFK von MgATP nachweisen. Erforderlich für eine ausreichende glykolytische Aktivität war hierbei eine freie Konzentration des divalenten Kations von mindestens $[Mg^{2+}]_{i(1/2)} = 0,03mM$. Die Autoren gaben jedoch zu bedenken, dass die freie Magnesiumkonzentration in Erythrozyten stets im Bereich zwischen 0,2mM im oxygenierten und 0,6mM im desoxygenierten Zustand und damit weit über der erforderlichen Mindestmenge zur vollständigen Aktivierung läge. Eine Regulation mittels Variation der Magnesiumkonzentration in der Zelle erschien ihnen daher als unwahrscheinlich.

Nach unseren Informationen wurden bisher keine Experimente dieser Art mit Muskelenzymen durchgeführt. Da die Schlüsselenzyme im Muskel zum Teil andere regulatorische Eigenschaften aufweisen (2.3) und auch die metabolische Situation im Muskel anders ist, hielten wir Unterschiede in der Rolle des Magnesiums als Glykolyse-Regulator für durchaus möglich.

Wichtig in diesem Zusammenhang sind die tatsächliche freie und totale Magnesiumkonzentration in Muskelzellen *in vivo*. Die Angaben zur Gesamtmagnesiumkonzentration im Skelettmuskel variieren sehr stark (Robertson, David Johnson and Potter, no date; Conway, 1957; Polimeni and Page, 1974; Maughan, 1983; Garfinkel and Garfinkel, 1984; Garfinkel, Altschuld

and Garfinkel, 1986; Buri and McGuigan, 1990; Iotti and Malucelli, 2008). Der Anteil des freien Magnesiums wird mit 0,3mM bis 0,9mM angegeben (Iotti and Malucelli, 2008).

Inwiefern ist dies medizinisch relevant? In Abschnitt 2 und 2.1 wurde beschrieben, dass ein Zusammenhang zwischen Magnesiummangel und dem Auftreten von Diabetes Mellitus Typ II gezeigt wurde. Bestünde eine direkte Aktivierung der Glykolyse durch Magnesium, würde ein Magnesiummangel eine verminderte Glykolyseaktivität bedingen. Dies wiederum begünstigt das Entstehen einer diabetischen Stoffwechsellage (2.1). Fragen für uns waren, auf welche Art und Weise eine mögliche Regulation durch Magnesium vorstatten geht, welche glykolytischen Enzyme betroffen sind und über welchen Mechanismus eine Aktivierung oder Hemmung erfolgt. Otto et al. setzten sich bereits 1974 mit der potentiellen Rolle des Magnesiums als Regulator der PFK auseinander. Sie kamen bei ihren Studien mit Rattenmuskel-Enzym zu dem Schluss, dass keine direkte Aktivierung durch Mg^{2+} zu beobachten sei, das divalente Kation allerdings indirekt eine wichtige Rolle für die Aktivität des Enzyms spielt: Ein Fehlen von Magnesium im Komplex mit ATP als MgATP würde eine Hemmung hervorrufen ($K_m(MgATP) = 0,07mM$). Die Autoren schrieben Magnesium eine enthemmende Wirkung zu, die auf der Komplexierung freien ATPs beruht, welches so nicht mehr inhibitorisch auf die PFK wirken kann ($K_i(ATP)=0,01mM$) (Otto et al., 1974). Rivas-Pardo et al. (2011) führten Versuche mit Phosphofruktokinase aus *E. coli* durch, um der Frage nach einer Bindestelle für divalente Kationen auf den Grund zu gehen. Sie kamen zu dem Schluss, dass für eine vollständige Aktivierung des Enzyms die Bindung eines zweiten divalenten Kations außerhalb der Enzym-Substrat-Bindestelle nötig ist (Rivas-Pardo *et al.*, 2011).

Lerch et al. berichteten eine Präferenz des Enzyms aus Hefe für Magnesium gegenüber Mangan (Lerch et al., 1975). Weitere Versuche mit Phosphofruktokinase aus Hefe, in denen ITP als alternatives Substrat genutzt wurde, zeigten, dass die Aktivität des Enzyms sowohl von der Konzentration des MgITPs als auch von jener der freien Mg^{2+} -Ionen abhängig ist (Mavis & Stellwagen, 1970).

Auch das Enzym des Protozoons *Trypanosoma brucei* benötigt freies Magnesium für eine vollständige Aktivierung, der K_d -Wert des Enzyms für freies Magnesium wird mit $0,294 \pm 0,018$ mM angegeben (Cronin & Tipton, 1987).

Peatkau & Lardy führten Versuche mit PFK aus Kaninchen-Muskel durch, wobei sich zeigte, dass das Enzym inaktiv ist, wenn die Konzentration von Magnesium jene von ATP im Ansatz nicht übersteigt (Peatkau & Lardy, 1967).

Zusammenfassend ergibt sich aus zahlreichen Studien von Eukaryoten-Enzym, dass freie divalente Kationen wichtig für die vollständige Aktivierung der Phosphofruktokinase sind.

Freies Magnesium könnte also – wie durch Laughlin & Thompson (1996) für Erythrozyten gezeigt – auch im Muskel für die Regulation der Glykolyse wichtig sein. Professor Mayr & Professor Wegener aus Tübingen führten in den 80er Jahren unveröffentlichte Flugversuche mit *Locusta migratoria* durch. Die Tiere wurden hierbei über bis zu 180 Minuten permanent fliegen gelassen und es wurde die Konzentration unterschiedlicher Metabolite während des Fluges bestimmt. Als Surrogatparameter der glykolytischen Aktivität wurde Fructose-1,6-Bisphosphat bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentration des Letzteren sich antiproportional zu jener eines Nucleosidtriphosphates verhielt, welches bei Wiederholung der Versuche durch Professor Mayr im Jahre 2015 als ATP identifiziert wurde. Nucleosidtriphosphate können Kationen stärker als -di- und -monophosphate komplexieren, binden also auch Magnesium sehr stark (Komplekonstanten $ATP_{Mg^{2+}} = 4,143$, (Maxchelator.stanford.edu)). Das bedeutet, dass vorhandenes Magnesium durch Nucleosidtriphosphate nahezu im Verhältnis eins zu eins gebunden wird. Die Komplexierung erfolgt über die Phosphatgruppen. Dephosphorylierung zu Nucleosiddi- oder monophosphaten führen daher zu einer Abnahme der Fähigkeit zur Komplexbildung (Komplekonstante von $ADP_{Mg^{2+}} = 3,211$ Maxchelator.stanford.edu)). Bei Zunahme des NTP/NDP-Verhältnisses in der Zelle kommt es daher zu einer Abnahme des freien Magnesiums, ein Sinken der NTP-Konzentration hingegen führt dazu, dass vermehrt Magnesium frei wird. Die ATP/ADP-Ratio repräsentiert außerdem den Energiezustand der Zelle (2.3.2.2). Hierbei kommt es zu einer Abnahme des ATPs bei niedrigem Energiegehalt. Da ATP verbraucht wird, steigt AMP an (Choi et al., 2009). Allgemein wird angenommen, dass die ATP-Konzentration im Skelettmuskel jedoch auch

während muskulärer Arbeit relativ konstant bei 5mM gehalten wird und nur um etwa 10-15% abnimmt (Horn, 2008). Gewährleistet wird dies durch Kreatinkinase-Reaktion, Glycogenolyse, Glykolyse, Citratzyklus und die Atmungskette (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014; Rassow *et al.*, 2016).

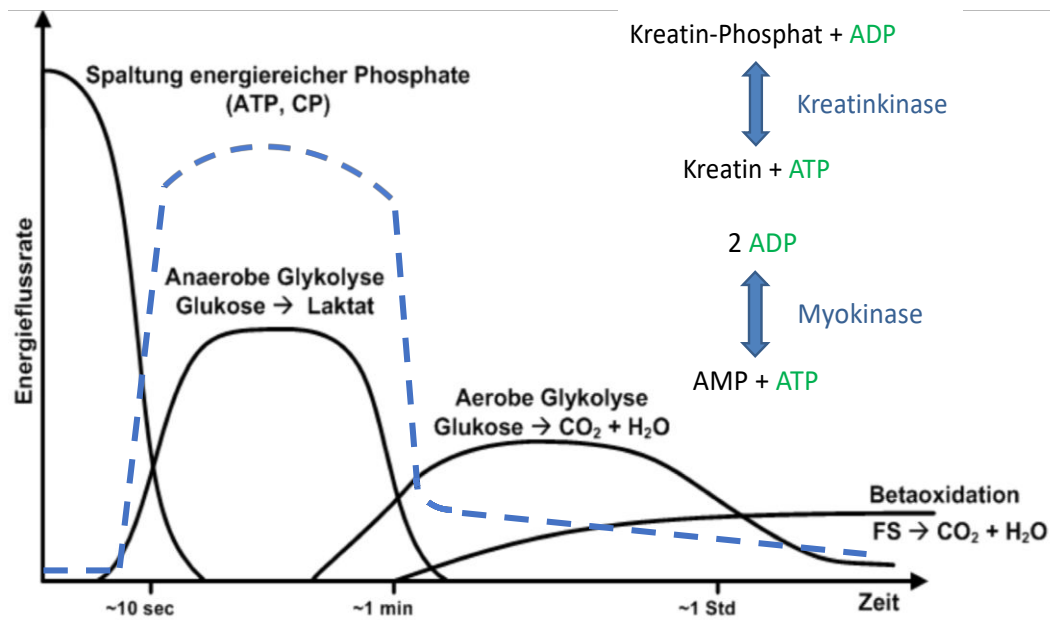


Abbildung 2.22: Schema der muskulären Energiebereitstellung (aus Moosburger, 1995). Die gestrichelte, Blaue Kurve stellt den Verbrauch von Glucose und Glykogen dar. Bereits in den ersten Sekunden sind die Nutzung des zellulären ATPs sowie die Generierung des Letzteren aus Kreatin-Phosphat erschöpft. Es schließt sich die anaerobe Glykolyse an, wobei Laktat gebildet wird, was zu einem Anstieg des pH-Werts in der Muskulatur führt. Schließlich wird bei ausreichendem Vorhandensein von Sauerstoff der aerobe Stoffwechsel in Gang gesetzt: Citratzyklus, Atmungskette und zuletzt die Betaoxidation von Fettsäuren tragen zur Herstellung von ATP bei. Ressource für die Glykolyse ist hierbei das im Muskel gespeicherte Glykogen, welches vor Einsetzen der Betaoxidation die wichtigste Energiequelle darstellt. Abgebildet ist zudem die Kreatinkinase-Reaktion, welche die Bildung von ATP und Kreatin aus Kreatinphosphat und ADP darstellt und somit kurzfristig und zum Beginn der muskulären Arbeit für die schnelle ATP-Bereitstellung verantwortlich ist. Einen Beitrag hierzu leistet zudem die Bildung von ATP und AMP aus 2 ADP, katalysiert durch Myokinase. Das hierbei entstehenden AMP hat zusätzlich einen aktivierenden Einfluss auf die Glykolyse.

Nicht nur ATP besitzt die Eigenschaft, Kationen zu komplexieren. Dies gilt auch für alle anderen Nucleosidtriphosphate. Die Dephosphorylierung zu Di- und Monophosphaten führt zu einer Abnahme der Bindungsfähigkeit. Da die ATP-Konzentration sich auch im Rahmen muskulärer Arbeit verändert, wäre eine Variation der intrazellulären, freien Magnesiumkonzentration durch Alteration der Konzentration von ATP und der anderen Nucleosidtriphosphate der Zelle denkbar. Eine Möglichkeit wäre, dass MgGTP und MgUTP ebenfalls als Substrate der glykolytischen Kinasen agieren und weit stärker bei Muskelaktivität variieren, als ATP. Um dies zu untersuchen, wurden im Rahmen

der vorliegenden Arbeit die K_m -Werte von Hexokinase, Phosphofruktokinase, Phosphoglyceratkinase und Pyruvatkinase auch für UTP und GTP (HK, PFK-1) beziehungsweise UDP und GDP (PGK, PK) bestimmt.

Da es sich bei der Skelettmuskulatur um ein sehr großes Kompartiment handelt, wäre eine Beeinflussung insbesondere der anaeroben glykolytischen Aktivität mit ihrem sehr raschen Glucoseverbrauch hier von besonderem Interesse: Aus medizinischer Sicht stellt sich die Frage nach einem möglichen therapeutischen Nutzen bei der Therapie beispielsweise des Diabetes Mellitus Typ II (2.1, 2.4). Eine Steigerung der peripheren Glucose-Verwertung bei Muskelarbeit hätte eine bessere Senkung des Blutglucose-Spiegels zufolge, wodurch wiederum die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten diabetischer Folgeerkrankungen gesenkt werden könnte (2.1). Eine genauere Erforschung der Glykolyse-Regulation könnte somit den Grundstein für mögliche neue Therapieansätze in der Behandlung dieser fortschreitenden Erkrankung der Zivilisationsgesellschaften legen, beispielsweise im Rahmen eines Trainings mit kurzzeitigen anaeroben Phasen, da gerade hierbei zur Herstellung der gleichen Menge an ATP deutlich mehr Glucose benötigt wird (2.2). Ziel meiner Arbeit war es daher, *in vitro* zu untersuchen, ob eine Steigerung der Glykolyseaktivität des Skelettmuskels durch Magnesium zu erreichen ist.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma, Roche, Merck oder Calbiochem hergestellt.

Reagenzien	Konzentration
Hepes pH 7,5	1M
Hepes pH 7,5	20mM
KCl	1M
KOH,	1M
MgCl ₂	1M, 100mM
DTT	1M
NADP	100mM
NADH	100mM
NAD ⁺	30mM
Creatin-Phosphat	1M, 100mM
BSA	10 mg/ml
Fructose-1,6-Bisphosphat	1mM, 0,35mM
Glucose	1M
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	6mM, 58mM
Phosphoenolpyruvat	200mM
Fructose-6-Phosphat	10mM
EDTA	0,5M
Mecaptoethanol,	14,17M
Glycerin	87%
Ammoniumsulfat	100mM, 10mM, 1mM
Natriumphosphat pH 7,4	0,5M
Natriumcitrat pH 7,5	1M
Ammoniumphosphat, pH 7,4	100mM
Magnesium-Titrisol	40,7 mM
Creatin	100mM

Nukleotide

Nucleotid	Konzentration
ATP	100mM, 10mM
UTP	100mM
GTP	57,3mM
ADP	100mM
UDP	100mM
GDP	100mM
AMP	100mM
UMP	100mM
GMP	100mM

Lagerung aller Nukleotide bei -20°C im Gefreischrank in kleinen Aliquots

Enzyme	Konzentration/ Aktivität	Firma
PFK Rattenmuskel, glycerinisiert Eluat 6, hergestellt durch W. Fanick	32ng/μl, 93nM, tetramer	
PFK Kaninchenmuskel, kristallin Pool3, hergestellt durch Prof. Mayr	2,2 mg/ml	
Kreatin-Kinase, Kaninchenmuskel lipophilisiert mit Kreatinphosphat/ADP	ca. 350 U/mg bei 25°C	Roche
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 3,2 M AmSO ₄ -Suspension, pH 6 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	1U/μl	Roche
Hexokinase (<i>S. cerevisiae</i>) lipophilisiert	1500U/ml, 3,33mg/ml	Roche
Phosphoglycerat-Isomerase (<i>S. cerevisiae</i>)	4U/μl	Sigma
Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (<i>S. cerevisiae</i>)	101U/mg	Sigma
Phosphoglycerat-Kinase (<i>S. cerevisiae</i>)	1851U/mg	Sigma
Aldolase, (NH ₄) ₂ SO ₄ -Suspension (dialysiert, Kaninchenmuskel)	10mg/ml	Roche
Glutamat-Dehydrogenase (dialysiert, Rinderleber)	10mg/ml, 170U/mg	Roche
Lactat-Dehydrogenase, (NH ₄) ₂ SO ₄ -Suspension (Kaninchenmuskel)	10μg/ml	Roche
Pyruvat-Kinase, (NH ₄) ₂ SO ₄ -Suspension, Kaninchenmuskel	200U/ml, 10μg/μl	Roche
Myokinase, (NH ₄) ₂ SO ₄ -Suspension Kaninchenmuskel	3,33 μg/μl	Sigma

Lagerung aller Enzyme bei 8°C im Kühlschrank

Geräte

Gerät	Firma
Pipetten 1000µl)	Eppendorf research 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 250µl
Pipettenspitzen	Sarstedt farblos (10µ, 200µl, 1000µl) I
Photometer:	Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer; Lambda 20 Norwalk
Küvetten	Polystyrol 10x4x45 mm Sarstedt AB1c-0408-0810

Zentrifugen

Biofuge pico Zentrifuge Rotor SM24 Rotor SS34	Heraeus – Kendro Laboratory Products Sorval RC plus Sorval Sorval
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph
Thermomixer 5436	Eppendorf
Waage PM480 Delta Range	Mettler
Gelkammer	Phase
MDD-HPLC	Systeme des Labors von Prof. Mayr

Säulenmaterial

12-AXP-monoQ-24min	Pharmacia
Goebel-Sys01	Goebel
Autosampler S5200	Schambeck

Puffer, Marker & Gele

LMW-Marker	Pharmacia (Zusammensetzung s. 3.2.9)
------------	--------------------------------------

Puffer H

- Puffer R 2-fach
- Sigma Trypsin Inhibitor Type II 300 µg/ml
- E64 Inhibitor 7 µg/ml
- PMSF 6,8 µg/ml
- Pepstatin A 50 µg/ml
- Benzamidin 15 µg/ml
- 1,10 Phenanthrolin 8 µg/ml

Puffer R 2-fach

- HEPES pH 7,4 50mM

- KCl 100mM
- MgCl₂ 10mM
- HNa₂PO₄/H₂NaPO₄ 2mM

Puffer A

- Tris pH 7,2 20mM

Puffer B

- NaCl 0,25mM
- Tris pH 7,2 20mM

Homogenisationspuffer:

- Imidazol 50mM
- Sucrose 250mM
- EDTA 2mM
- Fructose-6-Phosphat 1mM
- Glucose-6-Phosphat 3,5mM
- Mecaptoethanol, 30mM

Ammoniumsulfat (AmSO₄)-Fällungspuffer:

- Hepes pH 7,45 10mM
- EDTA 2mM
- Mecaptoethanol 30mM
- NH₄⁺/H₂SO₄ pH7,5 3,9M

Puffer C

- Hepes, pH 7,2 100mM
- EDTA 20mM
- ADP 1mM
- Mecaptoethanol 300mM

4 x Trenngelpuffer

- 1,5 M Tris-Cl, pH 8,8
- 0,4% SDS (= Sodium Dodecyl Sulfat)

4 x Sammelgelpuffer

- 0,5M Tris-Cl, pH 6,8
- 0,4% SDS

Trenngel 12,5 %

- 4,17ml 30% Acrylamid
- 2,5ml Trenngelpuffer
- 50µl Ammoniumpersulfat 10% (APS)
- 5µl TEMED 10%
- 3,28ml H₂O

Sammelgel 5%

- 0,8ml 30% Acrylamid
- 1,25ml Sammelgelpuffer
- 25µl Ammoniumpersulfat 10%
- 5µl TEMED 10%

1 x Laemmli Puffer

- 25mM Tris
- 192mM Glycin
- 0,1% SDS

4 X Probenpuffer

- 0,2M Tris-Cl pH 6,8
- 5,4% Mecaptoethanol
- 0,04% Bromphenolblau
- 8,8% SDS
- 15% Glycerin

Software

GraphPad Prism 3
GraphPad Prism 4
PerkinElmerUVWinlab
Lambda 20 Ink. UVWinLab
Microsoft Excel
Microsoft Word
Microsoft Power Point

3.2 Methodik

3.2.1 Enzymatisch gekoppelter optischer Test

Tritt monochromatisches Licht durch eine Küvette mit darin enthaltener Lösung, so kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen den elektromagnetischen Wellen des Lichtes und der Elektronenhülle der in Lösung befindlichen Teilchen. Das daraus resultierende optische Phänomen, die Absorption, wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben und kann photometrisch detektiert werden.

$$E = \varepsilon * c * d$$

E = Extinktion; ε = molarer Extinktionskoeffizient, ist definiert als die Extinktion 1 M Lösung bei bestimmter Wellenlänge (l/(mol x cm)); c = Konzentration der Lösung (NADH/NADPH) ; d = Schichtdicke der Küvette in cm

Nach Auflösen der Gleichung nach der Konzentration ist bei bekannter Schichtdicke der Küvette und definiertem molarem Extinktionskoeffizienten nach Messung der Extinktion die Berechnung der Konzentration möglich.

Das Verfahren des optischen Tests geht auf Otto Warburg (1936) zurück. Es erfolgt die Bestimmung der Enzymaktivität NAD⁺/NADH- beziehungsweise NADP⁺/NADPH-abhängiger Oxidoreduktasen. NAD(P)H weist ein zusätzliches, spezifisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda=340\text{nm}$ auf. Änderung der Konzentration der oxidierten beziehungsweise reduzierten Form können so photometrisch detektiert und mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014).

Soll eine enzymatische Reaktion untersucht werden, die NAD(P)⁺/NAD(P)H nicht als Co-Substrat aufweist, so ist eine enzymatische Kopplung möglich. Hierzu wird der zu untersuchenden Reaktion eine Indikatorreaktion angeschlossen, welche NAD(P)⁺/NAD(P)H umsetzt. Essentiell ist hierbei, dass die zu messende Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert und dass die Produkte der ersten Reaktion teils Substrate der zweiten Reaktion darstellen (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014).

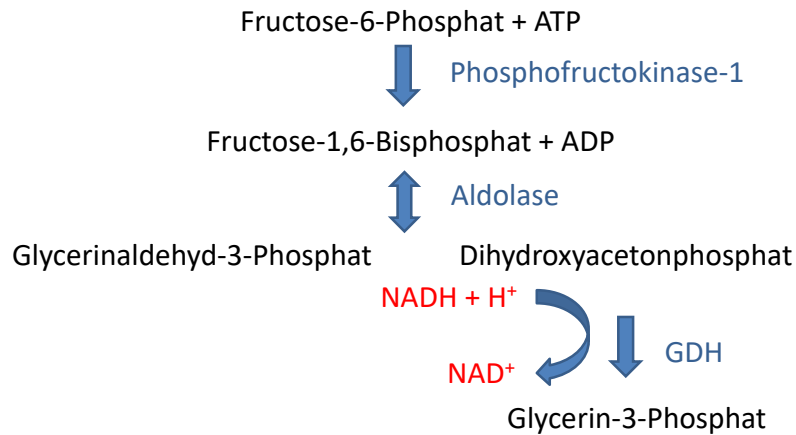


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des enzymatisch gekoppelten optischen Tests am Beispiel der Phosphofruktokinase-Reaktion. Das bei der Phosphofruktokinase-Reaktion entstehende Fructose-1,6-Bisphosphat wird durch Aldolase weiter zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgewandelt.

Beispielhaft ist dieses Prinzip in 3.1 anhand der Phosphofruktokinase-1-Reaktion dargestellt: Das in der PFK-Reaktion entstehende Fructose-1,6-Bisphosphat reagiert mithilfe von Aldolase weiter zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Aus letzterem entsteht dann katalysiert durch GDH Glycerin-3-Phosphat, gleichzeitig wird NADH zu NAD⁺ umgewandelt. Die Konzentration von NADH nimmt somit ab und dementsprechend auch die gemessene Extinktion bei der für NADH charakteristischen Wellenlänge (Mensonides *et al.*, 2013).

Um eine Reaktionsumgebung zu schaffen, die jener *in vivo* möglichst gut entspricht, wurden Substrat-Konzentrationen im Assay gewählt, die an den für Säugetier-Muskelzellen bekannten angelehnt sind (van Eunen *et al.*, 2010).

Die Substratkonzentrationen der zu untersuchenden Enzyme wurden im Bereich des K_m-Werts gehalten (Mensonides *et al.*, 2013).

3.2.1.1 Herstellung des Reaktionspuffers

Die für den jeweiligen Reaktionspuffer benötigten Substanzen – mit Ausnahme der Indikatorenzyme – wurden in einem handelsüblichen Reagenzglas zusammen pipettiert und der pH-Wert durch kleine Zugaben 1M KOH-Lösung mithilfe eines pH-Meters auf 7,5 eingestellt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der entsprechenden Indikatorenzyme sowie eine zehnminütige Zentrifugation bei 5.000 U/min und 4°C (Zentrifuge: Sorvail RC 5C plus; Rotor SM24).

Tabelle 3.1: Endkonzentrationen der Komponenten des Reaktionspuffers im Assay. Angegeben sind die Konzentrationen der Substanzen in den verwendeten Reaktionspuffer. Zusätzlich wurden je nach Versuch unterschiedliche Konzentrationen von Nucleosidtri-, di-, oder monophosphaten sowie von $MgCl_2$ beigefügt. Die entsprechenden Konzentrationsangaben finden sich in der methodischen Besprechung der einzelnen Experimente.

Substanz	Hexokinase	PFK-1 PK/LDH	PFK-1 Aldolase/GDH	Pyruvatkinase
Hepes pH 7,5	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
KCl	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
NADP/NADH/ NAD ⁺	0,2 mM	0,3 mM	0,2 mM	0,2 mM
PEP	-	1 mM	-	1 mM
Glucose	2 mM	-	-	-
Indikator-enzyme	G6PDH, 1,25 µg/ml im Ansatz	PK & LDH, jeweils 10 µg/ml im Ansatz	Aldolase & GDH, jeweils 25 µg/ml im Ansatz	LDH, 25 µg/ml im Ansatz

Substanz	AMP-Desaminase	Kreatin-Kinase	Phosphoglyceratkinase	Myokinase
Hepes	pH 7,4, 50 mM	pH 7,5 20 mM	20 mM	pH 7,5, 20mM
KCl	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
NADP/NADH/ NAD ⁺	0,3 mM	0,3 mM	0,5 mM	-
Phosphat	5 mM	-	-	-
α -Ketoglutarat	2mM	-	-	-
3 GAP	-	-	0,25 mM	-
ATP/ADP	-	5 mM	-	3 mM
Kreatinphosphat	-	2,5 mM	-	-
Glucose	-	5 mM	-	-
Indikator-enzyme	-	Hexokinase, G6PDH	GAPDH, 10,31 µg/ml im Ansatz	-

Danach wurden die Reaktionsansätze aus auf Raumtemperatur erwärmten Stocks in die Photometerküvetten pipettiert. Eine Ausnahme hinsichtlich der Erwärmung bildeten die Enzyme, diese wurden bis zur Pipettierung gekühlt gelagert. Das standardisierte Volumen betrug für alle Ansätze 800 Mikroliter. Vor Messung der eigentlichen Reaktionsassays erfolgte eine Nullwertbestimmung mit einer H₂O-enhaltenden Küvette.

Nach zehnminütiger Inkubation im thermostatisierten Photometer Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 20 von Norwalk bei 30 °C wurde die zu untersuchende Reaktion durch Zugabe des katalysierenden Enzyms oder seines Substrats gestartet. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wurde mithilfe einer speziellen Software (Lambda 20 Ink. UVWinLab) graphisch bestimmt. Aus Letzterer ließ sich unter Berücksichtigung der Konzentration des zu untersuchenden Enzyms auf dessen spezifische Aktivität in Micromol Substrat pro Minute pro Milligramm Protein berechnen.

3.2.1.2 Berechnung der enzymatischen Aktivität

Die Berechnung der spezifischen enzymatischen Aktivität wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\frac{\text{Reaktionsgeschwindigkeit } v \text{ in } \frac{\text{mmol}}{\text{min}} / \text{l}}{\text{Enzymkonzentration } c \text{ in } \text{mg/l}} = \text{spezifische Aktivität in } \frac{\text{mmol}}{\text{min}} / \text{mg}$$

Beispielrechnung:

Reaktionsgeschwindigkeit $v = 2,089 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{l}$, Konzentration c von Enzym(X)
 $= 0,08 \text{ mg/l}$

Daraus folgt:

$$\frac{2,089 \frac{\text{mmol}}{\text{min}} / \text{l}}{0,08 \text{ mg/l}} = 26,11 \text{ mmol}/\text{min}/\text{mg}$$

3.2.2 Bestimmung der K_m -Werte

Die Bestimmung der K_m -Werte der glykolytischen Kinasen für ATP, GTP und UTP beziehungsweise ADP, GDP und UDP erfolgte mittels optischem Test, das genaue Verfahren wird im Folgenden für die einzelnen Enzyme separat erläutert.

3.2.2.1 K_m -Wert-Bestimmung Hexokinase für ATP, GTP und UTP

Die Herstellung des Reaktionspuffers erfolgte wie in 3.2.1.1 beschrieben. Als Indikatorenzym dient im Hexokinase-Assay Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase: Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, reagieren Glucose und ATP, katalysiert durch Hexokinase, zu ADP und Glucose-6-Phosphat. Letzteres wird in der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasereaktion (G6PDH), welche die Schlüsselreaktion des Pentosephosphatzyklus darstellt, zu 6-Phosphogluconolacton umgewandelt. Hierbei entsteht aus NADP^+ zudem $\text{NADPH} + \text{H}^+$, es kommt somit zu einer Extinktionssteigerung bei 340nm.

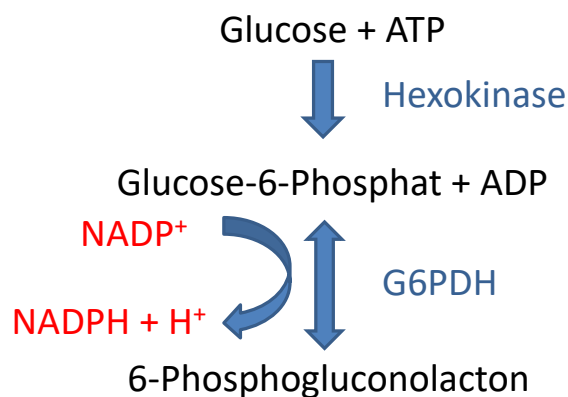


Abbildung 3.2: Reaktionsfolge Hexokinase-Assay. Glucose und ATP werden in der durch Hexokinase katalysierten ersten Reaktion der Glykolyse in Glucose-6-Phosphat und ADP umgewandelt. Durch Hinzufügen von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und NADP^+ zum Ansatz kann eine weitere Reaktion des Glucose-6-Phosphats zu 6-Phosphogluconolacton und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ erreicht werden, wobei es zu einer messbaren Änderung der Extinktion bei 340nm kommt. Hierdurch kann auf die enzymatische Aktivität der Hexokinase rückgeschlossen werden. Zur Bestimmung des K_m -Werts der HK für ATP, GTP und UTP werden zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen der zu untersuchenden Nucleosidtriphosphate beigefügt und geprüft, ob eine Änderung der enzymatischen Aktivität zu beobachten ist.

Nach Zentrifugation des Reaktionspuffers (3.2.1.1) und Nullung des Photometers mittels H_2O erfolgte die Messung der einzelnen Assays. Hierbei wurden stets zunächst der Reaktionspuffer, dann Wasser, zu messendes Nucleosidtriphosphat in variabler Konzentration, Magnesiumchlorid (MgCl_2) und schließlich Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase hinzupipettiert. Nach zehnminütiger Vorinkubation im Photometer bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe der Hexokinase (Endkonzentration im Assay 7,72nM) gestartet. Die ATP-Konzentration wurde im Bereich zwischen 15,6 μM und 2mM variiert, die Konzentration des Magnesiumchlorids wurde konstant 1mM über jener von ATP gehalten. Für UTP wurden Konzentrationen im Bereich zwischen 250 μM

und 4mM gewählt, da bei niedrigerem UTP keine enzymatische Aktivität messbar war. Die Magnesiumchloridkonzentrationen wurden ebenfalls angepasst und wie zuvor bei ATP stets 1mM über der Nukleosidtriphosphatkonzentration im Ansatz gehalten. Ähnlich wurde bei GTP verfahren; hier erfolgte eine Variation der Nukleosidtriphosphatkonzentration zwischen 1mM und 5mM. Die $MgCl_2$ -Konzentration wurde entsprechend angepasst

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit V wurde mithilfe der UV-Winlab-Software durchgeführt. Hieraus ließ sich mit der oben beschriebenen Formel die Aktivität der Hexokinase bei den untersuchten Konzentrationen von ATP, UTP und GTP errechnen. Die Berechnung des K_m -Werts erfolgte im Anschluss mittels der Software GRAPH PAD PRISM.

3.2.2.2 K_m -Wert-Bestimmung Phosphofruktokinase-1 für ATP, GTP und UTP

Die dem Assay zugrunde liegenden enzymatischen Reaktionen lassen sich Abbildung 3.3 entnehmen: Fructose-6-Phosphat und ATP reagieren, katalysiert durch Phosphofruktokinase, zu Fructose-1,6-Bisphosphat und ADP. Letzteres wird durch Pyruvatkinase mit Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Pyruvat reagiert im Anschluss weiter zu Laktat, hierbei wird zudem $NADH + H^+$ zu NAD^+ umgewandelt, es lässt sich somit eine Extinktionsänderung bei 340nm messen und auf die enzymatische Aktivität der PFK rückschließen.

Durch Variation der Nukleosidtriphosphatkonzentrationen unter Konstanthaltung der sonstigen Bedingungen ist – wie zuvor bei Hexokinase – eine Bestimmung der K_m -Werte der PFK für ATP, GTP und UTP möglich. Diese lag sowohl bei ATP als auch bei GTP und UTP in diesem Fall im Bereich zwischen 2mM und 0,01mM.

Die Auswertung des Versuchs erfolgte wieder mithilfe von UV-Winlab und GraphPad Prism, sodass nach Berechnung der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit von der jeweiligen Nukleosidtriphosphatkonzentration der entsprechende K_m -Wert ermittelt werden konnte.

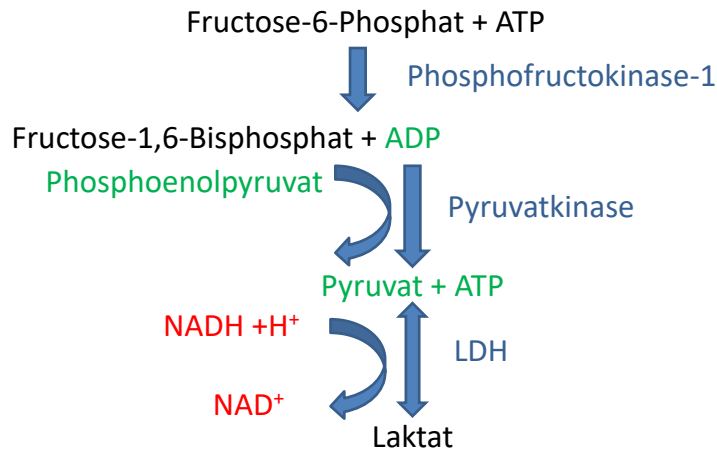


Abbildung 3.3: Reaktionsfolge PFK-1-PK/LDH-Assay. Fructose-6-Phosphat und ATP werden durch Phosphofruktokinase (PFK) zu Fructose-1,6-Bisphosphat und ADP umgewandelt. Die beigefügte Pyruvatkinase wiederrum katalysiert die sich anschließende Reaktion von ADP und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat und ATP. Letztere reagieren mithilfe von Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat weiter. Hierbei wird zudem $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ umgesetzt. Dies geht mit einer Abnahme der Extinktion einher, wodurch die Aktivität der PFK bestimmt wird. PK und LDH sowie PEP wurden im Überschuss zugegeben. Der limitierende Faktor ist somit die Produktion von ADP, bedingt durch Phosphofruktokinase. Zur Bestimmung des K_m -Werts des Enzyms für ATP, GTP und UTP wurden diese Enzyme – wie bereits weiter oben für Hexokinase beschrieben – dem Ansatz in unterschiedlicher Konzentration beigefügt.

Das Verfahren entspricht dem in 3.2.2.1 für Hexokinase beschriebenen. Genutzt wurde LDH/PK-Puffer für PFK-1 (3.2.1.1). Es wurden stets zunächst der Reaktionspuffer, dann Wasser und das zu messende Nucleosidtriphosphat in variabler Konzentration beigefügt. Es folgte Fructose-1,6-Bisphosphat (Endkonzentration im Assay $50\mu\text{M}$), Letzteres gilt als Aktivator der PFK. Zum Schluss wurden Magnesiumchlorid (MgCl_2) und Phosphofruktokinase-1 (Endkonzentration im Assay $0,23\text{nM}$) beigefügt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von Fructose-6-Phosphat. Die Konzentration von Magnesiumchlorid lag stets $3,5\text{mM}$ über jener von ATP.

3.2.2.3 K_m -Wert-Bestimmung Phosphoglyceratkinase für ADP, GDP und UDP

Wie bei den vorherigen K_m -Wert-Bestimmungen beschrieben, wird auch bei der Bestimmung der K_m -Werte der Phosphoglyceratkinase (PGK) für ADP, GDP und UDP zunächst der Reaktionspuffer zusammen pipettiert und zentrifugiert (3.2.1.1, Reaktionspuffer Phosphoglyceratkinase).

Nach Zentrifugation des Reaktionspuffers und Nullung des Photometers mittels H_2O erfolgte die Messung der einzelnen Assays. Hierbei wurden stets zunächst

der Reaktionspuffer, dann Wasser und Phosphoglyceratkinase (Endkonzentration im Assay 0,33nM) zusammen pipettiert.

Nach zehninütiger Inkubation im Photometer Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 20 von Norwalk bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe des Nucleosiddiphosphats in variabler Konzentration gestartet (Variation für ADP zwischen 2mM und 6,25µM, für UDP zwischen 2mM und 100µM und für GDP zwischen 2mM und 50µM). Da Magnesium durch Nucleosiddiphosphate deutlich weniger komplexiert wird als durch Triphosphate, konnte Magnesiumchlorid direkt in den Reaktionspuffer gegeben und bei konstant 1mM/ Ansatz gehalten werden.

Die dem Assay zugrunde liegenden enzymatischen Reaktionen lassen sich Abbildung 3.4 entnehmen: Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Phosphat (P_i) reagieren, katalysiert durch Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG). Hierbei wird zudem NAD⁺ zu NADH und H⁺ umgewandelt. Von 1,3-BPG wird durch Phosphoglyceratkinase eine Phosphatgruppe abgespalten, wodurch 3-Phosphoglycerat entsteht. Gleichzeitig wird aus ADP ATP generiert.

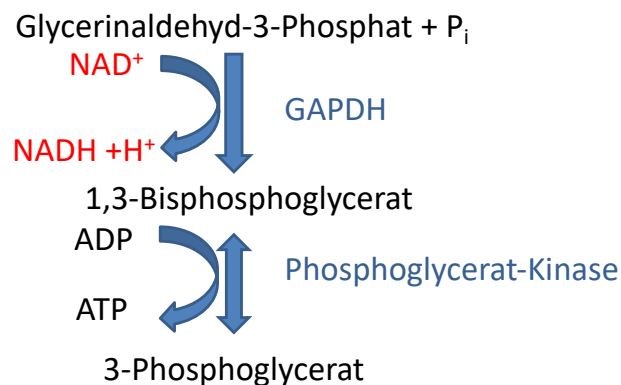


Abbildung 3.4: Reaktionsfolge PGK-Assay. Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Phosphat (P_i) reagieren, katalysiert durch Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Hierbei wird gleichzeitig NAD⁺ zu NADH + H⁺ umgewandelt. Durch Phosphoglyceratkinase (PGK) wird 1,3-Bisphosphoglycerat aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, es reagiert mit ADP weiter zu 3-Phosphoglycerat und ATP. Die Entstehung von NADH führt hierbei wieder zu einer Zunahme der Extinktion, welche die Aktivität der PGK ergibt. Zur K_m-Wert-Bestimmung erfolgte die Zugabe unterschiedlicher ADP-, GDP- und UDP-Konzentrationen.

3.2.2.4 K_m-Wert-Bestimmung Pyruvatkinase für ADP, GDP und UDP

Der Versuchsablauf erfolgte analog zu 3.2.2.1 unter Verwendung des Reaktionspuffers für Pyruvatkinase (3.2.1.1). Es wurden stets zunächst

Reaktionspuffer, H₂O und Pyruvatkinase (Endkonzentration im Assay 2,69nM) zusammenpipettiert, der Reaktionsstart nach Inkubation wurde durch Zugabe des Nucleosiddiphosphats in variabler Konzentration eingeleitet (Variation für ADP zwischen 3mM und 6,25µM, für UDP zwischen 3mM und 100µM und für GDP zwischen 3mM und 25µM). Die Konzentration von Magnesiumchlorid im Ansatz wurde konstant 1mM über der jeweiligen Nucleosiddiphosphatkonzentration gehalten.

Die dem Assay zugrundeliegenden enzymatischen Reaktionen lassen sich Abbildung 3.5 entnehmen: Phosphoenolpyruvat (PEP) und ADP reagieren, katalysiert durch Pyruvatkinase, zu Pyruvat und ATP. Pyruvat reagiert im Anschluss weiter zu Laktat. Diese Reaktion wird durch Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert, es wird zudem NAD⁺ zu NADH und H⁺ umgewandelt, was sich wieder in einer messbaren Änderung der Extinktion bei 340nm äußert.

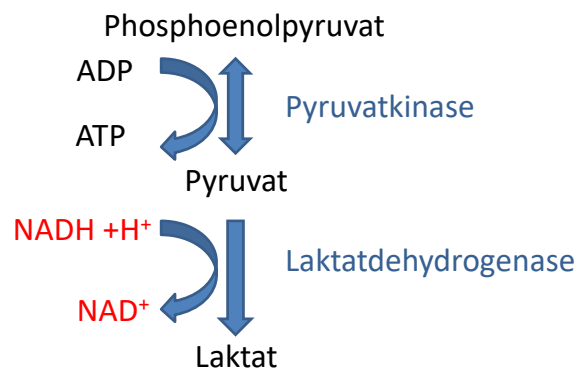


Abbildung 3.5: Reaktionsfolge Pyruvatkinase-Assay. Pyruvatkinase katalysiert die Reaktion von Phosphoenolpyruvat (PEP) und ADP zu ATP und Pyruvat. Letzteres reagiert im Anschluss – katalysiert durch Laktatdehydrogenase (LDH) weiter zu Laktat. Hierbei wird zudem NADH + H⁺ zu NAD⁺. Dies ist als Extinktionsabnahme, die der enzymatischen Aktivität der PK entspricht. Zur Bestimmung der K_m-Werte wurden die Konzentrationen von ADP, GDP und UDP variiert.

Die Bestimmung der K_m-Werte aus der Reaktionsgeschwindigkeit V erfolgte schließlich wieder mithilfe von UV-Winlab und GraphPad Prism.

3.2.3 Versuche zur Magnesiumabhängigkeit der glykolytischen Kinasen

Bei den Experimenten zur Untersuchung der Magnesiumabhängigkeit der glykolytischen Kinasen (Hexokinase, Phosphofruktokinase-1, Phosphoglyceratkinase, Pyruvatkinase) wurden im Prinzip dieselben Reaktionspuffer verwendet, wie bereits im Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Einen

Unterschied gab es jedoch bei den Versuchen zur Magnesiumabhängigkeit der Phosphofruktokinase: da für Pyruvatkinase (PK) bekannt ist, dass dieses Enzym Magnesium benötigt, um aktiv sein zu können, wäre eine PFK-Abhängigkeit bei Verwendung des PFK-1 LDH/PK-Assays hiervon nicht klar abzugrenzen (Baek and Nowak, 1982b; Valentini *et al.*, 2000). Stattdessen erfolgte hierfür der in 3.2.1.1 beschriebene Aldolase-GDH-Assay.

3.2.3.1 Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase

Verwendet wurde der in 3.2.1.1 für Hexokinase beschriebene Reaktionspuffer, wobei diesem zunächst kein Magnesium beigefügt wurde. Die ATP-Endkonzentration im Ansatz betrug über die gesamte Versuchsreihe konstant 1mM. Der zugrundeliegende Reaktionsassay ist dem Abschnitt zur K_m -Wert-Bestimmung zu entnehmen.

Der Versuchsablauf entspricht 3.2.2.1, wobei die Magnesiumkonzentration zwischen 0mM und 2mM variiert wurde. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von Hexokinase (Endkonzentration im Assay 7,72nM). Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 800 Microliter.

3.2.3.2 Magnesiumabhängigkeit der Phosphofruktokinase-1

Zur Bestimmung der Magnesiumabhängigkeit der Phosphofruktokinase-1 wurde der in 3.2.1.1 beschriebene PFK-1 Aldolase/GDH-Puffer verwendet. Es wurde dem Puffer zunächst kein Magnesium zugefügt, die ATP-Endkonzentration im Assay betrug konstant 5mM. Genutzt wurde, im Unterschied zur K_m -Wertbestimmung, das Aldolase-GDH-Assay (Abbildung 3.6). Fructose-6-Phosphat und ATP reagieren, katalysiert durch PFK-1, zu Fructose-1,6-Bisphosphat (Fru-1,6-BP) und ADP. Fru-1,6-BP wird durch Aldolase in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat gespalten. Letzteres wird durch GDH in Glycerin-3-Phosphat umgesetzt, wobei zudem $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert wird. Dies führt zu einer Extinktionsabnahme bei 340nm. Der Versuchsablauf erfolgte wie in 3.2.2.1 beschrieben, die Magnesiumkonzentration im Ansatz wurde variiert (6,5-3,25mM). Fructose-6-Phosphat (Endkonzentration im Assay 250 μ M) wurde bereits vor Inkubation

zugegeben, die Reaktion startete durch Zugabe von Phosphofruktokinase (Endkonzentration im Assay 0,23nM).

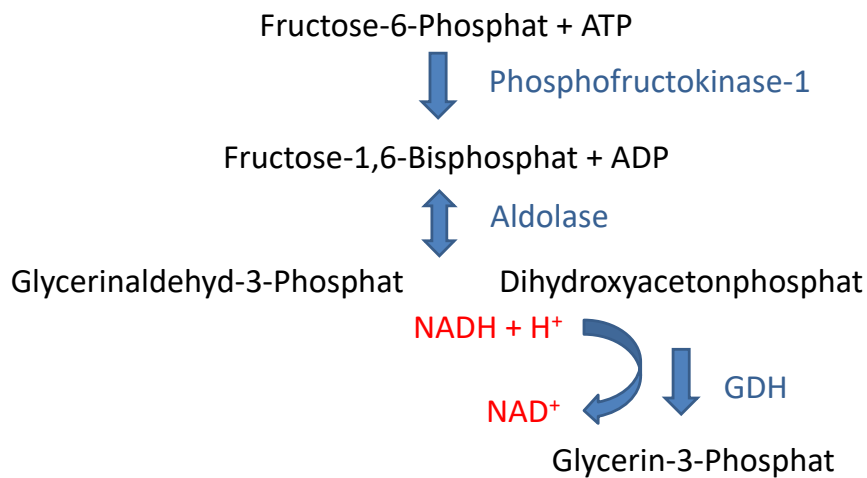


Abbildung 3.6: Aldolase-GDH-Assay für PFK. Fructose-6-Phosphat und ATP reagieren – katalysiert durch Phosphofruktokinase – zu Fructose-1,6-Bisphosphat und ADP. Fructose-1,6-Bisphosphat wird durch Aldolase weiter zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt. Letzteres reagiert zu Glycerin-3-Phosphat weiter, wobei NADH+H⁺ zu NAD⁺ oxidiert. Diese Reaktion führt zu einer Extinktionsänderung bei 340nm.

3.2.3.3 Magnesiumabhängigkeit der Phosphoglyceratkinase

Die Herstellung des Reaktionspuffers erfolgte wie für Phosphoglyceratkinase in 3.2.1.1 beschrieben, das Assay entspricht dem PGK-Assay in Kapitel 3.2.2.1. Die Zugabe von Phosphoglyceratkinase (Endkonzentration 0,33nM) wurde vor Inkubation durchgeführt, die Magnesiumkonzentration zwischen 125µM – 2,5mM moduliert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von ADP (Endkonzentration im Ansatz 1mM).

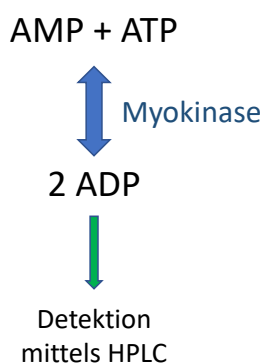
3.2.3.4 Magnesiumabhängigkeit der Pyruvatkinase

Verwendet wurde der in 3.2.1.1 beschriebene Puffer für Pyruvatkinase, hinsichtlich des Assays siehe 3.2.2. Der Versuchsablauf entspricht 3.2.2.1, wobei die Magnesiumchlorid-Konzentration zwischen 62,5µM und 2,5mM variiert wurde. Die Zugabe von Pyruvatkinase (Endkonzentration im Assay 2,69nM) erfolgte vor Inkubation, der Reaktionsstart durch ADP (Endkonzentration im Ansatz 1,5mM).

3.2.3.5 Magnesiumabhängigkeit der Myokinase aus Kaninchenmuskel

Bei der Bestimmung der Magnesiumabhängigkeit der Myokinase ergab sich das Problem, dass in zuvor durchgeführten Assays im optischen Test Hexokinase als Indikatorenzym eingesetzt wurde. Da Letztere (4.2.1) selbst eine Magnesiumabhängigkeit aufweist, könnte eine Vermischung der Hexokinase- und Myokinase-Effekte hinsichtlich Magnesium auftreten. Aus diesem Grund

Abbildung 3.7: Assay Magnesiumabhängigkeit der Myokinase wurden die entsprechenden Versuchsreihen nicht mittels optischem Test, sondern mithilfe der HPLC-



Analytik durch geführt (3.2.10).

Hinsichtlich des Reaktionspuffers siehe 3.2.1.1. Die Magnesiumchlorid-Konzentration wurde zwischen 0mM und 6mM variiert, AMP (Endkonzentration 0,1mM) vor Beginn der Inkubation zugegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 400 μ l. Reaktionsstart durch Zugabe der Myokinase (93,75-187,5 mU/mg im Ansatz). Nach null, zwei und vier Minuten wurden jeweils 80 μ l entnommen und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren zur späteren Analyse mittels HPLC (3.2.10). Myokinase katalysiert die Reaktion von 1M ATP und 1M AMP zu 2M ADP sowie die entsprechende Umkehrreaktion. Da ATP und AMP dem Ansatz beigefügt wurden, konnte anhand der chromatographisch bestimmten ADP-Konzentration auf die enzymatische Aktivität rückgeschlossen und somit eine Magnesiumabhängigkeit untersucht werden (Abbildung 3.7).

3.2.3.6 Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase

Auch zur Bestimmung der Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase erfolgt zunächst die Herstellung des Reaktionspuffers. Hierzu wurden Hepes pH 7,4 (Endkonzentration im Assay 50mM), KCl (Endkonzentration im Assay 100mM), DTT (Endkonzentration im Assay 1mM), Phosphat (Endkonzentration im Assay 5mM), NADH (Endkonzentration im Assay 0,3mM) und α -Ketoglutarat (Endkonzentration im Assay 2mM) zusammenpipettiert. Im weiteren Verlauf wurde vorgegangen wie in 3.2.1.1 beschrieben. Bei der durch AMP-

Desaminase katalysierten Desaminierung von AMP zu IMP entsteht zudem Ammonium, welches durch Glutamatdehydrogenase mit α -Ketoglutarat zu Glutamat reagiert. Hierbei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert (Abbildung 3.8). Letztere Reaktion kann durch Veränderung der Extinktion bei $\lambda=340\text{nm}$ photometrisch nachgewiesen werden.

Zum Ansetzen der einzelnen Reaktionsansätze wurde zunächst der Reaktionspuffer, dann H₂O und Magnesiumchlorid in je nach Ansatz variierender Endkonzentration (0mM, 2mM, 3mM und 4mM) in die Photometerküvetten pipettiert. Die Messreihen wurden bei 2mM und 0mM ATP-Zugabe durchgeführt. Es folgte die Zugabe von 12 μl AMP-Desaminase-enthaltendem Rattenmuskel-Extrakt. Nach zehninütiger Inkubation im Photometer bei 30°C wurde die Reaktion durch AMP-Zugabe (Endkonzentration im Ansatz 1,5mM) gestartet.

Wie bereits für die K_m-Wert-Versuche beschrieben, erfolgte anhand der UV-Winlab-Software für Perkin Elmar die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit v, welche die glykolytischen Kinasen bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen im Ansatz aufwiesen. Im Anschluss konnte die spezifische katalytische Aktivität in $\mu\text{mol}/\text{min}/12\mu\text{l}$ Extrakt berechnet werden.

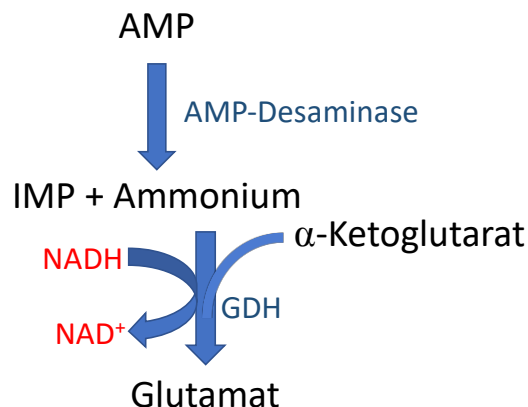


Abbildung 3.8: Assay Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase

3.2.3.7 Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase aus Kanichenmuskel

Zur Herstellung des Reaktionspuffers siehe 3.2.1.1 (Reaktionspuffer für Kreatinkinase) und 3.2.2.1. Das Assay ist in Abbildung 3.9 dargestellt: Kreatinkinase katalysiert die Bildung von Kreatin und ATP aus Kreatinphosphat

und ADP sowie die entsprechende Gegenreaktion gleichgewichtsgetrieben. Im Ansatz befindet sich zudem Hexokinase im Überfluss, welche Glucose mit dem entstehenden ATP zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. ATP wird zu ADP, welches wieder in die Kreatinkinase-Reaktion eingeht. Der weitere Reaktionsverlauf entspricht dem in 3.2.2.1 für Hexokinase beschriebenen. Magnesiumchlorid wurde zwischen 0mM und 5mM variiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von Kreatinkinase (Endkonzentration im Assay 25 ng/μl).

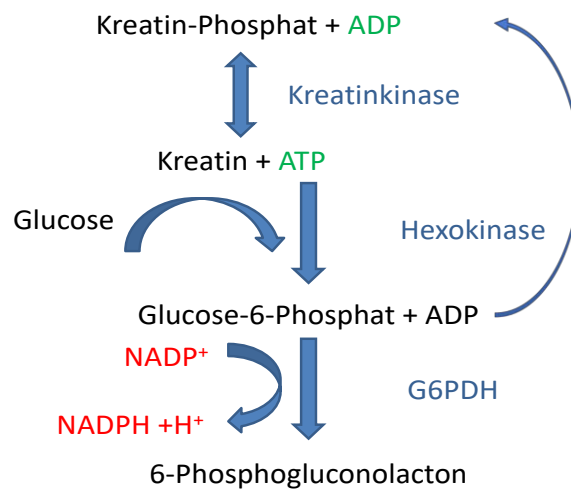


Abbildung 3.9: Reaktionsassay für Kreatinkinase. Kreatinkinase katalysiert die Reaktion von Kreatinphosphat und ADP zu Kreatin und ATP. Letzteres wird durch Hexokinase unter Zugabe von Glucose zu Glucose-6-Phosphat und ADP umgewandelt. Im Anschluss katalysiert G6PDH die Reaktion von Glucose-6-Phosphat und ADP zu 6-Phosphogluconolacton. Hierbei wird zudem NADP⁺ zu NADPH + H⁺ reduziert. Dies lässt sich photometrisch nachweisen.

3.2.4 Wirkung von ATP, GTP, UTP, ADP, GDP, UDP, AMP, GMP und UMP auf die Aktivität der PFK und Beeinflussung durch Magnesium

Bei der Untersuchung der Wirkung von Nukleosidtri-, di-, und monophosphaten auf die Aktivität der PFK wurde das im Kapitel 3.2.1.1 beschriebene Aldolase-GDH-Assay für PFK verwendet, für den Versuchsablauf siehe 3.2.2.1. Die Endkonzentration von ATP im Assay betrug konstant 5mM, es wurden zudem 6mM Magnesiumchlorid beigelegt. Die Zugabe von Fructose-6-Phosphat (Endkonzentration 250μM) erfolgte vor Inkubation, der Reaktionsstart durch Hinzupipettieren von PFK-1 (Endkonzentration Enzym Ratte 0,05nM, Endkonzentration Enzym Kaninchen 0,7nM im Ansatz).

Nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 3mM Nukleosidtri-, di- beziehungsweise -monophosphat, nach einer weiteren Minute wurde zusätzliches Magnesiumchlorid hinzugegeben (3mM, 5mM).

3.2.5 Einfluss von Phosphat auf die Phosphofruktokinase

Zur Untersuchung der Phosphatwirkung auf Phosphofruktokinase verwendeten wir wieder das im Kapitel 3.2.1.1 beschriebene Aldolase/GDH-Assay sowie den zugehörigen Reaktionspuffer. Es wurde eine Magnesiumchloridkonzentration von 7mM sowie eine ATP-Endkonzentration von 5mM im Assay gewählt.

Das Vorgehen entsprach 3.2.2.1, Phosphofruktokinase (Endkonzentration im Assay 0,7nM, Kaninchen) und Natrium-Phosphat (Variation zwischen 0mM und 20mM) wurden vor Inkubation hinzugefügt. Der Reaktionsstart erfolgte mittels Fructose-6-Phosphat (Endkonzentration 135 μ M). Nach einer Minute wurde zusätzlich 1mM AMP in die Ansätze pipettiert.

3.2.6 Einfluss von Ammoniumphosphat auf die PFK-1

Die Durchführung der Versuche zur Ammoniumphosphatwirkung auf die enzymatische Aktivität der PFK erfolgte analog zu jener zur Phosphatwirkung mit dem Unterschied, dass Ammoniumphosphat statt Phosphat verwendet wurde (Endkonzentrationen im Assay 0mM – 8,3mM). Zudem wurde kein zusätzliches AMP nach dem Start mit Fructose-6-Phosphat beigefügt.

3.2.7 Aufreinigung und Analyse der PFK-1 aus Rattenmuskel

Verwendet wurde eine durch Werner Fanick im Labor des Instituts, aufgereinigte sowie durch SDS-PAGE (Polyethyamid Gelelektrophorese) analysierte Phosphofruktokinase-1. Hierfür an dieser Stelle nochmals herzlichen Dank an Herrn Fanick. Im Folgenden werde ich das Verfahren zur Aufreinigung sowie Analyse des Proteins erläutern.

3.2.7.1 Extraktion und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung der PFK-1

Die Aufreinigung des Enzyms erfolgte weitestgehend anhand des durch die AG Prof. Wegener/Prof. Kamp in „Protokoll zum F2 „Enzyme und Regulation des tierischen Stoffwechsels“ – Reinigung der Phosphofruktokinase (PFK)“ beschriebenen Verfahrens. Hierzu wurde 1g Muskulatur aus dem Oberschenkel der Ratte entnommen, bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ im Freezer eingefroren und nach Auftauen unter Kühlung auf Eis mit 10 ml Homogenisationspuffer (3.1) im Ultra-Turrax homogenisiert. Es folgte eine dreißigminütige Zentrifugation bei 18000rpm und 4°C im Zentrifugen-Rotor SS34. Der Überstand (10ml), wurde mit 15ml Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällungspuffer (3.1) gemischt. Hierbei wurde eine 60%-ige Sättigung erreicht, dies entspricht $2,34\text{M}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nun wurde die Lösung für sechzig Minuten auf Eis gelagert und erneut für 15 Minuten bei 18.000rpm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ im SS34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 0,75ml einer Lösung hinzugegeben, welche aus $2,5\text{M}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20mM HEPES pH 7,45 und 1mM EDTA bestand. Die so entstandene, PFK-enhaltende Lösung wird im Folgenden als Glykolyse- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Suspension bezeichnet.

3.2.7.2 Aufreinigung der PFK-1 über Q-Sepharose bei 0M - 0,5 M Stufengradient

Die Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose dient der Anreicherung des gewonnenen Enzyms. Hierbei stellt Q-Sepharose die feste, stationäre Phase der Austauschchromatographie dar und besitzt an ihrer Oberfläche positive Ladungen, welche die in der mobilen Phase, also der Enzymlösung, enthaltenen Anionen binden. Die Aufreinigung erfolgt in mehreren Schritten: Zunächst findet die Äquilibration statt, wodurch die Pufferbedingungen der Säule an jene der löslichen Proteine angepasst werden. Im Anschluss wird die Proteinlösung (Glykolyse- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Suspension) auf die Säule gegeben. Die Säule wird gewaschen, um unspezifische Proteine zu entfernen, die letzten Schritte stellen Elution und Regeneration der Säule dar. Verwandt wurde eine Säule mit 1,5cm Durchmesser und 6ml Q-Sepharose, die zunächst mit 20ml Puffer C äquilibriert wurde. Im Anschluss wurden $600\mu\text{l}$ der zuvor unter 3.2.7.1 gewonnenen, PFK-1-enhaltenden Glykolyse- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -

Suspension und 10ml Puffer C auf die Säule gegeben. Die ersten drei Milliliter wurden verworfen, dann begann der Durchlauf. Es wurden 18 Fraktionen mit 2ml gesammelt, als Laufmittel diente Puffer C.

Die Elution erfolgte mit 50ml eines linearen Stufengradienten von 0-0,5 M KCl in Puffer C.

Im Anschluss wurden die Fraktionen 5-8 mit 0,3ml 87%-iger Glycerin-Lösung versetzt und die entstehenden Aliquots bei -20°C eingefroren.

3.2.7.3 SDS-PAGE mit 10% Acrylamid zur Analyse der Q-Sepharose-Fractionen der PFK-1

Zur Methodik des Verfahrens siehe 3.2.9. Der verwandte Marker, Phosphorylase B ($M_r = 97\text{kDa}$), war in der zu untersuchenden Probe vorhanden. Hierbei erwies sich Fraktion 6 (Elu 6) als reinste PFK-1-Fraktion, womit die weiteren Versuche durchgeführt wurden. Nur einige Experimente erfolgten auch mit den Randfraktionen Elu 5 und Elu 7.

3.2.7.4 Aktivitätstest des gereinigten Enzyms

Sowohl direkt nach Gewinnung als auch nach der Reinigung des Enzyms sowie der SDS-PAGE wurde die Aktivität des hergestellten PFK-Enzyms mithilfe des optischen enzymatischen Tests überprüft. Verwendet wurde hierzu der in 3.2.1.1 und 3.2.2.2 beschriebene Aldolase/GDH-Assay für PFK-1. Es zeigte sich eine maximale spezifische Aktivität von $30 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ in der Fraktion Elu 6.

3.2.8 „Whole-Glycolysis-Assay“

3.2.8.1 Entnahme der Rattenmuskelprobe

Die Präparation des Muskelgewebes hat netterweise Herr Fanick für mich übernommen, an dieser Stelle nochmals vielen herzlichen Dank hierfür. Er entnahm hierbei jeweils 1,6g der Oberschenkelmuskulatur (v.a. Musculus quadriceps) einer weiblichen Ratte (Versuchstiere von S. Kindler zur Verfügung gestellt). Im Anschluss wurden hiervon 0,6g zur späteren Verwendung bei -80 °C eingefroren, das restliche Gramm wurde zur sofortigen Herstellung des Glykolyseextraktes verwendet.

3.2.8.2 Herstellung des Glykolyseextraktes

Zunächst wurden 0,5g Rattenmuskel mit einer Gewebeschere zerkleinert und mit 2,5ml Puffer H im Ultra-Turrax für 2 Minuten homogenisiert. Im Anschluss folgte eine einstündige Zentrifugation bei 15.000rpm und 4 °C (Zentrifuge: SORVALL RC 5C PLUS, Einsatz SM-24). Bei dem gewonnenen Überstand handelte es sich um den Glykolyseextrakt (Volumen = 2,2ml). Dieser wurde mit 87%-igem Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10% versetzt, dann in 0,56ml Proben aliquotiert und anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.8.3 Durchführung des „Whole-Glycolysis-Assays“

Zunächst wurden H₂O, MgCl₂, Puffer R und Glykolysemix in einem Eppendorf-Tube auf Eis zusammen pipettiert. Anschließend wurde das Gemisch gewirkt und die Enzyme Kreatinkinase (0,25µl pro 100ml, Endkonzentration 100µg/ml) und Laktat-Dehydrogenase (0,25µl pro 100ml, Endkonzentration 100µg/ml) hinzugegeben.

Kreatinkinase katalysiert die Reaktion von Kreatin-Phosphat und ADP zu Kreatin, sowie die entsprechende Rückreaktion:



Laktat-Dehydrogenase wiederum katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in Laktat, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird und letzteres im Zuge der anaeroben Glykolyse regeneriert werden kann. Diese Reaktion ist wiederum in beide Richtungen möglich.



Es wurde der Glykolyseextrakt hinzugegeben und die Inkubation bei 37 °C gestartet, wobei sofort ein erstes 15µl-Aliquot für den Zeitpunkt Null entnommen wurde. Dieses wurde in ein mit exakt 5µl 10mM Laktat vorbefülltes Eppendorf-Gefäß (1,7ml) (Endkonzentration des Laktats 2,5mM) gegeben, dieses wurde gevortext und umgehend die Laktatbestimmung mittels Laktat-Teststreifen durchgeführt.

Somit wurde jedem Ansatz 2,5mM basales Laktat zugefügt, da das verwendete Laktat-Teststreifen-Messgerät (Accutrend Plus, Roche) erst ab einem Minimalwert von circa 2,5mM fähig ist, den Laktatgehalt des Aliquots linear wiederzugeben.

Nach zehnmütiger Inkubation des Glykolysegemischs bei 37°C erfolgte eine zweite Probenentnahme zur Bestimmung der Laktatkonzentration wie oben beschrieben, nahezu zeitgleich wurde Glucose-6-Phosphat (Endkonzentration im Assay 7,5mM) beigefügt. Letzteres wird durch Glucose-6-Phosphat-Isomerase im zweiten Schritt der Glykolyse in Fructose-6-Phosphat umgewandelt. Die weitere Glykolyseaktivität entspricht also einem Umsatz, der davon unabhängig ist, ob Glucose noch mit HK zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert werden muss oder durch Glykogenolyse über den Weg Glucose-1-Phosphat → Glucose-6-Phosphat (über Phosphoglucomutase) gebildet wird. Aus jedem Aliquot wurde Laktat wie oben beschrieben bestimmt. Weitere Aliquote wurden aus dem Glykolysemix entnommen nach 12,5, 15, 20, 30, 40 und 70 Minuten.

3.2.9 SDS-PAGE (=Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektro-phorese)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, die der Auftrennung von Polypeptiden nach Bindung von SDS anhand der Molekülmasse dient. Hierzu wird ein elektrisches Feld angelegt, in dem die durch SDS-Bindung negativ geladenen, denaturierten, das heißt „entfalteten“, Proteine wandern. Da die Bindung der Mole SDS proportional der Masse der Polypeptide ist, erfolgt deren Trennung im Wesentlichen nur mehr durch ihre Größe, d.h. der Verzögerung durch Reibung im Gel.

Wie aus dem Namen bereits hervor geht, wird ein Polyacrylamid-Gel als poröses Trennmedium unter Zusatz von SDS (Natriumdodecylsulfat) genutzt, welches als Detergens wirkt und durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine weitestgehend überdeckt. Es binden circa 1,4 Gramm SDS pro Gramm Protein, sodass die Proteine in etwa konstant pro Masseneinheit negativ geladen sind und sich gegenseitig abstoßen.

Wird nun ein elektrisches Feld an das Gel angelegt, wandern die negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Kathode. Einfluss auf die Wanderung

haben die Porengröße des Trägers, der pH-Wert, die Temperatur, die Ionenstärke des Puffers sowie die Stärke des elektrischen Feldes. Durch Vergleichen des zu untersuchenden Proteingemischs mit ausgesuchten Polypeptid-Markern bekannter Größen – in diesem Fall LMW-Marker von Pharmacia– ist eine Identifizierung und Molekularmassenbestimmung des zu bestimmenden Polypeptids möglich.

Das Verfahren der SDS-PAGE gliedert sich in vier Schritte. Der erste ist hierbei die Herstellung des Gels, welches aus einem Trenn- und einem Sammelgel besteht. Es folgt die Probenvorbereitung, die eigentliche Elektrophorese sowie die Färbung der Proteine.

In unseren Versuchen wurde das Verfahren nach Laemmli für die 12,5%-SDS-PAGE zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel verwendet (Laemmli, 1970)(3.1).

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer (4 X Probenpuffer) versetzt, es wurde H₂O bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 32µl Probenvolumen hinzugegeben. Es erfolgte die Denaturierung bei 95°C für zehn Minuten sowie eine kurze Zentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge.

Das Laemmli-Gel wurde in die Laufkammer eingebracht und Laufpuffer (Laemmli Laufpuffer: 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS) hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Proben in die jeweiligen Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung betrug bis zum Eintritt ins Trenngel konstant 80V, danach 120V. Es folgte das Einlegen des Gels in Färbelösung (circa 25 Minuten, 0,5%-Commassieblau). Zuletzt wurde eine Entfärbung mit Entfärbelösung (8% Eisessig, 25% Ethanol) durchgeführt. Hierbei bleibt nur noch das Commassieblau am Polypeptid gebunden.

<i>Komponente LMW</i>	<i>Molekülgröße</i>	<i>Endkonzentration in ng/µl in der Probe</i>	<i>Menge in µg pro Bande auf SDS- PAGE</i>
Phosphorylase B	97 kDa	167,5	0,84
Albumin	66 kDa	207,5	1,04
Ovalbumin	45 kDa	367,5	1,84
Carbonic Anhydrase	30 kDa	207,5	1,04
Trypsin Inhibitor	20,1 kDa	200	1

α -Laktalbumin	14,4 kDa	290	1,45
-----------------------	----------	-----	------

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des LMW-Markers von Pharmacia

Es konnte für die in den Experimenten genutzte PFK-1-Enzymcharge aus Kaninchenmuskel eine hohe Reinheit attestiert werden (Abbildung 3.8).

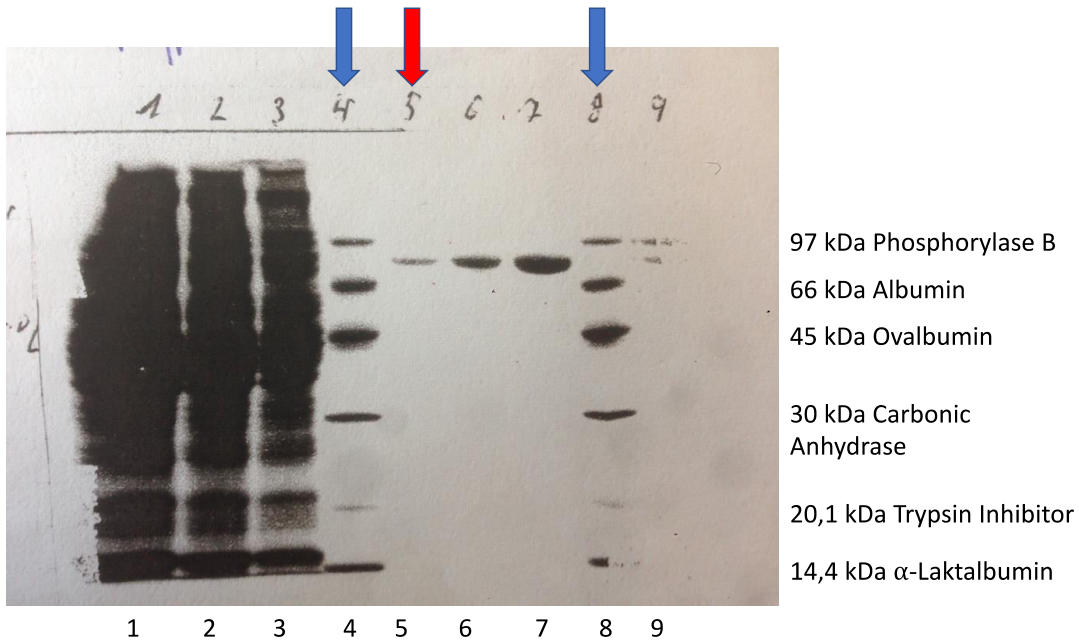


Abbildung 3.10: 12,5%-SDS-PAGE der PFK-1 aus Kaninchenmuskel. Dargestellt ist das Ergebnis der Gelelektrophorese zur Bestimmung der Reinheit der PFK-1 aus Kaninchenmuskel. Bande vier und acht repräsentieren hierbei den LMW-Marker von Pharmacia, welcher zum Vergleich herangezogen wurde (blaue Pfeile). Bande fünf steht für das Zielprotein Kaninchen-PFK (roter Pfeil). Da nur ein einziger Balken zu erkennen ist, spricht dies für eine sehr hohe Reinheit des untersuchten Enzyms.

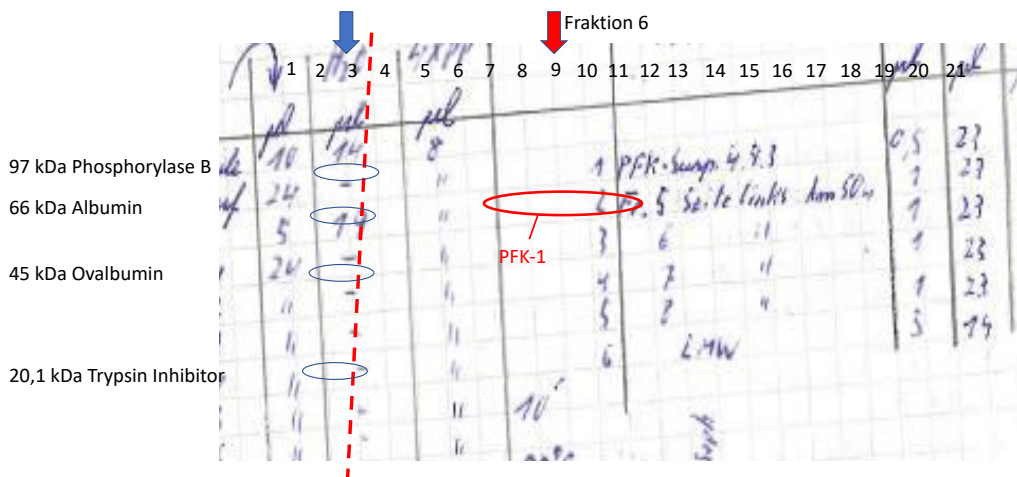


Abbildung 3.11: 12,5%-SDS-PAGE für PFK-1 aus Rattenmuskelmuskel. Die Abbildung zeigt ein Foto des Gels nach Ablauf der Gelelektrophorese und Färbung. Die einzelnen Banden repräsentieren die vermessenen Proben. Die dritte Bande von links (blauer Pfeil) entspricht dem genutzten LMW-Marker, die Banden 4-21 stellen die einzelnen Enzym-Fractionen dar. Aufgrund dieser Reinheitsanalyse wurde Fraktion sechs (roter Pfeil) zur Durchführung aller Versuche zur PFK aus Rattenmuskel genutzt. Fraktion 6 enthält einen hohen Phosphorylase-Anteil (~45%), circa 35% PFK-1 und wenig kontaminierende sonstige Proteine.

Auch zur Reinheitsbestimmung der PFK aus Rattenmuskel, welche wir ebenfalls in einigen Experimenten nutzten, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Ein Foto des hieraus resultierenden Gels ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Es wurden alle bei der Anreicherung über den Stufengradienten gewonnenen Fraktionen untersucht und miteinander verglichen, aufgrund der höchsten Reinheit wurde Fraktion sechs zur Durchführung aller Versuche mit PFK aus Rattenmuskel verwendet.

3.2.10 HPLC (= High performance/ pressure liquid chromatography) basierte Nukleotidanalyse und -quantifizierung

Bei der HPLC-Analyse handelt es sich um ein flüssigkeitschromatographisches Verfahren, welches der Auftrennung von Substanzen sowie der Identifizierung und Quantifizierung einzelner Komponenten eines Stoffgemischs anhand von Standards dient. Benötigt wird eine mobile Phase, auch als Eluent bezeichnet, sowie eine stationäre Phase, welche sich in der Trennsäule befindet. Bei der Letzteren handelt es sich im Falle der HPLC um ein sehr feinkörniges Material, aus diesem Grund ist ein äußerst hoher Druck von circa 100 bar notwendig, um das Laufmittel mithilfe von HPLC-Kolbenpumpen über die Säule zu transportieren. Am Ende der Säule erfolgt die Detektion der Analyt-Peaks, wodurch sich eine spezifische „Retentionszeit“ ergibt, welche von der Polarität oder Hydrophobizität der zu analysierenden Probe sowie von pH-Wert und Hydrophobizität des Eluenten abhängig ist. In unserem Fall diente das Verfahren dazu, die Zusammensetzung des Glykolyseextraktes (3.2.8) besonders im Hinblick auf enthaltene Nukleotide und deren Konzentrationen zu analysieren. Es wurde eine 10 Zentimeter x 5mm Mono Q AEX Anionenaustauschersäule sowie das Varian2-System zur Trennung und Analytik verwendet. Dieses besteht aus zwei kleinhübigen Einkolbenhubpumpen, einem Autosampler 410, welcher der Injektion der Proben in das HPLC-System dient, sowie aus einem UV-VIS-Dioden-Array-Detektorsystem 345 zur Detektion der Nukleotide. Diese weisen ein Absorptionsmaximum bei 260nm auf und können daher direkt detektiert werden.

Während der Gesamtglykolyse-Messungen wurden Proben-Aliquots sowohl für die Laktatbestimmung als auch für die Nukleotidanalytik entnommen (Teilung der Aliquote) und zur späteren Analyse bei -20°C eingefroren. Diese Proben wurden aufgetaut und hiervon jeweils exakt 3 Microliter bis auf 800 Microliter mit H_2O aufgefüllt. Hiervon wurden $700\mu\text{l}$ auf das HPLC-System injiziert. Es wurde ein binäres Eluentensystem, Puffer A/B, eingesetzt. Als Eluent A diente 20mM TRIS mit pH 7,2, Eluent B bestand aus 0,25mM NaCl in 20mM TRIS, ebenfalls pH 7,2. Die Flussrate wurde konstant bei 0,3ml/min gehalten.

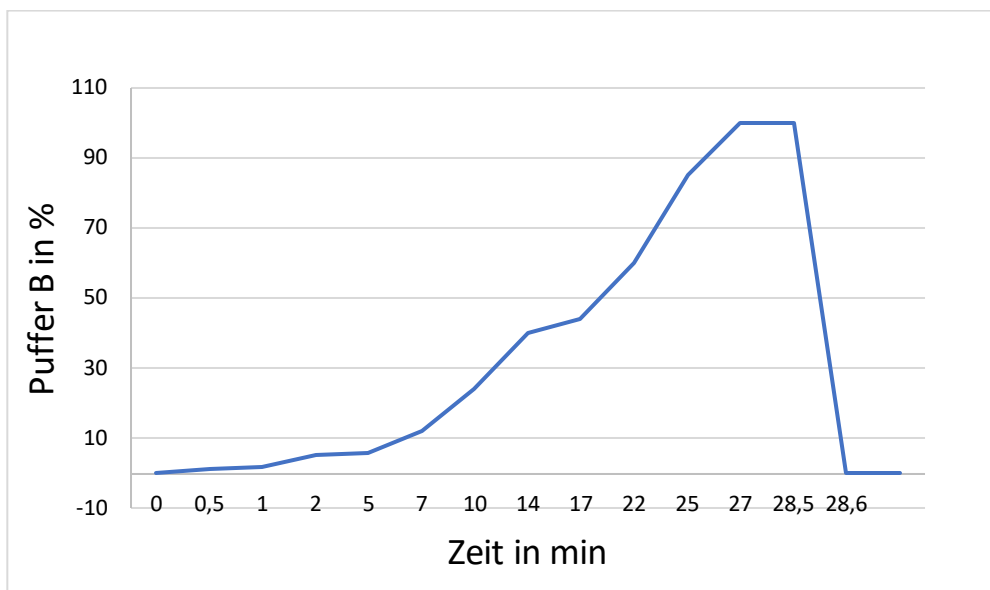


Abbildung 3.12: Gradient des binären HPLC-Eluentensystems zur Nukleotidanalyse. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Konzentration des Puffers B in Prozent. Die Flussrate wurde während der gesamten Messung konstant bei 0,3 Milliliter pro Minute gehalten und ist aus diesem Grunde nicht extra im Diagramm eingezeichnet. Puffer A: 20mM TRIS pH 7,2, Puffer B: 0,25M NaCl in 20mM TRIS (pH 7,2)

3.3.11 Quantitative Proteinbestimmung des Glykolyseextraktes mittels BioRad

Es wurde eine quantitative Proteinbestimmung des Glykolyseextrakts aus Rattenmuskel (Herstellung siehe 3.2.8.2) durchgeführt. Diese beruhte auf der Färbemittel-binde-Methode von Bradford (Bradford, 1976) und wurde mithilfe des *Bio Rad Protein Assays* durchgeführt. Hierzu wurden zunächst vier verschiedene Probenansätze 1-4 hergestellt, wobei der Glykolyseextrakt aus drei unterschiedlichen Messreihen jeweils um Faktor 50 mit Hapes pH 7,5 verdünnt wurde. Als Vergleich diente zudem eine vierte Probe, welche aus

fünzigfach mit HEPES pH 7,5 verdünntem Puffer H bestand. Das *BioRad*-Reagenz wurde 1:3 mit Wasser verdünnt. Es folgte das Pipettieren der Ansätze auf Microtiterplatten, wobei zunächst eine Eichkurve mithilfe von BSA 0,2mg/ml erstellt wurde. Hierzu wurde in die ersten beiden Kammern zur Leerwertbestimmung lediglich H₂O und *BioRad* pipettiert, in Kammer drei bis acht wurden zusätzlich ansteigende Volumina an BSA (2,5µl - 15µl) hinzugegeben, durch variierte H₂O-Zugabe wurde das Gesamtvolumen jeweils konstant gehalten (250µl). Es erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei $\lambda=620\text{nm}$. Nach Abzug der Leerwert-Extinktion konnte eine Eichgerade erstellt werden (Geradengleichung: $y=6,6894x - 0,2407$). Für Probe 1-4 wurde äquivalent verfahren mit dem Unterschied, dass statt BSA jeweils ansteigende Volumina der einzelnen Proben hinzugegeben wurden. Im Anschluss konnte die quantitative Proteinbestimmung für die einzelnen Glykolyseextrakt-Proben rechnerisch durch Vergleich mit dem BSA-Standard erfolgen. Hierzu wurde die sich für die Probe-Gerade ergebende Steigung durch jene der BSA-Eichgerade dividiert und das Ergebnis anschließend mit 0,2µg/µl, der BSA-Konzentration, multipliziert. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnte so auf die Proteinkonzentration im Glykolyseextrakt geschlossen werden.

4. Ergebnisse

4.1. Kinetik der glykolytischen Kinasen - Bestimmung der K_m -Werte

Wie im Abschnitt 2.4 der Einleitung bereits erläutert, stellte sich die Frage, ob die ATP-verwertenden Kinasen der Glykolyse zusätzlich auch andere Nucleosiddi- oder triphosphate umsetzen können und ob somit eine Einflussnahme auf die freie Magnesiumkonzentration in der Zelle möglich wäre. Aus diesem Grunde wurde die Kinetik von Hexokinase, Phosphofruktokinase-1, Phosphoglyceratkinase und Pyruvatkinase auch im Bezug auf GTP und UTP (HK und PFK-1) beziehungsweise GDP und UDP (PGK und PK) untersucht. Es handelt sich bei allen untersuchten Enzymen um sogenannte Bisubstratenzyme, welche zwei Substrate umsetzen. Soll nun der K_m -Wert für eines dieser Substrate bestimmt werden (variiertes Substrat), muss das zweite Substrat (konstantes Substrat) im Sättigungsbereich beigefügt werden.

Der K_m -Wert, auch als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet, spiegelt die Substratkonzentration wider, bei der eine enzymatische Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. Je niedriger dieser Wert, desto größer die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat. V_{max} wiederum repräsentiert die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Durch Bezug auf die eingesetzte Enzymkonzentration kann die Wechselzahl des Enzyms k_{cat} für das entsprechende Substrat berechnet werden. Obwohl zum Teil entsprechende Daten aus der Literatur vorliegen, wurden solche Messungen mit Hexokinase, PFK-1, Phosphoglyceratkinase und Pyruvatkinase unter identischen wie im Methodenteil genannten Messbedingungen zur besseren Vergleichbarkeit der Daten detailliert durchgeführt.

4.2.1 Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bestimmung der K_m -Werte der Hexokinase erfolgte aus *Saccharomyces cerevisiae*, einer Hefenart, da das Muskelenzym nicht zur Verfügung stand. Getestet wurde ATP, GTP und UTP wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben. Hexokinase zeigte eine ausgeprägte Präferenz für ATP gegenüber GTP (Tabelle 4.1). UTP wurde nicht als Substrat akzeptiert. Auch die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit war bei ATP deutlich höher ($V_{maxATP}(HK)$)

= 361,4 (+/-21,3) nmol/min/mg und $V_{\max\text{GTP}}(\text{HK}) = 6,36 (+/-0,91)$ nmol/min/mg). Es ergab sich also kein Hinweis darauf, dass das erste Schlüsselenzym der Glykolyse in größerem Maße zu einer Variation der UTP- oder GTP-Konzentration in der Zelle und somit der Konzentration des freien Magnesiums beiträgt.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Kinetik der Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* für ATP, GTP und UTP bei gesättigter Glucose-Konzentration.

Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$V_{\max, \text{app}}$ in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	$K_{m, \text{app}}$ -Wert in μM	$k_{\text{cat, app}}$ ($V_{\max}/[E]$) in min^{-1}	V_{\max}/K_m
Glucose	ATP	361,4 +/- 21,3	105,8 +/- 23,8	46,8	3,4
Glucose	GTP	6,35 +/- 0,91	2406 +/- 669,3	0,8	0,003
Glucose	UTP	nicht messbar	nicht messbar	-	-

Verglichen mit in der Literatur angegebenen Werten, zeigt unsere ATP- K_m -Wert-Bestimmung eine gute Übereinstimmung ($K_{m\text{ATP}}(\text{HK}) = 100 \mu\text{M}$ für *Saccharomyces cerevisiae*, (Gao and Leary, 2003), $K_{m\text{ATP}}(\text{HK}) = 100 \mu\text{M}$ für *Homo Sapiens* (Anna L Gloyn *et al.*, 2005)). Für GTP liegen nach unserer Recherche nur wenige Vergleichswerte bestimmt mit pflanzlichen Enzymen vor, was einen Vergleich mit den von uns gemessenen Werten deutlich erschwert ($K_{m\text{GTP}}(\text{HK}) = 231 \mu\text{M}$ für *Solanum chacoense* (Claeyssen *et al.*, 2006), $K_{m\text{GTP}}(\text{HK}) = 654-788 \mu\text{M}$ für *Helianthus annuus* (Troncoso-Ponce *et al.*, 2011)). Es war uns nicht möglich, eine Steady-State-Kinetik der Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* für UTP zu bestimmen. Auch in der Literatur ließen sich keine K_m -Werte für das Enzym aus Hefen finden, jedoch gibt es für Hexokinasen des Menschen Daten, die eine extrem schlechte Bindung an UTP zeigen. Diese sind allerdings ebenfalls um ein Vielfaches höher, als jene für ATP ($K_{m\text{UTP}}(\text{HK}) = 5.000 \mu\text{M}$ gegenüber $K_{m\text{ATP}}(\text{HK}) = 100 \mu\text{M}$ (Magnani *et al.*, 1988; Gloyn *et al.*, 2005), ebenso in Kaninchenmuskel $K_{m\text{UTP}}(\text{HK}) = 30.000 \mu\text{M}$ (Magnani *et al.*, 1982) gegenüber $K_{m\text{ATP}}(\text{HK}) = 181 \mu\text{M}$ (Aubert-Foucher, Font and Gautheron, 1984)).

4.1.2 Phosphofructokinase-1 aus *Rattenmuskel*

Bei der Bestimmung der Steady-State-Kinetik der PFK-1 für ATP, GTP und UTP zeigte sich, dass das Enzym anders, als Hexokinase, sehr wohl dazu im Stande ist, GTP und UTP als Substrat zu nutzen und alle drei Substrate mit vergleichbarer hoher Affinität ($K_m \leq 0,14\text{mM}$) zu binden (Tabelle 4.2).

Die Wechselzahlen für alle drei Substrate sind nahezu identisch.

Tabelle 4.2 Zusammenfassung der Kinetik der Phosphofructokinase-1 aus Rattenmuskel für ATP, GTP und UTP bei gesättigter Fructose-6-Phosphat-Konzentration

Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$V_{\max, \text{app}}$ in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	$K_{m, \text{app}}$ Wert in μM	$k_{\text{cat, app}}$ ($V_{\max}/[E]$) in min^{-1}	V_{\max}/K_m
Fru-6-P	ATP	31,2 +/- 1,1	31,1 +/- 5,5	135,5	1
Fru-6-P	GTP	26,9 +/- 1,3	86,9 +/- 18,7	116,9	0,31
Fru-6-P	UTP	29,1 +/- 1,9	134,6 +/- 34,6	126,4	0,22

Vergleicht man die in Tabelle 4.2 angegebenen K_m -Werte mit Werten aus der Literatur, so zeigt sich für ATP eine gute Übereinstimmung mit Daten von *Rattus norvegicus* ($K_{m\text{ATP}}(\text{PFK}) = 50\mu\text{M}$ (Ozawa, 1985)) und *Homo sapiens* ($K_{m\text{ATP}}(\text{PFK}) = 1\text{-}49\mu\text{M}$ (Brüser *et al.*, 2012)). Für GTP und UTP ließen sich nach meiner Recherche keine Vergleichs- Werte für Enzyme der Muskulatur aus höheren Säugertieren finden. Die K_m -Werte aus verschiedenen anderen Organismen variieren sehr stark (Habison, Kubicek and Röhr, 1983; Cawood, Botha and Small, 1988; Turner and Plaxton, 2003). In der Enzym-Datenbank *brendaenzymes.org* finden sich ausschließlich K_m -Werte aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien, die sich nur schlecht mit unseren Daten aus Rattenmuskel vergleichen lassen.

4.1.3 Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Als konstantes Substrat wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat in sättigender Konzentration den Versuchsansätzen beigelegt. Interessanterweise zeigte sich in unseren Versuchen unter diesen Bedingungen eine höhere Affinität der

Phosphoglyceratkinase zu GDP als zu ADP, was sich in einem etwa dreifach so hohen K_m -Wert für ADP ausdrückt (Tabelle 4.3). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} war jedoch bei ADP höher. Neben einer höheren Affinität von GDP gegenüber ADP ergab sich auch eine höhere katalytische Effizienz für GDP als für ADP unter sättigender 3-Phosphoglycerat-Zugabe ($k_{cat}/K_m(\text{ADP}) = 3,03$; $k_{cat}/K_m(\text{GDP}) = 4,28$).

UDP zeigte sich als ein vergleichsweise schlechtes Substrat für PGK mit einer deutlich geringeren Affinität und auch einer signifikant niedrigeren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Kinetik der Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae* für ADP, GDP und UDP bei gesättigter Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Konzentration

Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$V_{max, app}$ in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	K_m, app -Wert in μM	$k_{cat, app}$ ($V_{max}/[E]$) in min^{-1}	V_{max}/K_m
3-GAP	ADP	393,7 +/- 9,9	427,5 +/- 28	1193	0,9
3-GAP	GDP	207,6 +/- 15,8	146,2 +/- 43,5	629	1,4
3-GAP	UDP	17,6 +/- 2,6	1077 +/- 327	53,2	0,02

Vergleicht man die von uns gemessenen Werte mit den Angaben der Enzym-Datenbank *brenda-enzymes.org*, so zeigt sich eine gewisse Diskrepanz unserer Messung des K_m -Werts für ADP zu dem dort angegebenen Wert ($K_{mADP}(\text{PGK}) = 100\text{-}180\mu\text{M}$ für *Saccharomyces cerevisiae* (Hurth *et al.*, 2007; Varga *et al.*, 2009)). Diese beruht wohl auf unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, so führten Varga *et al.* ihre Messungen beispielsweise bei 22°C durch, unsere wurden jedoch stets bei 30°C durchgeführt, um etwas besser die im Säugetier-Organismus herrschenden Bedingungen nachzuempfinden (Varga *et al.*, 2009). Encalada *et al.* geben den K_{mADP} mit 500 +/- 170 μM und den K_{mGDP} mit 370 +/- 150 μM für Hefen an. V_{maxADP} ist 53 +/- 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ und V_{maxGDP} 38 +/- 2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Encalada *et al.*, 2009), also ähnlich unserem Wert. Zudem bestätigt sich unsere Beobachtung, dass Hefe-PGK eine höhere Affinität zu GDP als zu ADP besitzt. Für *Entamoeba histolytica* beschreiben Encalada *et al.* eine Präferenz der PGK für GDP gegenüber ADP ($K_{mGDP}(\text{PGK}) = 70\mu\text{M}$

gegenüber $K_{mADP}(PGK) = 7400$ (Encalada *et al.*, 2009)), zudem ist hier auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für GDP im Vergleich zu ADP erhöht. Selbiges gilt laut den Autoren für GTP und ATP beim reversiblen Test der Phosphoglyceratkinasereaktion, also der Bildung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat aus 3-Phosphoglycerat (Encalada *et al.*, 2009).

Für humane PGK findet sich ein K_m -Wert für ADP von 77-120 μM (Hurth *et al.*, 2007; Varga *et al.*, 2009). Dies würde also für eine höhere Affinität des humanen Enzyms zu ADP sprechen, leider war jedoch kein Vergleichswert für GDP in der Datenbank zu finden. Die Literaturrecherche zu UDP ergab keinerlei Referenzwert.

4.1.4 Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel

Schließlich wurde auch die Steady-State-Kinetik der NTP-generierenden Pyruvatkinase für ADP, GDP und UDP unter sättigenden Bedingungen von Phosphoenolpyruvat bestimmt. In den Versuchen zeigte sich, dass Kaninchenmuskel-Pyruvatkinase durchaus auch GDP und UDP als Substrat nutzen kann, allerdings ist die Affinität für ADP wie auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit deutlich höher. So ist der $K_{m,app}$ des Enzyms für GDP fast sechsfach, jener für UDP sogar mehr als elffach höher, als jener für ADP.

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Kinetik der Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel für ADP, GDP und UDP bei gesättigter Phosphoenolpyruvat-Konzentration im Ansatz.

Konstantes Substrat	Variiertes Substrat	$V_{max, app}$ in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	$K_{m, app}$ -Wert in μM	$k_{cat, app}$ ($V_{max}/[E]$) in min^{-1}	V_{max}/K_m
PEP	ADP	284,6 +/- 8,4	185,0 +/- 22,4	106	1,5
PEP	GDP	41,86 +/- 1,8	1087 +/- 109	15,6	0,04
PEP	UDP	154,8 +/- 2,3	2098 +/- 60,1	58	0,07

Die Wechselzahl der PGK für das Adenosindisphosphat ist ebenfalls um ein Vielfaches höher, als jene für die anderen beiden Nukleosiddiphosphate

(Tabelle 4.4). Insgesamt ähneln diese Ergebnisse denjenigen, die bei den Kinetikversuchen zur PFK beobachtet wurden (4.1.2).

Vergleicht man den K_m -Wert für ADP mit denjenigen auf *brenda-enzymes.org*, so stimmen unsere Daten mit denjenigen anderer Säugetier-Muskel-Pyruvatkinasen relativ gut überein ($K_{mADP}(PK) = 240-340\mu M$ für humane PK, (Jill D. Dombrauckas, Bernard D. Santarsiero and Mesecar*, 2005); $K_{mADP}(PK) = 400\mu M$ für Rattenmuskel-PK (Imamura and Tanaka, 1982)).

Für GDP und UDP finden sich Vergleichswerte zu der PK-M2 aus *Rattus norvegicus*. Meine Werte divergieren zwar von denjenigen aus *Rattus norvegicus* ($K_{mGDP}(PK) = 670\mu M$ (Schering *et al.*, 1982) gegenüber $K_{mGDP}(PK) = 1087 \pm 109,2\mu M$ für unsere Kaninchenmuskel-PK; $K_{mUDP}(PK) = 1.250\mu M$ für PK-M2 (Schering *et al.*, 1982) gegenüber $K_{mUDP}(PK) = 2098 \pm 60,1\mu M$ (unsere Messung)), zeigen jedoch auch dort, dass die Affinität des Enzyms für ADP größer ist, als diejenige für GDP und UDP.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass von den untersuchten Kinasen alle bis auf Hexokinase in nicht zu vernachlässigendem Maße neben ADP/ATP auch UDP/UTP und GDP/GTP umsetzen können. Phosphofruktokinase zeigte eine vergleichbare Affinität für alle Nukleosidtriphosphate, PGK aus Hefe sogar eine größere Affinität zu GDP als zu ADP. Es ist also durchaus möglich, dass das NTP/NDP-Verhältnis intrazellulär und somit auch die Konzentration des freien Magnesiums durch die Aktivität der Glykolyse beeinflusst wird.

4.2 Versuche zur Magnesiumabhängigkeit der glykolytischen Kinasen

Wie in der Einleitung (2.4) dargelegt, brauchen alle ATP-verbrauchenden glykolytischen Kinasen Magnesium zur Bildung von MgATP als Substrat. Es stellte sich nun die Frage, ob Magnesium darüber hinaus auch eine regulatorische Funktion in der Glykolyse übernimmt.

4.2.1 Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Wie zu erwarten zeigte sich ohne das Vorhandensein von Magnesium im Ansatz keine enzymatische Aktivität der Hexokinase (Abbildung 4.1, $\text{MgCl}_2 = 0\text{mM}$). Steigerung der MgCl_2 -Konzentration über $60\mu\text{M}$ führte zur Aktivierung des Enzyms, sodass bei einer MgCl_2 -Konzentration von etwa $300\mu\text{M}$ der EC_{50} -Wert erreicht wurde. Bei Erreichen des 1:1-Verhältnisses von Magnesium und ATP (1mM MgCl_2) wurde keine gesonderte Messung durchgeführt, es zeigt sich jedoch eine Sättigung des Magnesiumeffekts bei $1\text{-}1,5\text{mM}$. Die Aktivierungskinetik spricht eher für eine aktivierende Magnesiumbindungsstelle außerhalb der Substratbindungsstelle für ATP, als für eine Bindung eines hochaffinen Mg/ATP-Komplexes als Voraussetzung für ein aktives Enzym.

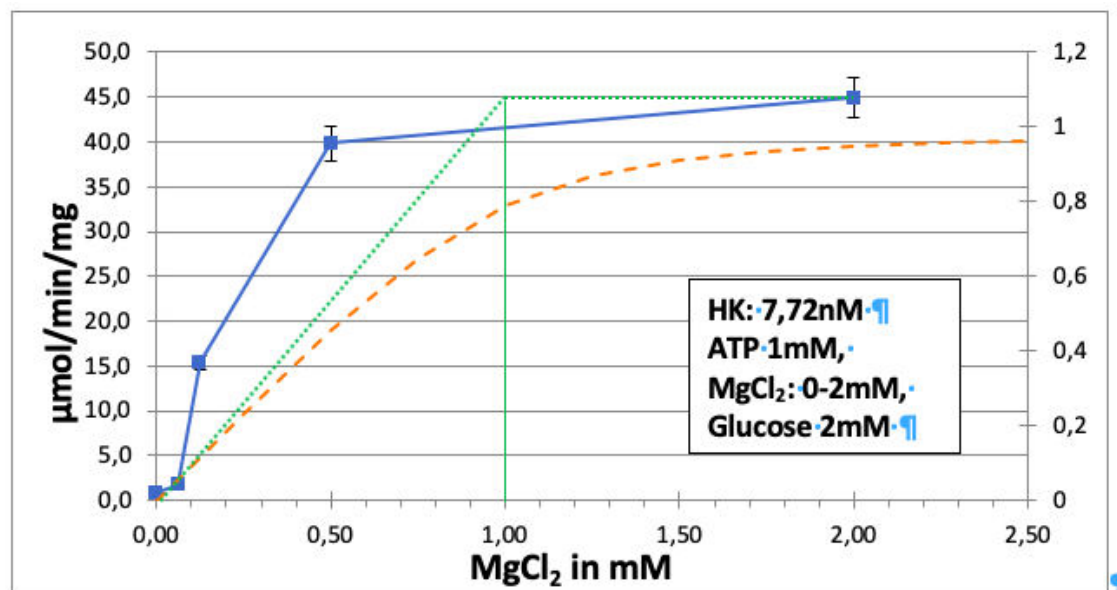


Abbildung 4.1: Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase. Auf der X-Achse ist die MgCl_2 -Konzentration in Millimolar aufgetragen, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität der Hexokinase in Micromol pro Minute pro Milligramm. Die gestrichelte Kurve zeigt die

mittels Maxchelator berechnete MgATP-Konzentration bei 1mM ATP und steigender Magnesiumkonzentration. Bei Zugabe von 1mM MgCl₂ ist ATP = Magnesium (grüne Linie). Eingezeichnet ist zudem die entsprechende Standardabweichung bei n=3. Die gepunktete, grüne Linie zeigt den theoretischen Verlauf der Aktivierungskurve unter der Annahme eines hochaffinen 1:1-Komplexes von Mg:ATP. Bei Zugabe von 1mM MgCl₂ ist zudem das 1:1-Verhältnis von Magnesium zu ATP erreicht (durchgezogene grüne Linie).

4.2.2 Magnesiumabhängigkeit der Phosphofruktokinase aus Kaninchen- und Rattenmuskel

Da auch die Pyruvatkinase eine Magnesiumabhängigkeit aufweist (2.3.3, 3.2.3.3, 4.2.3) wurde für diese Versuche der in 3.2.3.2 beschriebene Aldolase/GDH-Assay verwendet. Wie im Einleitungsteil erläutert, stellt Phosphofruktokinase-1 das wichtigste Schlüsselenzym der Glykolyse dar und ist daher von besonderem regulatorischem Interesse. Weithin ist bekannt, dass PFK-1 durch hohes ATP gehemmt und durch AMP aktiviert wird, wodurch die glykolytische Aktivität auf die energetischen Bedürfnisse der Zelle abgestimmt werden kann (2.3.3). MgATP hingegen ist Substrat des Enzyms, welches zwar wie zuvor gezeigt auch durch die Magnesium-Nukleosidtriphosphate GTP und UTP ersetzt werden kann, die Affinität des Enzyms zu MgATP war allerdings die höchste (4.1.2). Banaszak et al. (2011) konnten anhand von Kristallstrukturanalysen der eukaryotischen PFK-1 aus Hefe zeigen, dass das Enzym mehrere ATP-Bindestellen aufweist, wovon eine sich im katalytischen Zentrum befindet und eine weitere die allosterische, inhibitorische Bindestelle darstellt. Otto et al. (1974) hatten bereits die Überlegung aufgeworfen, dass Magnesium durch Komplexbildung von freiem ATP dessen inhibitorische Wirkung auf die Phosphofruktokinase abschwächen könnte (Otto et al., 1974). Möglich wäre dies durch eine Änderung der chemischen Eigenschaften des ATP-Moleküls durch Mg-Bindung, welche ein Andocken an die allosterische Bindestelle verhindert. Aus diesem Grund führten wir einen Vorversuch zur Magnesiumabhängigkeit der PFK durch, in welchem das Konzentrationsverhältnis von Magnesiumchlorid und ATP im Ansatz stets konstant gehalten, also keine Veränderung der freien Konzentration herbeigeführt wurde.

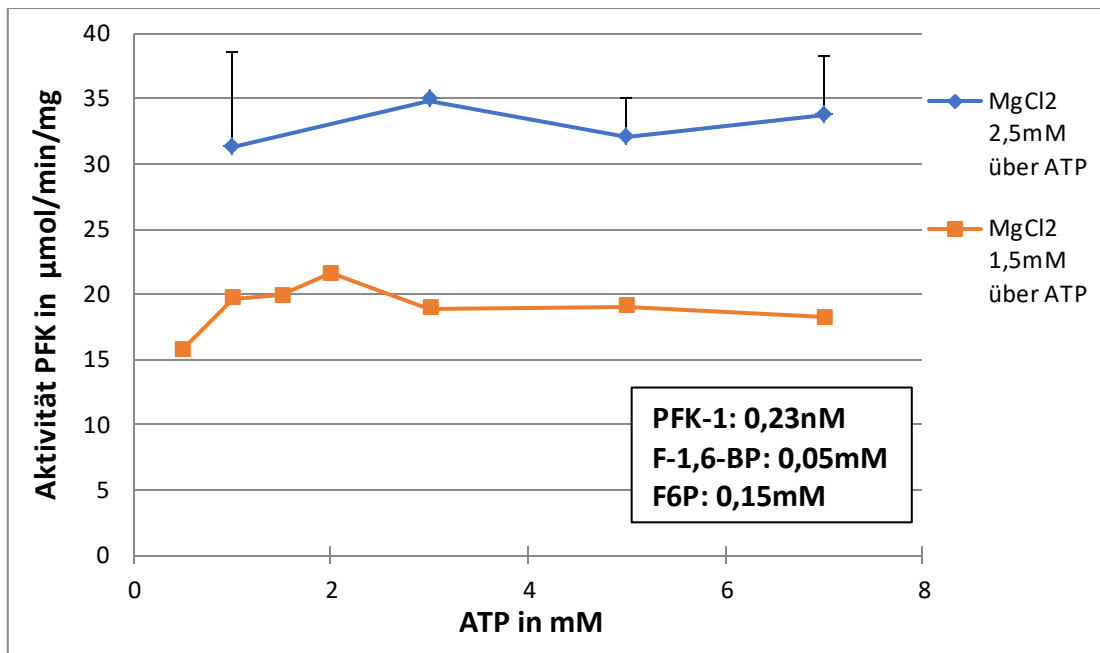


Abbildung 4.2: Aktivität der PFK bei konstantem Verhältnis von $MgCl_2$ zu ATP bei variiertem ATP-Konzentration. Die Messungen wurden bei $[MgCl_2]=[ATP] + 3,5mM$ und $[MgCl_2]=[ATP] + 2,5mM$ durchgeführt (Variation der Magnesiumchlorid-Konzentration zwischen $10,5mM$ und $4,5mM$, Variation der ATP-Konzentration zwischen $7mM$ und $1mM$). Es zeigte sich, dass bei Konstanthaltung des Magnesium-ATP-Verhältnisses auch bei Steigerung der ATP-Konzentration im Ansatz keine Hemmung der PFK resultierte. Insgesamt war bei einer höheren $MgCl_2$ -Konzentration im Verhältnis zu ATP eine höhere Enzymaktivität zu beobachten.

Es zeigte sich, dass es hierdurch tatsächlich zu keiner Abnahme der enzymatischen Aktivität kam (Abbildung 4.2), trotz Steigerung der absoluten ATP-Konzentration im Assay. Da bei diesem Versuch der PK/LDH-Assay für PFK-1 verwendet wurde und die hierbei verwendete Pyruvatkinase ebenfalls Magnesium-aktiviert ist, wurden alle weiteren Versuche mithilfe des Aldolase/GDH-Assays durchgeführt (siehe Methodik).

Diese Versuche zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Magnesium im Ansatz. Besonderes Augenmerk lag hierbei darauf, zu sehen, ob über das Erreichen eines Magnesium-ATP-Verhältnisses von 1:1 hinaus noch eine weitere Aktivierung der PFK erfolgt. Dies zeigte sich jedoch nicht eindeutig: Bei weiterer Magnesiumzugabe über das 1:1-Verhältnis hinaus war nur noch eine geringe weitere Steigerung der PFK-Aktivität zu erkennen (Abbildung 4.3). Die wesentliche Regulation ist hier also aus der Bindung von Magnesium an das freie ATP bis zur Bildung eines 1:1-MgATP-Komplexes abzuleiten.

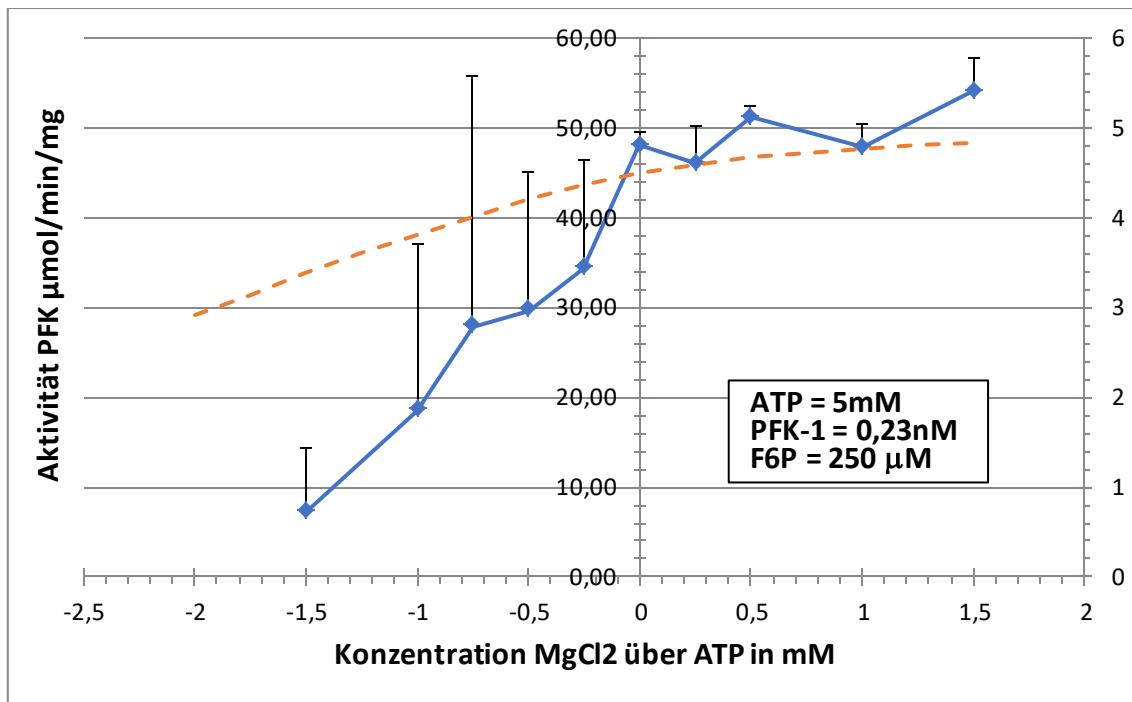


Abbildung 4.3: Aktivität der PFK bei Modulation des $MgCl_2/ATP$ -Verhältnisses unter Konstanthaltung der ATP-Konzentration bei 5mM im Ansatz. Auf der X-Achse ist ($MgCl_2 - ATP$) in Millimolar aufgetragen, auf der Y-Achse die Aktivität der PFK in Micromol pro Minute pro Milligramm. Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n=3$ Versuchen und die entsprechende Standardabweichung sowie die mittels Maxchelator berechnete Konzentration von MgATP bei 5mM ATP und variiertes Magnesiumkonzentration (gestrichelte rote Linie).

4.2.3 Magnesiumabhängigkeit der Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Im Folgenden wurde Phosphoglyceratkinase, nur verfügbar aus *Saccharomyces cerevisiae*, die dritte Kinase der Glykolyse untersucht. Wie eingangs beschrieben (2.3.4), ist auch für dieses Enzym eine Bindung von MgADP als Substrat bekannt, eine Sonderstellung gegenüber den anderen untersuchten Kinase ergibt sich allerdings daraus, dass die durch PGK katalysierte Reaktion reversibel und nicht durch eine Feedback-Hemmung limitiert ist. Dies drückt sich auch darin aus, dass das Enzym sowohl Teil der Glykolyse ist als auch einen Schritt der Gluconeogenese in Leber und Niere katalysiert.

Eine Magnesiumabhängigkeit der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, des Enzyms der Indikatorreaktion des gekoppelten optischen Tests, wurde in Vorversuchen ausgeschlossen. Anders als bei den zuvor untersuchten glykolytischen Kinasen war bereits bei vollständigem Fehlen von

Magnesium im Ansatz (0mM) eine signifikante – wenn auch sehr geringe – Grundaktivität der Phosphoglyceratkinase im optischen Test messbar (Abbildung 4.4). Durch schrittweise Steigerung von $MgCl_2$ kam es zu einer weiteren Aktivierung des Enzyms, welche ab einem Verhältnis von ADP (1,5mM) zu $MgCl_2$ (ab etwa 0,7mM) als maximal zu beobachten war. Eine maximale Aktivierung der PGK erfolgte bei einer Mg-Konzentration, bei welcher ein großer Teil der ADPs noch unkomplexiert mit Magnesium ist, also vor Erreichen des 1:1-Verhältnisses von Magnesium zu ATP. Dies stellt einen Unterschied zu den vorherigen Versuchen dar, bei welchen eine vollständige Aktivierung erst bei Erreichen des 1:1-Verhältnisses im Ansatz erfolgte.

Eine Ursache für diesen Unterschied in der Regulation des Enzyms ist sicherlich in seiner Doppelrolle in Glykolyse und Gluconeogenese begründet. Flachner et al. beschreiben sehr ausführlich die Bindung von MgATP und MgADP an PGK und die Rolle des Metallions bei der Katalyse (Beáta Flachner *et al.*, 2004). Sie vermuten, dass die Bindung von freiem ATP und freiem ADP zu einer Stabilisierung des aktiven Zustands des Enzyms führt, eine Komplexierung mit Magnesium verstärkt diesen Effekt bei MgADP, nicht aber bei MgATP. Dies könnte die bereits vor Magnesiumzugabe vorhandene Grundaktivität der PGK in unserem Versuch, zudem aber auch die weitere Aktivierung durch vermehrte Zugabe von $MgCl_2$ erklären.

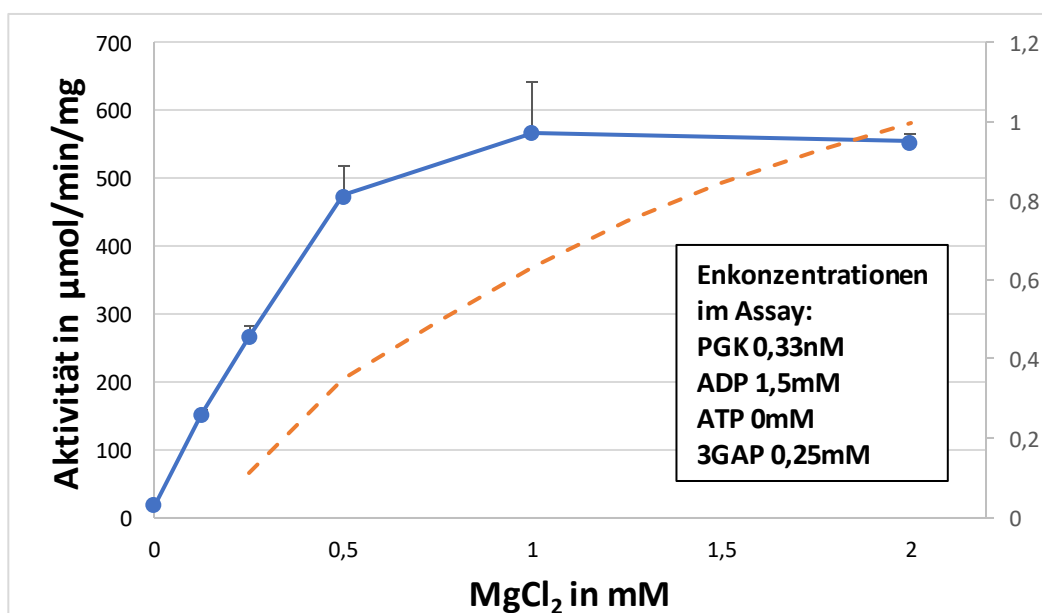


Abbildung 4.4: Magnesiumabhängigkeit der Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Auf der X-Achse ist die Konzentration von $MgCl_2$ in Millimolar aufgetragen, auf der Y-Achse die Aktivität der PGK in Micromol pro Minute pro Milligramm. Die Konzentration der PGK im Assay beträgt 0,33nM, jene von ADP 1,5mM und jene von Glycerinaldehyd-3-Phosphat 0,25mM. Die gestrichelte, rote Linie repräsentiert die mittels Maxchelator errechnete Konzentration von MgADP bei konstantem

1,5mM ADP und 0mM ATP bei variiertem Magnesiumkonzentration. Eingezeichnet ist zudem die Standardabweichung bei n=3.

4.2.4 Magnesiumabhängigkeit der Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel

Im Folgenden wurde die Magnesiumabhängigkeit der Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel untersucht. PK katalysiert, wie HK und PFK-1, eine der Schlüsselreaktionen der Glykolyse, energetisch ist die Reaktion nur von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und nicht umgekehrt möglich. Es besteht eine Feedback-Hemmung durch ATP (Carbonell *et al.*, 1973).

Wie aufgrund der bekannten Abhängigkeit des Enzyms von dem Vorhandensein divalenter Kationen zu erwarten (2.3.3.2), war bei vollständiger Abwesenheit von Magnesium im Ansatz keinerlei enzymatische Aktivität im optischen Assay detektierbar (Abbildung 4.5), ebenso wenig bei einer Konzentration von $<50\mu\text{M}$. Nach schrittweiser Steigerung der Magnesiumchloridkonzentration in den Ansätzen kam es zur Aktivierung des Enzyms. Die Aktivierungskurve zeigt ähnlich wie bei PGK eine direkte Mg-Bindung an das Enzym, noch bevor genügend MgADP gebildet ist (Abbildung 4.5). Der Verlauf der Mg-Aktivierungskurve zeigt ein komplexes sigmoidales Verhalten an, also eine ebenfalls komplexe Interaktion zwischen Protomeren und ADP. Dies lässt sich anhand der gewonnenen Daten jedoch nicht mit Sicherheit sagen.

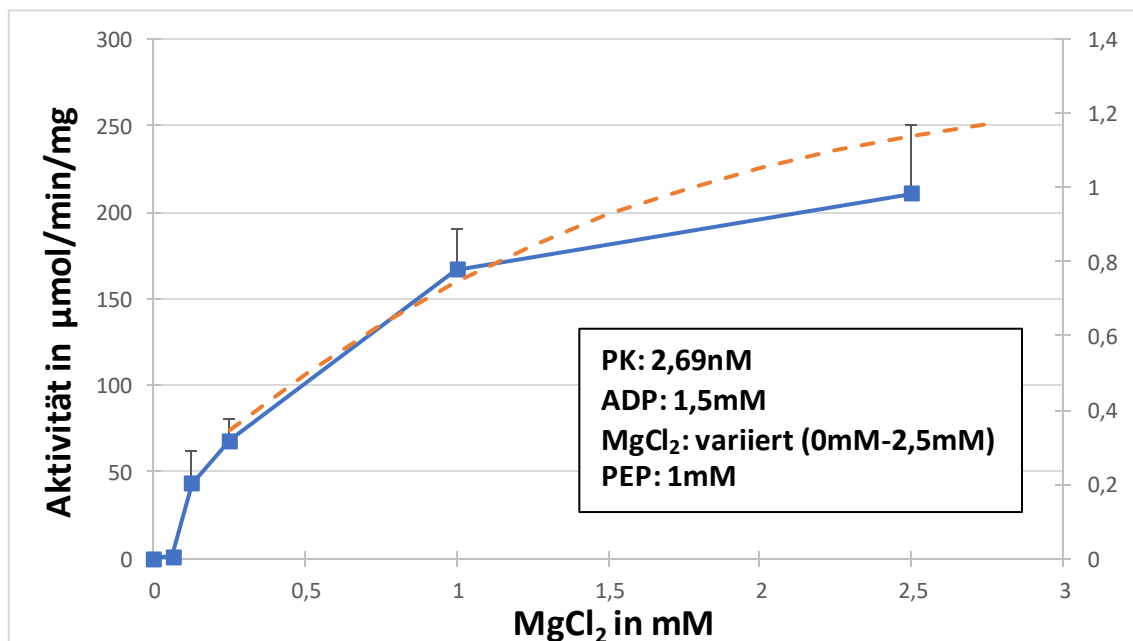


Abbildung 4.5: Magnesiumabhängigkeit der Pyruvatkinase. Auf der X-Achse ist die Konzentration von MgCl₂ in Millimolar aufgetragen, auf der Y-Achse die Aktivität der Pyruvatkinase in Micromol pro Minute pro Milligramm. Die Konzentration der PK im Ansatz

betrug 2,69nM, die des ADPs 1,5mM. Die gestrichelte, rote Linie repräsentiert die geschätzte Konzentration von Mg/ADP im Assay bei 1,5mM ADP berechnet mittels Maxchelator.

4.2.5 Magnesiumabhängigkeit der Myokinase aus Kaninchenmuskel

Myokinase (Adenylatkinase) katalysiert die Umwandlung von zwei ADP zu ATP und AMP sowie umgekehrt die Bildung von zwei ADP aus ATP und AMP. Das Enzym spielt stets eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiehaushalts der Zelle auf dem Niveau der Adeninnukleotide, wie in der Einleitung (2.4) anhand des Energieschemas erklärt. Es handelt sich bei dem Enzym also um eine Kinase, welche entweder ATP als Substrat nutzt und Phosphat und auf AMP überträgt (AMP-Kinase) oder, da das Enzym nahe beim thermodynamischen Gleichgewicht arbeitet, alternativ um eine Kinase, welche β -Phosphat von ADP auf ein zweites ADP überträgt, um ATP und AMP zu erzeugen (ADP-Kinase). Letztere Reaktion dominiert bei einem Abfall von ATP durch Muskelaktivität zugunsten von ADP, erstere bei Vorab-Glykolyseaktivierung zum Beispiel durch Phosphorylaseaktivierung vor Kontraktion. Eine Abhängigkeit von Magnesium beziehungsweise von MgATP bei der Enzymreaktion liegt daher nahe.

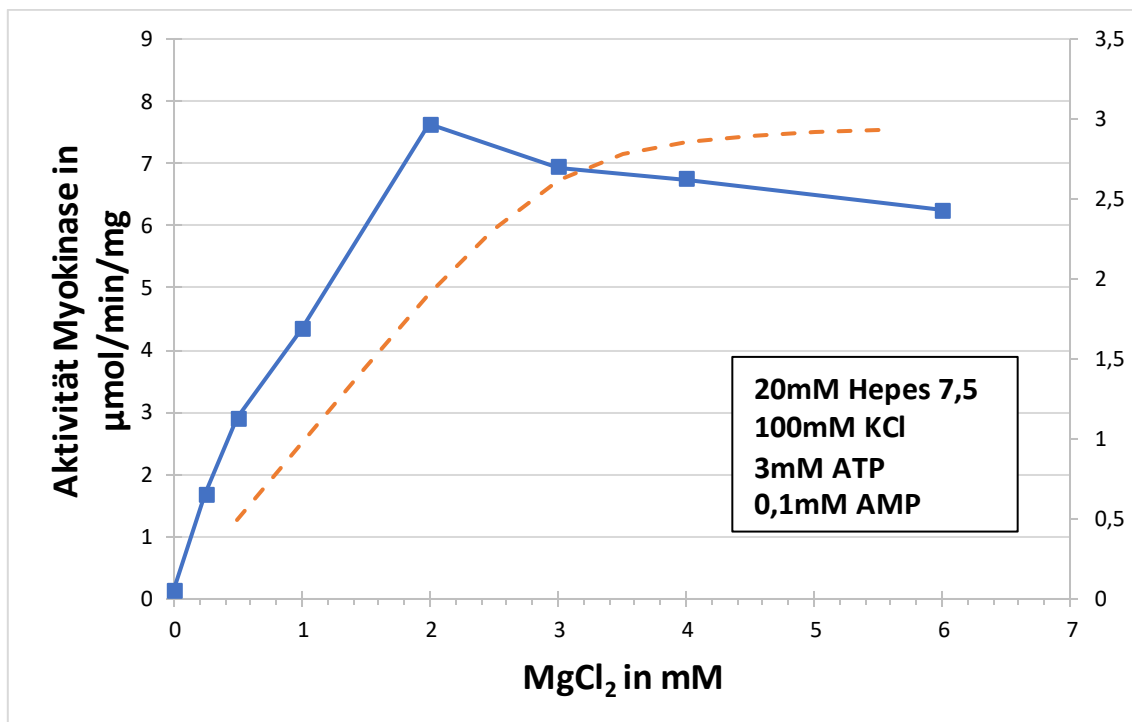


Abbildung 4.6: Magnesiumabhängigkeit der Myokinase. Auf der X-Achse ist die Magnesiumchloridkonzentration im Ansatz in Millimolar angegeben, auf der Y-Achse die Aktivität der Myokinase in Micromol pro Minute pro Milligramm. Die gestrichelte Linie gibt

die Konzentration von MgATP im Assay an berechnet mit Maxchelator. Gemessen wurde die AMP-Kinase-Aktivität der Myokinase.

Bei unseren Versuchen (3.2.3.5) zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Myokinase von Magnesium, bei vollständigem Fehlen des Kations im Ansatz war keine enzymatische Aktivität zu detektieren (siehe Abbildung 4.6). Mit steigender Zugabe von Magnesiumchlorid stieg auch die Aktivität des Enzyms, um bei einer Konzentration von etwa 2mM MgCl₂ ihr Maximum zu erreichen. Danach war keine weitere Aktivitätssteigerung sondern eher eine Wiederabnahme der Aktivität zu beobachten (4.6). Auch in der Literatur wird beschrieben, dass das Vorhandensein von Magnesium für eine Aktivierung der Myokinase essentiell ist (Thuma, Schirmer and Schirmer, 1972; Tsuboi and Chervenka, 1975; Luz *et al.*, 1990). Der K_m-Wert des menschlichen Enzyms für MgATP wird mit 0,23mM, jener für MgADP mit 0,15mM angegeben (Luz *et al.*, 1990). Der sich aus unseren Messungen ergebende K_{0,5}-Wert für Kaninchenmuskelenzym und MgATP lag bei 0,73mM (+/- 0,3), bewegt sich also in einer ähnlichen Größenordnung. Es ist anzunehmen, dass die Aktivitätskurve die Bindung von MgATP wiedergibt, dass aber freies ATP nicht so wie bei PFK das Enzym stark hemmt. Allerdings kann man auch die Wiederabnahme der Aktivität bei ATP >2mM als eine geringere Hemmung durch ATP erklären.

4.2.6 Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase aus Rattenmuskel

Die intrazelluläre Konzentration von AMP kann durch verschiedene enzymatische Reaktionen beeinflusst werden. Sie ist für die Aktivität der Glykolyse von Bedeutung, da AMP – wie bereits in der Einleitung erläutert – einen wichtigsten Aktivator von PFK-1 darstellt. AMP kann über die Myokinase-Reaktion bei geeigneten Bedingungen wieder zu ADP phosphoryliert und damit entfernt werden. Eine Entfernung kann aber auch durch AMP-Desaminase erfolgen. Im Zuge der Desaminierungsreaktion entsteht hierbei IMP (3.2.3.7).

Es stellte sich daher die Frage, ob AMP-Desaminase, welche nicht der Enzymklasse der Kinasen angehört, ebenfalls eine Magnesiumabhängigkeit aufweist. In der Literatur gab es diesbezüglich wenige Angaben, so wird lediglich ein hemmender Effekt von Magnesium unter bestimmten Bedingungen für AMP-Desaminase in Fischen beschrieben (Lushchak, Husak and Storey, 2008; Lushchak *et al.*, 2009).

Wie in Abbildung 4.7 gezeigt, war in unserem Versuch bei Variation der Magnesiumkonzentration im Ansatz keinerlei Änderung der enzymatischen Aktivität der AMP-Desaminase zu beobachten. Es ergab sich also kein Hinweis auf eine Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase.

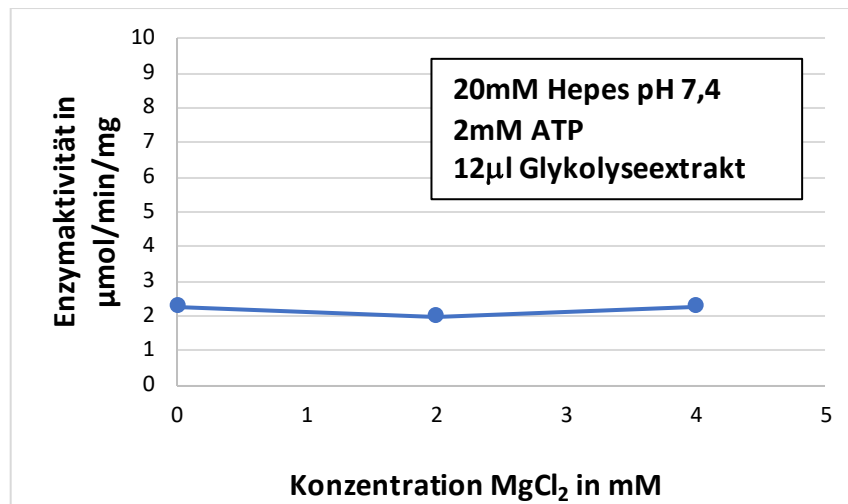


Abbildung 4.7: Magnesiumabhängigkeit der AMP-Desaminase. Auf der X-Achse ist die Magnesiumkonzentration in Millimolar angegeben, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität der AMP-Desaminase in Micromol pro Minute pro Milligramm.

4.2.7 Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase aus Kaninchenmuskel

Wie in 3.2.3.7 beschrieben, wurde auch Kreatinkinase auf eine Magnesiumabhängigkeit hin untersucht. Das verwendete Indikatorenzym Hexokinase weist ebenfalls eine Magnesiumabhängigkeit auf (4.2.1). Durch die etwa 40-fach höhere Konzentration des Letzteren im Ansatz ist eine Auswertung des Versuches jedoch trotzdem möglich. Vergleicht man die Kinetik der Hexokinase für Magnesiumchlorid (4.2.1) mit jener in den Versuchen zur Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase (Abbildung 4.8, 4.9), so zeigt sich ein Unterschied hinsichtlich der für eine vollständige Aktivierung benötigten Konzentration im Ansatz: Bei Hexokinase wurde bereits bei einer Konzentration von 0,5mM Magnesiumchlorid im Ansatz eine nahezu maximale Aktivität erreicht, der E_{c50} -Wert lag bei 0,3mM (4.2.1). Im gekoppelten Kreatinkinase/HK-Assay kam es bis zu einer Zugabe von 3mM Magnesium weiterhin zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität. Dies lässt auf eine andere Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase schließen, wobei Hexokinase deutlich sensitiver auf Magnesiumzugabe reagiert. Dies erklärt sich aus den Daten von Abbildung 4.1.

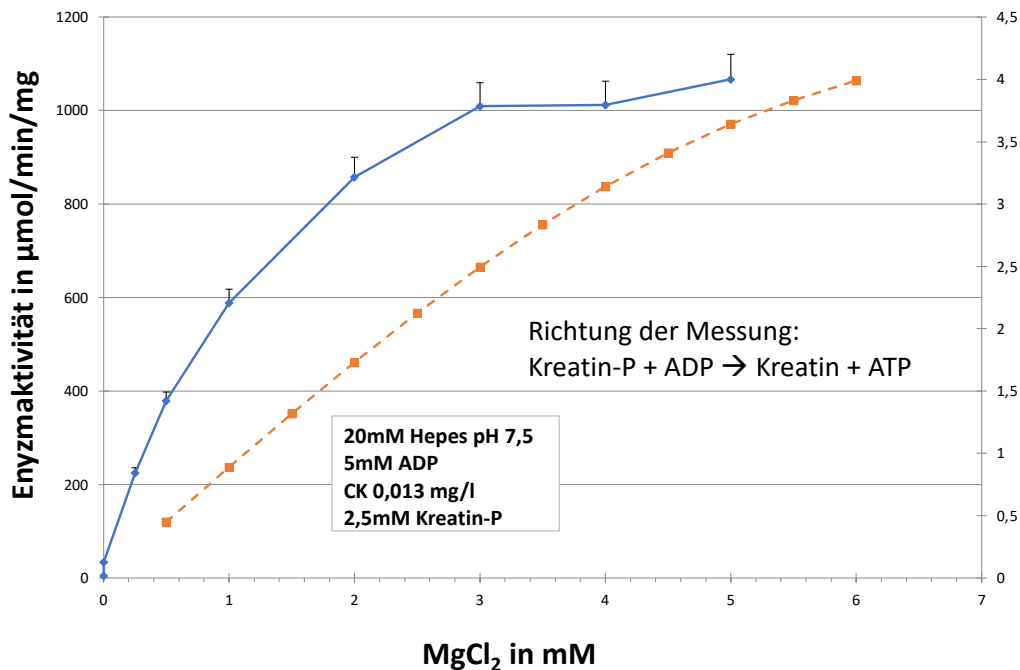


Abbildung 4.8: Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase im CK/HK-Assay. Auf der X-Achse ist die Konzentration des Magnesiums im Ansatz in Millimolar angegeben, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Die gestrichelte, rote Linie gibt die mittels Maxchelator berechnete Konzentration von MgADP bei 5mM ADP und wechselndem Magnesium wieder. Eingezeichnet ist zudem die Standardabweichung bei n=3.

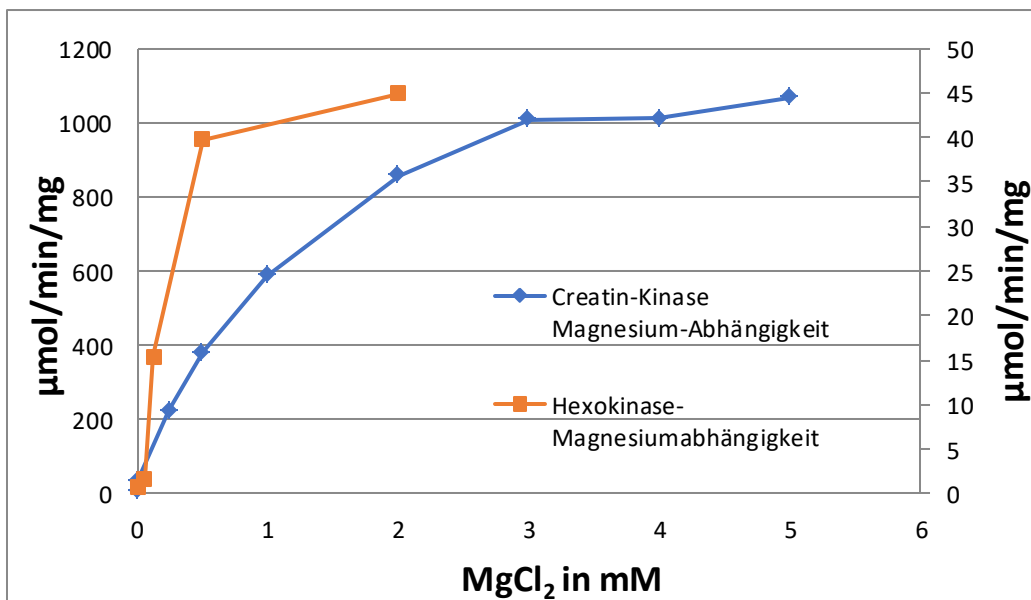


Abbildung 4.9: Magnesiumabhängigkeit der Kreatinkinase (blaue Kurve) vs. Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase (orange Kurve). Auf der X-Achse ist die Magnesiumkonzentration in Millimolar aufgetragen, auf der linken Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm für Kreatinkinase bei 5mM ADP, auf der rechten Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm für Hexokinase bei 1mM ATP.

Zu beachten ist jedoch auch, dass bei den Versuchen zu Magnesiumabhängigkeit der Hexokinase 1mM ATP dem Ansatz beigefügt wurde, dem Kreatinkinase-Assay hingegen 5mM ADP und Kreatin-Phosphat.

In der Literatur wird eine Notwendigkeit von Magnesium für eine Aktivierung der Kreatinkinase aus Säugetieren in Form von MgATP beschrieben (Saks *et al.*, 1975; Blum, Deus and Gerok, 1983; McLeish and Kenyon, 2005; Feng *et al.*, 2013; Schlattner *et al.*, 2016).

4.3 Regulation der PFK-1-Aktivität durch Änderung des Verhältnisses zwischen Nukleotiden und Magnesiumüberschuss

In 2.4 wurden die Auswirkungen einer Variation des NTP/NDP-Verhältnisses intrazellulär auf die Konzentration des freien Magnesiums beschrieben. Zudem zeigte sich in den in 4.1 durchgeführten Versuchen zur Kinetik der PFK-1, dass GTP und UTP als Substrat der PFK dienen können. Hierdurch könnte eine Beeinflussung NTP/NDP-Verhältnisses erfolgen, wodurch sich wiederum mittels veränderlicher Komplexierung des freien Magnesiums eine Regulation der PFK-Aktivität ergäbe. In der Literatur fanden sich keine entsprechende systematische Untersuchungen an Säugetiermuskel-PFK-1.

Insgesamt wurden zwei Versuchsreihen mit Phosphofruktokinase aus Ratten- und Kaninchenmuskel durchgeführt.

Beide PFK-Präparationen wurden mittels SDS-Page auf Integrität, insbesondere Proteolysefreiheit, getestet. Das Kaninchenenzym stammte aus einer alten, aber bei -80°C gelagerten Enzymcharge und wies zwar eine sehr hohe Reinheit und Abwesenheit von Proteolyse, aber eine ungewöhnlich niedrige spezifische Aktivität bei der verwendeten niedrigen Fructose-6-Phosphat-Konzentration von 0,25mM auf. Da dies nicht hinreichend erklärt werden konnte, werden in dieser Arbeit nur die Daten aus der Versuchsreihe mit Rattenmuskelenzym gezeigt und diskutiert (Abbildungen 4.10 – 4.17), welches bei 0,25mM Fructose-6-Phosphat eine sehr hohe spezifische Aktivität aufweist. Eine Gegenwart von ~45% Phosphorylase in den verwendeten Enzymfraktionen (3.2.9, Abbildung 3.9) scheint die PFK-1 nicht zu beeinflussen.

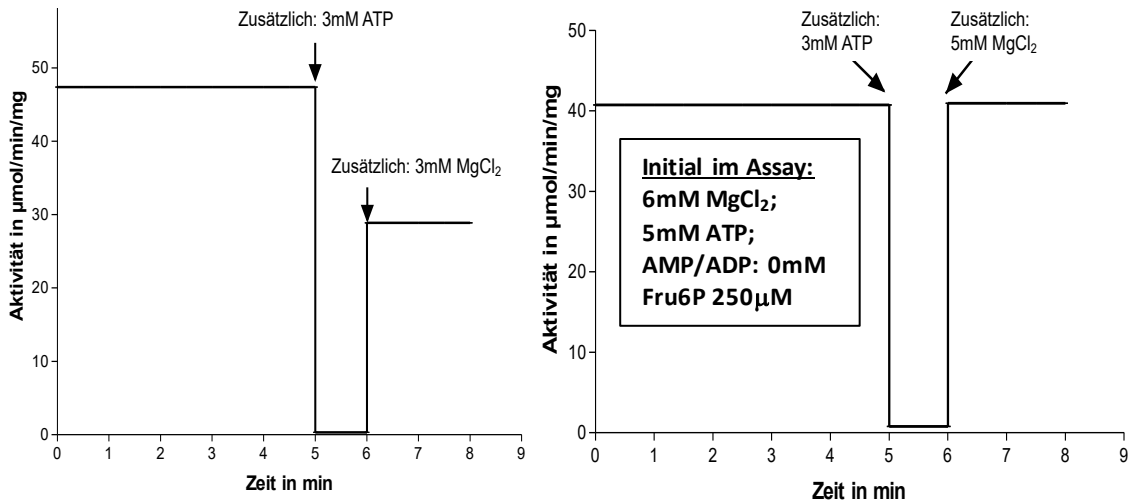


Abbildung 4.10: Hemmung der PFK-1 aus Rattenmuskel durch ATP-Zugabe und anschließende Reaktivierung der enzymatischen Aktivität durch Magnesiumzugabe. Auf der X-Achse ist die Zeit nach Reaktionsstart durch PFK-Zugabe (Endkonzentration im Assay 0,05nM) in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Nach fünf Minuten erfolgte eine weitere Zugabe von 3mM ATP. Bei Minute sechs wurde zusätzliches Magnesiumchlorid hinzugegeben, beim ersten Versuchsdurchlauf 3mM, beim zweiten Versuchsdurchlauf 5mM MgCl₂.

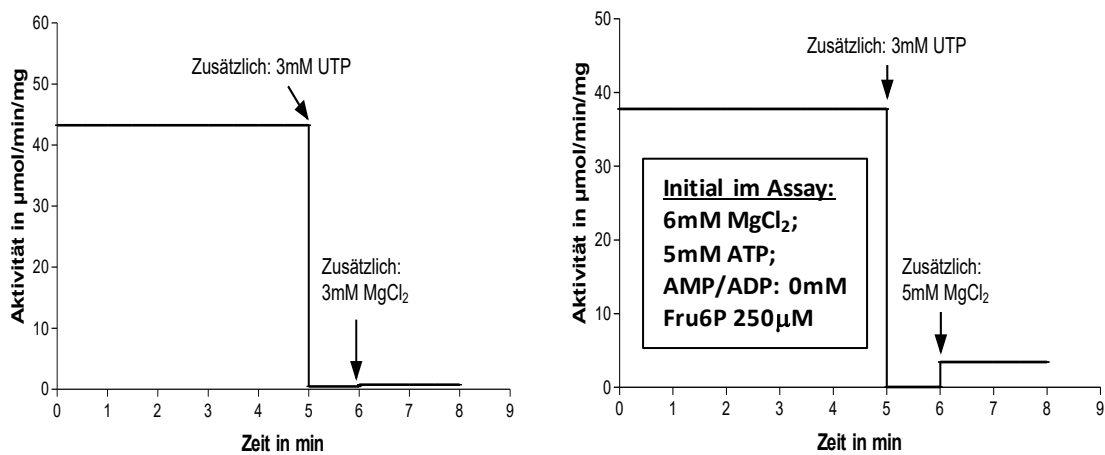


Abbildung 4.11: Hemmung der PFK-1 aus Rattenmuskel durch UTP. Auf der X-Achse ist wieder die Zeit in Minuten nach Start der enzymatischen Reaktion durch PFK-Zugabe (Endkonzentration im Assay 0,05nM) angegeben, auf der Y-Achse die Aktivität der PFK in Micromol pro Minute pro Milligramm. Nach fünf Minuten erfolgte die weitere Zugabe von 3mM UTP. Zugabe von 3mM (erste Messung) beziehungsweise 5mM (zweite Messung) Magnesiumchlorid nach sechs Minuten.

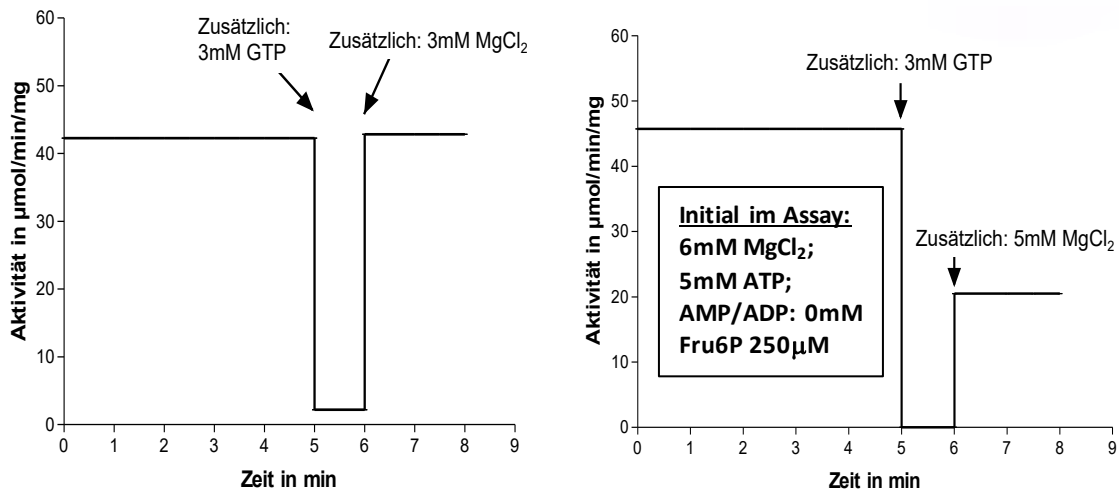


Abbildung 4.12: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch GTP und anschließende Reaktivierung durch Magnesium im Exzess. Auf der X-Achse ist wie gehabt die Zeit nach Reaktionsstart durch PFK-Zugabe (Endkonzentration im Assay 0,05nM) dargestellt, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 3mM GTP.

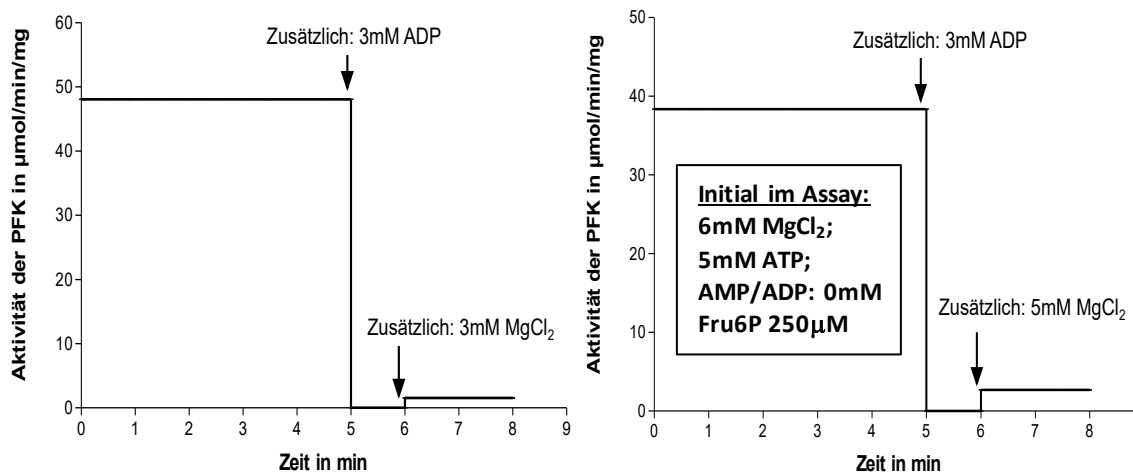


Abbildung 4.13: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch ADP-Zugabe, kaum Reaktivierung durch Mg-Zugabe. Dargestellt ist auf der X-Achse die Zeit in Minuten nach Reaktionsstart durch Zugabe von 0,05nM Rattenmuskel-PFK zum Ansatz. Auf der Y-Achse ist die korrespondierende enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm aufgetragen. Nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 3mM ADP, nach einer weiteren Minute die Zugabe von Magnesiumchlorid (3mM linke bzw. 5mM rechte Abbildung).

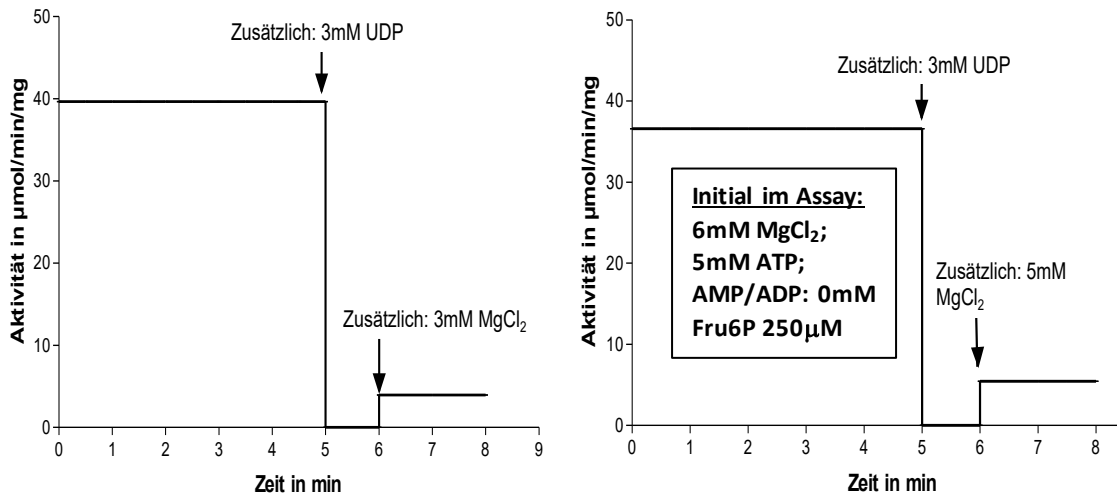


Abbildung 4.14: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch UDP, geringe Reaktivierung durch Mg-Zugabe. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten nach Reaktionsstart durch PFK-Zugabe (Endkonzentration im Assay 0,05nM) dargestellt, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 3mM UDP. Nach einer weiteren Minute erfolgte die Zugabe von 3mM (links) beziehungsweise 5mM (rechts) MgCl₂.

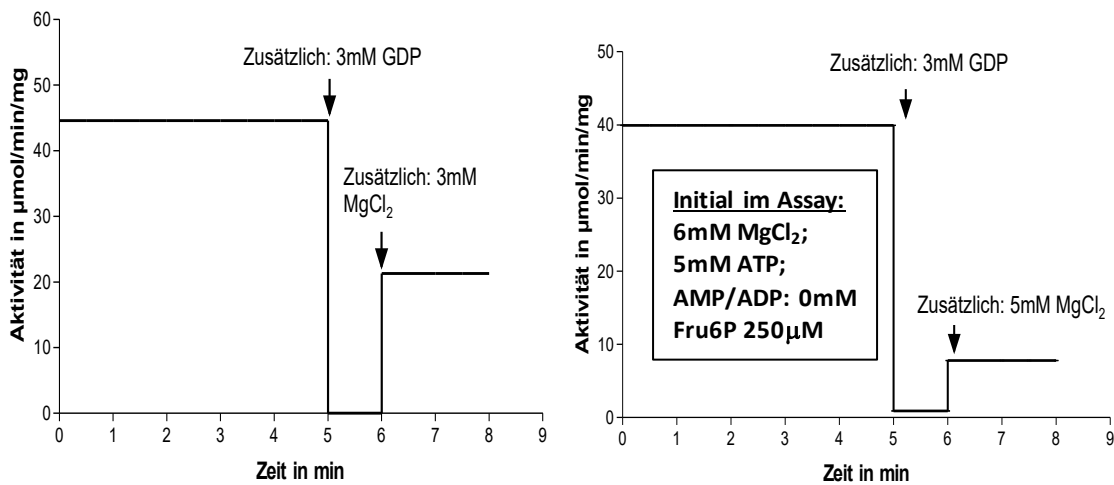


Abbildung 4.15: Hemmung von Rattenmuskel-PFK durch GDP. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten nach Reaktionsstart durch PFK-Zugabe (Endkonzentration im Assay 0,05nM) dargestellt, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 3mM GDP, nach einer weiteren Minute die Zugabe von 3mM (links) beziehungsweise 5mM (rechts) MgCl₂.

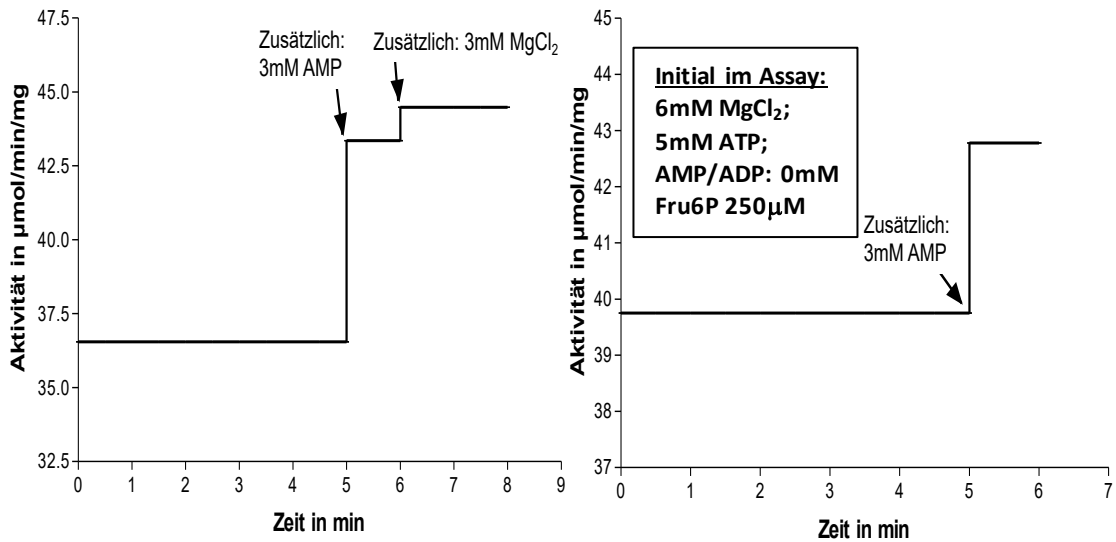


Abbildung 4.16: Aktivierung der PFK durch AMP und Magnesium. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten nach Reaktionsstart durch PFK-Zugabe (Endkonzentration im Assay 0,05nM) dargestellt, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 3mM AMP.

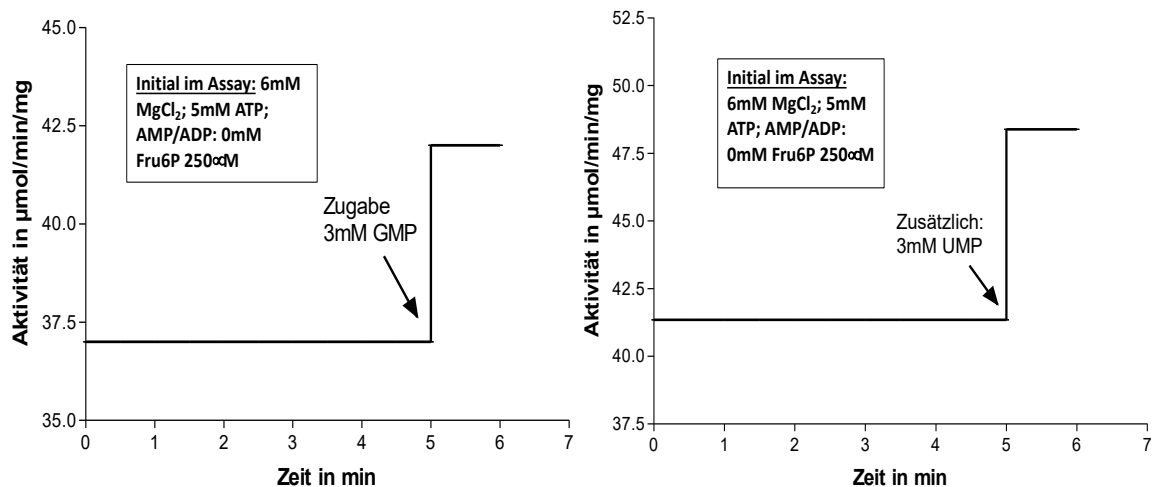


Abbildung 4.17: Aktivierung von Rattenmuskel-PFK durch UMP und GMP. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten nach Reaktionsstart durch PFK-Zugabe (Endkonzentration im Assay 0,05nM) dargestellt, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 3mM UMP beziehungsweise GMP.

Bei der Durchführung der Messreihen mit 0,05nM Rattenmuskel-PFK im Assay zeigte sich eine vollständige Hemmung der Enzymaktivität nach Zugabe von 3mM Nucleosidtriphosphat. Dieser Effekt war sowohl bei ATP als auch bei GTP und UTP zu beobachten (Abbildungen 4.10 – 4.12). Bei anschließender Magnesiumchloridzugabe in stöchiometrischem Überschuss nach einer Minute erfolgte nach ATP- und GTP-Hemmung eine vollständige Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität. Bei Hemmung durch ATP-Überschuss kam es durch

Hinzufügen von 5mM Magnesium zu einer 100-prozentigen, bei Zugabe von nur 3mM Magnesiumchlorid zu einer 60-prozentigen Reaktivierung (Abbildung 4.10). Bei GTP zeigte sich interessanterweise im Rahmen unserer Versuchsreihen eine stärkere Reaktivierung der PFK-Aktivität bei Zugabe von weniger Magnesium. Ein ähnlicher Effekt wurde mit GDP beobachtet: Zugabe von 3mM des Nukleosiddiphosphates führte zu einer nahezu hundertprozentigen Hemmung der PFK, Zugabe von 3mM Magnesiumchlorid reaktivierte das Enzym zu circa 50%, Zugabe von 5mM nur zu circa 25% (Abbildung 4.15). Auch die Zugabe von ADP führte zu einer starken Hemmung der enzymatischen Aktivität, welche durch anschließende Magnesiumzugabe kaum antagonisiert werden konnte. Allerdings zeigte mehr Magnesium hier auch mehr reaktivierenden Effekt (Abbildung 4.13). Die Zugabe von 3mM UDP hatte ebenfalls eine starke Inhibition zur Folge, welche nur geringfügig durch Magnesium aufgehoben werden konnte (Abbildung 4.14). Ein ähnlicher Effekt war für UTP zu beobachten. Für die Monophosphate zeigte sich durchgehend eine aktivierende Wirkung auf die Enzymaktivität (Abbildung 4.16, 4.17), welche durch zusätzliche Magnesiumzugabe weiter verstärkt wurde.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass alle untersuchten Nukleosiddi- und triphosphate bei stöchiometrischem Überschuss hemmend auf die Aktivität der PFK wirkten. Diese Hemmung ließ sich zum Teil durch Magnesium antagonisieren. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre das Abdiffundieren der freien, nicht Magnesium-komplexierten Nukleotide von allosterischen Bindestellen zugunsten einer Komplexierung mit Magnesium. ADP, UTP, UDP, GTP und GDP scheinen allerdings auch auf anderem Wege inhibitorisch auf die PFK-Aktivität einzuwirken. Sämtliche Monophosphate hatten einen aktivierenden Effekt, was gut mit den bereits für AMP in der Literatur beschriebenen Daten vereinbar ist (2.3.2.2)

4.4 Gesamtglykolysemessung

4.4.1 Gesamtglykolyse-Assay mit Glykolyseextrakt aus Rattenmuskel

Wie in Kapitel 2.4 der Einleitung erläutert, konnten Laughlin & Thompson *in vitro* bereits eine Aktivierung der Erythrozyten-Glykolyse durch Magnesium zeigen (Laughlin and Thompson, 1996). Wir wollten deshalb eine Regulation der gesamten Glykolyse des Muskels durch Magnesium analysieren. Dafür haben wir nach Wegener et al. (1987) einen glykolytischen Enzymextrakt präpariert und *in vitro* analysiert.

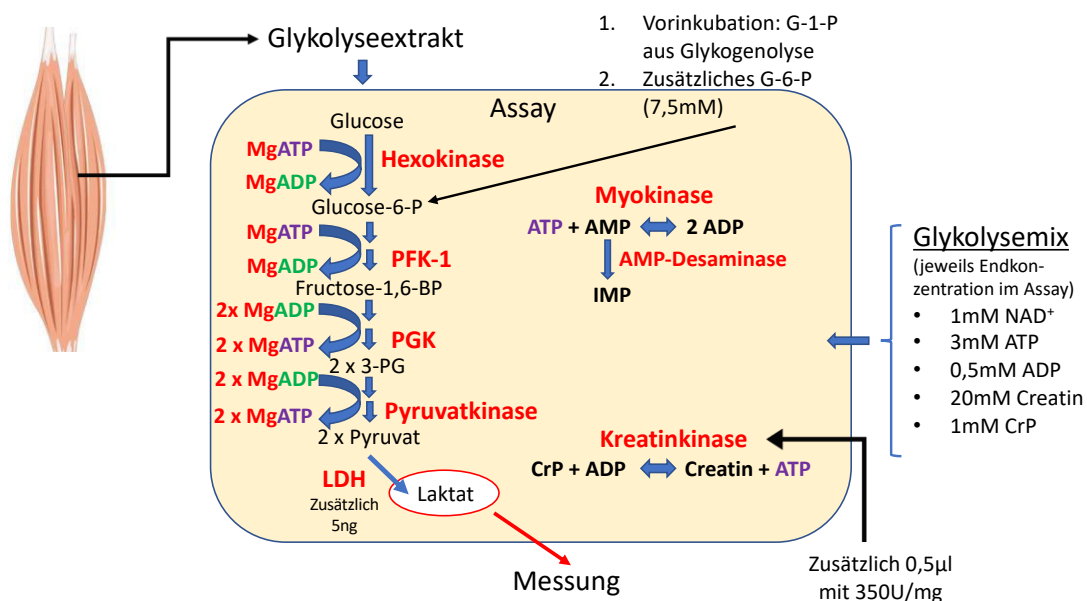


Abbildung 4.18: Funktionsweise des in-vitro-Glykolyseassays mit Enzymextrakt aus Rattenmuskel

In Abbildung 4.17 ist die Funktionsweise des in-vitro-Glykolyseassays mit glykolytischem Enzymextrakt aus Ratten-Skelettmuskel dargestellt. Der Extrakt enthält sämtliche Glykolyseenzyme sowie Glykogen und Glykogenolyseenzyme. Zusätzlich wurde Laktatdehydrogenase im Überschuss hinzugefügt, sodass glykolytisch gebildetes Pyruvat zu Laktat weiter reagiert. Letzteres wurde konsekutiv mittels Laktat-Teststreifenanalyse gemessen und erlaubt so, die Glykolyse-Aktivität zu bestimmen. Als Substrat wurde nach einer initialen Vorinkubation mit einer gewissen Glucose-6-P-Bildung durch Glykogenolyse zusätzlich Glucose-6-Phosphat (7,5mM) hinzugefügt. Im Rahmen der Glykogenolyse wird im arbeitenden Skelettmuskel Glykogen zu Glucose-1-Phosphat abgebaut. Dieses kann zu Glucose-6-Phosphat isomerisiert

und in die Glykolyse eingespeist werden. Durch die Zugabe von Glucose-6-Phosphat in den Assay wird somit die rasche Glucose-Phosphat-Bereitstellung durch Glykogenolyse und somit die Situation im schnell arbeitenden Muskel *in vivo* simuliert. Der Glykolyse-Extrakt enthält zudem zusätzliches Kreatin-Phosphat und Kreatin. Durch die Kreatin-Kinase-Reaktion kann so die Konzentration von ATP gepuffert werden. Auch dies entspricht der *in vivo* Situation während muskulärer Arbeit (2.4). Im Muskelextrakt befindliche Myokinase hat ebenfalls einen Einfluss auf das Gleichgewicht der Adenosinphosphate, da sie die reversible Reaktion von ATP und AMP katalysiert. Beide Reaktionen sind Massenwirkungs-getrieben, also nahe ihrem Gleichgewicht, wobei die Entfernung des Edukts AMP durch Desaminierung zu IMP durch AMP-Desaminase dieses Gleichgewicht beeinflusst. Der Glykolysemix enthält *a priori* zusätzliches ATP, ADP und NAD^+ in physiologischen Konzentrationen. Auch im Muskelextrakt sind diese Metabolite enthalten, durch die erfolgte Verdünnung bei der Extraktpräparation jedoch in deutlich geringerer Konzentration als *in vivo*.

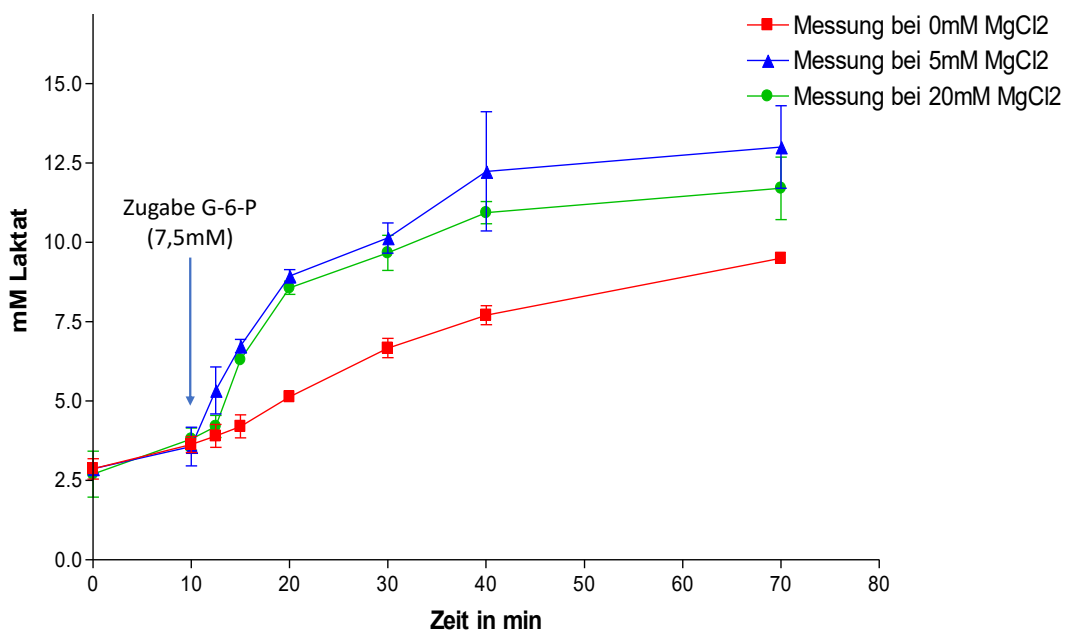


Abbildung 4.19: Messung der Glykolyseaktivität unter Zugabe unterschiedlicher Magnesiummengen. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Menge des entstehenden Laktats in Millimolar. Letzteres entsteht proportional zur glykolytischen Aktivität im Ansatz, da es durch die im Überschuss den Ansätzen beigefügte LDH aus Pyruvat, dem Endprodukt der anaeroben Glykolyse, gebildet wird. Nach zehnmütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von Glucose-6-Phosphat (Endkonzentration 7,5mM) zum Ansatz, um die Glykolyse in Gang zu setzen. Die Versuche wurden pro

Messreihe drei Mal durchgeführt, wobei jeweils eine Messreihe unter zusätzlicher Zugabe von 0mM, 5mM und 20mM Magnesiumchlorid erfolgte.

Bereits bei diesen ersten Messungen (Abbildung 4.19) wurde ein aktivierender Effekt von Magnesium gezeigt. Besonders die initiale Glykolyserate nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe war deutlich erhöht, was sich in einem deutlich steileren Anstieg der blauen (zusätzlich 5mM Magnesium im Ansatz) und grünen Messkurve (zusätzlich 20mM Magnesium im Ansatz) gegenüber der roten Messkurve (keine zusätzliche Magnesiumzugabe) zwischen Minute zehn und zwanzig widerspiegelte (siehe Abbildung 4.19).

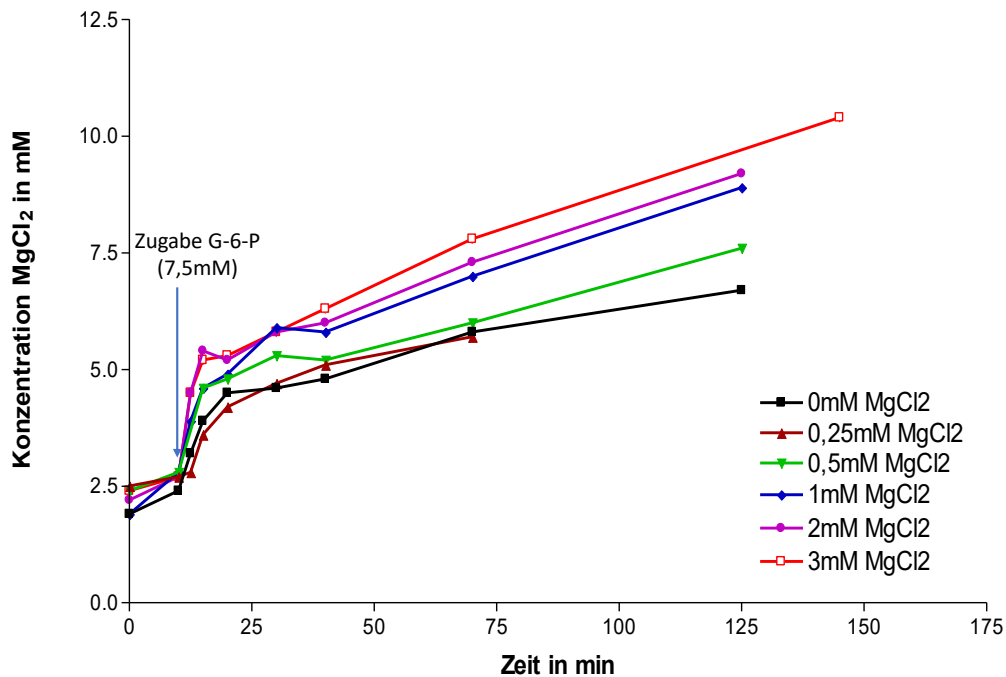


Abbildung 4.20: Glykolyseaktivität bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Magnesiumchlorid. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Menge des entstehenden Laktats in Millimolar. Letzteres entsteht proportional zur glykolytischen Aktivität im Ansatz, da es durch die im Überschuss den Ansätzen beigefügte LDH aus Pyruvat, dem Endprodukt der anaeroben Glykolyse, gebildet wird. Nach zehnmütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von Glucose-6-Phosphat (Endkonzentration 7,5mM) zum Ansatz, um die Glykolyse in Gang zu setzen.

Die Tatsache, dass unter Zugabe von 5mM Magnesiumchlorid zum Ansatz in dieser Versuchsreihe eine höhere Aktivität erzielt werden konnte, als bei Zugabe von 20mM, weist auf ein mögliches Konzentrations-Optimum <20mM hin. Aus diesem Grund führten wir weitere Messungen bei zwischen 0 und 3mM zugegebenem Magnesium durch, um die beobachtete Magnesiumaktivität weiter einzugrenzen (siehe Abbildung 4.20). Der aktivierende Effekt des Magnesiums konnte reproduziert werden, zudem konnte eine Proportionalität zwischen Magnesiumzugabe und initialer Glykolyseaktivität nach Glucose-6-P-

Zugabe für den untersuchten Bereich zwischen additivem 0mM und 3mM Magnesium gezeigt werden. So ist die stärkste Aktivität unter Zugabe von 3mM Magnesiumchlorid zum Ansatz zu beobachten, die geringste Aktivität bei Fehlender Zugabe. Auch die initiale Rate erwies sich – ebenso wie bei den vorherigen Versuchsreihen – als deutlich erhöht (starker initialer Anstieg nach Aktivierung der Glykolyse durch Zugabe von Glucose-6-Phosphat 7,5mM). (Abbildung 4.20).

4.4.2 HPLC-Analytik des Gesamtglykolyse-Assays in Abhängigkeit zur Magnesiumkonzentration im Ansatz

Die in 4.4.1 dargestellten Gesamtglykolysemessungen zeigten eine Aktivierung durch Magnesium und zudem den relevanten Bereich für eine solche Regulation. Zur Klärung der Frage, welche glykolytischen Metabolite hierbei eine Rolle spielen, wurde eine qualitative und quantitative Analyse der glykolytischen Metabolite mittels HPLC-Analyse durchgeführt. Durch diese Daten war sodann eine näherungsweise Berechnung der freien Magnesiumkonzentration über die Zeit möglich. Die Messungen aus 4.4.1 wurden daher reproduziert und zu allen Messzeitpunkten Proben für die HPLC-Analyse genommen (3.2.10).

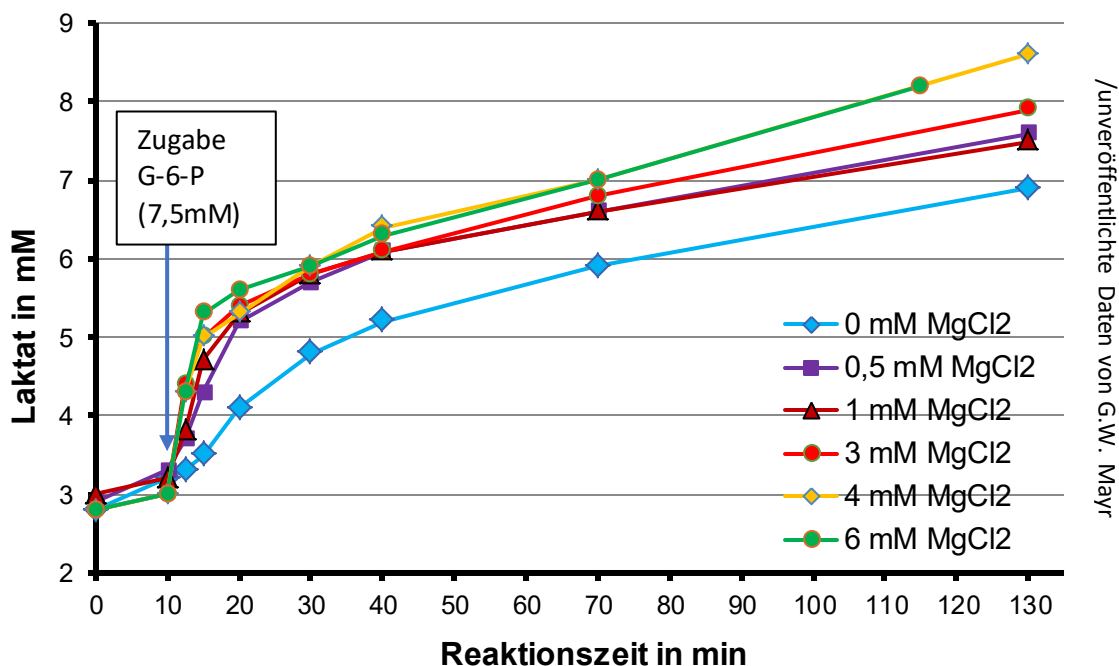


Abbildung 4.21: Gesamtglykolysemessung mit Muskelextrakt aus Rattenmuskel bei 5mM Phosphat und variierter Zugabe von MgCl zum Ansatz. Auf der X-Achse ist die Reaktionszeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Laktatkonzentration in

Millimolar. Die unterschiedlichen Kurven repräsentieren die durchgeführten Messreihen bei Zugabe variiert Konzentrationen von Magnesiumchlorid (0mM, 0,5mM, 1mM, 3mM, 4mM, 6mM).

Die dargestellten Ergebnisse sind alle aus einer mit hoher Präzision durchgeführten Messreihe. In Abbildung 5.22 und 5.23 ist die Laktatentstehung über die Reaktionszeit bei Zugabe unterschiedlicher Magnesiumchloridkonzentrationen (0mM, 0,5mM, 1mM, 3mM, 4mM, 6mM) zum Ansatz dargestellt.

Abbildung 4.21 zeigt den Reaktionsverlauf über den gesamten Messzeitraum, Abbildung 4.22 während der ersten vierzig Minuten. Es wird eine Abhängigkeit der glykolytischen Aktivität von der Magnesiumzugabe zum Ansatz deutlich, wobei der Sprung zwischen fehlender Magnesiumzugabe (hellblaue Kurve) und der Zugabe von 0,5mM (lilafarbene Kurve) besonders prägnant ist. Auch in hier nicht dargestellten Versuchen zeigte sich dieses Phänomen (4.4.1). Aufgrund der dreißigfachen Verdünnung der Metabolite und Ionen im Glykolyseextrakt ist die Menge des aus dem Muskelextrakt eingeschleppten Magnesiums sehr gering (circa 0,02mM „freies“ Magnesium, etwa 0,195mM über ATP/ADP-Pool, siehe 4.4.5, Abbildung 5.21), sodass durch Zugabe von zusätzlichen 0,5mM Magnesiumchlorid eine deutliche Steigerung der freien Magnesiumkonzentration im Ansatz und damit eine drastische Steigerung der initialen glykolytischen Aktivität nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe erfolgt.

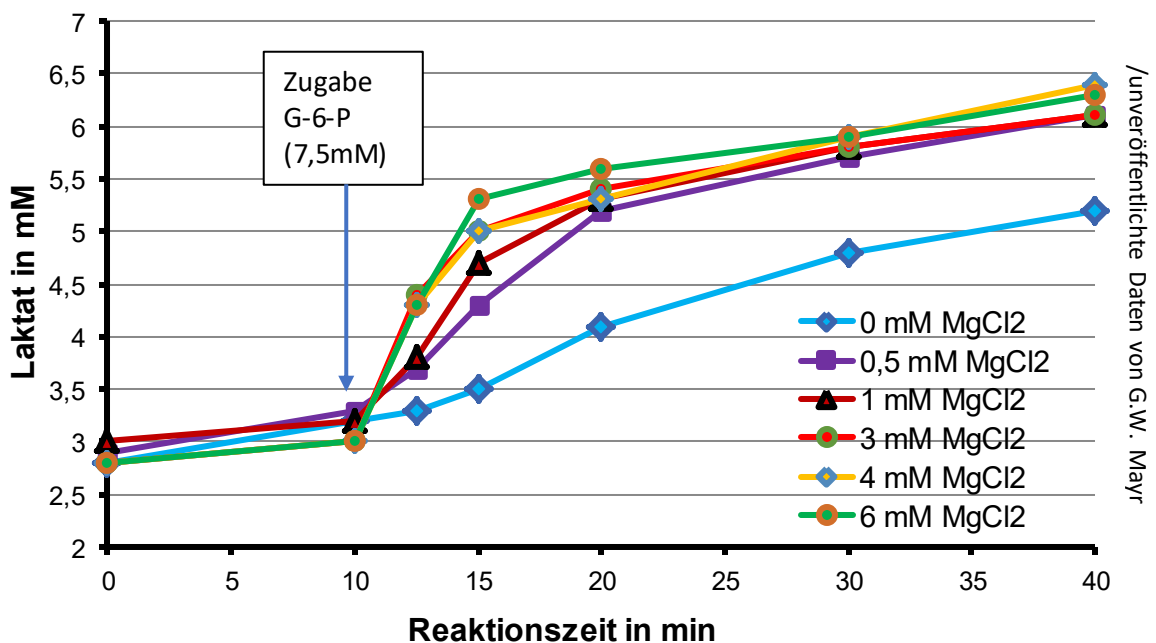


Abbildung 4.22: Gesamtglykolysemessung mit Muskelextrakt aus Rattenmuskel bei 5mM Phosphat und variiert Zugabe von MgCl₂ zum Ansatz, Messung bis Minute 40.

In Abbildung 4.23 ist die Variation der Glykolyserate bei verschiedenen Magnesiumkonzentration über die Zeit dargestellt. Es zeigt sich, dass die maximale Glykolyserate bei 4 und 6mM $MgCl_2$ 2,5 Minuten nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe erreicht ist. Bei niedrigem Magnesium ist die erreichte maximale Rate deutlich niedriger und wird später (bis zu 7,5 Minuten) nach Glucose-6-Phosphat-Zusatz erreicht (Abbildung 4.24, 4.25). Abbildung 4.24 stellt die maximal erreichte Glykolyserate in Abhängigkeit von Magnesium dar. Zudem wird die Rate bei Minute 17,5 und 100 dargestellt. Es zeigt sich eine klare Magnesiumabhängigkeit der maximalen Glykolyserate (Abbildung 4.23). Ein Maximum der glykolytischen Rate liegt bei circa 2mM Magnesiumchlorid. Die Zugabe von 4mM und 6mM $MgCl_2$ führt eher zu einem Abfall (Abbildung 4.23).

Abbildung 4.24 zeigt zudem, dass bei Minute 17,5 (7,5 Minuten nach G-6-P-Zugabe) keine positive Abhängigkeit der Glykolyserate von der Magnesiumkonzentration vorliegt, sondern eine negative Magnesiumabhängigkeit.

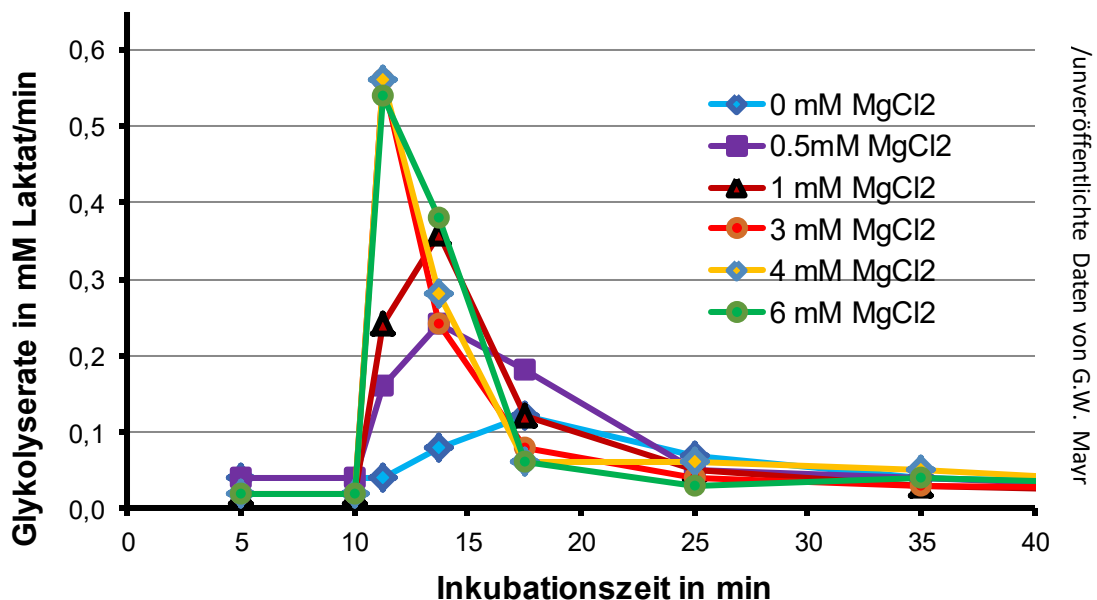


Abbildung 4.23: Glykolyserate in Millimol Laktat pro Minute bei Variation der Magnesiumkonzentration im Ansatz und 5mM Phosphat. Auf der X-Achse ist die Zeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die entsprechende Glykolyserate repräsentiert durch die Laktatproduktion in Millimolar pro Minute. Verschiedenfarbige Kurven kennzeichnen, wie auch bei den vorherigen Graphiken, die Zugabe unterschiedlicher Magnesiumkonzentrationen.

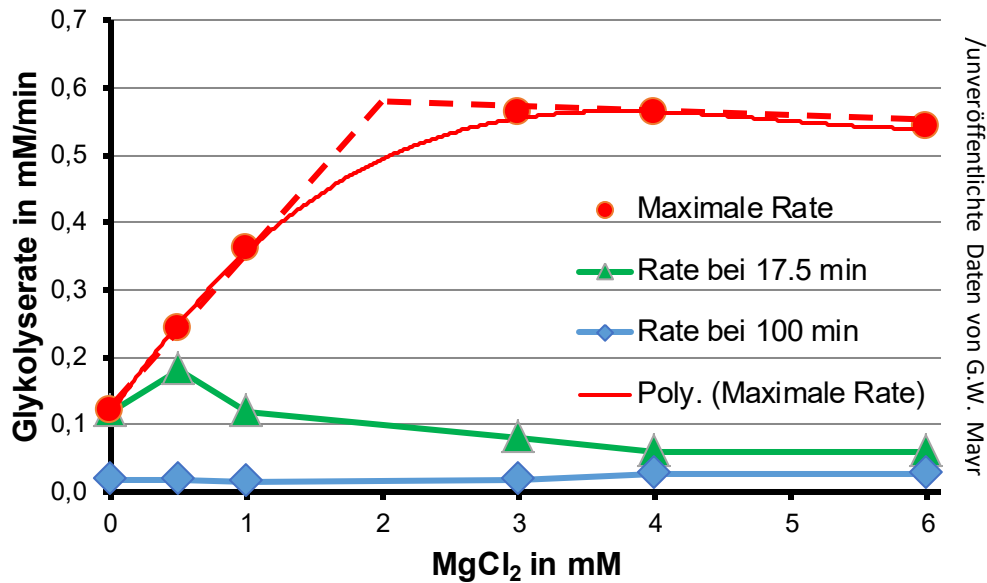


Abbildung 4.24: Maximale Glykolyserate und Rate bei Minute 17,5 und 100 in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration im Ansatz. Auf der X-Achse ist die Magnesiumkonzentration in Millimolar aufgetragen, auf der Y-Achse die Glykolyserate in Millimol pro Minute. Die rote, durchgezogene Kurve repräsentiert die maximal erreichte Stoffwechselrate in Abhängigkeit der zugegebenen Magnesiumkonzentration im Ansatz.

Die Rate 50 Minuten nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe steigt wieder Magnesium-abhängig leicht an, wenngleich sie sehr gering gegenüber der schnellen initialen Phase ist.

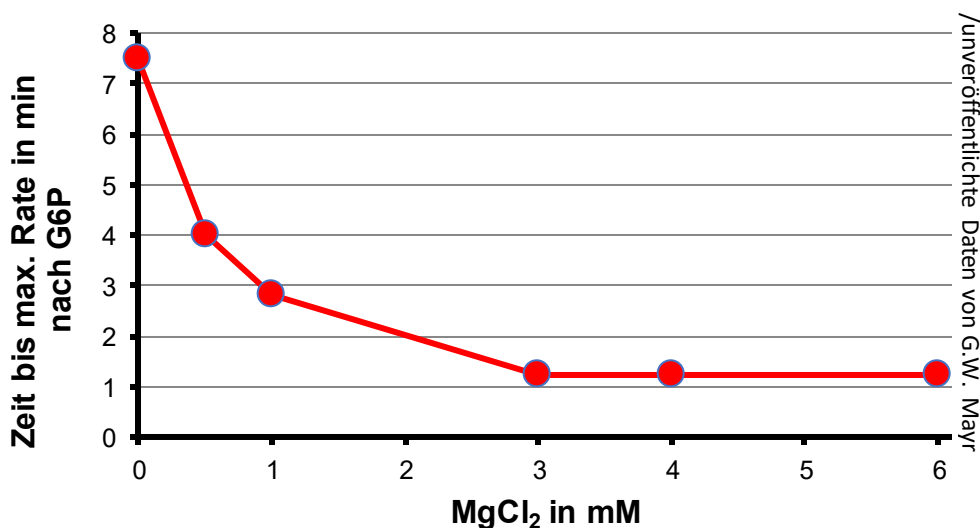


Abbildung 4.25: Zeit bis zum Erreichen der maximalen Glykolyserate nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe in Abhängigkeit zur Magnesiumzugabe zum Ansatz

In Abbildung 4.25 ist die Zeit in Minuten bis zum Erreichen der maximalen Glykolyserate nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe in Abhängigkeit zur beigefügten Magnesiumchloridkonzentration aufgetragen. Klar ist erkennbar, dass ab 3mM MgCl₂-Zugabe keine weitere Verkürzung dieser Zeit erfolgt, also dann eine maximale Steigerung der Glykolyse vorliegt.

4.4.3 Quantitative und qualitative Proteinbestimmung für Glykolyseextrakt aus Rattenmuskel mittels BioRad und 12,5% -SDS-PAGE

Um die Menge des proteingebundenen Magnesiums im Glykolyseassay abzuschätzen, erfolgte eine Proteinbestimmung des Glykolyseextrakts aus Rattenmuskel nach Bradford (Bradford, 1976). Hierbei ergab sich eine mittlere Proteinkonzentration der vollständig extrahierten Glykolyseenzyme von 7,88mg/ml (siehe 4.4.4 Abbildung 4.27), welche zur weiteren Schätzung des proteingebundenen Magnesiums verwendet wurde.

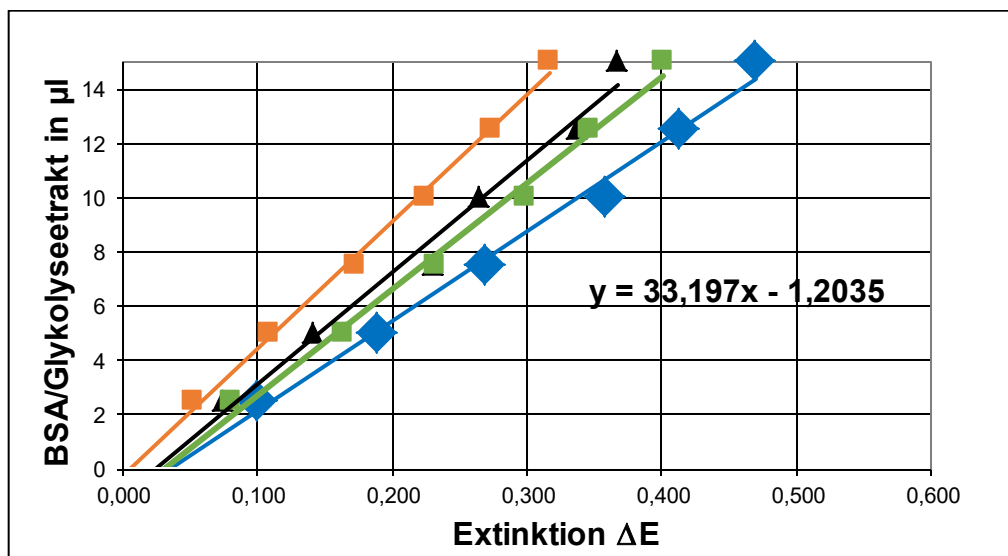


Abbildung 4.26: Proteinbestimmung des Glykolyseextrakts mittels BioRad. Auf der X-Achse ist die Extinktion ΔE aufgetragen, welche sich durch Subtraktion des Leerwerts vom photometrisch gemessenen Wert ergibt. Auf der Y-Achse ist die Zugabe von BSA (Referenz) beziehungsweise von Glykolyseextrakt im einzelnen Ansatz in Microliter aufgetragen. In blau sind die Messwerte für den BSA-Standard sowie die hieraus ermittelte Eichgerade aufgetragen. Die anderen Kurven (orange, schwarz, grün) repräsentieren die verschiedenen Probenansätze. Anhand der resultierenden Geradengleichung ($y = 33,197x - 1,2035$) erfolgt die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben.

Der Muskel enthält viele Proteine mit funktionsspezifischen Aufgaben: Proteine des kontraktiven Apparats, des Submembran-Zytoskeletts (Myolemm), Transportproteine, Stoffwechselproteine. Im Rahmen der Zentrifugation des Glykolyseextraktes erfolgt eine Entfernung der meisten kontraktiven und sarkolemmalen Proteine, sie verbleiben im Pellet.

4.4.4 12,5% -SDS-PAGE des Glykolyseextraktes aus Rattenmuskel

Die SDS-PAGE zeigt vor allem glykolytische und glykogenolytische Proteine, welche auch Magnesium binden, also zur Schätzung der freien

Magnesiumkonzentration berücksichtigt werden müssen. Abbildung 4.27 stellt das entsprechende Gel dar. Es zeigt sich, dass Glykolyseextrakt aus Rattenmuskel (Bande 1-6) deutlich mehr Phosphorylase enthält, als die Extrakte aus Heuschreckenmuskel (Bande 7,8, zum Vergleich Bande 9). Phosphorylase ist ein Enzym des Glykogenabbaus, welches Glucose-1-Phosphat bildet, das nach Isomerisierung durch Phosphoglyceratmutase rasch in Glucose-6-Phosphat umgewandelt wird.

Das Molekulargewicht der Hexokinase aus Rattenmuskel wird in der Literatur mit 106kDa angegeben (Easterby and Qadri, 1982). Die entsprechende Bande müsste also etwas oberhalb der 97kDa-Bande der Phosphorylase B zu finden sein. Für *Locustae* sind in diesem Bereich zwei Banden zu finden. Der Rattenmuskelextrakt weist eine deutliche Bande bei etwa 106kDa auf. Es findet sich zudem eine weitere Bande bei etwa 150kDa (Abbildung 4.27). Es handelt sich vermutlich um Phosphorylase-Kinase (145kDa-Untereinheit). Das Molekulargewicht der PFK-Protomere für Ratten-PFK aus Darmgewebe wird in der Literatur mit 84kDa angegeben (Khoja, Beach and Kellett, 1983).

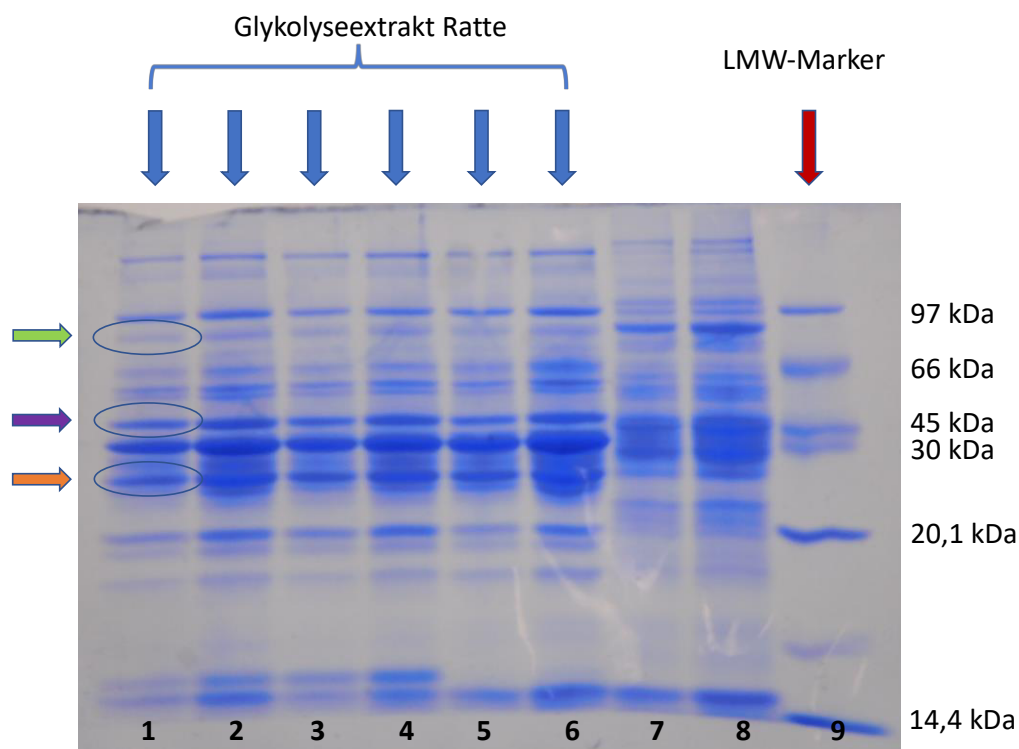


Abbildung 4.27: 12,5%-SDS-PAGE für Glykolyseextrakt aus Rattenmuskel und *Locusta*. Ansatz 1-6 repräsentieren Rattenmuskelextrakt, Ansatz 7 und 8 *Locusta*-Muskel und Ansatz 9 LMW-Marker. Der Anfang des Gels befindet sich oben auf der Abbildung, das Ende des Gels unten am Bildrand. Zu erkennen ist, dass Muskelextrakt aus Ratte gegenüber *Locusta* deutlich mehr Phosphorylase B enthält. 97kDa = Phosphorylase B, 66kDa = Albumin, 45kDa = Ovalbumin, 30kDa = Carbonic Anhydrase, 20,1kDa = Typsin-Inhibitor, 14,1kDa = α -Laktalbumin.

Die entsprechende Bande müsste sich also – wie in 3.2.9, Abbildung 3.9 für das aufgereinigte Enzym aus Rattenmuskel gezeigt – zwischen jener von Phosphorylase (97kDa) und Albumin (66kDa) befinden. In der Tat ist in diesem Bereich eine zusätzliche Bande zu finden (grüner Pfeil). Das Molekulargewicht der Phosphoglyceratkinase wird mit etwa 45kDa angegeben (Lee and O'Sullivan, 1975) , die entsprechende Bande ist daher im Bereich jener von Ovalbumin zu suchen und nicht von dieser zu unterscheiden (lila Pfeil). Pyruvatkinase aus Rattenmuskel weist ein Molekulargewicht von 58kDa auf (O'Connell *et al.*, 2008). Die entsprechende Bande ist also im Bereich zwischen 66kDa und 45 kDa zu suchen, wo insgesamt drei Banden zu finden sind. Es ist davon auszugehen, dass eine hiervon Pyruvatkinase repräsentiert. Rattenmuskel-Myokinase hat ein Molekulargewicht von circa 24 kDa (Tamura, Shiraki and Nakagawa, 1980), die entsprechende Bande müsste sich also zwischen jener von Carboanhydrase und Trypsin-Inhibitor befinden. Hier zeigen sich ebenfalls mehrere Banden, jedoch ist ein besonders stark ausgeprägt (oranger Pfeil). Diese repräsentiert möglicherweise Myokinase, könnte allerdings auch eine der Myosinketten darstellen, die mit 25kDa ein sehr ähnliches Molekulargewicht aufweisen (Bailin, 1976).

Insgesamt sind noch viele weitere Proteine im Glykolyse-Extrakt zu finden zusätzlich zu den identifizierbaren glykolytischen Enzymen. Es handelt sich hierbei um weitere Glykolyse-Enzyme, z.B. GAPDH, lösliches G-Aktin und AMP-Desaminase, LDH sowie CK. Das Molekulargewicht der humanen AMP-Desaminasen beträgt laut Literatur etwa 72kDa pro Untereinheit (Nobuaki Ogasawara *et al.*, 1982; Ranieri-Raggi *et al.*, 1995). Es wird also höchstwahrscheinlich durch die zarte, oberhalb der Albumin-Bande liegende Bande repräsentiert.

4.4.5 HPLC-Analyse der Nukleotide des Glykolyseextrakts

Mittels HPLC-Analyse erfolgte die quantitative und qualitative Bestimmung der Nucleotide im Glykolyseassay. Hierdurch ist nicht nur eine Abschätzung der Nukleotid-gebundenen Magnesiumfraktion möglich (4.4.2), sondern es sind auch metabolische Aktivitäten während des Versuchs messbar (4.4.6). Ich bedanke mich an dieser Stelle ausdrücklich der verstorbenen

Chemieingenieurin Frau Doktor rerum naturalium Hongying Lin für die exzellente Durchführung zur HPLC-Analysen sowie für die Bereitstellung der hieraus entstandenen Daten.

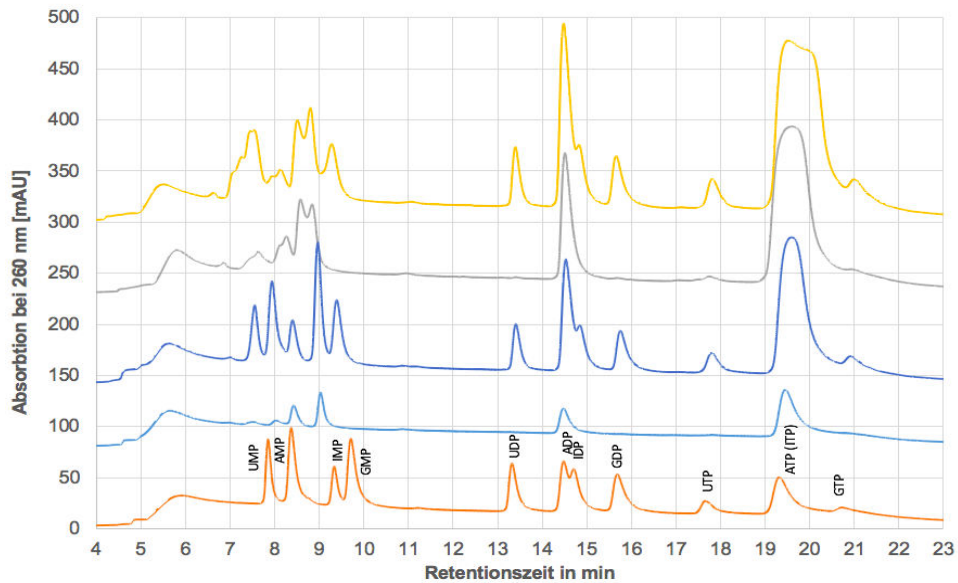


Abbildung 4.28: HPLC-Analyse zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Nucleotide in Rattenmuskelextrakt. Auf der X-Achse ist die Retentionszeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Absorption bei 260nm in Milli-Absorbtionseinheiten. Zuunterst ist die Standardkurve dargestellt (orange Kurve), welche mit den entsprechenden Angaben zu den enthaltenen Nucleotiden versehen ist. Die darüberliegende, hellblaue Kurve repräsentiert eine Messreihe unter Einsatz von 10µl Rattenmuskelextrakt. Zur genaueren Klassifizierung der gemessenen Peaks wurde zudem eine Messung mit Standard + 10µl Rattenmuskelextrakt durchgeführt (dunkelblaue Kurve). Hierbei kommt es zur Addition der sich entsprechenden Peaks, wodurch eine bessere Identifizierung möglich ist. Zusätzlich wurden diese Untersuchungen noch unter Einsatz der doppelten Menge an Rattenmuskelextrakt durchgeführt, um auch Nucleotide zu erfassen, die in sehr geringen Konzentrationen vorkommen (gelbe Kurve).

Tabelle 4.5: Tabellarische Darstellung der Nucleotid-Konzentrationen nach quantitativer & qualitativer HPLC-Analyse des Muskelextraktes. Conc. in mM entspricht der gemessenen Konzentration, in der nebenstehenden Spalte ist der entsprechende SD angegeben. Cyt.conc. in mM entspricht der durch Multiplikation mit Faktor 1,25 errechneten zytosolischen Konzentration.

Metabolit	Conc. in mM	SD	Cyt.conc.in mM	SD
UMP	0,27	0,031	0,34	0,031
AMP	0,28	0,03	0,35	0,038
IMP	1,25	0,154	1,56	0,193
GMP	0,03	0,002	0,03	0,003
NADP	0,03	0,005	0,04	0,006
UDP	0,01	0,001	0,01	0,001
ADP	0,94	0,09	1,17	0,113
GDP	0,03	0,002	0,03	0,003
UTP	0,07	0,01	0,09	0,013
ATP	4,00	0,75	5,00	0,938

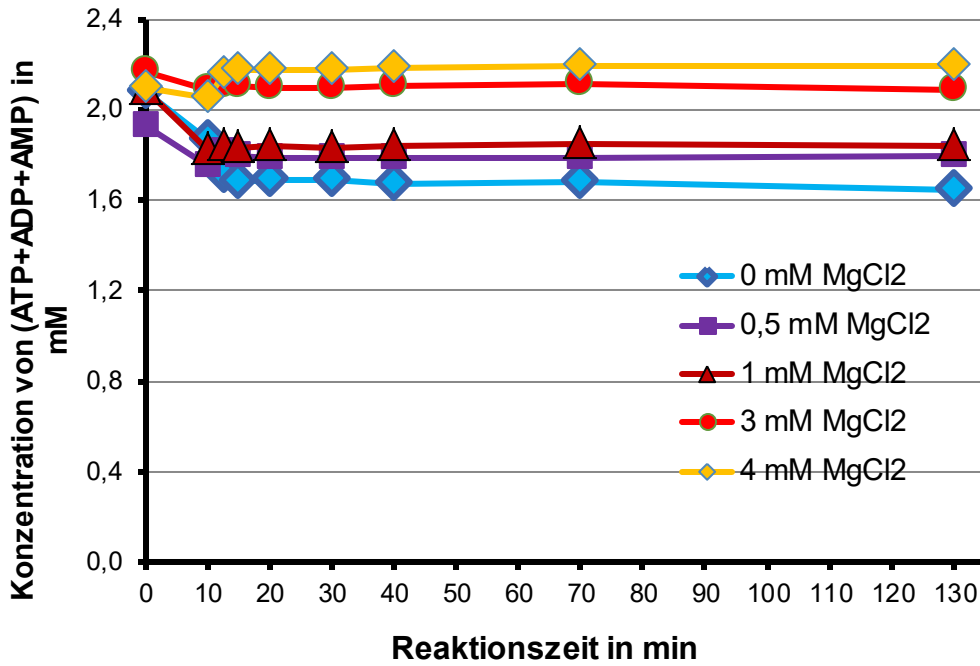
<i>GTP</i>	0,13	0,012	0,17	0,015
------------	------	-------	------	-------

In Tabelle 4.5 sind die aus den Ergebnissen der HPLC-Analytik errechneten Nukleotidkonzentrationen angegeben. Neben der gemessenen Konzentration in Millimolar mit zugehörigem Standardfehler ist die geschätzte zytosolische Konzentration angegeben, welche sich unter Schätzung einer Menge von Proteinen und Zellbestandteilen wie beispielsweise dem Sarkoplasmatischen Retikulum, T-Tubuli und Sarkolemm von 0,2g pro Gramm Muskelgewebe durch Multiplikation mit Faktor 1,25 ergibt (letzte beide Spalten Tabelle 4.5).

Es zeigt sich, dass ATP mit Abstand das in der höchsten Konzentration vorliegende Nukleotid darstellt, gefolgt von IMP. Effekte auf die freie Magnesiumkonzentration durch Komplexierung sind also hauptsächlich von Seiten des ATPs zu erwarten.

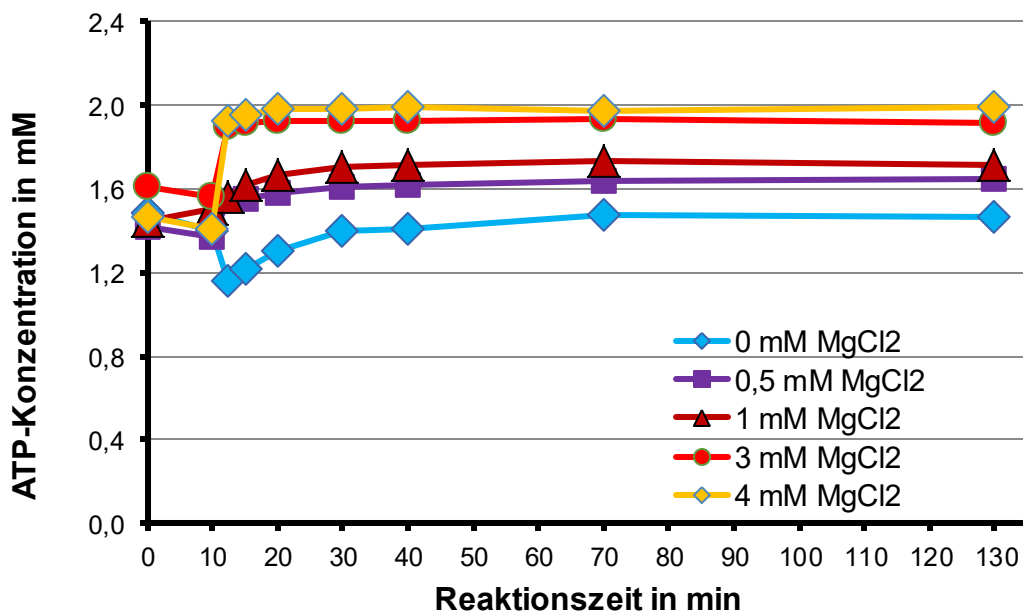
4.4.6 Veränderung der Nukleotide im Glykolyseassay in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration

Die Analyse der Adeninnukleotidkonzentration im Ansatz im Verlauf der Reaktion zeigte (Abbildung 4.29) bis 1mM MgCl₂ eine leichte Abnahme der Summe ([ATP]+[ADP]+[AMP]) in der Vorinkubationsphase mit nur endogener Glykogenolyse und nach Zugabe von Glucose-6-Phosphat eine Konstanz der Adeninnukleotide. Damit ergab sich folgende Magnesiumabhängigkeit: Je höher die Magnesiumkonzentration, desto höher die Summe der Adeninnukleotide. Das Verhältnis von ATP zu ADP und AMP lässt eine Aussage über den Energiezustand des Muskels zu: Ein niedriges Energiepotenzial geht mit einer höheren Konzentration an Mono- und Diphosphaten einher, ein hohes mit einer hohen Konzentration an Triphosphaten (2.4). Ein niedriges Energiepotential mit hohem Anteil an AMP aktiviert die Glykolyse, vor allem die Phosphofruktokinase (2.3.2). Das entstehende ATP wirkt dann im Sinne einer Feedback-Hemmung inhibitorisch auf PFK und PK (2.2, 2.3.2, 2.3.3).



/unveröffentlichte Daten von G.W. Mayr

Abbildung 4.29: Adeninnukleotidkonzentration im Assay über die Zeit bei unterschiedlichen Magnesiumchloridkonzentrationen im Ansatz bei 5mM Phosphat. Auf der X-Achse ist die Reaktionszeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Summe der Adeninnukleotidkonzentrationen in Millimolar. Die verschiedenfarbigen Kurven repräsentieren Messreihen bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen (Zugabe von 0mM, 0,5mM, 1mM, 3mM, 4mM) im Ansatz. Bei Minute 10 erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von Glucose-6-P. Es zeigte sich eine positive Korrelation der Magnesiumkonzentration gegenüber der Summe der Adeninnukleotide im Ansatz.



/unveröffentlichte Daten von G.W. Mayr

Abbildung 4.30: ATP-Konzentration im Ansatz über die Zeit bei Variation der Magnesiumkonzentration und 5mM Phosphat. Auf der X-Achse ist die Reaktionszeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die ATP-Konzentration in Millimolar. Verschiedenfarbige Kurven repräsentieren Messreihen bei Zugabe unterschiedlicher Magnesiumchloridkonzentrationen zum Ansatz.

Abbildung 4.30 zeigt, dass es zunächst zu einem leichten Absinken der ATP-Konzentration im Ansatz kommt, nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe steigt diese magnesiumabhängig unterschiedlich schnell und stark wieder an. Die Messung mit 0mM Magnesium-Zugabe weist initial nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe sogar ein deutliches Absinken der ATP-Konzentration auf (Minute 10-15, Abbildung 4.30), im Verlauf ist ein Wiederanstieg etwa auf das Anfangsniveau zu beobachten. In den anderen Ansätzen übersteigt die ATP-Konzentration nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe magnesiumabhängig das Ausgangsniveau: Die Ansätze mit 3mM und 4mM Zugabe weisen den steilsten Anstieg der ATP-Konzentration nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe auf, es zeigt sich eine Stabilisierung der ATP-Konzentration bei etwa 2mM.

Ingesamt zeigt sich die ATP-Konzentration als recht stabil, es sind lediglich Schwankungen zwischen 1,2 und 2mM zu beobachten. Dies ist auf die Pufferung durch Myokinase- und Kreatinkinase-Reaktion zurück zu führen (2.4).

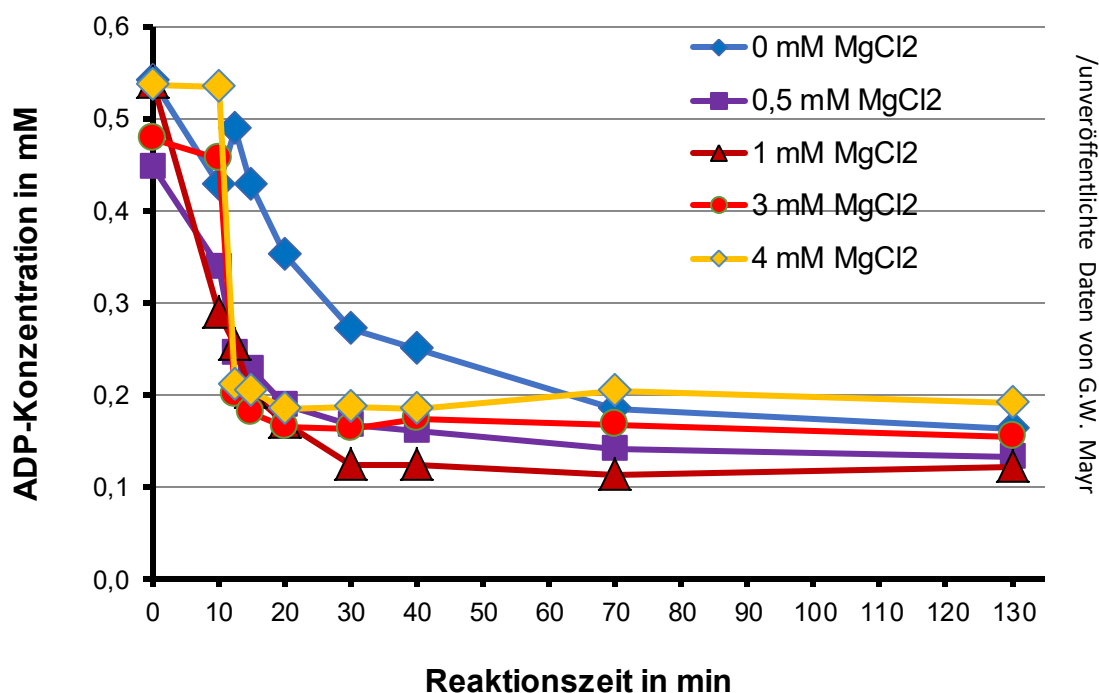


Abbildung 4.31: ADP-Konzentration im Ansatz über die Zeit bei Variation der Magnesiumkonzentration und 5mM Phosphat.

Abbildung 4.31 stellt die Veränderung der ADP-Konzentration bei unterschiedlichem Magnesium im Ansatz über die Reaktionszeit dar. Initial wurde eine maximale ADP-Konzentrationen von circa 0,55mM gemessen, welche nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe auf 0,17 bis 0,11mM sank. Ohne MgCl₂-Zugabe (dunkelblaue Kurve) und bei höchstem Magnesium wies ADP bei Start der Glykolyse ohne Glucose-6-Phosphat-Zugabe die höchste

Konzentration auf. Vor allem bei 0, 0,5 und 1mM $MgCl_2$ kommt es in dieser Phase bereits zum Abfall des ADP. Mit Glucose-6-Phosphat-Zugabe kommt es bei allen $MgCl_2$ -Konzentrationen zum weiteren Abfall von ADP. Eine weitere Steigerung der Magnesiumzugabe zum Ansatz führte zu keiner weiteren maximalen Abnahme der ADP-Konzentration. Vielmehr stieg die Rate des ADP-Umsatzes zu ATP (Abbildung 4.30) mit steigendem Magnesium stark an bis zu einer Konzentration von 3mM, wo ein Maximum erreicht wurde. Dies ist noch besser erkennbar in der in Abbildung 4.32 dargestellten ATP/ADP-Ratio: Die maximale Ratio ATP/ADP wird bei 1mM Magnesiumchlorid beobachtet. Jedoch ist der Anstieg der Ratio bei 3mM und 4mM am höchsten (Abbildung 4.32).

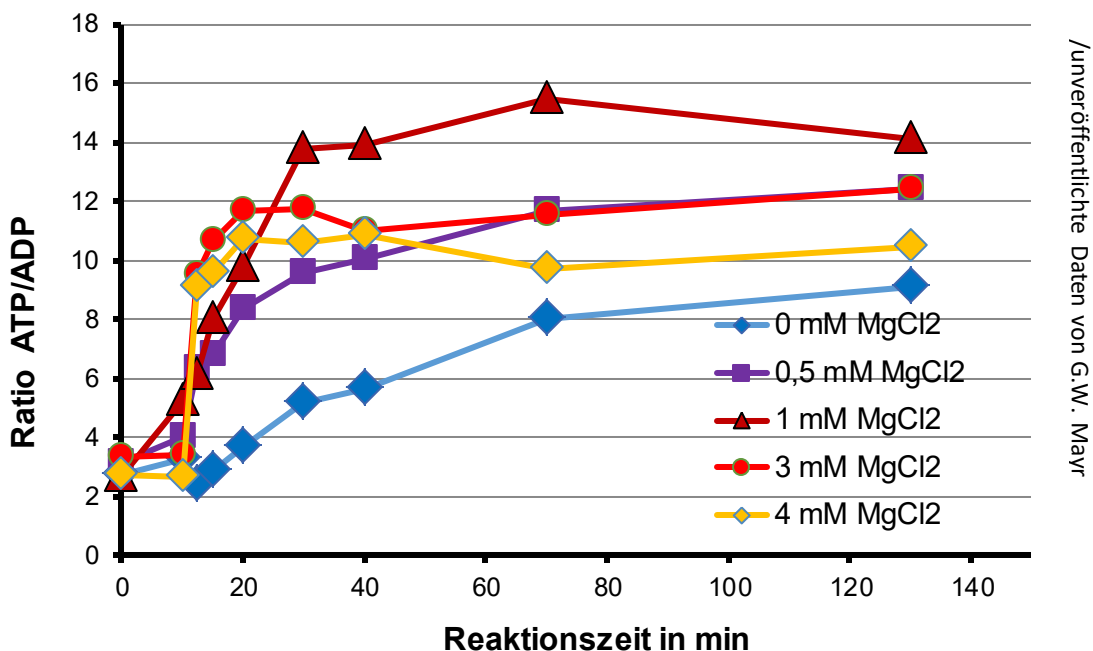
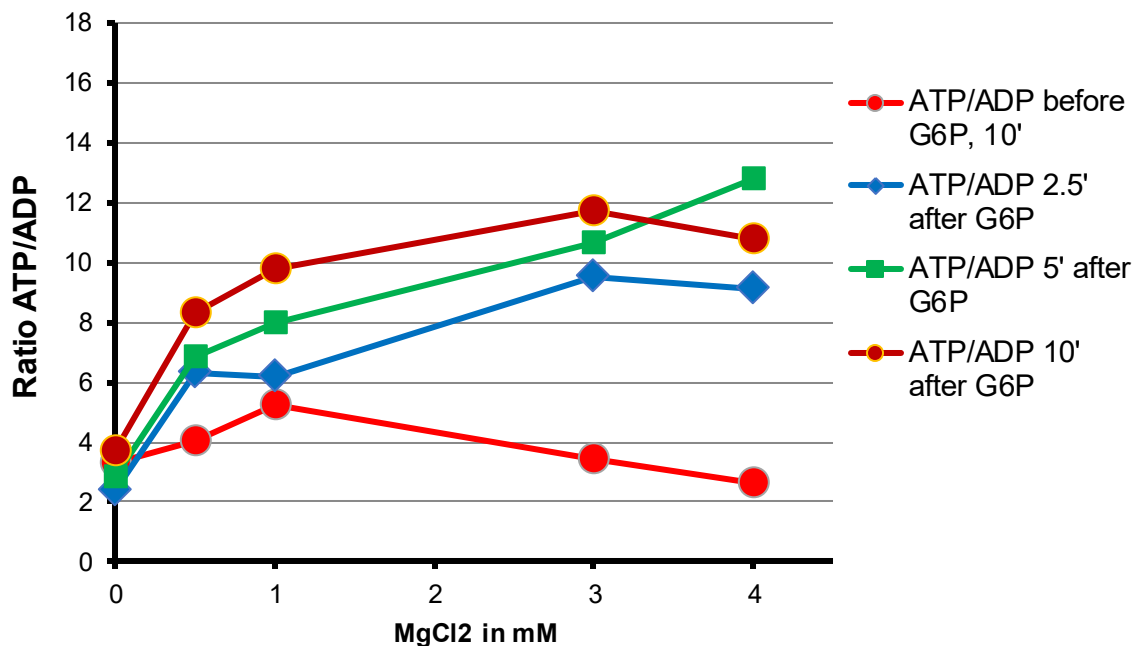


Abbildung 4.32: ATP/ADP-Ratio bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen im Ansatz.

Abbildung 4.33 und 4.34 zeigen darüber hinaus die ATP/ADP-Ratio zu unterschiedlichen Messzeitpunkten in Abhängigkeit zur hinzugefügten Magnesiummenge. Vor Glucose-6-Phosphat-Zugabe (rote Kurve) ist ein Maximum der ATP/ADP-Ratio bei 1mM zu beobachten. Interessanterweise lässt sich noch 2,5, 5 und 10 Minuten nach Glucose-6-Phosphatzugabe (Abbildung 4.33, braune, grüne, blaue Kurve) eine Steigerung der ATP/ADP-Ratio mit steigender Magnesiumkonzentration beobachten. Ab Minute 20 nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe wird jedoch die maximale ATP/ADP-Ratio bei Zugabe von 1mM $MgCl_2$ erreicht. Dies gilt auch für die ATP/ADP-Ratio vor Glucose-6-Phosphat-Zugabe, allerdings ist die Ratio hier nur 5, nach Glucose-

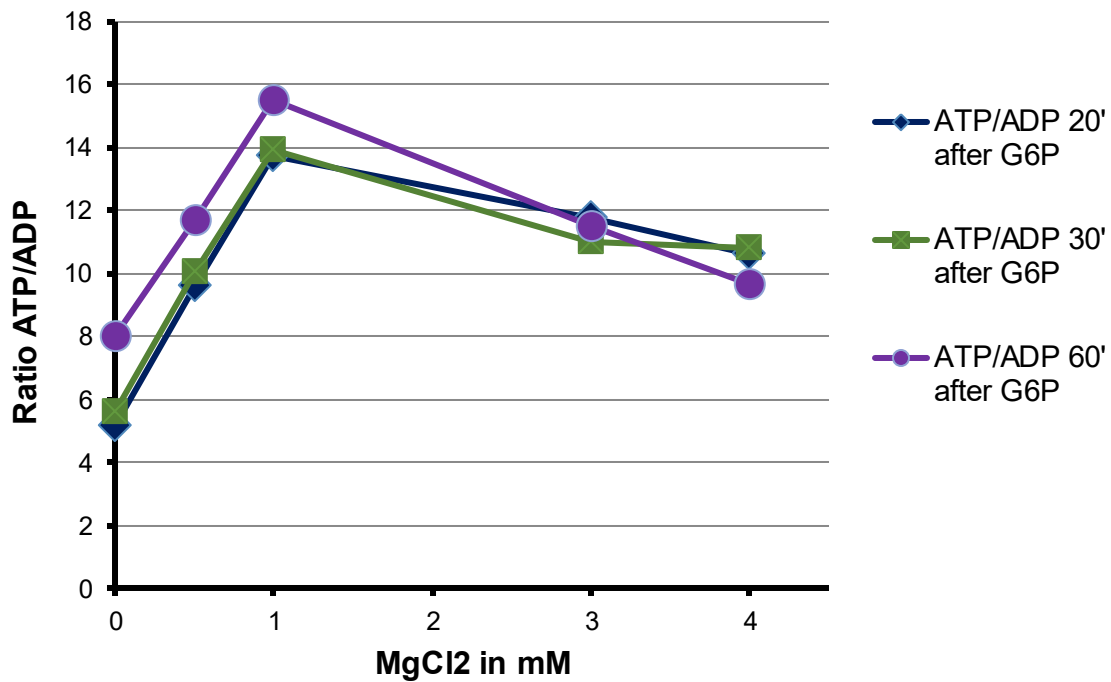
6-P-Zugabe 14-15. Dieser Umstand lässt sich auch aus Abbildung 4.32 vermuten, wo der initiale Anstieg der ATP/ADP-Ratio bei 3mM und 4mM Magnesiumzugabe besonders steil war, die höchste absolute Rate jedoch bei Zugabe von 1mM erreicht wurde (Abbildung 4.32). Es gibt also zwei von Magnesium beeinflusste Effekte: die maximale Rate der ATP-Bildung aus ADP, die bei 3mM maximal wird und die maximale Ratio von ATP zu ADP, welche ein Maximum bei 1mM Magnesium zeigt und dann wieder abnimmt (Abbildungen 4.33 und 4.34).

Abbildung 4.33 und 4.34: ATP/ADP-Ratio in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration im Ansatz zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Auf der X-Achse ist die Magnesiumkonzentration in Millimolar aufgetragen, auf der Y-Achse die entsprechende ATP/ADP-Ratio.



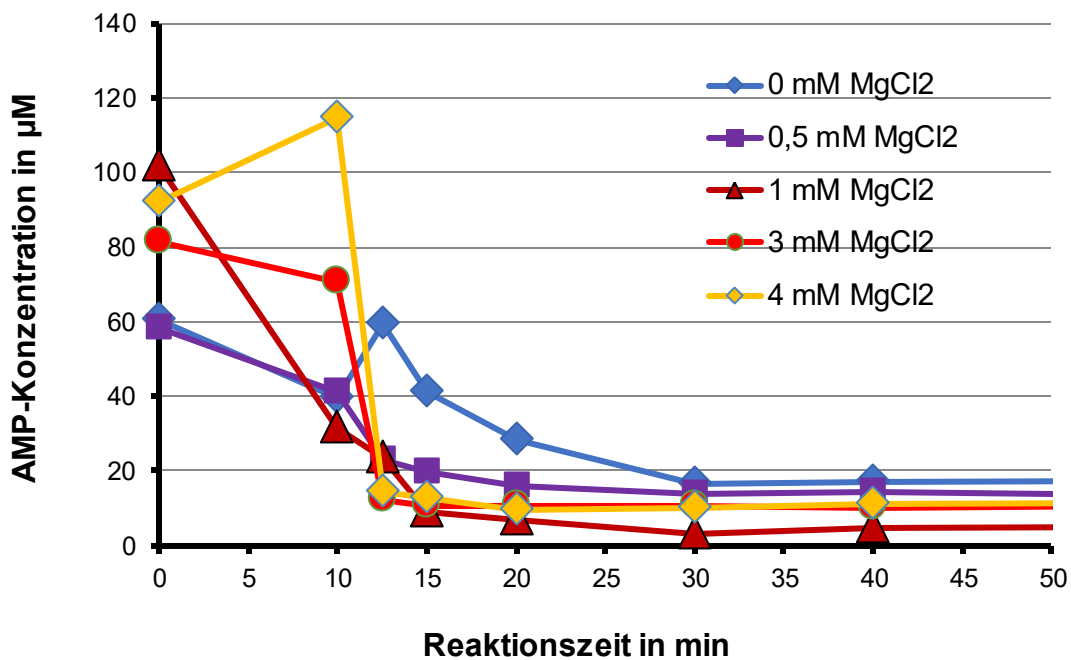
/unveröffentlichte Daten von G.W. Mayr

Abbildung 4.35 zeigt die AMP-Konzentration im Ansatz in Abhängigkeit zur zugegebenen Magnesiummenge. Bei Minute 10 erfolgte die Zugabe von 7,5mM Glucose-6-Phosphat. Vor Glucose-6-Phosphat-Zugabe steigt AMP Magnesium-abhängig auf Werte $>100\mu\text{M}$ an. Nach Zugabe folgt sehr schnell eine Mg-abhängige Abnahme der AMP-Konzentration, die initial besonders stark ausfällt (gelbe und orangefarbene Kurve). Die absolut niedrigste AMP-Konzentration wird auch hier bei Zugabe von nur 1mM MgCl_2 beobachtet. Allerdings ist in diesem Ansatz auch vor Glucose-6-Phosphat-Zugabe bereits eine deutlich geringere AMP-Konzentration registriert, was für diesen Effekt ursächlich sein könnte (dunkelrote Kurve Abbildung 4.35).



/unveröffentlichte Daten von G.W. Mayr

Abbildung 4.34: ATP/ADP-Ratio 20min, 30min und 60min nach Glucose-6-P-Zugabe in Abhängigkeit zur Magnesiumkonzentration im Ansatz.



/unveröffentlichte Daten von G.W. Mayr

Abbildung 4.35: AMP-Konzentration im Ansatz über die Zeit bei Variation der Magnesiumkonzentration und 5mM Phosphat.

Die AMP-Konzentration in der Muskelfaser wird stark durch zwei Enzyme beeinflusst: AMP-Desaminase katalysiert eine Weiterreaktion unter Abspaltung einer Ammonium-Gruppe zu IMP. Ebenso kann AMP mit ATP mittels Myokinase zu 2 ADP reagieren. Dies kann durch Spaltung zu Adenosin und

Phosphat entfernt werden. AMP-Desaminase zeigt keine Magnesiumabhängigkeit (4.2.6), jedoch wird das Enzym durch ATP aktiviert.

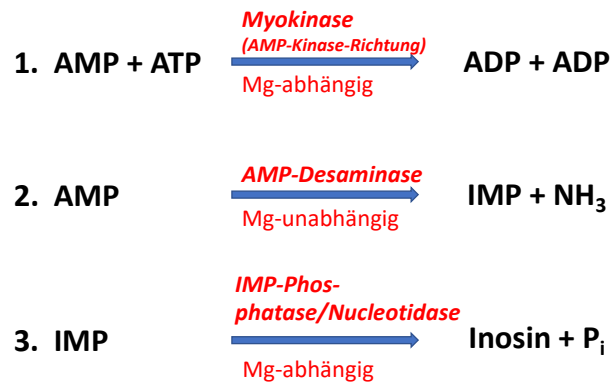


Abbildung 4.1 36: Schema AMP-abbauende Reaktionen

Myokinase benötigt als Kinase MgATP als Substrat (4.2.5), auch für Nucleotidasen wird eine Aktivierung durch Magnesium in der Literatur berichtet (Henz *et al.*, 2006; Pochmann *et al.*, 2008; Walldén and Nordlund, 2011). Es gibt also mehrere Wege, über welche die AMP-Konzentration zum Teil Magnesium-abhängig beeinflusst werden kann. Anhand unserer Daten kann nicht differenziert werden, wie groß der jeweilige Anteil an der AMP-Degradierung ist. Die Magnesium-Abhängigkeit der AMP-Bildung und Wiederentfernung – vermutlich durch Myokinase – ist also vor und nach dem Start der Glykolyse mit Glucose-6-Phosphat deutlich unterschiedlich.

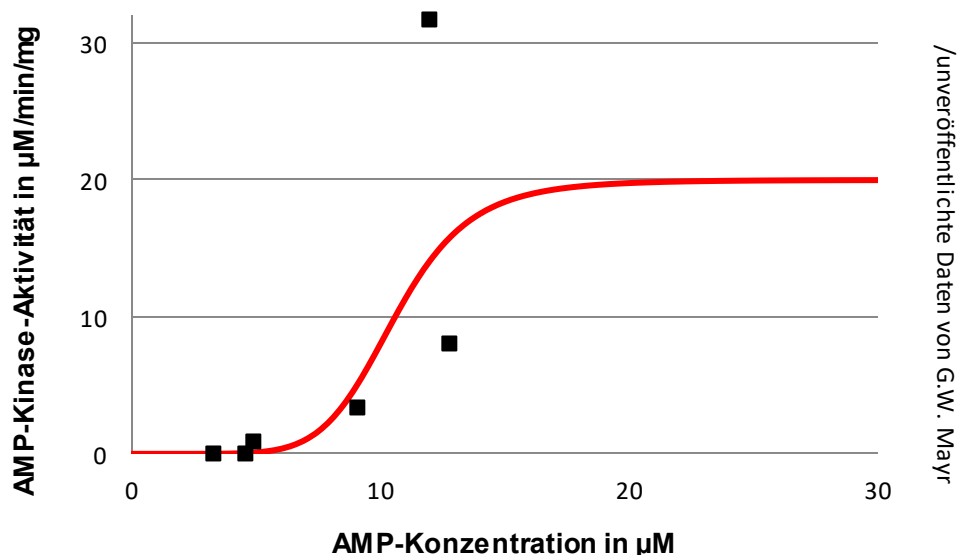


Abbildung 4.37: AMK-Kinase-Aktivität der Myokinase in Abhängigkeit zur AMP-Konzentration im Ansatz bei hohen Magnesiumkonzentrationen. Auf der X-Achse ist die AMP-Konzentration aufgetragen, auf der Y-Achse die AMP-Kinase-Aktivität. Daten von Mayr abgeleitet aus Whole-Glycolysis-Assays.

Bei der weiteren Auswertung der gewonnenen Daten zeigte sich ein sehr interessanter Effekt: Wie bereits beschrieben, verfügt Myokinase sowohl über eine AMP- als auch über eine ADP-Kinase-Funktion in Abhängigkeit vom ATP/ADP-Verhältnis. Trägt man diese jeweils gegen die Konzentrationen von AMP und ADP im Ansatz auf, ergibt sich für die AMP-Kinase-Aktivität eine deutliche Kooperativität gegenüber AMP (Abbildung 4.37), für die ADP-Kinase-Aktivität entsprechend eine Kooperativität gegenüber ADP (Abbildung 4.38). Ab einer AMP-Konzentration von $>5\mu\text{M}$ kommt es zu einer plötzlichen Aktivierung der AMP-Kinase-Aktivität der Myokinase im Sinne einer „Schalterfunktion“, es wird sehr schnell ADP aus AMP und ATP gebildet, also AMP entfernt.

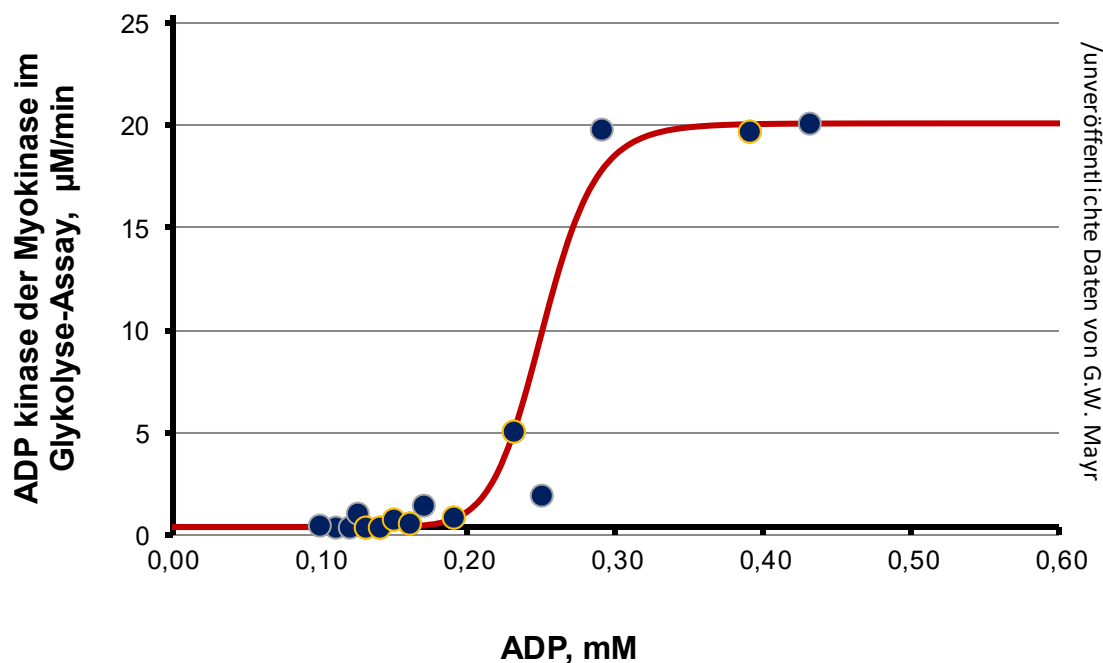


Abbildung 4.38: ADP-Kinase-Aktivität der Myokinase in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration. Auf der X-Achse ist die ADP-Konzentration in Millimolar im Ansatz aufgetragen, auf der Y-Achse die entsprechende ADP-Kinase-Aktivität in Micromol pro Minute. Daten aus einer weitergehenden Auswertung durch Prof. Mayr.

Umgekehrt kommt es bei der ADP-Kinase-Funktion der Myokinase ab einer ADP-Konzentration von $>0,1-0,15\text{mM}$ zu einer hochkooperativen starken Aktivierung des Enzyms und somit zum Abbau von ADP unter Bildung von AMP und ATP. Umgekehrt führt ein Absinken der ADP-Konzentration unter $0,2\text{mM}$ zum „Abschalten“ des Enzyms und konsekutiv zu einer plötzlichen, schnellen Abnahme von AMP.

4.4.5 Berechnung der freien Magnesiumkonzentration im Glykolyseassy

In der Einleitung wurde dargelegt, dass die intrazelluläre Magnesiumkonzentration in verschiedenen Geweben im menschlichen Körper deutlich divergiert (2). Im Weichteilgewebe liegt etwa 90% des Magnesium gebunden vor – an ATP, Phospholipide, Nukleinsäuren, Polyamine und Proteine (Tabelle 4.6, de Baaij *et al.*, 2015). Hinsichtlich der intrazellulären Gesamtmagnesiumkonzentration im Muskel variieren die Angaben in der Literatur erheblich (Polimeni and Page, 1974; Maughan, 1983; Maughan and Recchia, 1985), Iotti *et al.* legten die Gesamtmagnesiumkonzentration im humanen Skelettmuskel auf etwa 7mM fest (Iotti *et al.*, 2000; Iotti and Malucelli, 2008). Recht übereinstimmend sind jedoch die Angaben zur freien Magnesiumkonzentration, die wohl in Abhängigkeit vom pH-Wert zwischen 0,3mM und 0,9mM anzusiedeln ist (Polimeni and Page, 1974; Gupta and Moore, 1980; Garfinkel and Garfinkel, 1984; Buri and McGuigan, 1990; Iotti and Malucelli, 2008). Hierbei ist zu beachten, dass eine Messung der freien Magnesiumkonzentration ohne Verfälschung der Selbigen durch den Messvorgang ein äußerst schwieriges Unterfangen ist, da immer eine Beeinflussung der Wechselwirkungen des Kations mit einem geeigneten Kationen-Indikator erfolgt. Im Folgenden wird für alle Berechnungen trotzdem von den in der Literatur angegebenen Werten ausgegangen.

Intrazelluläres Magnesium	
80-90%	gebunden an ATP/ADP, z.B. anorganisches Phosphat
5-20%	gebunden an Proteine, Phosphomonoester, Phospholipide
1-5%	freies Magnesium

Tabelle 4.6: Zusammensetzung des intrazellulären Magnesiums (nach Rude, 1998)

Um festzustellen, wie viel lösliches Protein, vor allem glykolytische und glykogenolytische Enzyme, sich im Überstand befindet, wurde eine quantitative Proteinbestimmung durchgeführt (3.3.11, 4.4.2). Es ergab sich hierbei eine Konzentration von 7,5-8 mg/ml. Vereinfacht wurde im Folgenden mit 8 mg/ml gerechnet.

Anhand der erfolgten quantitativen sowie qualitativen Nukelotidbestimmung für Rattenmuskulatur mittels HPLC (3.2.10, 4.4.3, 4.4.6) konnte zudem die Konzentration der Nukleosidtri- und diphosphate bestimmt werden, welche Magnesium komplexieren und somit einen Einfluss auf die freie Magnesiumkonzentration im Assay ausüben können. Diese verändert sich über die Zeit, was bei den Berechnungen der freien Magnesiumkonzentration berücksichtigt werden muss.

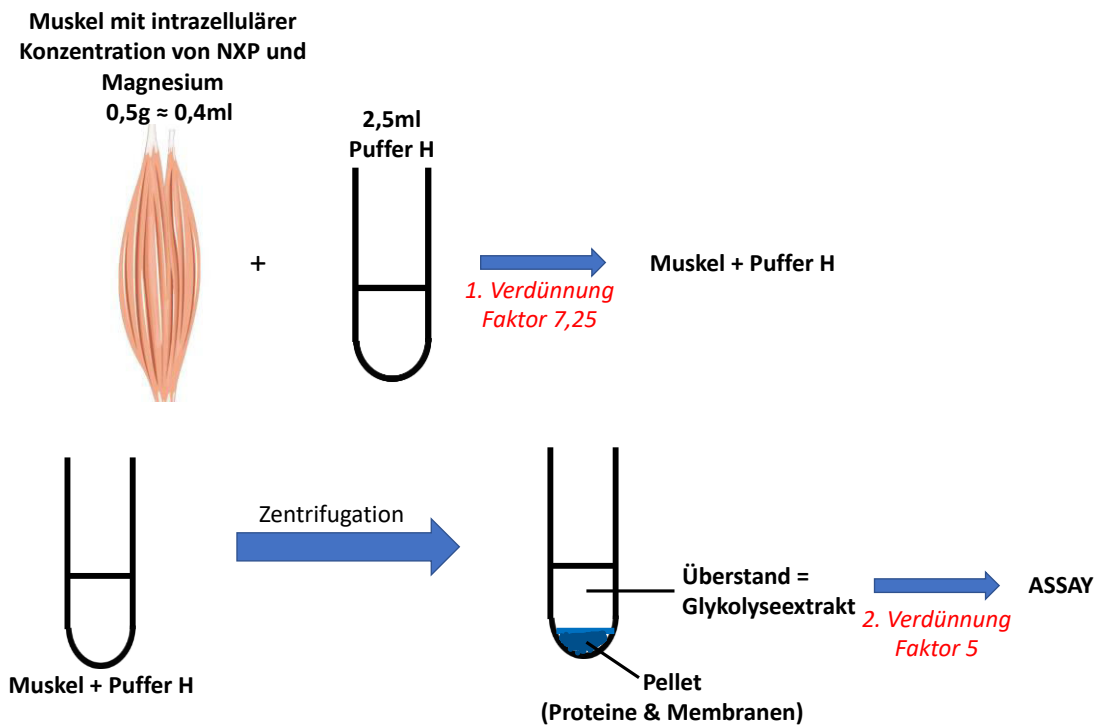


Abbildung 4.39: Schematische Darstellung der Verdünnung der Bestandteile des Muskels im Glykolyseassay. Zu 0,4ml Rattenmuskel wurden 2,5ml Puffer H gegeben, wodurch eine erste Verdünnung der im Muskel befindlichen Metabolite um Faktor 7,25 erfolgte. Die im Puffer befindlichen Komponenten wurden um Faktor 1,16 verdünnt. Es erfolgte wie im Methodikteil beschrieben die Zentrifugation des Gemischs. Durch die anschließende Glycerinisierung des Überstandes kam es zu einer erneuten Verdünnung um Faktor 1,13. Bei Zugabe zum Assay erfolgte eine weitere Verdünnung des Glykolyseextraktes um Faktor 5.

Bei Zugabe des Extrakts zum Assay erfolgte eine weitere Verdünnung um Faktor 5, sodass sich unter der Annahme einer ursprünglich im Muskel vorhandenen Gesamtmagnesiumkonzentration von 7mM eine Endkonzentration im Ansatz von 0,17mM ergab, bei einer Ausgangskonzentration von 17mM läge diese bei 0,41mM. ATP aus dem Muskel wurde ebenfalls verdünnt, bei Zugabe der Assay-Puffer wurde 3mM ATP zugegeben, durch zusätzliche Einschleppung von ATP mit dem Extrakt – circa 0,007mM nach Verdünnung – betrug die Endkonzentration von ATP im

Assay dann 3,07mM. Äquivalent hierzu betrug die Endkonzentration von ADP 0,55mM. Da ATP und Magnesium aufgrund der hohen Komplexkonstanten des Nukleosidtriphosphats in der Regel nahezu im Verhältnis 1:1 im Komplex vorliegen, war davon auszugehen, dass allein aufgrund dieses Mechanismus bei fehlender zusätzlicher Zugabe von Magnesium zum Assay (0mM $MgCl_2$) nahezu sämtliches Magnesium als Komplex Mg:ATP vorlag. Freies Magnesium, welches zu einer möglichen Aktivierung der Glykolyse beitragen könnte, läge also in diesem Fall praktisch nicht vor. Zudem überstieg die ATP-Konzentration im Ansatz jene von Magnesium, es ist also von einer Hemmung von PFK und PK durch freies ATP auszugehen (2.3.2, 2.3.3).

In den folgenden Messreihen wurde die Magnesiumkonzentration im Ansatz nun sukzessive gesteigert, was eine Aktivierung der Glykolyse zur Folge hatte (4.4.1). Zudem musste berücksichtigt werden, in welchen Mengen Magnesium durch Proteine des Glykolyseextrakts gebunden wird sowie durch Bestandteile des Reaktionspuffers Puffer H. Für die vorhandenen Proteine wird davon ausgegangen, dass etwa $1\mu\text{Mol}$ Magnesium pro Milligramm Protein (1mg Protein entspricht $8\mu\text{Mol}$ Aminosäuren, hiervon bindet $1\mu\text{Mol}$ $1\mu\text{Mol}$ Mg) gebunden wird. Hier wurde postuliert, dass das bereits im intakten Muskel an Protein gebundenes Magnesium dort gebunden bleibt und dass dies auch im Assay so ist. Zur Berechnung der freien Magnesiumkonzentration im Ansatz über die Zeit wurde zunächst die freie Konzentration nach Komplexbildung durch ATP und ADP mithilfe des Programms Maxchelator bestimmt. Ersichtlich wurde aus diesen Berechnungen zudem die freie ATP-Konzentration. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 zusammen gefasst. Es wird deutlich, dass ab einer Zugabe von 3mM Magnesiumchlorid zum Ansatz die freie ATP-Konzentration sehr gering ist. Dies ist hinsichtlich der hemmenden Wirkung des freien ATPs auf das wichtigste glykolytische Schlüsselenzym, die PFK, von Bedeutung.

Tabelle 4.7: Berechnung der freien Magnesium- und ATP-Konzentration nach Komplexierung von Magnesium durch ATP und ADP. In der folgenden Tabelle sind die mithilfe des frei zugänglichen Programmes „Machelator“ errechneten Konzentrationen von freiem Magnesium und ATP nach Komplexierung des ersteren durch ATP und ADP zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten im Assay angegeben. Die zugegeben Magnesiumkonzentration wurde variiert (0mM, 0,5mM, 1mM, 3mM, 4mM MgCl₂). Zugabe von 3mM ATP, 0,5mM ADP und 1mM Kreatin-Phosphat, Reaktionsstart mit Glucose-6-Phosphat 7,5mM.

	Zeit in min								
	0	10	12,5	15	20	30	40	70	150
	Zugabe 0mM Mg ²⁺								
Mg ²⁺ frei nach ATP/ADP-Komplexierung	0,031	0,033	0,042	0,04	0,037	0,034	0,034	0,032	0,033
freies ATP in mM	1,036	0,954	0,732	0,775	0,866	0,948	0,957	1,021	1,010
	Zugabe 5mM Mg ²⁺								
Mg ²⁺ frei nach ATP/ADP-Komplexierung	0,095	0,105	0,094	0,093	0,091	0,089	0,088	0,086	0,086
freies ATP in mM	0,629	0,538	0,664	0,673	0,695	0,719	0,727	0,743	0,751
	Zugabe 1mM Mg ²⁺								
Mg ²⁺ frei nach ATP/ADP-Komplexierung	0,238	0,247	0,236	0,222	0,214	0,207	0,204	0,2	0,204
freies ATP in mM	0,335	0,339	0,363	0,394	0,416	0,436	0,443	0,456	0,443
	Zugabe 3mM Mg ²⁺								
Mg ²⁺ frei nach ATP/ADP-Komplexierung	1,614	1,671	1,543	1,538	1,551	1,551	1,545	1,536	1,558
freies ATP in mM	0,068	0,064	0,084	0,085	0,085	0,085	0,085	0,086	0,084
	Zugabe 4mM Mg ²⁺								
Mg ²⁺ frei nach ATP/ADP-Komplexierung	2,643	2,707	2,458	2,437	2,434	2,426	2,424	2,418	2,417
freies ATP in mM	0,038	0,036	0,055	0,056	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057

Im Anschluss wurde mittels numerischer Differenzierung die freie Magnesiumkonzentration nach Komplexierung durch Phosphat und Phosphomonoester näherungsweise bestimmt (Tabelle 4.8). Die zuvor errechneten freien Magnesiumkonzentrationen nach ATP/ADP wurden nun als Ausgangswert Magnesium total eingesetzt, MgSP repräsentiert den Anteil des im Komplex mit Phosphoestern und Pyrophosphat vorliegenden Magnesiums und SP die freie Phosphat- plus Phosphoester- plus Pyrophosphat-Konzentration. Letztere ergibt sich aus der Addition der in der HPLC gemessenen Konzentrationen für AMP, NAD⁺, NADH, IMP, Kreatinphosphat, Phosphat und Fructose-1,6-Bisphosphat. Mangels vorliegender, einzelner Komplexkonstanten wurde 10mM pauschal für jede Verbindung als K_d-Wert

festgelegt, hier erfolgte eine Orientierung an der Literatur. Folgende mathematische Annahmen wurden gemacht:

$$K_d = \frac{(SP * Mg)}{MgSP}$$

$$MgSp = SPt - SP$$

$$Mg = Mgt - MgSP$$

Hieraus folgt durch Umstellen die Differenzialgleichung:

$$MgSP = SP * \frac{Mgt - SPt * SP + SP^2}{K_d}$$

Diese lässt sich nicht direkt lösen, daher erfolgt die Näherung mittels numerischer Differenzierung. Hierzu variiert man SP(frei) solange, bis der entsprechende K_d -Wert gefunden wird. Dort wird dann auch die freie Magnesiumkonzentration und die Konzentration des Komplexes aus Phosphomonoestern und Magnesium berechnet. Es ergaben sich hieraus die in Tabelle 4.8 angegebenen freien Magnesiumkonzentrationen.

Tabelle 4.8: Beispielberechnung der freien Magnesiumkonzentration nach Komplexierung durch Phosphomonoester. Ausgehend von den zuvor errechneten freien Magnesiumkonzentrationen nach Komplexierung durch ATP/ADP (Tabelle 4.9) wurde durch numerische Differenzierung mit Annahme eines K_d -Wertes der Phosphomonoester für Magnesium von 10 nach der in 4.4.5 beschriebenen Methode näherungsweise die verbleibende, freie Magnesiumkonzentration nach Komplexierung durch Phosphomonoester errechnet. Mg^{2+} total entspricht hierbei der totalen freien Magnesiumkonzentration nach Komplexierung durch ATP/ADP, MgSP repräsentiert die Konzentration der im Komplex mit Phosphomonoestern vorliegenden Magnesiummenge in Millimolar, SP die Konzentration an freiem Phosphomonoester ebenfalls in Millimolar und SP total die angenommene Gesamtkonzentration von Phosphomonoestern im Ansatz

Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM	Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM
2,7	1,45	11,55	1,25	13	1,1	0,61	12,39	0,49	13
	1,5	12,5	1,20	14		0,63	13,37	0,47	14
	1,55	13,45	1,15	15		0,65	14,35	0,45	15
	1,59	14,41	1,11	16		0,67	15,33	0,43	16
	1,64	15,36	1,06	17		0,68	16,32	0,41	17
	1,78	19,22	0,92	21		0,74	20,26	0,36	21
Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM	Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM
2,6	1,4	11,6	1,20	13	1	0,55	12,45	0,45	13
	1,45	12,55	1,15	14		0,57	13,43	0,43	14
	1,49	13,51	1,11	15		0,59	14,41	0,41	15
	1,54	14,46	1,06	16		0,61	15,39	0,39	16
	1,58	15,42	1,02	17		0,62	16,38	0,38	17
	1,71	19,29	0,89	21		0,67	20,33	0,33	21

Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM	Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM
2,4	1,29	11,71	1,11	13	0,24	0,14	12,87	0,11	13
	1,34	12,66	1,06	14		0,14	13,86	0,10	14
	1,38	13,62	1,02	15		0,14	14,86	0,10	15
	1,42	14,58	0,98	16		0,15	15,85	0,10	16
	1,46	15,54	0,94	17		0,15	16,85	0,10	17
	1,58	19,42	0,82	21		0,16	20,84	0,10	21
Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM	Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM
1,7	0,93	12,07	0,77	13	0,2	0,11	12,89	0,09	13
	0,96	13,04	0,74	14		0,12	13,88	0,08	14
	0,99	14,01	0,71	15		0,12	14,88	0,08	15
	1,02	14,98	0,68	16		0,12	15,88	0,08	16
	1,05	15,96	0,66	17		0,13	16,87	0,07	17
	1,13	19,87	0,57	21		0,14	20,86	0,06	21
Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM	Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM
1,6	0,88	12,12	0,72	13	0,09	0,05	12,95	0,04	13
	0,91	13,09	0,69	14		0,05	13,95	0,04	14
	0,94	14,07	0,67	15		0,05	14,95	0,04	15
	0,96	15,04	0,64	16		0,06	15,94	0,03	16
	1,07	16,02	0,62	17		0,06	16,94	0,03	17
	1,08	19,93	0,53	21		0,06	20,94	0,03	21
Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM	Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM
1,5	1,29	12,18	0,68	13	0,035	0,02	12,98	0,02	13
	1,34	13,15	0,65	14		0,02	13,98	0,01	14
	1,38	14,12	0,62	15		0,02	14,98	0,01	15
	1,42	15,10	0,60	16		0,02	15,98	0,01	16
	1,46	16,08	0,58	17		0,02	16,98	0,01	17
	1,58	20,00	0,50	21		0,02	20,98	0,01	21
Mg ²⁺ t in mM	MgSP in mM	SP frei in mM	Mg ²⁺ frei in mM	SP total in mM					
1,2	0,66	12,34	0,54	13					
	0,69	13,32	0,52	14					
	0,71	14,29	0,49	15					
	0,73	15,28	0,48	16					
	0,74	16,26	0,46	17					
	0,80	20,20	0,40	21					

Da SP total nur annähernd anhand der durchgeführten HPLC-Analytik in Kombination mit den Substrat-Zugaben bestimmt werden konnte, erfolgte auch hier bei unseren Berechnungen eine Variierung (SP total in mM in Tabelle 4.8). Es zeigte sich, dass im Bereich der Zugabe von 4mM Magnesiumchlorid zum Ansatz, was im Vergleich mit Tabelle 4.7 einer freien Konzentration nach Komplexierung durch ATP/ADP von 2,4-2,7mM entspricht. Nach Komplexierung durch Phosphomonoester resultiert eine freie Magnesiumkonzentration von 0,92-1,25mM unter den gewählten Berechnungsbedingungen. Für die Zugabe

von 3mM ergab sich dementsprechend eine freie Konzentration von 0,5-0,77mM Magnesium und bei der Zugabe von 1mM resultiert eine freie Konzentration von etwa 0,2-0,44mM. Es wurde keine Messung bei 2mM Magnesiumchlorid-Zugabe durchgeführt, diese müsste jedoch eine freie Magnesiumkonzentration zwischen 0,2mM und 0,5mM zur Folge haben. Bei diesen Ergebnissen wäre also eine *in vivo*-Relevanz der Aktivierung der Muskel-Glykolyse durch Magnesium möglich.

Die vorliegenden Ergebnisse dienen lediglich als Modellrechnung, da viele gesetzte Bedingungen nicht endgültig verifiziert werden konnten: die totale intrazelluläre Magnesiumkonzentration konnte aus den Angaben der Literatur nur geschätzt werden (2, 4.4.5), allerdings fällt hier eine Änderung des Wertes zwischen 17mM und 7mM (Polimeni and Page, 1974; Iotti *et al.*, 2000) aufgrund der starken Verdünnung kaum ins Gewicht. Des Weiteren wurde die Angabe des K_d -Wertes der Phosphomonoester für Magnesium mit 10mM sowie deren intrazelluläre Konzentration ebenfalls angenommen und nicht gemessen, bei Änderung dieser Parameter in weiteren Rechenbeispielen bewegten sich die rechnerisch resultierenden, freien Magnesiumkonzentrationen nicht mehr in einem Bereich, in dem eine Regulation denkbar wäre. Zudem handelt es sich bei der numerischen Differenzierung lediglich um eine Näherung, keine genaue Bestimmung. Insgesamt sind die Ergebnisse unserer Berechnungen also nur ein Fingerzeig, weitere Untersuchungen zur genauen Bestimmung der verwendeten Parameter sind notwendig, um sichere Vorhersagen machen zu können.

4.5 Regulierung von PFK-1- und Gesamtglykolyse-Aktivität durch Phosphat

4.5.1 Regulierung der PFK durch AMP und Phosphat

Es ist bekannt, dass Phosphat und AMP synergistisch aktivierend auf die Aktivität der Phosphofruktokinase wirken (Bañuelos, Gancedo and Gancedo, 1977; Przybylski *et al.*, 1985; Dobson, 1986; Wegener *et al.*, 1987). Des Weiteren ist ein aktivierender Effekt von Ammonium auf das Enzym bekannt (Dobson, 1986; Wegener *et al.*, 1987). Diese Ergebnisse waren mit unserem

System im Aldolase-GDH-Assay mit PFK aus Rattenmuskel reproduzierbar. Für die entsprechenden Versuchsbedingungen siehe 3.2.5.

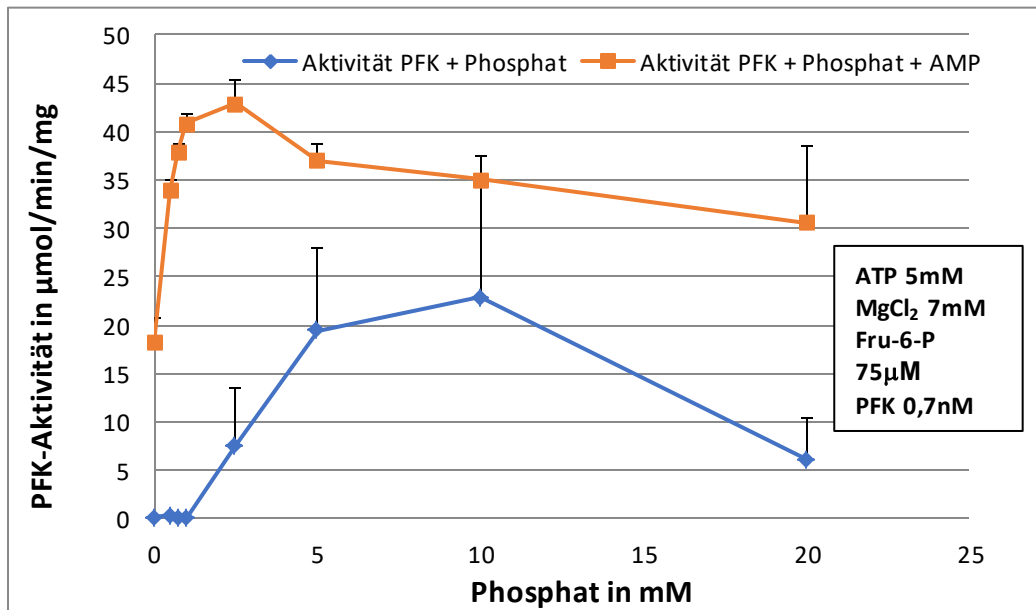


Abbildung 4.40: Aktivierung der PFK durch Phosphat und AMP. Auf der X-Achse ist die Phosphat-Konzentration in mM angegeben, auf der Y-Achse die enzymatische Aktivität in Micromol pro Minute pro Milligramm. Die Magnesiumkonzentration im Assay betrug 7mM, die ATP-Konzentration 5mM und die Fructose-6-P-Konzentration 75µM. Es befand sich 1mM AMP im Ansatz. Die Phosphatzugabe (NaP) wurde variiert. Zudem ist die Standardabweichung bei n=3 angegeben.

Wie erwartet konnte ein aktivierender Effekt von Phosphat auf die PFK-Aktivität im Assay gezeigt werden, wobei eine maximale Aktivierung bei etwa 5-10mM Phosphat zu beobachten war (siehe Abbildung 4.40). Die Zugabe von 1mM AMP führte zu einer weiteren Aktivierung, dieser Effekt war vor allem im Bereich niedriger Phosphatkonzentrationen stark ausgeprägt (<2,5mM Phosphat im Ansatz). Die Gegenwart von AMP bewirkt also nicht nur eine Steigerung der maximalen Aktivierung durch Phosphat auf circa das Doppelte, sondern vor allem eine extreme Linksverschiebung der Phosphat-Aktivierungskurve. Während $E_c=0,5$ ohne AMP bei circa 3mM Phosphat ist, wird sie durch AMP auf <0,5mM nach links verschoben. Auch die PFK-Hemmung durch $P_i > 10mM$ wird weitgehend aufgehoben.

4.5.2 Aktivierung der PFK-1 aus Rattenmuskel durch Ammoniumionen und Phosphat

Es ist beschrieben, dass auch Ammoniumionen einen aktivierenden Effekt auf die PFK-Aktivität ausüben. In Vorversuchen konnte eine Aktivierung durch Ammoniumsulfat nachgewiesen werden (7mM MgCl₂, ATP 5mM, 150µM Fructose-6-Phosphat, PFK 0,2nM im Ansatz), bei Durchführung der entsprechenden Messreihe mit Ammoniumchlorid konnte im optischen Test jedoch keinerlei enzymatische Aktivität detektiert werden. Es zeigte sich bei n=1 eine enzymatische Aktivität von 1,3µmol/min/mg bei Zugabe von 1mM Ammoniumsulfat, bei einer Zugabe von weniger als 0,2mM zeigte sich eine enzymatische Aktivität <0,1µmol/min/mg.

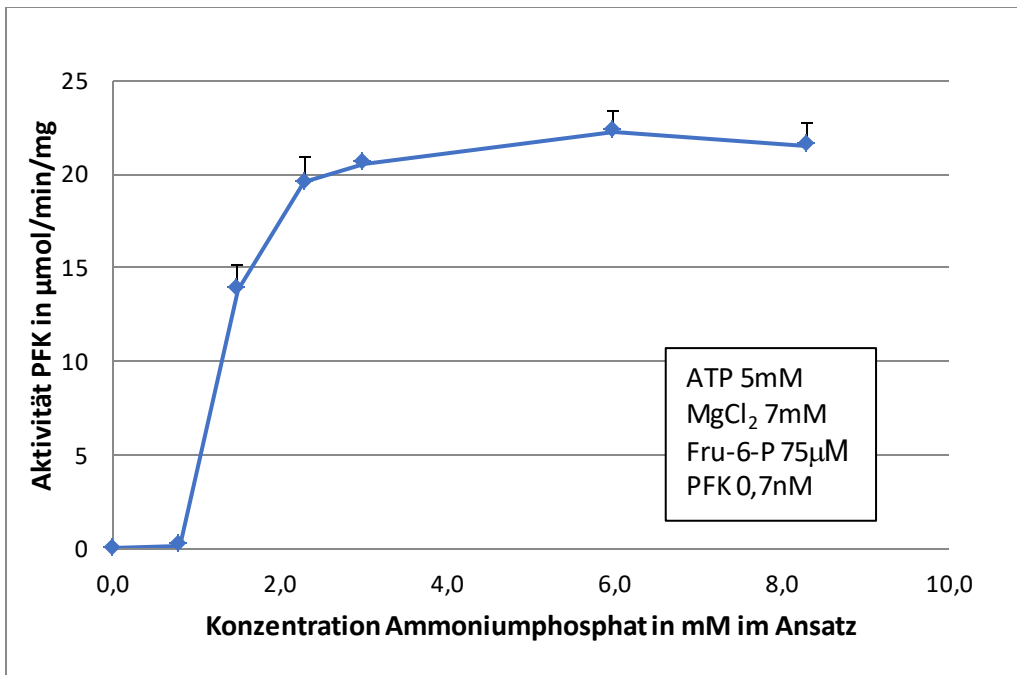


Abbildung 4.41: Ammoniumphosphatabhängigkeit der PFK-1 bei 5mM ATP, 7mM MgCl₂ und 75µM Fructose-6-Phosphat im Ansatz. Auf der X-Achse ist die Ammoniumphosphatkonzentration in Millimolar im Ansatz dargestellt, auf der Y-Achse die Aktivität der PFK in Micromol pro Minute pro Milligramm. Die Ammoniumphosphatkonzentration im Ansatz wurde variiert (0mM, 0,8mM, 1,5mM, 2,3mM, 3mM, 6mM, 8,3mM). Eingezeichnet ist zudem die Standardabweichung bei n=3.

Es stellte sich daher die Frage, ob eine Aktivierung durch Ammonium unter oben und in 3.2.5 genannten Bedingungen möglicherweise nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von Phosphat oder Sulfat möglich ist. In menschlichen Zellen findet sich deutlich mehr Phosphat als Sulfat, zudem spielt Ersteres eine wesentliche Rolle in der Glykolyse und auch bei anderen Stoffwechselreaktionen. Es wäre daher anzunehmen, dass *in vivo* Phosphat

diese Rolle übernimmt. Aus diesem Grund wurde eine weitere Kinetik zur Abhängigkeit der PFK-Aktivität von Ammoniumphosphat durchgeführt (Abbildung 4.41). Bis circa 0,8mM $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ fand sich keine Aktivierung, jedoch kam es danach zu einer viel steileren Aktivierungsfunktion mit $E_{C50} \cong 2,3\text{mM}$ statt circa 3mM ohne NH_4^+ mit Erreichen der maximalen Aktivierung bei etwa 4mM.

4.5.3 Bestimmung der Phosphatabhängigkeit der Glykolyse mit Extrakt aus Rattenmuskel mittels HPLC-Analytik

Mithilfe des Glykolyseassays mit Laktatbestimmung (3.2.8) und der HPLC-Analytik der Nukelotide (3.2.10) wurde zudem eine Gesamtglykolysemessung unter Zugabe unterschiedlicher Phosphatkonzentrationen zum Ansatz durchgeführt (Zugabe von 2mM, 5mM und 10mM Phosphat). Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Gesamtglykolyseaktivität bei steigender Phosphatkonzentration im Ansatz (Abbildung 4.42). Werte unter 2mM Phosphat konnten nicht gewählt werden, da P_i als Substrat der GAPDH nötig ist.

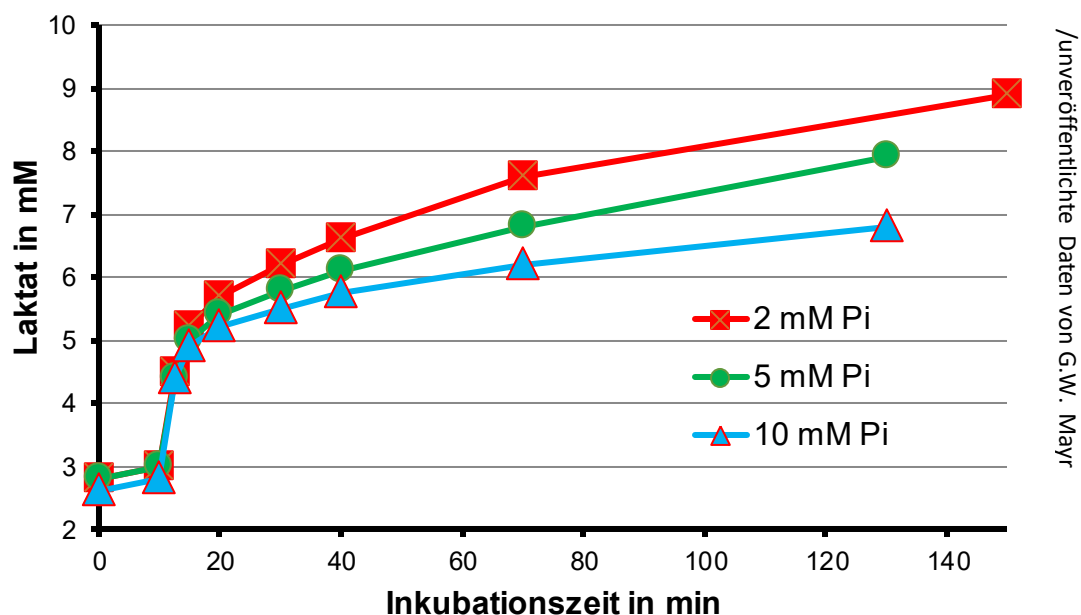


Abbildung 4.42: Gesamtglykolysemessung bei Variation der Phosphatkonzentration im Ansatz. Auf der X-Achse ist die Inkubationszeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Laktatkonzentration im Ansatz in Millimolar. Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Glykolyseaktivität von der Phosphatkonzentration im Ansatz. MgCl_2 -Konzentration im Ansatz betrug 3mM, die Phosphatkonzentration wurde variiert (2mM, 5mM, 10mM)

Die initiale Glykolyserate war hierbei wenig beeinflusst (Abbildung 4.43), wohl jedoch die Rate im Steady State (Abbildung 4.44). Da die initial schnelle

Glykolyse nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe vor allem durch hohes AMP bestimmt wird, ist für die beobachtete Art der Glykolyseaktivierung wohl die in Abbildung 4.40 mit AMP dargestellte Funktion der Phosphat-Aktivierung relevant. Die hier gemessene Abnahme bei höherem Phosphat entspricht der dort beobachteten höchsten PFK-Hemmung bei >2mM.

Abbildung 4.43 zeigt zudem die initiale Glykolyserate nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration im Ansatz bei konstanter

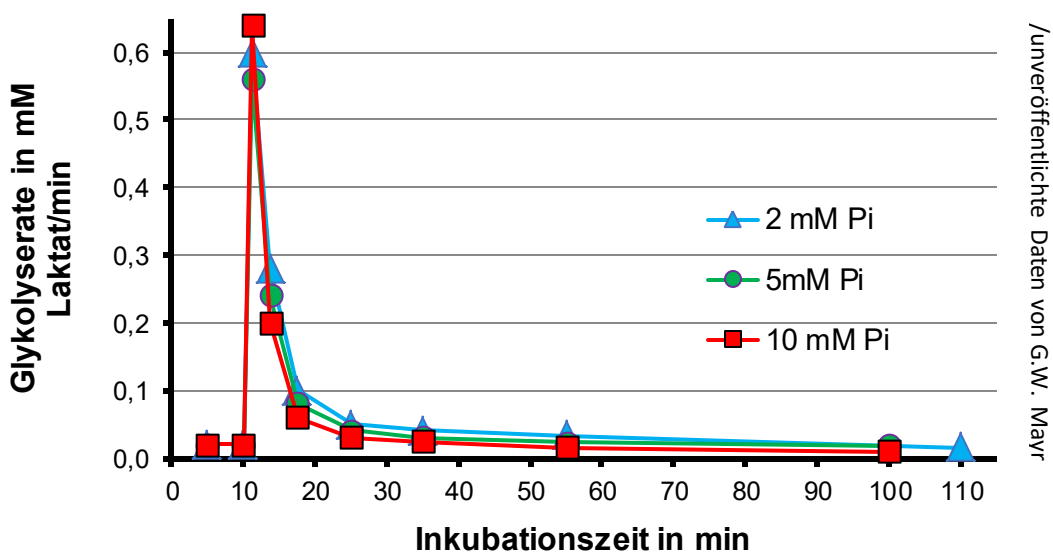
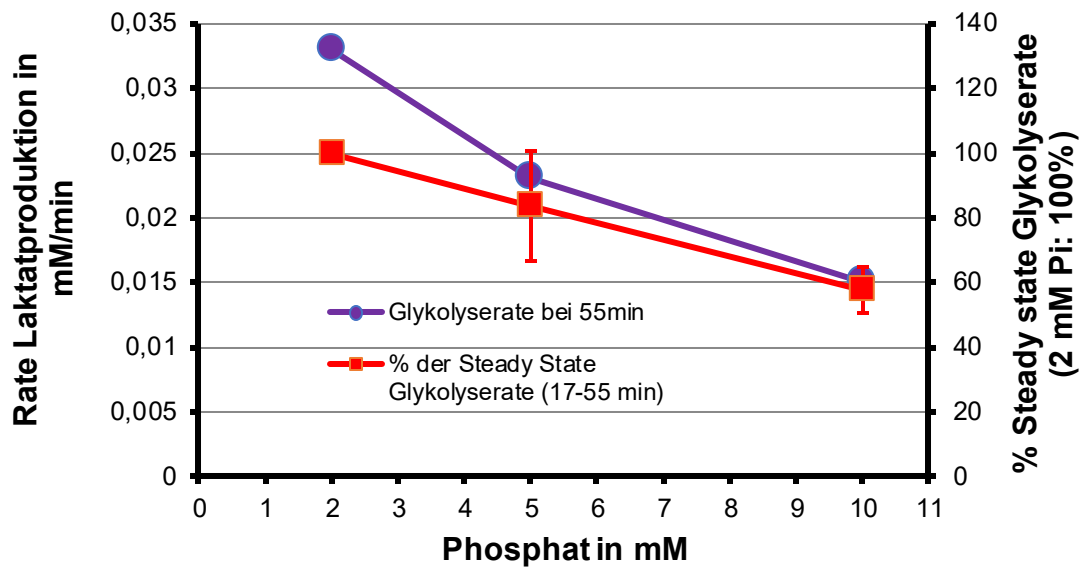


Abbildung 4.43: Glykolyserate in Abhängigkeit zur Phosphatkonzentration im Ansatz über die Zeit. Auf der X-Achse ist die Inkubationszeit in Minuten aufgetragen, auf der Y-Achse die Glykolyserate gemessen an der Laktatentstehung in Millimol pro Minute. Die zugegebene Phosphatmenge wurde variiert (2mM, 5mM, 10mM). Die Magnesiumchlorid-Konzentration betrug konstant 3mM. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied der initialen Glucose-6-Phosphat-Raten, im Verlauf ist jedoch eine höhere Rate bei niedriger Phosphatkonzentration im Ansatz zu beobachten (Abbildung 4.36).



/unveröffentlichte Daten von G.W. Mayr

Abbildung 4.44: Glykolyserate bei Variation der Phosphatkonzentration im Ansatz und in Prozent der Steady State Rate. Auf der X-Achse ist die Phosphatkonzentration in Millimolar aufgetragen, auf der linken Y-Achse die Glykolyserate repräsentiert durch die Laktatproduktion und auf der rechten Y-Achse die Glykolyserate in Prozent der Steady-State-Rate bei 2mM Phosphatzugabe.

Magnesiumzugabe von 3mM. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in der initialen Rate. Sieht man im Vergleich dazu Die Glykolyserate im Steady-State (bei Minute 55) in Abhängigkeit zur Phosphatkonzentration (Abbildung 4.44), zeigt sich bei höherer Phosphatkonzentration eine niedrigere Glucoserate im Zeitfenster zwischen 5 und 100 Minuten nach Glucose-6-Phosphat-Zugabe. Eine Hemmung der Glykolyse durch Phosphat scheint also insbesondere im Steady-State relevant zu sein, welcher in unserem Glykolyseassay eine Phase nach Muskelaktivität repräsentiert.

5. Diskussion

5.1 Kinetik der glykolytischen Kinasen - Bestimmung der K_m -Werte

Die Bestimmung der K_m -Werte der glykolytischen Kinasen für NTPs und NDPs wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob abgesehen von Adeninnukleotiden auch Guanin- oder Uracilnukleotide als Substrate der glykolytischen Schlüsselenzyme dienen und um festzustellen, wie hoch die entsprechende Affinität ist. Warum ist dies interessant? Im Einleitungsteil wurde bereits dargelegt, dass eine Verschiebung des NTP/NDP-Verhältnisses eine Änderung der freien Magnesiumkonzentration nach sich zieht, da NTPs eine höhere Komplexkonstante gegenüber dem Kation aufweisen als NDPs (Komplexkonstante $\text{ATP}(\text{Mg}^{2+}) = 4,143$, Komplexkonstante $\text{ADP}(\text{Mg}^{2+}) = 3,211$, Maxchelator.stanford.edu) (2.4). Ein Anstieg der NTP-Konzentration führt somit zu einer vermehrten Komplexierung von Magnesium und in der Folge zu einer Verringerung der Menge an freiem Magnesium. Umgekehrt bedingt eine Dephosphorylierung zu NDP die Freisetzung des Kations (2.4). Durch Nutzung von GTP/UTP beziehungsweise GDP/UDP als Substrat könnten die Schlüsselenzyme der Glykolyse so die freie Magnesiumkonzentration beeinflussen. Ferner ist bei deutlich höherer Affinität zu ATP/ADP eine Hemmung durch steigende Konzentrationen der anderen Nukleotide denkbar, da eine Konkurrenz um die Komplexierung von Magnesium entstünde. Da allerdings ATP beziehungsweise ADP nur im Komplex mit dem divalenten Kation als Substrat der Kinasen dienen und als freies Nukleotid sogar hemmende Eigenschaften haben kann, wäre eine Inhibition insbesondere der PFK auf diesem Wege denkbar. Bei der oxidativen Phosphorylierung werden sowohl die Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse als auch NADH aus dem Citratzyklus hochselektiv nur zur Phosphorylierung von ADP zu ATP verwendet (Aprille, 1988; Bose *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 2016). Eine nicht selektive Verwertung und Generierung anderer NTPs könnte daher über eine Änderung des NTP/NDP-Verhältnisses die Konzentration des freien Magnesiums beeinflussen und so regulatorisch wirken.

5.1.1 Hexokinase

Die Untersuchung der Kinetik der Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* für ATP, GTP und UTP zeigte eine klare Präferenz des Enzyms für ATP (4.2.1), die sich durch einen deutlich geringeren K_m -Wert des Enzyms für dieses Triphosphat äußert. Für UTP war kein K_m -Wert bestimmbar, da mit unserem Assay keine enzymatische Aktivität nachweisbar war. Wir verwendeten für unsere Versuche stets Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae*. Hefen besitzen zwei unterschiedliche Hexokinase-Unterformen, HK PI und PII, welche sich in 76% ihrer Aminosäuresequenz entsprechen (Entian *et al.*, 1985; Kuser *et al.*, 2000). Das im Assay verwendete Enzympräparat stellte eine Mischung dieser beiden Unterformen dar. Vergleicht man den von uns gemessenen Wert mit Werten aus der Literatur, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung (4.2.1). Eine Beeinflussung des GTP/GDP- beziehungsweise UTP/UDP-Verhältnisses durch HK erscheint daher unwahrscheinlich sowie eine daraus möglicherweise resultierende Änderung der freien Magnesiumkonzentration.

Sequenzanalysen zeigten eine hohe strukturelle Übereinstimmung von Säugetier- und Hefen-Hexokinase (Kleywegt and Jones, 1996; Kuser *et al.*, 2000). Anhand unserer Versuche ist keine Aussage bezüglich der Regulation der Säugetier-HKs möglich, allerdings zeigen K_m -Wert-Messungen mit Enzym aus *Homo sapiens* eine deutlich höhere Affinität der humanen HK zu ATP als zu UTP ($K_{mATP}(HK) = 100\mu M$ (Anna L. Gloyn *et al.*, 2005) gegenüber $K_{mUTP}(HK) = 5.000\mu M$ (Magnani *et al.*, 1988)). Wegen der großen strukturellen Übereinstimmung von humanen und Hefe-Enzymen ist eine ähnlich spezifische Präferenz der Enzyme für ATP zu erwarten.

5.1.2 Phosphofruktokinase-1

Im Gegensatz zu Hexokinase konnte Phosphofruktokinase-1 aus Rattenmuskel in unseren Versuchen sehr gut MgGTP und MgUTP als Substrat nutzen (4.1.2). Jedoch wies auch dieses Enzym eine höhere Affinität zu MgATP auf (4.1.2). Der Vergleich mit Literatur-Werten zeigte wieder eine gute Übereinstimmung unserer Daten.

Aufgrund der dargelegten Ergebnisse wäre eine Utilisation von GTP und UTP als Substrat denkbar, wodurch eine Beeinflussung des NTP/NDP-Verhältnisses möglich wäre. Dies wiederum könnte eine Änderung der freien Magnesiumkonzentration zur Folge haben, durch welche eine zusätzliche

Magnesium-Regulation der gesamten Glykolyse denkbar wäre (5.3.4, 5.5). Allerdings zeigen die Massenbestimmungen der Nukleotide in Rattenmuskelextrakt (Abb. 4.28 und Tab. 4.5), dass nur GTP eine wesentliche Rolle neben ATP spielen könnte.

5.1.3 Phosphoglyceratkinase

Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigte interessanterweise sogar eine höhere Affinität zu GDP als zu ADP, was sich in einem 3-fach höheren K_m -Wert für ADP als für GDP äußerte (4.1.3). Das Enzym konnte zudem auch UDP als Substrat umsetzen. Der Vergleich mit der Literatur ergab zwar eine leichte Diskrepanz hinsichtlich der absoluten Werte (4.1.3), die Beobachtung, dass Hefen-PGK eine höhere Affinität zu GDP als zu ADP aufweist, ließ sich allerdings auch hier finden (Encalada *et al.*, 2009). Für humane PGK ließ sich allerdings auch kein K_{mGDP} für Säugetier-PGK ausfindig machen (4.1.3). Allerdings führten Soong & O'Sullivan Versuche mit PGK aus humanen Erythrozyten durch, bei denen sie im Rahmen der Umwandlung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat die Affinität des Enzyms zu MgATP und MgGTP untersuchten. Hierbei zeigte sich eine größere Affinität zu ATP als zu GTP (Soong and O'sullivan, 1975).

Da aufgrund unserer Experimente keine Aussage bezüglich einer Nutzung von GDP/GTP und UDP/UTP durch das Säugetier-Enzym möglich war, verglichen wir zunächst die Aminosäuresequenzen von Säugetier- und Hefeenzym. Sie zeigten eine Übereinstimmung von 64% (Perkins *et al.*, 1983). Bei Säugern wird bei Glykolyseenzymen durch organspezifische Enzym-Isoformen eine organspezifische Stoffwechselaktivität ermöglicht. Als Beispiel dient hier die Expression von HK IV in Leber und Pankreas, welche als Glucokinase einen deutlich höheren K_m -Wert für Glucose aufweist, als alle anderen humanen HKs (2.3.2). Für Phosphoglyceratkinase sind im Menschen lediglich zwei Isoenzyme bekannt, von denen eines allerdings ausschließlich im Hoden exprimiert wird (Liu *et al.*, 2015).

PGK nimmt unter den untersuchten Kinasen eine Sonderstellung ein: das Enzym katalysiert sowohl die Reaktion von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat, wobei NDP zu NTP reagiert, als Teil der Glykolyse, als auch die umgekehrte Umwandlung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-

Bisphosphoglycerat im Rahmen der Gluconeogenese in Leber und Niere. Das Enzym arbeitet nahe am kinetischen Gleichgewicht. Alle anderen untersuchten Kinasen katalysieren als Schlüsselenzyme Reaktionen, die aufgrund ihrer freien Reaktions-Enthalpie nur in eine Richtung ablaufen können (2.2, 2.3).

Eine Beeinflussung des NTP/NDP-Verhältnisses durch PGK scheint also durchaus denkbar. Ist das Enzym als Teil der Glykolyse aktiv, würde vermehrt NTP aus NDP gebildet werden, es käme somit zu einer Abnahme der freien Magnesiumkonzentration. Dies wiederum könnte eine Hemmung der Glykolyse bei zunehmendem NTP im Sinne eines Feedback-Hemmmechanismus zur Folge haben. Außerdem stellt das Enzym zusammen mit GAPDH ein Phosphat-Sensor-System dar, das heißt, Änderungen des freien Phosphats können die Glykolyseaktivität beeinflussen.

5.1.4 Pyruvatkinase

Die Kinetik der Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel für ADP, GDP und UDP zeigte eine deutliche Präferenz des Enzyms für ADP, welche sich in um ein Vielfaches höheren K_m -Werten für GDP und UDP widerspiegelt (4.1.4). Der Vergleich mit Werten aus der Literatur zeigt eine gute Übereinstimmung (4.1.4), was für die Verlässlichkeit unserer Messungen spricht. Da ein Säugetier-Muskelenzym verwendet wurde, lassen sich die bestimmten Werte mit hoher Wahrscheinlichkeit gut auf den Menschen übertragen.

5.1.5 Zusammenfassende Diskussion der Sensitivität der glykolytischen Kinasen für ATP/ADP, GTP/GDP und UTP/UDP

Es ließ sich feststellen, dass im Rahmen der gegebenen Versuchsbedingungen – mit Ausnahme von Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae* – alle Enzyme die höchste Affinität und Selektivität gegenüber Adeninnukleotiden aufwiesen. Die Präferenz der untersuchten PGK für GDP lässt sich, wie unter 5.1.3 erläutert, höchst wahrscheinlich nicht auf das humane Enzym übertragen. Nichtsdestotrotz konnten GTP beziehungsweise GDP und UTP beziehungsweise UDP durch alle Enzyme umgesetzt werden, die höchste Adeninnukleotid-Spezifität wies HK auf, was in der Gate-Keeper-Funktion des Enzyms begründet liegen könnte (2.3.1). Eine Beeinflussung der freien Mg-

Konzentration wäre, außer durch das ATP/ADP-Verhältnis, vor allem durch das GTP/GDP-Verhältnis möglich (Abb. 4.28 und Tab 4.5). Dies könnte die Aktivität der Glykolyse regulatorisch beeinflussen. Da MgGTP und MgUTP schlechtere Substrate für HK und PFK darstellen, würde eine Verschiebung des $[MgATP]/[MgGTP][MgUTP]$ -Verhältnisses zugunsten von MgGTP und MgUTP *de facto* vor allem eine Inhibition der PFK zur Folge haben.

Alle untersuchten Enzyme zeigten eine Präferenz für Adeninnukleotide >> Guaninnukleotiden > Uridinnukleotiden. Dies lässt vermuten, dass *in vivo* neben Adeninnukleotiden Guaninnukleotiden eine gewisse Rolle bei der Glykolyse-Regulation zukommt.

Bei der Analytik der Nukleotide im ruhenden Rattenskelettmuskel mittels HPLC (Abbildung 4.28) zeigte sich ein deutliches Überwiegen der Adeninnukleotidkonzentrationen gegenüber jenen der Guaninnukleotide. Uridinnukleotide scheinen keine Rolle zu spielen.

5.2 Beeinflussung der PFK-1-Aktivität aus Rattenmuskel durch Veränderung des freien Magnesiums und Änderung des Nukleosidtriphosphat-zu -diphosphat-Verhältnisses

In 4.3 konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Nukleosidtri- und diphosphate (ATP, GTP, UTP, ADP, GDP, UDP) im Überschuss über Magnesium, das heißt als freie Nukleotide hemmend auf die Aktivität der Phosphofruktokinase-1 aus Rattenmuskel wirkten (5.4.3). Dieser Effekt konnte durch anschließende Magnesiumzugabe im Exzess unterschiedlich gut antagonisiert werden, wobei eine vollständige Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität lediglich bei Mg-Komplexierung des Überschusses an ATP und GTP zu beobachten war. Interessanterweise zeigte sich nach Zugabe von GTP und GDP eine stärkere Reaktivierung des Enzyms bei geringerer Magnesiumzugabe (Abb. 4.11 und 4.14). Auffällig ist jedoch, dass dieser Effekt jeweils ausschließlich bei den Guaninnukleotiden auftauchte. Dieses Phänomen lässt sich am ehesten durch eine hemmende Wirkung des MgGTP- beziehungsweise MgGDP-Komplexes auf die PFK erklären. Das heißt eine etwa stöchiometrische Zugabe von $MgCl_2$ zu dem vorher zugegebenen GTP oder GDP erhöht das freie Magnesium und damit den Anteil an MgATP im Assay auf

nahezu hundert Prozent – was aktivierend wirkt – wohingegen mehr Magnesium-Zugabe auch die Bildung von MgGTP und MgGDP erlaubt. Die Bindung der letzteren Komplexe an vermutlich eine regulatorische Nukleotidbindungsstelle der PFK-1 scheint eine allosterische Hemmung der PFK-Aktivität bei Nutzung von MgATP als Substrat zu bewirken. Da der Effekt auch durch MgGDP beobachtbar ist, muss es sich um eine allosterische Hemmwirkung handeln.

Eine gute Vereinbarkeit zeigten die Beobachtungen zur Hemmung und Reaktivierung am ATP-Ansatz jedoch mit den in 4.2.2 beschriebenen Versuchen zur Magnesiumabhängigkeit der PFK. Hier hatte sich gezeigt, dass unter Konstanthaltung der Mg/ATP-Verhältnisses keinerlei Hemmung des Enzyms bei Steigerung der ATP-Konzentration im Ansatz zu beobachten war. Otto et al. hatten bereits 1974 darauf hingewiesen, dass Magnesium über eine Komplexierung von ATP die hemmende Wirkung von freiem ATP auf die PFK antagonisieren könnte (Otto *et al.*, 1974). Diese Annahme wird durch die in 4.2.2 und 4.3 beschriebenen Ergebnisse stark untermauert.

ADP übt in millimolaren Konzentrationen einen allosterischen, hemmenden Effekt auf die enzymatische Aktivität der PFK aus (Mediavilla, Metón and Baanante, 2008; Brüser *et al.*, 2012). Dies konnte in unseren Versuchen (4.3) bestätigt werden.

Insgesamt war bezüglich einer Regulation der PFK durch GTP, GDP, UTP und UDP wenig Vergleichbares in der Literatur zu finden. Die diesbezüglichen Angaben auf *brenda-enzymes.org* bezogen sich lediglich auf die Kinetik pflanzlicher oder bakterieneigener Enzyme. Da die Säugetier-PFK gegenüber ihrem mutmaßlichen bakteriellen Vorläufer-Enzym eine starke evolutionäre Weiterentwicklung erfahren hat und sich daher hinsichtlich ihrer Regulationsmechanismen grundlegend von Letzterem unterscheidet, ist ein Übertragen von Eigenschaften der bakteriellen oder pflanzlichen Enzyme auf das von uns untersuchte Rattenmuskelenzym obsolet. Jedoch ist eine Inhibition von PFK aus Bakterien (*Methanococcus maripaludis*, *Enterobacter aerogenes*) und Pflanzen (*Solanum lycopersicum*) durch GDP, GTP und UTP bekannt (Isaac and Rhodes, 1986; Yu, Ladapo and Whitman, 1994). Für GDP wird ein aktivierender Effekt auf PFK aus verschiedenen Bakterienarten (*Escherichia coli*, *Geobacillus stearothermophilus*) angegeben (Deville-Bonne, Bourgain and

Garel, 1991; Byrnes *et al.*, 1994; Yu, Ladapo and Whitman, 1994). Die GDP-Konzentrationen lagen hierbei im micromolaren (*Escherichia coli*) bis millimolaren (*Geobacillus stearothermophilus*) Bereich (Deville-Bonne, Bourgain and Garel, 1991; Zhu *et al.*, 1995).

Da es in unseren Versuchen nach Zugabe von GTP und UTP durch Hinzufügen von Magnesium im Überschuss nicht zu einer vollständigen Reaktivierung der enzymatischen Aktivität kam, wäre es denkbar, dass diese Nukleotide in einer anderen Weise hemmend auf die Aktivität der PFK wirken, als ATP. In 5.1.2 wurde eine mögliche Hemmung der PFK durch MgUTP- und MgGTP-Bildung in Konkurrenz mit ATP um freies Magnesium diskutiert. Unter den für die Nukleotidversuche gewählten Bedingungen (3.2.4, 4.3) müsste jedoch sowohl zur Sättigung von ATP als auch von GTP beziehungsweise UTP mit Magnesium eine ausreichende Menge des Kations im Ansatz vorhanden sein: Initial befinden sich 6mM Magnesium und 5mM ATP im Ansatz, ATP liegt also zu nahezu hundert Prozent im Komplex mit Magnesium vor. Nach Zugabe von 3mM UTP beziehungsweise GTP kommt es zu einem Magnesiumaustausch, sodass voraussichtlich nicht mehr das gesamte vorhandene ATP magnesiumgebunden vorliegt, es kommt zur Hemmung der PFK. Da anschließend aber 5mM Magnesium zugegeben werden, müsste dieses sowohl zur Komplexierung von ATP als auch von GTP und UTP ausreichen (insgesamt 8mM NTP und 11mM MgCl₂). Es ist jedoch denkbar, dass MgUTP beziehungsweise freies UTP und MgGTP beziehungsweise freies GTP an eine allosterische, inhibitorische Bindestelle binden und auch bei Steigerung der Magnesiumkonzentration im Ansatz nicht von dieser abdiffundieren. Bei niedrigeren Magnesiumkonzentrationen ist jedoch auch eine Konkurrenz von ATP vs. GTP und UTP um Magnesium aufgrund der deutlich niedrigeren Affinität der PFK zu MgGTP und MgUTP denkbar ($K_m(\text{ATP})=31,1 \pm 5,5\mu\text{M}$ gegenüber $K_m(\text{GTP})=86,9 \pm 18,7\mu\text{M}$ und $K_m(\text{UTP})=134 \pm 34,6\mu\text{M}$, 4.1).

GDP und UDP könnten hingegen auf ähnliche Weise hemmend auf die Aktivität des Enzyms wirken, wie ADP und dies vielleicht im Falle von GDP der MgGDP-Komplex in stärkerem Ausmaß.

In allen durchgeführten Versuchen konnte eine Aktivierung der PFK durch Zugabe von Nucleosidmonophosphaten gezeigt werden (4.3). Dieser Effekt ließ sich auch in Versuchen mit Kaninchenmuskel-Enzym reproduzieren. Für AMP

ist dieser Effekt bekannt (2.3.2, 4.5, 5.6). Leider konnten wir bei unserer Recherche keine Literaturangaben zur Aktivierung von Säugetier-PFK durch GMP und UMP finden, denkbar wäre jedoch eine gemeinsame Nucleosidmonophosphat-Bindungsstelle des Enzyms. Die HPLC-Analyse des Muskelextrakts aus Rattenmuskel (siehe Kapitel 4.4.5) ergab Konzentrationen von 0,35mM AMP, 0,033mM GMP, 0,34mM UMP und 1,56mM IMP im ruhenden Muskel. IMP stellte also mit Abstand die größte Fraktion der Monophosphate dar, gefolgt von AMP und UMP, GMP liegt in mehr als 10-fach geringerer Konzentration vor. IMP haben wir hinsichtlich einer Aktivierung der PFK nicht untersucht, es wäre denkbar, dass es ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf das Enzym ausübt. Eine Aktivierung der PFK-1 durch IMP oder UMP könnte also durchaus relevant sein.

5.3 Effekte von Magnesium auf die Enzyme der Glykolyse

Wie bereits zuvor dargelegt, ist Magnesium als Komplexmetallion in MgATP essentiell für viele Reaktionsschritte der Glykolyse (2.3, 2.4). Wir haben uns die Frage gestellt, ob Magnesium über seine Eigenschaft als Cofaktor hinaus regulatorisch auf die Schlüsselenzyme der Glykolyse einwirken könnte (1, 2.4). Laughlin & Thompson haben dies bereits für Enzyme aus humanen Erythrozyten untersucht und konnten eine Abhängigkeit des gesamten Stoffwechselweges sowie insbesondere der PFK von freiem Magnesium zeigen. Allerdings sei die notwendige Menge an Magnesium so gering, dass intrazellulär stets eine ausreichende Menge zur vollständigen Aktivierung der Glykolyse vorhanden ist. Eine Regulation über diesen Mechanismus halten die Autoren daher für äußerst unwahrscheinlich (Laughlin and Thompson, 1996). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die muskuläre Glykolyse hinsichtlich eines möglichen, zusätzlichen physiologischen Regulationsmechanismus durch Magnesium zu untersuchen. Hierzu haben wir uns zunächst der Untersuchung der einzelnen Schlüsselenzyme gewidmet (3.2.3, 4.2).

5.3.1 Hexokinase

Gerber et al. führten im Jahre 1973 mittels optischem Test Versuche mit Hexokinase aus humanen Erythrozyten durch (pH 7,2, 37°C, MgATP 1,0-

2,1mM), wobei sich zeigte, dass Magnesium im Überschuss über ATP bis zu 4mM eine Verdopplung der enzymatischen Aktivität nach sich zog ($K_{Mg^{2+}}=1,0mM$), bei höheren Konzentrationen wurde eine Inhibition beobachtet (Gerber, G.; Preissler, H.; Heinrich, 1974). In unseren Versuchen verwendeten wir Hexokinase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Da Hexokinase ein Bisubstratenzym ist und neben Glucose auch MgATP als Substrat nutzt, war zu erwarten, dass bei fehlendem Magnesium im Ansatz keine enzymatische Aktivität zu beobachten wäre. Eben dies war auch der Fall bei unseren Versuchen mit Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (4.2.1). Nun stellte sich die Frage, ob über das 1:1-Verhältnis von ATP zu Magnesium hinaus noch eine weitere Steigerung der HK-Aktivität zu beobachten wäre, wodurch die Ergebnisse von Gerber et al. bestätigt werden könnten (Gerber *et al.*, 1974). Hefen besitzen zwei Arten von Hexokinasen: HK PI und PII, welche sich in ihren regulatorischen Eigenschaften im Hinblick auf Magnesium und ATP unterscheiden (Bachelard, 1971; Purich and Fromm, 1972; Peters and Neet, 1977; Norton and Feldman, 1980; Moreno *et al.*, 1986). Moreno et al. (1986) beschreiben eine maximale enzymatische Aktivität für PI bei einer MgATP-Konzentration von 1,5mM im optischen Test, eine Hemmung oder Aktivierung durch freies ATP oder freies Magnesium wurde nicht beobachtet. Für HK PII aus Hefen geben die Autoren eine maximale Aktivierung bei 0,75mM MgATP an, höhere Konzentrationen wirkten hemmend. Auch freies ATP habe eine hemmende Wirkung. Freies Magnesium hingegen zwischen 4mM und 7mM führte in den Experimenten von Moreno et al. bei niedrigem freien ATP (0,01mM) zu einer vollständigen Aktivierung der HK PII (Moreno *et al.*, 1986). Norton und Feldmann beschrieben des Weiteren, dass Magnesium durch Herbeiführen einer Konformationsänderung zur Verstärkung der Glucose-Bindung in Hefen beitrage, sie postulieren daher auch einen Beitrag des Kations zur Regulation der Hefe-HKs *in vivo* (Norton and Feldman, 1980). Peters & Neet postulierten hingegen, Magnesium sei nur als Substrat MgATP in die Katalyse der HK involviert (Peters and Neet, 1977). Insgesamt gehen die Meinungen hinsichtlich einer regulatorischen Funktion von Magnesium in Bezug auf die Aktivität der HK aus Hefen also auseinander.

Die präsentierten Versuche (4.2.1) sind in den diesbezüglichen Aussagen begrenzt. Die ATP-Konzentration im Ansatz betrug jeweils 1mM, die

korrespondierende Magnesiumchlorid-Konzentration wurde variiert. Es wurde keine Messung bei 1:1-Verhältnis Magnesium zu ATP durchgeführt, jedoch das ATP bei konstantem Magnesium im Überschuss variiert (4.2.1 und Tab. 4.1). Aufgrund der Komplexbildungseigenschaften von Magnesium gegenüber ATP ergäbe sich in Abbildung 4.1 eine starke, nahezu vollständige Bindung des freien ATPs bei circa 50% Magnesium-Sättigung, sofern nicht an der ATP-Bidnungsstelle auch das Mg^{2+} im Komplex mit ATP besser gebunden würde. Bei einer weiteren Steigerung der Magnesiumkonzentration über das 1:1-Verhältnis hinaus läge hingegen freies, regulatorisches Magnesium vor.

Eine weitere Schwachstelle stellt die Verwendung des Hefe-Enzyms dar, welches auch in anderen Studien bereits häufig zur Untersuchung der Hexokinase-Eigenschaften herangezogen wurde. Einerseits handelte es sich um eine Enzymgemisch mit HK PI- und PII-Anteilen, sodass die zum Teil unterschiedlichen, kinetischen Eigenschaften der beiden Isoenzyme nicht analytisch separiert werden konnten. Zudem besteht zwar generell eine große genetische Übereinstimmung zwischen HK aus *Saccharomyces cerevisiae* und dem entsprechenden Enzym aus Säugetiermuskel (5.1.1), Unterschiede – gerade im Hinblick auf die enzymatische Regulation – sind jedoch durchaus denkbar. Einen Hinweis auf eine Regulation des Säugtierenzym liefern die Erkenntnisse von Gerber et al., die eine Aktivierung der HK aus humanen Erythrozyten durch freies Mg^{2+} zeigen konnten (Gerber et al., 1974; Gerber, G.; Preissler, H.; Heinrich, 1974). Kristallstrukturanalysen der humanen Hexokinase zeigen die Bindung mehrerer Magnesium-Ionen pro Molekül (Rosano et al., 1999), vergleichbare Studien des Hefe-Enzyms waren bei der Recherche leider nicht zu finden. Interessant im Hinblick auf einen möglichen Regulationsmechanismus der Glykolyse im Muskel wäre vor allem eine Untersuchung humaner HK II, da diese hauptsächlich in insulinsensitivem Gewebe wie Skelettmuskulatur und Fett exprimiert wird und hier als "Glucosefalle" agiert, die zytosolische, freie Glucose praktisch sofort verschwinden lässt (2.3.1). Dies könnte einen möglichen Ansatz für weitere experimentelle Untersuchungen darstellen. Das Enzym stand aber leider nicht zur Verfügung und konnte von mir aus Zeitgründen auch nicht selbst hergestellt werden.

Da wir das menschliche Muskelenzym HKII nicht direkt untersuchen konnten, wurden die Gesamtglykolysemessungen bereits direkt mit Glucose-6-Phosphat gestartet, um Effekte von Magnesium auf HK auszuschließen. Es wurde so die Situation einer schnellen Phosphorylaseaktivierung mit Bildung von Glucose-1-Phosphat aus Glykogen mit anschließender, ebenso schneller Isomerisierung zu Glucose-6-Phosphat nachgeahmt.

5.3.2 Phosphofructokinase-1

Phosphofructokinase-1 ist das wichtigste Schlüsselenzym der Glykolyse, wodurch seiner Regulation eine besonders große Bedeutung zukommt (2.2, 2.3.2). Bereits im Jahre 1974 setzten Otto et al. sich mit der Rolle von Magnesium als potentielltem Regulator der PFK aus Rattenmuskel auseinander, kamen allerdings zu dem Schluss, dass es zu keiner direkten Aktivierung des Enzyms durch das divalente Kation käme (2.4). Die Autoren postulierten lediglich eine Aufhebung der Inhibition durch ATP und eine daraus *de facto* erfolgende Aktivierung des Enzyms (Otto et al., 1974). Dies ist sehr gut mit den Ergebnissen unserer Vorversuche vereinbar (4.2.2), bei denen gezeigt werden konnte, dass die bekannte Hemmung der PFK durch ATP bei proportionaler Steigerung der Magnesiumzugabe im Ansatz auch bei Erhöhung der ATP-Konzentration unterbunden werden konnte (Abbildung 5.2, Kapitel 4.2.2). Es scheint also das freie ATP zu sein, welches hemmend auf die enzymatische Aktivität wirkt. Bei Zugabe von Magnesium kommt es zu einer nahezu vollständigen Komplexbildung des Adenosintri-phosphats aufgrund der hohen Komplexkonstante von ATP für Magnesium ($K_A = 4,143$, *maxchelator.stanford.edu*). Die hemmende Wirkung des freien ATPs kann dadurch aufgehoben werden. Paetkau und Lardy konnten unter den von ihnen gewählten Versuchsbedingungen zeigen, dass Kaninchen-Muskel-PFK nicht aktiv ist, wenn die Konzentration von Magnesium im Ansatz jene von ATP nicht überschreitet (Paetkau and Lardy, 1967).

Nun stellt sich allerdings weiterhin die Frage, ob Otto et al. Recht behalten und die regulatorische Wirkung von Magnesium auf die PFK ausschließlich auf der Aufhebung der Hemmung durch freies ATP beruht. Rivas-Pardo et al. untersuchten PFK aus *E. coli* und kamen zu dem Schluss, dass für eine vollständige Aktivierung des Enzyms das Vorhandensein eines zweiten

divalenten Kations außerhalb des Enzym-Substrat-Komplexes absolut unabdinglich sei. Allerdings wurde nach Aussage der Autoren Mangan dreizehnmal stärker gebunden, als Magnesium (Rivas-Pardo *et al.*, 2011). 1975 berichteten Lerch *et al.* eine Präferenz des Enzyms für Magnesium gegenüber Mangan (Lerch, Muir and Fischer, 1975). Weitere Versuche mit Phosphofruktokinase aus Hefe, in denen ITP als alternatives Substrat genutzt wurde, zeigten, dass die Aktivität des Enzyms sowohl von der Konzentration des MgITPs als auch von jener der freien Mg^{2+} -Ionen abhängig war (Mavis and Stellwagen, 1970).

Auch das Enzym aus *Trypanosoma brucei* scheint zusätzlich freies Magnesium für eine vollständige Aktivierung zu benötigen (Cronin and Tipton, 1987).

Akkerman *et al.* (1974) stellten fest, dass eine maximale Aktivierung der PFK aus humanen Blutplättchen dann erreicht wurde, wenn die Konzentration von Magnesium jener von $MgITP^{2-}$ entsprach oder diese sogar überschritt, bei hohen MgATP-Konzentrationen beobachteten sie zusätzlich eine Verstärkung der Inhibition durch freies ATP (Akkerman *et al.*, 1974).

Schlussendlich sind auch Laughlin & Thompson im Rahmen ihrer Versuche zur regulatorischen Rolle von freiem Magnesium in der Glykolyse humaner Erythrozyten zu dem Schluss gekommen, dass das Vorhandensein freier Magnesium-Ionen eine Voraussetzung der enzymatischen Aktivität der PFK darstellt (Laughlin and Thompson, 1996).

Zusammenfassend ergibt sich aus dem Studium der Literatur, dass das Vorhandensein freier divalenter Kationen höchstwahrscheinlich wichtig für die vollständige Aktivierung der Phosphofruktokinase-1 ist. Diese Eigenschaft wird für Isoenzyme aus verschiedensten Organismen berichtet. Im menschlichen Körper stellt Magnesium intrazellulär das am häufigsten vorkommende divalente Kation dar. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Funktion hier durch Magnesium übernommen wird. In unseren Versuchsreihen wurde Enzym aus Rattenmuskel verwendet. Die ATP-Konzentration wurde konstant bei 5mM gehalten, die zugegebene Menge an Magnesiumchlorid zum Ansatz wurde variiert. Die Ergebnisse weisen im Bereich $[MgCl_2] < [ATP]$ im Ansatz eine starke Streuung auf (Abbildung 4.3). Dennoch ergibt sich wie erwartet das Bild einer proportional zur steigenden Magnesiumkonzentration zunehmenden enzymatischen Aktivität. Ab Erreichen des 1:1-Verhältnisses von Magnesium

und ATP im Ansatz und bei weiterer Steigerung der Magnesiumzugabe darüber hinaus ist keine deutliche Aktivitätszunahme mehr zu verzeichnen, alle gemessenen Werte liegen im Bereich der Standardabweichung der übrigen Werte mit $[MgCl_2] \geq [ATP]$. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse lässt sich daher keine eindeutige Aussage bezüglich einer direkten Aktivierung der Rattenmuskel-PFK durch freies Magnesium zusätzlich zu MgATP treffen. Hierzu nötige weitere Experimente haben aber den Rahmen der vorliegenden Arbeit überstiegen. Stattdessen konnten durch die oben diskutierten konsekutiven Zugabeexperimente wesentliche weitere Regel-Aspekte aufgezeigt werden.

5.3.3 Phosphoglyceratkinase

Bereits im Jahre 1967 konnte Larsson-Raznikiewicz zeigen, dass PGK durch geringe Konzentrationen verschiedener multivalenter Anionen wie Pyrophosphat, Sulfat, Phosphat und Citrat aktiviert wird. Zusätzlich beschrieb er eine Aktivierung des Enzyms durch hohe Konzentrationen von MgATP und 3-Phosphoglycerat (Larsson-Raźnikiewicz, 1967). Wie bereits in 2.3.4 und 2.4 dargelegt, benötigt Phosphoglyceratkinase MgNTP oder MgNDP als Substrat, um katalytisch aktiv sein zu können (2.3.4, 3.2.3.3, 4.2.3, Ponce, Roth and Harkness, 1971). Es war daher zu erwarten, dass sich in den Versuchsreihen zur Magnesiumabhängigkeit der PGK bei vollständigem Fehlen von divalenten Kationen im Ansatz aufgrund des Substratmangels keine enzymatische Aktivität einstellen würde. Dies konnte auch in unseren Experimenten mit Hefen-PGK gezeigt werden (4.2.3). Bei Steigerung der Magnesiumkonzentration im Ansatz kam es zu einer Zunahme der PGK-Aktivität, wobei ab einer Magnesiumchloridkonzentration von etwa 1mM bei einer Enzymkonzentration von 0,33nM eine vollständige Aktivierung zu beobachten war, eine weitere Steigerung von $MgCl_2$ führte zu keiner vermehrten Enzymaktivität (4.2.3). Im Ansatz befanden sich allerdings 1,5mM ADP, es kam also zu einer vollständigen Aktivierung deutlich vor Erreichen des 1:1-Verhältnisses von Nukleotid zu divalentem Kation. Hierin unterscheidet die Regulation der PGK sich von jener der PFK, wo erst bei Erreichen einer Äquimolarität von ATP und Mg^{2+} eine vollständige Aktivierung zu beobachten war (4.2.2, 5.2.2). Worin liegt dies begründet? Wie in 2.3.2, 4.3, 5.2.2 und 5.4 erläutert, wird PFK-1 im Sinne

einer Feedback-Hemmung durch freies ATP gehemmt, MgATP stellt jedoch ein Substrat und einen aktivierenden Regulator des Enzyms dar. Es konnte eine Aufhebung der ATP-Hemmung durch Magnesiumzugabe beobachtet werden (4.2.2, 4.3). Ein entsprechender Feedback-Hemmmechanismus ist für PGK aus *Saccharomyces cerevisiae* unseres Wissens nach nicht beschrieben. Jedoch konnten Larsson-Raznikiewicz & Arvidsson für Hefen-PGK eine Hemmung durch ADP (0mM bis 10mM) bei Vorliegen besonders hoher (>10mM) und niedriger (<1mM) Magnesiumkonzentrationen im Ansatz beobachten (Larsson-Raznikiewicz and Arvidsson, 1971). Sie untersuchten hierbei die Rückreaktion von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat.

PGK nutzt MgADP als Substrat, dieses liegt nach Zugabe von 1mM Magnesium voraussichtlich bereits in ausreichendem Maße vor, um eine Substratsättigung zu gewährleisten. ADP weist eine deutlich geringere Komplexkonstante gegenüber Magnesium auf, als ATP ($K_A(\text{ATP})_{\text{Mg}^{2+}}=4,14$ vs. $K_A(\text{ADP})_{\text{Mg}^{2+}}=3,21$, nach *Maxchelator.stanford.edu*), sodass auch bei Erreichen der äquimolaren Konzentrationen von ADP und Magnesium nicht alles ADP im Komplex mit Magnesium vorliegt. So ergibt sich (berechnet mit *Maxchelator.stanford.edu*) bei Zugabe von 1mM Magnesiumchlorid und einer ADP-Konzentration von 1,5mM im Ansatz unter den gewählten Versuchsbedingungen (3.2.3, 3.2.3.3) eine freie Magnesiumkonzentration von 0,42mM und eine freie ADP-Konzentration von 0,92mM. Es müsste also auch bei Erreichen der vollständigen enzymatischen Aktivität in unserem Versuch noch freies ADP im Ansatz vorhanden sein. Da eine weitere Steigerung der Magnesiumzugabe zu keiner weiteren Zunahme der Enzymaktivität führte, scheint die Aktivierung der PGK durch Magnesium nicht ausschließlich durch die Komplexbildung von ADP bedingt zu sein. Möglich wäre eine ADP-unabhängige Aktivierung durch freie Magnesiumionen mit Sättigung des Enzyms bei circa 0,4mM $[\text{Mg}^{2+}]$ oder lediglich eine Steigerung der Komplexkonstante für MgADP bei Bindung an Enzym (4.2.2, 5.3.1). Es ergibt sich aus unseren Versuchen kein Hinweis auf Hemmung des Enzyms durch freies ADP.

Im Laufe der Reaktion entsteht aus ADP ATP. Larsson-Raznikiewicz und Schierbeck konnten zeigen, dass freies ATP als Inhibitor auf PGK aus *Saccharomyces cerevisiae* wirkt, MgATP hat jedoch einen aktivierenden Effekt (Raznikiewicz and Schierbeck, 1977). Es ist davon auszugehen, dass MgADP

am Enzym sein Magnesium behält und somit MgATP entsteht. Im Ansatz wurde kein zusätzliches ATP zugegeben, sodass eine Hemmung durch freies ATP sehr unwahrscheinlich ist.

Spielt freies Magnesium nun eine Rolle für die Aktivierung der PGK? Dies ließ sich in unseren Versuchsreihen mit PGK aus *Saccharomyces cerevisiae* weder eindeutig be- noch widerlegen. Erkennbar war eine extrem niedrige Enzymaktivität bei 0mM Magnesium im Ansatz (Abbildung 4.4), was im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur die Notwendigkeit eines divalenten Kations bestätigt. Da nur Versuche mit Magnesium durchgeführt wurden, kann keine Aussage bezüglich einer Spezifität für dieses Kation getroffen werden. Des Weiteren scheint diese Aktivierung – im Gegensatz zur Rolle des Magnesiums bei der Aktivierung der PFK – nicht von der vollständigen Komplexierung von ADP durch Magnesium abhängig zu sein.

Wir führten unsere Versuche mit Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae* durch. So sind nur begrenzt Rückschlüsse auf das Verhalten des humanen Enzyms möglich (5.1.3). In der Literatur finden sich jedoch verschiedene Überlegungen hierzu: Flachner et al. (2004) haben sich mit der Rolle des Metall-Ions bei der Katalyse der Reaktion von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat befasst. Sie stellten mehrere Hypothesen auf: Magnesium könnte der Abschirmung der negativen Ladungen der Phosphatreste dienen, der Stabilisation des Übergangszustandes oder der Positionierung der Reaktanden in einer optimalen Stellung zueinander (Miziorko and Eckstein, 1984; Herschlag and Jencks, 1990; Tari et al., 1997; Beáta Flachner et al., 2004). Davies et al. konnten zeigen, dass Magnesium die Interaktion zwischen α - und β -Phosphat des ADPs und einem konservierten PGK-Polypeptid-Segment ermöglicht, was zu einer besseren Bindung von Enzym und Substrat beiträgt (Davies et al., 1994). Für MgATP konnte jedoch kein entsprechender Effekt gezeigt werden, hier wurde lediglich eine Interaktion zwischen Kation und Nukleosidtriphosphat postuliert, die Bindung zwischen MgATP und Enzym sei insgesamt flexibler, was allerdings essentiell für die Bildung des aktiven Zentrums sein könnte (Davies et al., 1994). Insgesamt ergab sich für die Autoren kein Hinweis auf die Notwendigkeit des Vorhandenseins von freiem Magnesium für die Reaktion der PGK, als Teil des Substrats sei das Kation jedoch unabkömmlich (Davies et al., 1994). Für

humane Phosphoglyceratkinase konnte experimentell zudem eine Hemmung durch hohe Magnesiumkonzentrationen $>50\text{mM}$ gezeigt werden (Yoshida, 1975). Da entsprechende Werte in Skelettmuskelzellen nicht annähernd beobachtet wurden (Iotti *et al.*, 2000), scheint dieser Effekt *in vivo* keine Rolle zu spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir in unserem Versuch – wie aufgrund der Literaturangaben zu erwarten – zeigen konnten, dass ohne das Vorhandensein von divalenten Kationen im Ansatz keine wesentliche Aktivität der Phosphoglyceratkinase aus *Saccharomyces cerevisiae* zu beobachten ist. Bei einer Zugabe von 1mM MgCl_2 wurde bei einer ADP-Konzentration von $1,5\text{mM}$ eine vollständige Aktivierung des Enzyms erreicht (Endkonzentration der PGK im Ansatz: $0,33\text{nM}$). Dies ist gut mit dem in 4.1.3 gezeigten K_m -Wert des Enzyms von circa $0,4\text{mM}$ für MgADP vereinbar. Auch bei der weiterführenden Auswertung der Gesamtglykolysemessungen ergaben sich Hinweise auf eine Aktivierung der PGK bereits bei Konzentrationen, die unterhalb des Sättigungsbereichs von ADP mit Magnesium lagen. Es sind jedoch weitergehende Experimente zur genaueren Charakterisierung der Beobachtungen nötig, welche den Rahmen der vorliegenden Arbeit überstiegen hätten. Kristallstrukturanalysen des Hefeenzym zeigen die Bindung eines Magnesiumions im katalytischen Zentrum (Watson *et al.*, 1982). Vergleichbare Strukturanalysen des Säugetierenzym ließen sich bei der Recherche nicht auffinden.

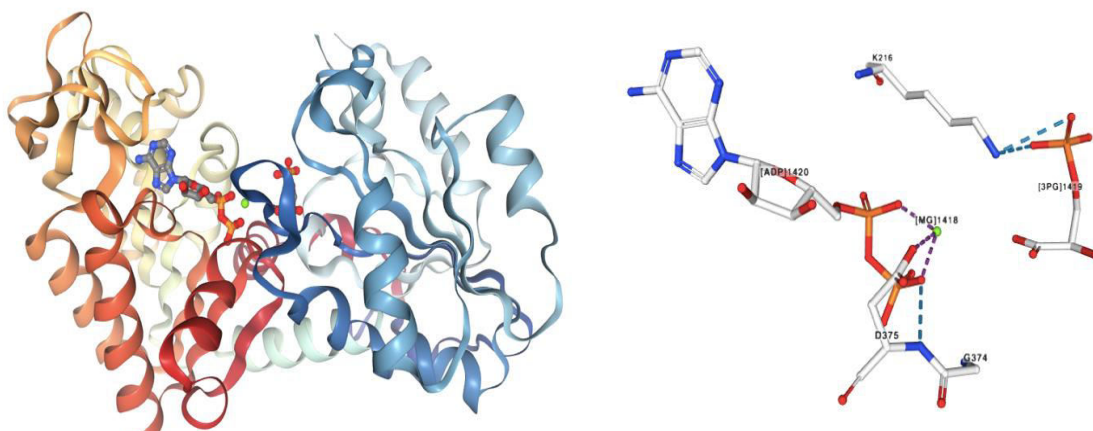


Abbildung 5.1: Kristallstrukturanalyse der PGK aus *Saccharomyces cerevisiae*. In grün gekennzeichnet ist das Magnesiumion, welches über Wasserstoffbrückenbindungen im katalytischen Zentrum des Enzyms gebunden wird.

5.3.4 Pyruvatkinase

In der Einleitung wurde bereits dargelegt, dass Pyruvatkinase laut Literatur zwei divalente und ein monovalentes Kation benötigt, um katalytische Aktivität zu zeigen und dass es sich bei Säugetieren bei dem divalenten Kation wohl um Magnesium handelt (2.3.3.2). In aktuellen Kristallstrukturanalysen konnten sogar drei Magnesiumbindestellen für humane Pyruvatkinase gezeigt werden (Srivastava, Nandi and Dey, 2019). Eines der Ionen bindet direkt im katalytischen Zentrum (Mildvan and Cohn, 1966; Reuben and Cohn, 1970; Cottam and Mildvan, 1971; Bollenbach and Nowak, 2001), das zweite im Komplex mit ADP als Substrat (Gupta, Fung and Mildvan, 1976; Baek and Nowak, 1982a; Bollenbach and Nowak, 2001). Welche Rolle spielt Magnesium nun in der Katalyse der Pyruvatkinase? Laut Bollenbach und Nowak dient es der Neutralisation negativer Ladungen der anionischen Substrate, wodurch der nucleophile Angriff während des Phosphorybosyl-Transfers sowie die Stabilisierung des Pentakoordinierten-Übergangszustandes erleichtert wird (Bollenbach and Nowak, 2001). Zudem komme es zu einer positiven Kooperativität der Bindung von Mg^{2+} an den PK-PEP-Komplex der Hefen-Pyruvatkinase, wodurch die Bindung von Fructose-1,6-Bisphosphat an das Enzym positiv beeinflusst werde (Bollenbach and Nowak, 2001). Hierdurch werde eine Aktivierung der PK hervorgerufen. Umgekehrt hat Fructose-1,6-Bisphosphat ebenfalls einen positiven Effekt auf die apparente Affinität der Hefen-PK für Phosphoenolpyruvat (PEP) und Magnesium (Bollenbach and Nowak, 2001). Es ist zudem bekannt, dass freies ADP die Bindung von PEP an PK aus Hefe hemmt (Mesecar and Nowak, 1997).

Nun stellt sich die Frage, inwiefern dies auf das von uns untersuchte Enzym aus Kaninchenmuskel übertragbar ist. Kumar & Barth führten Experimente mit Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel durch und postulierten, dass das Enzym vier Metall-Ionen-Bindungsstellen für di- und monovalente Kationen besitzt (Kumar and Barth, 2010). Bei dem monovalenten Kation handelt es sich höchstwahrscheinlich um Kalium, bei Zugabe von Ammoniumionen war allerdings ebenfalls eine Aktivierung des Enzyms zu beobachten (Mildvan and Cohn, 1966; Suelter *et al.*, 1966). In 4.2.4 zeigte sich – wie zu erwarten – keine enzymatische Aktivität der Pyruvatkinase bei vollständigem Fehlen von divalenten Kationen im Ansatz. Bei schrittweiser Steigerung der Zugabe von

Magnesiumchlorid (0mM - 2,5mM) bei einer ADP-Konzentration von 1,5mM im Ansatz kam es zu einer Aktivierung der Kaninchenmuskel-PK. Hierbei ist es aufgrund unserer Ergebnisse schwierig zu sagen, ob bei Erreichen des äquimolaren Verhältnisses von ADP und Magnesium bereits eine vollständige Aktivierung vorhanden ist (4.2.4). Die Steigerung der Mg-Komplexierung von ADP in unserem Experiment ist oben recht gut mit der Enzymaktivierung korreliert (Abb. 4.5). Für eine genauere Aussage wären Messreihen mit kleinschrittigeren Variationen der Magnesiumkonzentration über eine größere Konzentrations-Bandbreite von Nöten. In Zusammenschau mit den dargelegten Literaturangaben ist jedoch davon auszugehen, dass der aktivierende Mechanismus darin begründet liegt, dass Magnesium als MgADP Substrat an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet und für den Ablauf einer effizienten Katalyse essentiell ist. Bei einem 1:1-Verhältnis von Nukleotid zu Kation ist jedoch noch keine vollständige Aktivierung des Enzyms erreicht da ADP aufgrund seiner Komplexkonstanten nicht zu hundert Prozent im Komplex mit Mg^{2+} vorliegt.

Für das Leber-Isoenzym der Pyruvatkinase ist zudem eine Feedback-Hemmung durch ATP bekannt (Carbonell *et al.*, 1973). Da wir für unsere Versuche Muskel-Enzym verwendeten, kann jedoch keine diesbezügliche Aussage getroffen werden.

5.3.5 Myokinase

In 4.2.5 konnte gezeigt werden, dass auch Myokinase Magnesium-aktiviert ist. Damit konnten die Angaben aus der Literatur bestätigt werden, in denen eine Magnesiumabhängigkeit für Myokinase beschrieben wird (Thuma, Schirmer and Schirmer, 1972; Tsuboi and Chervenka, 1975). Eine vollständige Aktivierung des Enzyms wurde in unserem Versuch bei Erreichen des 1:1-Verhältnisses von ATP zu Magnesium im Ansatz erreicht. Die Messung wurde lediglich einmalig zur Bestätigung der Angaben aus der Literatur durchgeführt. Die Magnesiumabhängigkeit der Myokinase muss jedoch bei der Auswertung der Messungen des Gesamtglykolyseassays berücksichtigt werden, da hierdurch die Bildung von ATP und AMP aus ADP beeinflusst wird. Die K_m -Werte der Myokinase aus *Homo sapiens* werden mit 0,23mM für MgATP (AMP-Kinase-

Richtung) und 0,15mM für MgADP angegeben (ADP-Kinase-Richtung)(Luz *et al.*, 1990).

5.3.6 Effekte von Magnesium auf die Gesamtglykolyseaktivität

Die in 4.4 beschriebenen Experimente der Gesamtglykolysemessung mit Extrakt aus Rattenmuskel bei variabler Magnesiumkonzentration im Ansatz lieferten spannende Ergebnisse, die im Folgenden diskutiert werden sollen und eine Grundlage weiterer Untersuchungen zur Frage einer möglichen therapeutischen Nutzung von Magnesium beispielsweise bei der Behandlung von Diabetes Mellitus sein können. Anhand der in 4.4.5 dargestellten, schätzenden Berechnung der freien Magnesiumkonzentration ist eine Regulation der Glykolyse im Skelettmuskel durch Magnesium möglich: Aus den Tabellen 4.7 und 4.8 ergibt sich unter Berücksichtigung der in Abbildung 4.19 – 4.22 dargestellten Ergebnisse des Gesamtglykolyseassays eine Aktivierung der Glykolyse durch Magnesium, die im physiologischen Bereich von 0,3-0,8mM intrazellulärer, freier Magnesiumionen (Iotti and Malucelli, 2008) läge. Ein Magnesiummangel mit einer intrazellulären Magnesiumkonzentration unter 0,3mM würde somit im Umkehrschluss zu einer deutlichen Reduktion der Glykolyseaktivität führen. Bei der Wertung unserer Ergebnisse hinsichtlich der Situation *in vivo* ist jedoch zu bedenken, dass es, wie bereits in 4.4.5 dargelegt, praktisch unmöglich ist, die freie, intrazelluläre Magnesiumkonzentration genau zu bestimmen. Die Literatur geht relativ übereinstimmend von einer Konzentration von 0,3-0,8mM aus (Iotti and Malucelli, 2008). Dies ist also der intrazelluläre, freie Konzentrationsbereich, in dem sich eine mögliche Regulation bewegen könnte. Im Zuge eines ausgeprägten Magnesiummangels läge eine niedrigere Konzentration vor, wobei sich auch in diesem Falle eine Bewertung als schwierig darstellt, da zur Feststellung eines Mangels aktuell stets die nur ein Prozent des Gesamtkörpermagnesiums repräsentierende Plasmakonzentration herangezogen wird. Es ist allerdings davon auszugehen, dass bei Plasmahypomagnesiämie bereits ein deutlicher Mangel an intrazellulärem Magnesium vorliegt, da die Plasmakonzentration nicht mehr im Normbereich aufrechterhalten werden kann.

Ebenfalls schwierig ist die Bestimmung der Gesamtkonzentration des Magnesiums in der Zelle, welche wir als Grundlage zur Berechnung der

Magnesiumkonzentration im Muskelextrakt genutzt haben. Hier divergieren die Angaben in der Literatur extrem (4.4.5). Aufgrund der starken Verdünnung unseres Glykolyse-Enzyme-Extraktes fällt dies jedoch kaum ins Gewicht, sodass dieser Fehler zu vernachlässigen ist.

Ein weiteres Problem stellen die gewählten K_d -Werte der Phosphomonoester für Magnesium bei definiertem pH-Wert dar. Wir sind für unsere Berechnungen pauschal von einem K_d von etwa 10mM ausgegangen und haben uns damit auf die verfügbaren Angaben in der Literatur gestützt (Martell and Smith, 1974; McGuigan *et al.*, 2007). Läge der tatsächliche K_d -Wert deutlich niedriger oder höher (d.h. um Faktor 3-5), würden sich veränderte freie Magnesiumkonzentrationen ergeben, der beobachtete Regulationsmechanismus *in vitro* läge nicht mehr im Bereich der physiologisch freien intrazellulären Konzentration des Kations. Somit wäre eine Relevanz *in vivo* sehr fraglich.

Die Gesamtkonzentration der Phosphomonoester wurde in den Berechnungen entsprechend der Messungen variiert (Tabelle 4.8), bei der Auswahl des Konzentrationsbereiches wurde sich auf die Messungen der HPLC-Analyse gestützt (4.4.5). Auch hier besteht also eine gewisse Ungenauigkeit, die nicht außer Acht gelassen werden darf.

Alles in Allem dienen die in 4.4.5 ausgeführten Berechnungen als Modellrechnungen. Unter den verwendeten "best knowledge"-Modell-Bedingungen konnte *in vitro* jedoch eine eindeutige Aktivierung der Rattenmuskelglykolyse durch Magnesium gezeigt werden.

Bereits in der Einleitung wurden mögliche therapeutische Überlegungen angestoßen, die sich hieraus ergeben (2.1, 2.4): eine Steigerung der Aktivität der Glykolyse hätte einen erhöhten Verbrauch von Plasmaglucoose zur Folge, wodurch Letztere aus der Blutzirkulation entfernt würde. Hieraus resultiert eine Senkung des Blutglucosespiegels, was bei Diabetikern zur Verhinderung von weitreichenden Folgeerkrankungen essentiell ist. Trotz der schwierigen Übertragung der *in-vitro*-Ergebnisse auf die Situation *in vivo*, erscheinen klinische Studien zur direkten Testung einer Steigerung der Glykolyseaktivität bei Diabetikern durch Magnesiumsupplementierung sinnvoll. Da Magnesiummangel generell mit einem höheren kardiovaskulären Risiko behaftet ist (2), hätte eine Supplementierung in jedem Fall einen positiven

Effekt hinsichtlich des Outcomes bei metabolischem Syndrom, eine entsprechende Studie sollte also für die teilnehmenden Probanden unbedenklich sein. Hinzu kommt der bereits beschriebene, positive Effekt des Kations auf die Aktivität des Insulinrezeptors (2). Aus diesem Grund sollte jedoch zur Messung des Erfolgs nicht nur die Blutglucose-Konzentration herangezogen werden, sondern es müsste eine direkte Bestimmung der skelettmuskulären Glykolyseaktivität erfolgen, damit eine Trennung der Effekte in der Beurteilung erreicht werden könnte. Auch dies stellt eine verfahrenstechnische Herausforderung dar.

5.3.7 Aktivierung der Glykolyse initial nach Ruhephasen via AMP durch allosterische Regulation

Es stellt sich nun die Frage, über welchen Mechanismus die Aktivierung der Glykolyse durch Magnesium erfolgt. Betrachtet man die in Tabelle 4.7 angeführten Ergebnisse zur freien ATP-Konzentration nach Komplexierung durch ATP und ADP, so fällt auf, dass ab einer Magnesiumchlorid-Zugabe von 3mM und mehr ein deutliches Absinken der freien ATP-Konzentration zu beobachten ist. Wie bereits zuvor ausführlich dargelegt und in den Vorversuchen zur Magnesiumabhängigkeit der PFK demonstriert (4.2.2), hemmt freies ATP die Aktivität dieses Schlüsselenzyms. Der schnelle, initiale Anstieg der Glykolyseaktivität bei Zugabe von 3mM Magnesium und mehr zum Ansatz ließe sich also durch eine Entthemmung der Phosphofruktokinase durch Komplexierung von freiem ATP erklären. Erstaunlicherweise war auch bei zusätzlicher Magnesiumzugabe von 0mM und ATP im Überschuss zum Gesamtglykolyseassay eine glykolytische Grundaktivität zu beobachten (Abbildung 4.19 – 4.22). Dies lässt sich wohl darauf zurückführen, dass das wenige, im Ansatz vorhandene Magnesium ein essentielles Substrat der Glykolyse, vermutlich das MgATP-Substrat der PFK, bildet. Der K_m -Wert der PFK für MgATP liegt bei etwa $31\mu\text{M}$, also extrem niedrig, das heißt PFK ist auch bei ganz wenig MgATP noch aktiv, beziehungsweise aktivierbar, zum Beispiel bei hohem AMP. Durch den hohen Anteil an freiem ATP unter diesen Bedingungen werden Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase jedoch basal gehemmt, es ist nur ein geringes Maß an Glykolyseaktivität unter diesen Bedingungen möglich.

Es konnte im Rahmen unserer Versuchsreihen zudem eine Magnesiumabhängigkeit der Myokinase aufgezeigt werden (4.2.5), welche sich gut mit der entsprechenden Literatur in Einklang bringen lässt (5.3.5). Das Optimum der Aktivierung der Myokinase durch Magnesium liegt in unserem Myokinase-Assay (AMP-Kinase-Richtung zur Bestimmung verwendet) *in vitro* bei 2mM Magnesiumchlorid im Ansatz bei einer Konzentration von 3mM ATP und 0,1mM AMP, ein Hemmeffekt durch freies ATP trat nicht auf und ist unseres Wissens nach in der Literatur auch nicht bekannt (4.2.5).

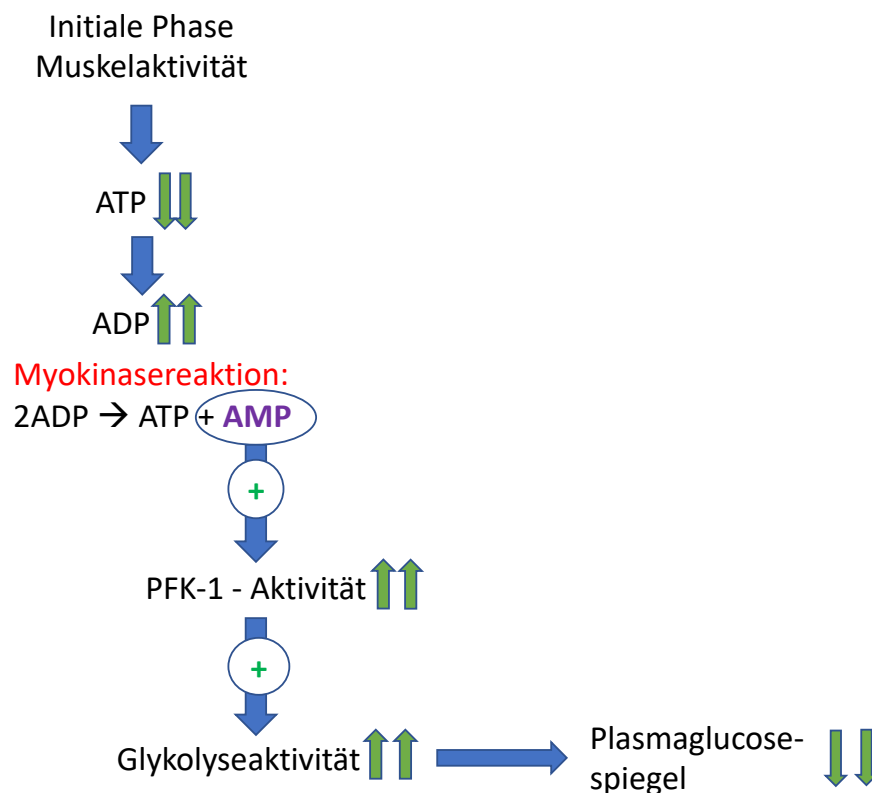


Abbildung 5.2: Aktivierung der Glykolyse durch AMP mittels Myokinase-reaktion. Initial kommt es bei Beginn muskulärer Arbeit zu einem sehr schnellen Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration, da dieses zu ADP hydrolysiert wird. Dies führt zu einer Aktivierung der Myokinase-Reaktion, wodurch aus 2ADP ATP und AMP gebildet werden. Letzteres ist ein starker Aktivator von PFK-1 und PK, es kommt zu einer Steigerung der Glykolyseaktivität und konsekutiv zu einem Absinken der Plasmaglucosekonzentration.

Aktiviert wird Myokinase *in vivo* durch einen Abfall der ATP-Konzentration in der Zelle durch ATP-Verbrauch, z.B. durch Muskelkontraktion. In der initialen Phase muskulärer Aktivität wird ATP zu ADP hydrolysiert, Letzteres steigt dadurch an. Myokinase bildet hieraufhin aus 2ADP ATP und AMP (ADP-Kinase-Richtung). Im Gesamtglykolyseassay ist die ADP-Konzentration zu Beginn der Messung am höchsten und sinkt dann rapide ab (Abbildung 4.31), bei Zugabe von 0mM, 0,5mM und 1mM Magnesiumchlorid zum Ansatz geschieht dies bereits vor Start

der Reaktion durch Zugabe von Glucose-6-Phosphat. Dieser Effekt ist durch Myokinase verursacht, insbesondere, wenn man die ATP/ADP-Ratio vor Reaktionsstart in Abhängigkeit zur Magnesiumzugabe betrachtet, welche in Abbildung 4.28 dargestellt ist: bei Zugabe von 0,5mM und 1mM Magnesium kommt es zu einer Zunahme der ATP/ADP-Ratio, es wird also bereits vor Glucose-6-Phosphat-Zugabe ATP aus steigendem ADP unter Bildung von AMP gebildet. Letzteres aktiviert nun allosterisch sehr stark die PFK.

Sobald die Glykolyse aktiviert ist, steigt das ATP/ADP-Verhältnis wieder massiv an, Myokinase reagiert nun rückwärts und wandelt den allosterischen PFK-Aktivator AMP mit ATP wieder zu 2ADP um. Letzteres wird als Substrat in die Glykolyse eingeschleust und erneut zu ATP phosphoryliert. So kommt es insgesamt zu dem in 4.25 beobachteten Anstieg des ATPs im Laufe der Versuchsreihe.

Bei der weiteren Auswertung des Gesamtglykolyseassays zeigte sich eine deutliche Kooperativität der ADP-Kinase-Aktivität – also der Umwandlung von 2 ADP zu ATP und AMP – der Myokinase gegenüber der ADP-Konzentration im Ansatz (4.4.6). Hierdurch kommt dem Enzym eine „Schalterfunktion“ zu: im Ruhezustand vor Glucose-6-Phosphat-Zugabe und bei fehlender Phosphorylaseaktivität wird die ADP-Kinase-Aktivität der Myokinase bei hohem ADP angeschaltet, es entsteht vermehrt AMP, welches als sehr potenter Aktivator der PFK (Passonneau and Lowry, 1964; Löffler, Petrides and Heinrich, 2014) eine Voraktivierung der Glykolyse hervorruft (Abbildung 5.2). Durch die vermehrte glykolytische Aktivität sinkt ADP ab, bis es schließlich zum „Abschalten“ der ADP-Kinase kommt. Die AMP-Produktion sinkt hierdurch ebenfalls, durch AMP-Desaminase und Nukleotidase wird AMP zusätzlich entfernt. Die Glykolyseaktivierung durch AMP entfällt.

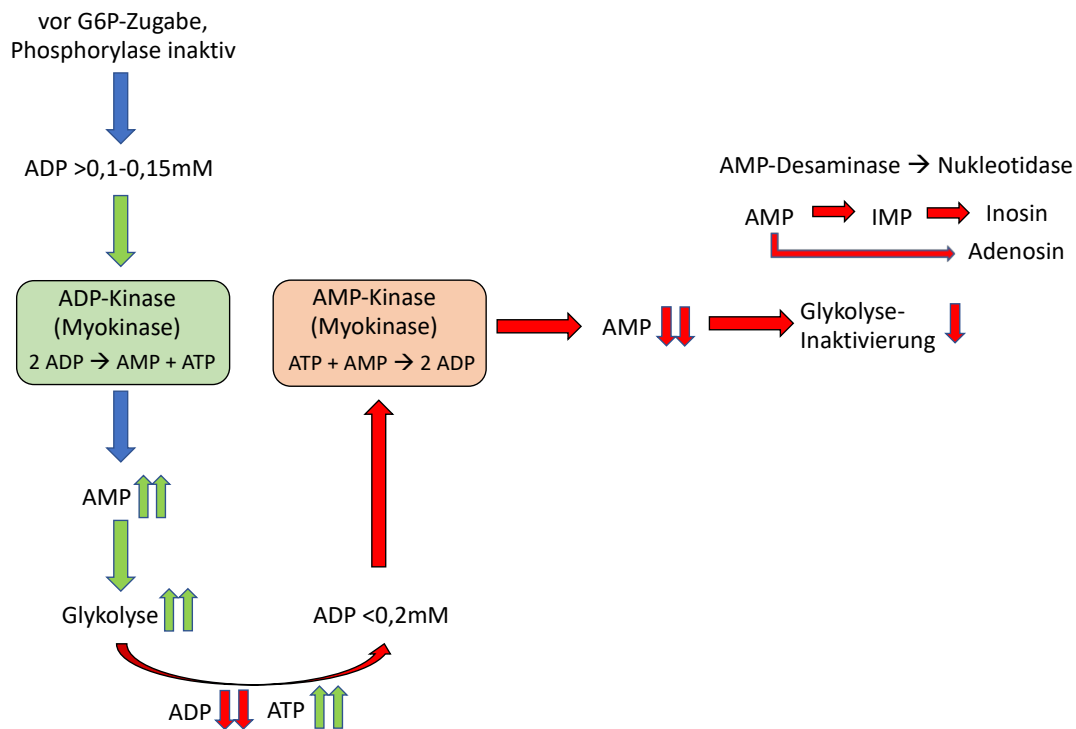


Abbildung 5.3: Alternative Regulation der ADP-Kinase- und AMP-Kinase-Aktivität der Myokinase. Vor Glucose-6-Phosphat-Zugabe bei inaktiver Phosphorylase ist die ADP Konzentration hoch, aus Abbildung 4.31 ergibt sich eine Kooperativität der ADP-Kinase-Aktivität der Myokinase mit Schalterfunktion ab einer Konzentration von >0,1-0,15mM ADP im Ansatz, es kommt also zu einem schnellen, starken Anstieg der AMP-Produktion. Diese wiederum hat eine Aktivierung der Glykolyse, mittels allosterischer Aktivierung der PFK, zufolge. Durch die vermehrte Glykolyseaktivität wird ADP zu ATP regeneriert. Ab einer Konzentration <0,2mM (Abbildung 4.31) wird die ADP-Kinase-Aktivität der Myokinase abgeschaltet, es wird weniger AMP gebildet, eine entsprechende Glykolyseaktivierung bleibt aus. Durch AMP-Desaminase und Nukleotidase wird die Menge des vorhandenen AMPs noch weiter reduziert.

Auch *in vivo* könnte dieser Effekt von großer Bedeutung sein für eine rasche Muskelaktivierung nach Intervallphasen ohne hohes intrazelluläres, die Aktomyosin-ATPase und Glykogenolyse erhöhendes Calcium. Die mittels Myokinase und AMP verstärkte Glykolyseaktivität ohne Calcium-induzierte Phosphorylase-Aktivierung – also ohne wesentlichen Glykogenabbau – bedingt einen hohen plasmatischen Glucoseverbrauch. Magnesium würde also über diesen Weg zur Senkung des Blutglucosespiegels beitragen. Genutzt werden könnte dieser Effekt beim sogenannten High-Intensity-Intervalltraining: Hier werden Intervalle kurzer, hochintensiver sportlicher Aktivität mit Ruhephase beziehungsweise Phasen leichter Aktivität abgewechselt. Auf zellulärer Ebene käme es so stets zu einem plötzlichen Abfall von ATP, was mittels Myokinase und AMP eine intermittierende Steigerung der anaeroben Glykolyse zur Folge hat. Letztere führt, wie in 2.2 dargelegt, zu einem deutlich höheren Verbrauch von Glucose zur Herstellung der gleichen Menge an ATP gegenüber der

aeroben Verstoffwechslung. Somit wird eine effektivere Senkung des Blutglucosespiegel erreicht. In einer klinischen Studie aus Finnland konnte bereits gezeigt werden, dass High-Intensity-Intervalltraining zu einer ausgeprägten Senkung des Blutzuckers bei Diabetikern führt und somit einen äußerst positiven, therapeutischen Effekt hat (Sjöros *et al.*, 2018).

Ein weiterer interessanter Aspekt zeigt sich bei Begutachtung der AMP-Konzentration bei hohen Magnesiumkonzentrationen im Ansatz (Abbildung 4.30, Zugabe von 3mM und 4mM Magnesium): Nach initial starkem Absinken bei Glucose-6-Phosphat-Zugabe bleibt die AMP-Konzentration konstant bei etwa 10 μ M. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass das ATP/ADP-Verhältnis nach schneller Aktivierung der Glykolyse im anschließenden Steady-State wieder niedriger ist (Abbildung 4.33, 4.34), die ADP-Kinase-Aktivität der Myokinase ist angeschaltet (Abbildung 5.3), es wird also AMP aus ADP gebildet, die AMP-Konzentration sinkt nicht weiter ab, sondern wird in einem Konzentrationsbereich um 10 μ M eingependelt.

Wodurch wird die Konzentration des AMPs sonst beeinflusst? Der weitere Abbau von AMP erfolgt anhand der AMP-Desaminase-Reaktion sowie durch Nucleosidasen (Löffler, Petrides and Heinrich, 2014; Rassow *et al.*, 2016). AMP-Desaminase wurde ebenfalls hinsichtlich einer möglichen Magnesiumabhängigkeit untersucht, diese konnte jedoch nicht festgestellt werden (4.2.6). Weitergehende Analysen nach Abschluss meiner Auswertungen zeigen jedoch eine deutliche Magnesiumabhängigkeit der Nucleotidasen, was mit den Angaben aus der Literatur gut vereinbar ist (4.4.6). Auch auf diesem Wege wäre also eine Beeinflussung der AMP-Konzentration durch Magnesium und der konsekutiven Aktivierung der Glykolyse durch Magnesium möglich.

Insgesamt ergaben sich aus unseren Messungen zur Magnesiumabhängigkeit der Gesamtglykolyse im Rattenmuskel Ansätze, die weitergehende experimentelle und klinische Forschung nach sich ziehen sollten. Die HPLC-Analyse-Daten führen zu sinnvollen Arbeitshypothesen bei weiterführenden klinischen, physiologischen und biochemischen Experimenten. Bei der Bestimmung der freien, muskulären Magnesiumkonzentration sind noch Probleme zu lösen. Fest steht jedoch, dass *in vitro* eine Aktivierung der

Glykolyse durch Magnesium gezeigt werden konnte, deren tatsächliche Relevanz *in vivo* noch in weiteren Experimenten bestätigt werden muss und dann gegebenenfalls therapeutisch genutzt werden könnte. Die Supplementierung von Magnesium ist klinisch kostengünstig und nur bei deutlicher Überdosierung mit möglichen Nebenwirkungen behaftet, eine weitere Untersuchung hinsichtlich einer Wirksamkeit zur Prävention diabetischer Folgeschäden erscheint daher definitiv als sinnvoll, vor allem in Verbindung mit den hier vorgeschlagenen Intervalltrainings und Muskelstimulationsmaßnahmen. Auch eine passive, elektrische Intervallstimulation großer Muskeln wäre ein gut zu verifizierender experimenteller Ansatz.

5.4 Diskussion der Rolle von Phosphat in der Glykolyse

Im Rahmen unserer Experimente ergab sich eine interessante Beobachtung hinsichtlich der Phosphatwirkung auf die Aktivität der Glykolyse: in der Literatur ist ein aktivierender Effekt des Ions auf die PFK-Aktivität bekannt, welcher sich durch AMP verstärken lässt (Bañuelos, Gancedo and Gancedo, 1977; Przybylski *et al.*, 1985; Dobson, 1986; Wegener *et al.*, 1987). Dies konnten wir in unseren Versuchsreihen bestätigen (4.5.1). Bei hohen Phosphatkonzentrationen >10mM zeigte sich jedoch eine Hemmung des Enzyms (4.5.1).

Auch eine Aktivierung der PFK-1 durch Ammonium ist bereits bekannt (2.3.2), wir konnten in unseren Versuchen mit Ammoniumchlorid, -phosphat und -sulfat zeigen, dass hierfür wahrscheinlich zusätzlich das Vorhandensein von Phosphat oder Sulfat von Nöten ist (4.5.2). Entsprechende Kristallstrukturanalysen, in denen sowohl Ammonium als auch Phosphat oder Sulfat an PFK gebunden wurden, konnten bei unserer Recherche nicht gefunden werden.

Für Ammoniumphosphat zeigte sich in den durchgeführten Experimenten eine Abhängigkeit in stark sigmoidaler Aktivierungskinetik, welche eine maximale Aktivierung der PFK bei 3mM Ammoniumphosphat aufweist (Abbildung 4.41) sowie eine halbmaximale Aktivierung bei circa 15mM Ammoniumphosphat. Verglichen mit der Aktivierung durch P_i alleine, welche ebenfalls in der ersten

Phase eine sigmoidale Form aufweist, führt Ammoniumphosphat zu einer signifikanten Linksverschiebung der Phosphat-Aktivierungskurve, also zu einer Affinitätssteigerung für das aktivierende Phosphat (EC_{50} -Wert von circa 3mM auf 1,5mM erhöht).

Es wurden zudem Gesamtglykolysemessungen unter Variation der beigefügten Phosphatkonzentration durchgeführt (4.5.3). Hierbei konnte bereits bei Konzentrationen von 5mM und 10mM zusätzlichen Phosphats im Ansatz eine Hemmung der Steady-State-Glykolyserate um etwa 40% gegenüber einer Phosphatzugabe von 2mM beobachtet werden (4.5.3, Abbildung 4.42-4.44). Worin kann dies begründet liegen? Es ist zu berücksichtigen, dass durch den Assay rasch zusätzliches Phosphat über den Verbrauch von Kreatinphosphat bei in etwa konstantem ATP entsteht. Dies führt bei 2mM zugegebenem Phosphat zu einer Hemmwirkung auf PFK-1, da bei der *in vitro* Glykolyse sehr rasch zusätzliches Phosphat in Höhe von zwei P_i pro verbrauchtem Glucose-6-Phosphat beziehungsweise ein P_i pro Laktat entsteht.

In der Literatur findet sich für humane Pyruvatkinase aus Erythrozyten die Beschreibung eines aktivierenden Phosphateffekts, ebenso für das korrespondierende Enzym aus Tauben (Staal *et al.*, 1971; Calomenopoulou, Kaloyianni and Beis, 1989; Wang *et al.*, 2001). Für humane Hexokinase ist hingegen eine Aktivierung bei niedrigen Phosphatkonzentrationen bis 3mM und eine Inhibition bei hohen Konzentrationen >10mM beschrieben (Bianchi *et al.*, 1998). Hashimoto & Wilson erklären diesen Effekt durch Konkurrenz des Phosphats in geringen Konzentrationen mit Glucose-6-Phosphat um dessen Bindestelle am Enzym. Glucose-6-P wirkt Rückkopplungs-hemmend auf HKI (2.3.1), durch Aufhebung dieser Hemmung kommt es zur Aktivierung. In hohen Konzentrationen bindet Phosphat zusätzlich an eine low-affinity Bindestelle am C-Terminus des Enzyms, wodurch ein Hemmeffekt hervorgerufen wird (Hashimoto and Wilson, 2002). Dies könnte ebenfalls zu dem beobachteten Hemmeffekt der Gesamtglykolyse durch hohe Phosphatkonzentrationen beitragen. Für Phosphoglyceratkinase sowie Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ergab unsere Literaturrecherche keine Angaben hinsichtlich einer möglichen Inhibition durch Phosphat.

Im ruhenden Muskel beträgt die Phosphatkonzentration etwa 1-5mM, bei Kontraktion kann es zu einem Anstieg auf 30-40mM kommen, insbesondere

durch die Bildung von Kreatin aus Kreatin-Phosphat bedingt (Cady *et al.*, 1989; Kushmerick, Moerland and Wiseman, 1992; Allen and Westerblad, 2001). Eine Aktivierung der Glykolyse durch Phosphat erfolgt also am ehesten kurze Zeit nach deren Aktivierung nach Ruhephasen, bei zunehmender Aktivität kommt es schließlich zu einer Hemmung der Glykolyse.

Der beobachtete Effekt könnte analog zur Verstärkung der ATP-Hemmung bei niedrigem pH-Wert (2.3.2.1) funktionieren: bei beginnender Muskelarbeit steigt die Phosphatkonzentration zunächst an, es kommt zu einer Aktivierung der PFK. Mit steigender anaerober Glykolyse-Aktivität wird vermehrt Laktat gebildet, der pH-Wert in der Muskulatur sinkt ab. Phosphat steigt weiterhin an. Irgendwann ist der pH-Wert so niedrig, dass eine Schädigung der Muskelzellen droht. Eine Hemmung der anaeroben Glykolyse und damit der Laktat-Bildung macht daher Sinn zur Protektion vor Muskelschädigung (Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; Tymoczko, 2013).

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob Magnesium und Phosphat einen regulatorischen Einfluss auf die Glykolyse im Skelettmuskel beziehungsweise auf deren Schlüsselenzyme haben. Anstoß hierzu bot die 1996 durch Laughlin und Thompson beschriebene *in vitro*-Aktivierung der Erythrozyten-Glykolyse.

Die Regulation der glykolytischen Kinasen durch Magnesium und Phosphat wurde mittels gekoppeltem, enzymatischem optischem Test untersucht. Zur Messung der Gesamtglykolyse erfolgte die Gewinnung eines Muskelextraktes aus Rattenmuskel. Im Assay wurde die Bildung von Laktat über die Zeit als Surrogatparameter der glykolytischen Aktivität bei Zugabe von Laktatdehydrogenase im Überschuss verwendet. Die Bestimmung der Nukleotidkonzentrationen im Ansatz, welche unter anderem zur modellhaften Berechnung der freien Magnesiumkonzentration bestimmt wurden, erfolgte mittels HPLC-Analytik. In den durchgeführten Versuchen konnte *in vitro* eine eindeutige Aktivierung der Skelettmuskel-Glykolyse durch Magnesium gezeigt werden, welche sich nach einer Modellrechnung zur freien Magnesiumkonzentration in dem *in vivo* relevanten Bereich von 0,3 – 0,8mM (Lotti *et al.*, 2000) befand. Für die einzelnen Schlüsselenzyme konnte eine klare Abhängigkeit von Magnesium gezeigt werden. Aus den K_m -Wert-Bestimmungen ergab sich, dass PFK-1, PK und PGK nicht Adenin-spezifisch sind, sondern auch andere Nukleotide umsetzen können. Hierdurch ist eine Beeinflussung der freien Magnesiumkonzentration in der Zelle durch Komplexbildung denkbar. Zusätzlich zeigte sich eine Magnesiumabhängigkeit der Myokinase, die möglicherweise bei der Bereitstellung von AMP zur Aktivierung der Glykolyse eine Rolle spielt. Dieser Effekt könnte im Rahmen von Intervalltraining zur Senkung des Blutglucosespiegels genutzt werden. Des Weiteren wurde der bereits bekannte, aktivierende Effekt von Phosphat auf PFK-1 sowie auf die Gesamtglykolyse genauer untersucht. Hier zeigte sich eine Potenzierung der Aktivierung durch AMP und ein Hemmeffekt bei hohen Phosphatkonzentrationen.

Insgesamt ergaben sich im Rahmen der Arbeit Erkenntnisse hinsichtlich der Regulation der Glykolyse, welche die Grundlage weiterer physiologisch-

biochemischer und klinischer Forschung bilden und beispielsweise in der Therapie des Diabetes einen Nutzen bringen könnten.

6.2 Summit

The present thesis investigates, whether magnesium and phosphate have a regulatory impact on the whole glycolytic flux and its key enzymes. Experiments by Laughlin and Thompson, realized in year 1996, showing *in vitro* activation of glycolysis in erythrocytes, already gave a little hint concerning a possible regulatory mechanism.

The regulation of the glycolytic kinases by magnesium has been analysed via linked enzymatic optic assays, whole-glycolysis-assays have been performed with muscle extracts from rat muscle via HPLC-analysis. The alteration of lactate concentration was used as a surrogate to monitor glycolytic activity. The concentration of nucleotides in the assay, which was necessary to be known to calculate free magnesium concentrations, was also determined by HPLC-analysis.

A distinct *in vitro*-activation of muscle glycolysis could be shown in the *in vivo*-relevant interval of free magnesium concentration of 0,3-0,8mM, respectively to our numeric modeling. For all key enzymes a definite *in-vitro*-activation by magnesium could be shown. Experimental calculations of K_m -values showed a non-specificity of PFK-1, PK and PGK towards adenine-nucleotides. Other nucleotides were processed by those enzymes, as well. Free magnesium concentration in the cell could be modulated via complexation by altering nucleotide-concentrations.

Additionally, we observed a magnesium dependency of myokinase, that could play an important role in providing AMP for glycolysis-activation. This effect might be useful in decreasing blood sugar levels by interval training.

Furthermore, we investigated the already know activating effect of phosphate on PFK-1 and the whole glycolysis. A potentiation of this effect by AMP could be shown. In the contrary, high phosphate concentration lead to inhibition of the enzyme.

After all, this work gave new information concerning glycolysis regulation, that could be the fundament of further physiological, biochemical and clinical research, which might for example be useful in the therapy of diabetes.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott, R. D. *et al.* (2003) 'Dietary magnesium intake and the future risk of coronary heart disease (the Honolulu Heart Program).', *The American journal of cardiology*, 92(6), pp. 665–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972103> (Accessed: 6 October 2016).
- Akkerman, J. W. *et al.* (1974) 'Influence of Mg²⁺.', *Biochimica et biophysica acta*, 370(1), pp. 113–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4279116> (Accessed: 14 August 2018).
- Allen, D. G. and Westerblad, H. (2001) 'Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue.', *The Journal of physiology*. Wiley-Blackwell, 536(Pt 3), pp. 657–65. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00657.x.
- and, X. W. and Kemp*, R. G. (1999) 'Identification of Residues of Escherichia coli Phosphofructokinase That Contribute to Nucleotide Binding and Specificity†'. American Chemical Society . doi: 10.1021/BI982940Q.
- Aprille, J. R. (1988) 'Regulation of the mitochondrial adenine nucleotide pool size in liver: mechanism and metabolic role.', *The FASEB Journal*, 2(10), pp. 2547–2556. doi: 10.1096/fasebj.2.10.3290024.
- Aubert-Foucher, E., Font, B. and Gautheron, D. C. (1984) 'Rabbit heart mitochondrial hexokinase: solubilization and general properties.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 232(1), pp. 391–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6742859> (Accessed: 5 October 2018).
- de Baaij, J. H. F. *et al.* (2015) 'Magnesium in man: implications for health and disease.', *Physiological reviews*. American Physiological Society, 95(1), pp. 1–46. doi: 10.1152/physrev.00012.2014.
- de Baaij, J. H. F., Hoenderop, J. G. J. and Bindels, R. J. M. (2015) 'Magnesium in man: implications for health and disease.', *Physiological reviews*, 95(1), pp. 1–46. doi: 10.1152/physrev.00012.2014.
- Bachelard, H. S. (1971) 'Allosteric activation of brain hexokinase by magnesium ions and by magnesium ion–adenosine triphosphate complex.', *The Biochemical journal*. Portland Press Limited, 125(1), pp. 249–54. doi: 10.1042/bj1250249.
- Baek, Y. H. and Nowak, T. (1982a) 'Kinetic evidence for a dual cation role for muscle pyruvate kinase.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 217(2), pp. 491–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7138020> (Accessed: 3 December 2017).
- Baek, Y. H. and Nowak, T. (1982b) 'Kinetic evidence for a dual cation role for muscle pyruvate kinase.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 217(2), pp. 491–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7138020> (Accessed: 5 December 2017).
- Bailin, G. (1976) 'Myosin and actomyosin from human skeletal muscle', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 449(2), pp. 310–326. doi: 10.1016/0005-2728(76)90143-2.
- Banaszak, K. *et al.* (2011) 'The crystal structures of eukaryotic phosphofructokinases from baker's yeast and rabbit skeletal muscle.', *Journal of molecular biology*, 407(2), pp. 284–97. doi: 10.1016/j.jmb.2011.01.019.
- Banks, R. D. *et al.* (1979) 'Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme.', *Nature*, 279(5716), pp. 773–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/450128> (Accessed: 29 November 2017).
- Bañuelos, M., Gancedo, C. and Gancedo, J. M. (1977) 'Activation by phosphate of yeast phosphofructokinase.', *The Journal of biological chemistry*, 252(18), pp. 6394–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19473> (Accessed: 7 December 2017).
- Bär, J., Schellenberger, W. and Kopperschläger, G. (1997) 'Purification and characterization of phosphofructokinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*.', *Yeast (Chichester, England)*, 13(14), pp. 1309–17. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199711)13:14<1309::AID-YEA181>3.0.CO;2-#.
- Barbagallo, M. and Dominguez, L. J. (2007) 'Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 458(1), pp. 40–7. doi: 10.1016/j.abb.2006.05.007.
- Beáta Flachner, ‡§ *et al.* (2004) 'Role of Phosphate Chain Mobility of MgATP in Completing the 3-Phosphoglycerate Kinase Catalytic Site: Binding, Kinetic, and Crystallographic Studies with ATP and MgATP†'. American Chemical Society. doi: 10.1021/BI035022N.
- Berg, Jeremy M.; Stryer, Lubert; Tymoczko, J. L. (2013) *Biochemie*. 7. Auflage. Edited by Stryer.
- Berg, J., Stryer, L. and Tymoczko, J. L. (2013) *Stryer Biochemie*. 7. Auflage.
- Bianchi, M. *et al.* (1998) 'Enzymatic properties of overexpressed human hexokinase fragments.', *Molecular and cellular biochemistry*, 189(1–2), pp. 185–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9879670> (Accessed: 29 October 2018).
- Bloxham, D. P. and Lardy, H. A. (1973) '7 Phosphofructokinase', *The Enzymes*. Academic Press, 8, pp. 239–278. doi: 10.1016/S1874-6047(08)60067-0.
- BLUM, H. E., DEUS, B. and GEROK, W. (1983) 'Mitochondrial Creatine Kinase from Human Heart Muscle: Purification and Characterization of the Crystallized Isoenzyme', *The Journal of Biochemistry*, 94(4), pp. 1247–1257. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134470.
- Bo, S. and Pisu, E. (2008) 'Role of dietary magnesium in cardiovascular disease prevention, insulin sensitivity and diabetes.', *Current opinion in lipidology*, 19(1), pp. 50–6. doi: 10.1097/MOL.0b013e3282f33ccc.
- Bollenbach, T. J. and Nowak, T. (2001) 'Thermodynamic linked-function analysis of Mg(2+)-activated yeast pyruvate kinase.', *Biochemistry*, 40(43), pp. 13088–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11669647> (Accessed: 30 November 2017).
- Bose, S. *et al.* (2003) 'Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic

phosphate.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(40), pp. 39155–65. doi: 10.1074/jbc.M306409200.

Boyer, P. D., Lardy, H. A. and Phillips, P. H. (1942) *THE ROLE OF POTASSIUM IN MUSCLE PHOSPHORYLATIONS**. Wisconsin. Available at: <http://www.jbc.org/> (Accessed: 7 October 2018).

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> (Accessed: 23 October 2018).

Breitbart, R. E., Andreadis, A. and Nadal-Ginard, B. (1987) 'Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes.', *Annual review of biochemistry*, 56, pp. 467–95. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.002343.

Brunet, S. *et al.* (2005) 'Modulation of Ca_v 1.2 Channels by Mg²⁺ Acting at an EF-hand Motif in the COOH-terminal Domain', *The Journal of General Physiology*, 126(4), pp. 311–323. doi: 10.1085/jgp.200509333.

Brüser, A. *et al.* (2012) 'Functional linkage of adenine nucleotide binding sites in mammalian muscle 6-phosphofructokinase.', *The Journal of biological chemistry*, 287(21), pp. 17546–53. doi: 10.1074/jbc.M112.347153.

Buri, A. and McGuigan, J. (1990) 'Intracellular free magnesium and its regulation, studied in isolated ferret ventricular muscle with ion-selective microelectrodes', *Experimental Physiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 75(6), pp. 751–761. doi: 10.1113/expphysiol.1990.sp003457.

Buschmeier, B., Meyer, H. E. and Mayr, G. W. (1987a) 'Characterization of the calmodulin-binding sites of muscle phosphofructokinase and comparison with known calmodulin-binding domains.', *The Journal of biological chemistry*, 262(20), pp. 9454–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2954960> (Accessed: 9 December 2018).

Buschmeier, B., Meyer, H. E. and Mayr, G. W. (1987b) 'Characterization of the calmodulin-binding sites of muscle phosphofructokinase and comparison with known calmodulin-binding domains.', *The Journal of biological chemistry*, 262(20), pp. 9454–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2954960> (Accessed: 12 August 2018).

Byrnes, M. *et al.* (1994) 'Kinetic Characteristics of Phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*: MgATP Nonallosterically Inhibits the Enzyme', *Biochemistry*, 33(11), pp. 3424–3431. doi: 10.1021/bi00177a036.

Cady, E. B. *et al.* (1989) 'Changes in force and intracellular metabolites during fatigue of human skeletal muscle.', *The Journal of physiology*. Wiley-Blackwell, 418, pp. 311–25. doi: 10.1113/jphysiol.1989.sp017842.

Cai, G. Z. *et al.* (1997) 'Regulation of rabbit muscle phosphofructokinase by phosphorylation.', *Biophysical chemistry*, 64(1–3), pp. 199–209. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9127945> (Accessed: 6 May 2015).

Calomenopoulou, M., Kaloyianni, M. and Beis, I. D. (1989) 'Purification and regulatory properties of pigeon erythrocyte pyruvate kinase', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 93(3), pp. 697–706. doi: 10.1016/0305-0491(89)90397-0.

Carbonell, J. *et al.* (1973) 'Pyruvate Kinase. Classes of Regulatory Isoenzymes in Mammalian Tissues', *European Journal of Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 37(1), pp. 148–156. doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02969.x.

Cawood, M. E., Botha, F. C. and Small, J. G. C. (1988) 'Properties of the Phosphofructokinase Isoenzymes from Germinating Cucumber Seeds', *Journal of Plant Physiology*. Urban & Fischer, 132(2), pp. 204–209. doi: 10.1016/S0176-1617(88)80162-7.

Claeyssen, E. *et al.* (2006) 'Cloning, expression, purification, and properties of a putative plasma membrane hexokinase from *Solanum chacoense*.' *Protein expression and purification*, 47(1), pp. 329–39. doi: 10.1016/j.pep.2005.11.003.

Coelho, W. S., Costa, K. C. and Sola-Penna, M. (2007) 'Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization', *Molecular Genetics and Metabolism*, 92(4), pp. 364–370. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.07.010.

Conway, E. J. (1957) 'Nature and Significance of Concentration Relations of Potassium and Sodium Ions in Skeletal Muscle', *Physiological Reviews*, 37(1), pp. 84–132. doi: 10.1152/physrev.1957.37.1.84.

Cottam, G. L. and Mildvan, A. S. (1971) 'Effect of urea on the divalent cation binding site of pyruvate kinase.', *The Journal of biological chemistry*, 246(13), pp. 4363–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4326216> (Accessed: 5 December 2017).

Cronin, C. N. and Tipton, K. F. (1987) 'The roles of magnesium ions in the reaction catalysed by phosphofructokinase from *Trypanosoma brucei*.' *The Biochemical journal*, 247(1), pp. 41–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2961325> (Accessed: 26 November 2017).

Davies, G. J. *et al.* (1994) 'Structure of the ADP complex of the 3-phosphoglycerate kinase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.65 Å', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 50(2), pp. 202–209. doi: 10.1107/S0907444993011138.

Deville-Bonne, D., Bourgain, F. and Garel, J. R. (1991) 'pH dependence of the kinetic properties of allosteric phosphofructokinase from *Escherichia coli*.' *Biochemistry*, 30(23), pp. 5750–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1828369> (Accessed: 20 December 2017).

Dobson, G. P. (1986) *Metabolic Regulation in Skeletal Muscle during Exercise: A fish-mammal comparison*. University of British Columbia.

Dunaway, G. A. *et al.* (1988) 'Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues.', *The Biochemical journal*, 251(3), pp. 677–83. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1149058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (Accessed: 18 April 2016).

Easterby, J. S. and Qadri, S. S. (1982) 'Hexokinase type II from rat skeletal muscle.', *Methods in enzymology*, 90 Pt E, pp. 11–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7154940> (Accessed: 29 October 2018).

Encalada, R. *et al.* (2009) 'Molecular basis of the unusual catalytic preference for GDP/GTP in *Entamoeba histolytica* 3-phosphoglycerate kinase', *FEBS Journal*, 276(7), pp. 2037–2047. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06939.x

Entian, K. D. *et al.* (1985) 'Cloning of hexokinase structural genes from *Saccharomyces cerevisiae* mutants with regulatory mutations responsible for glucose repression.', *Molecular and cellular biology*, 5(11), pp. 3035–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3018496> (Accessed: 17 October 2018).

van Eunen, K. *et al.* (2010) 'Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology', *FEBS Journal*. Wiley/Blackwell (10.1111), 277(3), pp. 749–760. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07524.x

Fang, X. *et al.* (2016) 'Dose-Response Relationship between Dietary Magnesium Intake and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis of Prospective Cohort Studies.', *Nutrients*, 8(11), p. 739. doi: 10.3390/nu8110739

Feng, S. *et al.* (2013) 'Effects of the Fc-III tag on activity and stability of green fluorescent protein and human muscle creatine kinase', *Protein Science*, 22(7), pp. 1008–1015. doi: 10.1002/pro.2282

Fothergill-Gilmore, L. A. and Michels, P. A. (1993) 'Evolution of glycolysis.', *Progress in biophysics and molecular biology*, 59(2), pp. 105–235. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8426905> (Accessed: 8 September 2016).

Gao, H. and Leary, J. A. (2003) 'Multiplex inhibitor screening and kinetic constant determinations for yeast hexokinase using mass spectrometry based assays', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(3), pp. 173–181. doi: 10.1016/S1044-0305(02)00867-X

Garfinkel, L., Altschuld, R. A. and Garfinkel, D. (1986) 'Magnesium in cardiac energy metabolism.', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 18(10), pp. 1003–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3537318> (Accessed: 21 August 2018).

Garfinkel, L. and Garfinkel, D. (1984) 'Calculation of free-Mg²⁺ concentration in adenosine 5'-triphosphate containing solutions in vitro and in vivo.', *Biochemistry*, 23(15), pp. 3547–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6331847> (Accessed: 21 August 2018).

Gerber, G., Preissler, H., Heinrich, R. (1974) 'Hexokinase of Human Erythrocytes', *Eur. J. Biochem.* 45, 39-52.

Gerber, G. *et al.* (1974) 'Hexokinase of Human Erythrocytes. Purification, Kinetic Model and Its Application to the Conditions in the Cell', *European Journal of Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 45(1), pp. 39–52. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03527.x

Gloyn, Anna L *et al.* (2005) 'Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(14), pp. 14105–13. doi: 10.1074/jbc.M413146200.

Gloyn, Anna L. *et al.* (2005) 'Insights into the Structure and Regulation of Glucokinase from a Novel Mutation (V62M), Which Causes Maturity-onset Diabetes of the Young', *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp. 14105–14113. doi: 10.1074/jbc.M413146200.

Gomes Alves, G. and Sola-Penna, M. (2003) 'Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase.', *Molecular genetics and metabolism*, 78(4), pp. 302–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706382> (Accessed: 7 May 2015).

Greger, R. and Velázquez, H. (1987) 'The cortical thick ascending limb and early distal convoluted tubule in the urinary concentrating mechanism.', *Kidney international*, 31(2), pp. 590–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3550228> (Accessed: 1 January 2019).

Günther, T. (2010) 'The biochemical function of Mg²⁺ in insulin secretion, insulin signal transduction and insulin resistance.', *Magnesium research*, 23(1), pp. 5–18. doi: 10.1684/mrh.2009.0195.

Gupta, R. K., Fung, C. H. and Mildvan, A. S. (1976) 'Chromium(III)-adenosine triphosphate as a paramagnetic probe to determine intersubstrate distances on pyruvate kinase. Detection of an active enzyme-metal-ATP-metal complex.', *The Journal of biological chemistry*, 251(8), pp. 2421–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/177415> (Accessed: 5 December 2017).

Gupta, R. K. and Moore, R. D. (1980) '31P NMR studies of intracellular free Mg²⁺ in intact frog skeletal muscle.', *The Journal of biological chemistry*, 255(9), pp. 3987–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6966281> (Accessed: 21 August 2018).

Habison, A., Kubicek, C. P. and Röhr, M. (1983) 'Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*.' *The Biochemical journal*. Portland Press Limited, 209(3), pp. 669–76. doi: 10.1042/BJ2090669.

Hall, E. R. and Cottam, G. L. (1978) 'Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties.', *The International journal of biochemistry*, 9(11), pp. 785–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/367845> (Accessed: 8 September 2016).

Harlos, K., Vas, M. and Blake, C. F. (1992) 'Crystal structure of the binary complex of pig muscle phosphoglycerate kinase and its substrate 3-phospho-D-glycerate', *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 12(2), pp. 133–144. doi: 10.1002/prot.340120207.

Harrady, J. J. *et al.* (1997) 'Identification of a new phosphorylation site in cardiac muscle

phosphofructokinase.', *Biochemical and biophysical research communications*, 234(3), pp. 582–7. doi: 10.1006/bbrc.1997.6677.

Hashimoto, M. and Wilson, J. E. (2002) 'Kinetic and regulatory properties of HK I(+), a modified form of the type I isozyme of mammalian hexokinase in which interactions between the N- and C-terminal halves have been disrupted.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 399(1), pp. 109–15. doi: 10.1006/abbi.2001.2744.

Helmreich, E. and Cori, C. F. (1966) 'The activation of glycolysis in frog sartorius muscle by epinephrine.', *Pharmacological reviews*, 18(1), pp. 189–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5904136> (Accessed: 9 December 2018).

Henz, S. L. *et al.* (2006) 'Kinetic characterization of ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in cells cultured from submandibular salivary glands of rats', *Cell Biology International*, 30(3), pp. 214–220. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.10.027.

Herold, G. (2018) *Innere Medizin*.

Herschlag, D. and Jencks, W. P. (1990) 'Catalysis of the hydrolysis of phosphorylated pyridines by Mg(OH)⁺: a possible model for enzymatic phosphoryl transfer.', *Biochemistry*, 29(21), pp. 5172–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2378873> (Accessed: 29 November 2017).

Hoenderop, J. G. J. and Bindels, R. J. M. (2005) 'Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ channels in health and disease.', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(1), pp. 15–26. doi: 10.1681/ASN.2004070523.

HONGO, K., KONISHI, M. and KURIHARA, S. (1994) 'Cytoplasmic Free Mg²⁺ in Rat Ventricular Myocytes Studied with the Fluorescent Indicator Fura-2.', *The Japanese Journal of Physiology*. THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN, 44(4), pp. 357–378. doi: 10.2170/jjphysiol.44.357.

Horn, R. S. (2008) *Work and Energy in Muscles Why can 't I sprint forever?*, *Energy*.

Howard, T. D., Akots, G. and Bowden, D. W. (1996) 'Physical and genetic mapping of the muscle phosphofructokinase gene (PFKM): reassignment to human chromosome 12q.', *Genomics*, 34(1), pp. 122–7. doi: 10.1006/geno.1996.0250.

Hruby, A. *et al.* (2013) 'Dietary magnesium and genetic interactions in diabetes and related risk factors: a brief overview of current knowledge.', *Nutrients*, 5(12), pp. 4990–5011. doi: 10.3390/nu5124990.

Hunsley, J. R. and Suelter, C. H. (1969a) 'Yeast pyruvate kinase. I. Purification and some chemical properties.', *The Journal of biological chemistry*, 244(18), pp. 4815–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5824554> (Accessed: 20 December 2018).

Hunsley, J. R. and Suelter, C. H. (1969b) 'Yeast pyruvate kinase. II. Kinetic properties.', *The Journal of biological chemistry*, 244(18), pp. 4819–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5824555> (Accessed: 20 December 2018).

Hurth, C. *et al.* (2007) 'Enzymatic activity of immobilized yeast phosphoglycerate kinase', *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), pp. 2449–2455. doi: 10.1016/j.bios.2006.09.007.

Ikari, A., Kano, T. and Suketa, Y. (2002) 'Magnesium influx enhanced by nitric oxide in hypertensive rat proximal tubule cells.', *Biochemical and biophysical research communications*, 294(3), pp. 710–3. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00542-9.

Imamura, K. and Tanaka, T. (1982) 'Pyruvate kinase isozymes from rat.', *Methods in enzymology*, 90 Pt E, pp. 150–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7154944> (Accessed: 9 September 2016).

Iotti, S. *et al.* (2000) 'In vivo (31)P-MRS assessment of cytosolic [Mg(2+)] in the human skeletal muscle in different metabolic conditions.', *Magnetic resonance imaging*. Elsevier, 18(5), pp. 607–14. doi: 10.1016/S0730-725X(00)00132-6.

Iotti, S. and Malucelli, E. (2008) 'In vivo assessment of Mg²⁺ in human brain and skeletal muscle by ³¹P-MRS', *Magnesium Research*, 21(3), pp. 157–162. doi: 10.1684/MRH.2008.0142.

Isaac, J. E. and Rhodes, M. J. C. (1986) 'Phosphofructokinase from lycopersicon esculentum fruits-I. Kinetic properties in relation to its substrates', *Phytochemistry*. Pergamon, 25(2), pp. 339–343. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85477-1.

Jahnen-Dechent, W. and Ketteler, M. (2012) 'Magnesium basics.', *Clinical kidney journal*. Oxford University Press, 5(Suppl 1), pp. i3–i14. doi: 10.1093/ndtplus/sfr163.

Jill D. Dombrackas, Bernard D. Santarsiero, and Mesecar*, A. D. (2005) 'Structural Basis for Tumor Pyruvate Kinase M2 Allosteric Regulation and Catalysis†,‡'. American Chemical Society. doi: 10.1021/B10474923.

Kao, W. H. *et al.* (1999) 'Serum and dietary magnesium and the risk for type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study.', *Archives of internal medicine*, 159(18), pp. 2151–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527292> (Accessed: 8 June 2014).

KARPATKIN, S., HELMREICH, E. and CORI, C. F. (1964) 'REGULATION OF GLYCOLYSIS IN MUSCLE. II. EFFECT OF STIMULATION AND EPINEPHRINE IN ISOLATED FROG SARTORIUS MUSCLE.', *The Journal of biological chemistry*, 239, pp. 3139–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14245353> (Accessed: 9 December 2018).

Khoja, S. M., Beach, N. L. and Kellest, G. L. (1983) 'The isolation and characterization of phosphofructokinase from the epithelial cells of rat small intestine', *Biochemical Journal*, 211(2), pp. 373–379. doi: 10.1042/bj2110373.

Kirchberger, J. *et al.* (2002) '6-phosphofructokinase from *Pichia pastoris*: purification, kinetic and molecular characterization of the enzyme.', *Yeast (Chichester, England)*, 19(11), pp. 933–47. doi: 10.1002/yea.885.

Kleywegt, G. J. and Jones, T. A. (1996) 'Phi/psi-chology: Ramachandran revisited.', *Structure (London, England: 1993)*, 4(12), pp. 1395–400. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994966> (Accessed: 17 October 2018).

- Konrad, M. *et al.* (2006) 'Mutations in the Tight-Junction Gene Claudin 19 (CLDN19) Are Associated with Renal Magnesium Wasting, Renal Failure, and Severe Ocular Involvement', *The American Journal of Human Genetics*, 79(5), pp. 949–957. doi: 10.1086/508617.
- Kopperschläger, G. (1994) 'Phosphofruktokinase from baker's yeast.', *Methods in enzymology*, 228, pp. 144–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519281> (Accessed: 18 April 2016).
- Kumar, S. and Barth, A. (2010) 'Phosphoenolpyruvate and Mg²⁺ binding to pyruvate kinase monitored by infrared spectroscopy.', *Biophysical Journal*. Elsevier, 98(9), pp. 1931–40. doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4335.
- Kuser, P. R. *et al.* (2000) 'The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 275(27), pp. 20814–21. doi: 10.1074/jbc.M910412199.
- Kushmerick, M. J., Moerland, T. S. and Wiseman, R. W. (1992) 'Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 89(16), pp. 7521–5. doi: 10.1073/pnas.89.16.7521.
- Laemmlin, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature*, 227(5259), pp. 680–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> (Accessed: 2 October 2018).
- Lambers, T. T., Bindels, R. and Hoenderop, J. (2006) 'Coordinated control of renal Ca²⁺ handling', *Kidney International*, 69, pp. 650–654. doi: 10.1038/sj.ki.5000169.
- Larsson-Raznikiewicz, M. (1967) 'Kinetic studies on the reaction catalyzed by phosphoglycerate kinase: II. The kinetic relationships between 3-phosphoglycerate, MgATP²⁻ and activating metal ion', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. Elsevier, 132(1), pp. 33–40. doi: 10.1016/0005-2744(67)90189-1.
- Larsson-Raznikiewicz, M. and Arvidsson, L. (1971) 'Inhibition of Phosphoglycerate Kinase by Products and Product Homologues', *European Journal of Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 22(4), pp. 506–512. doi: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01570.x.
- Laughlin, M. R. and Thompson, D. (1996) 'The regulatory role for magnesium in glycolytic flux of the human erythrocyte.', *The Journal of biological chemistry*, 271(46), pp. 28977–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910548> (Accessed: 8 June 2014).
- Lee, C. S. and O'Sullivan, W. J. (1975) 'Properties and mechanism of human erythrocyte phosphoglycerate kinase.', *The Journal of biological chemistry*, 250(4), pp. 1275–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1112804> (Accessed: 10 June 2019).
- Lerch, K., Muir, L. W. and Fischer, E. H. (1975) 'Purification and properties of a yeast protein kinase.', *Biochemistry*, 14(9), pp. 2015–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/235975> (Accessed: 26 November 2017).
- Liao, F., Folsom, A. R. and Brancati, F. L. (1998) 'Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.', *American heart journal*, 136(3), pp. 480–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9736141> (Accessed: 6 October 2016).
- Liu, X.-X. *et al.* (2015) 'Characteristics of testis-specific phosphoglycerate kinase 2 and its association with human sperm quality', *Human Reproduction*, 31(2), p. dev301. doi: 10.1093/humrep/dev301.
- Liu, X. *et al.* (2010) 'Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis', *Oncogene*, 29(3), pp. 442–450. doi: 10.1038/onc.2009.332.
- Löffler, G., Petrides, P. E. and Heinrich, P. C. (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Edited by Springer. Berlin, Heidelberg: Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz.
- Lushchak, V. I. *et al.* (2009) 'AMP-deaminase from goldfish white muscle: regulatory properties and redistribution under exposure to high environmental oxygen level', *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), pp. 443–452. doi: 10.1007/s10695-008-9270-x.
- Lushchak, V. I., Husak, V. V. and Storey, K. B. (2008) 'Regulation of AMP-deaminase activity from white muscle of common carp *Cyprinus carpio*', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2), pp. 362–369. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.10.008.
- Luther, M. A. and Lee, J. C. (1986) 'The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofruktokinase with F-actin.', *The Journal of biological chemistry*, 261(4), pp. 1753–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2935531> (Accessed: 7 August 2018).
- Luz, C. M. *et al.* (1990) 'Human cytosolic adenylate kinase allelozymes; purification and characterization.', *Biochimica et biophysica acta*, 1038(1), pp. 80–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1969292> (Accessed: 16 October 2018).
- Ma, J. *et al.* (1995) 'Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin, and carotid arterial wall thickness: the ARIC study.', *Journal of clinical epidemiology*, 48(7), pp. 927–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782801> (Accessed: 8 June 2014).
- Magnani, M. *et al.* (1982) 'Solubilization, purification, and properties of rabbit brain hexokinase.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 216(2), pp. 449–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7114848> (Accessed: 5 October 2018).
- Magnani, M. *et al.* (1988) 'Purification, properties, and evidence for two subtypes of human placenta hexokinase type I.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 260(1), pp. 388–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3341751> (Accessed: 5 October 2018).
- Maguire, M. E. and Cowan, J. A. (2002) 'Magnesium chemistry and biochemistry.', *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 15(3), pp. 203–10.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12206387> (Accessed: 8 June 2014).

Mahrenholz, A. M., Lan, L. and Mansour, T. E. (1991) 'Phosphorylation of heart phosphofructokinase by protein kinase', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174(3), pp. 1255–1259. doi: 10.1016/0006-291X(91)91556-R.

Maldonado, E. N. *et al.* (2016) 'ATP/ADP Turnover and Import of Glycolytic ATP into Mitochondria in Cancer Cells Is Independent of the Adenine Nucleotide Translocator.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 291(37), pp. 19642–50. doi: 10.1074/jbc.M116.734814.

Martell, A. E. and Smith, R. M. (1974) *Critical stability constants*. Available at: <https://trove.nla.gov.au/work/10861213?q&versionId=45272155> (Accessed: 20 October 2019).

Maughan, D. (1983) 'Diffusible magnesium in frog skeletal muscle cells', *Biophysical Journal*, 43(1), pp. 75–80. doi: 10.1016/S0006-3495(83)84325-2.

Maughan, D. and Recchia, C. (1985) 'Diffusible sodium, potassium, magnesium, calcium and phosphorus in frog skeletal muscle.', *The Journal of physiology*, 368, pp. 545–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3878405> (Accessed: 12 October 2018).

Mavis, R. D. and Stellwagen, E. (1970) 'The role of cations in yeast phosphofructokinase catalysis.', *The Journal of biological chemistry*, 245(4), pp. 674–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4244536> (Accessed: 14 August 2018).

Mayr, G. W. (1984) 'Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase. Interplay with metabolic effectors of the enzyme under physiological conditions.', *European journal of biochemistry / FEBS*, 143(3), pp. 521–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6236976> (Accessed: 22 September 2014).

McGuigan, J. A. S. *et al.* (2007) 'Comparison between measured and calculated ionised concentrations in Mg²⁺ /ATP, Mg²⁺ /EDTA and Ca²⁺ /EGTA buffers; influence of changes in temperature, pH and pipetting errors on the ionised concentrations.', *Magnesium research*, 20(1), pp. 72–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17536492> (Accessed: 20 October 2019).

McLeish, M. J. and Kenyon, G. L. (2005) 'Relating Structure to Mechanism in Creatine Kinase', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1), pp. 1–20. doi: 10.1080/10409230590918577.

Mediavilla, D., Metón, I. and Baanante, I. V. (2008) 'Purification and kinetic characterization of 6-phosphofructo-1-kinase from the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*).', *Journal of biochemistry*, 144(2), pp. 235–44. doi: 10.1093/jb/mvn066.

Mensonides, F. I. C. *et al.* (2013) 'A new regulatory principle for in vivo biochemistry: Pleiotropic low affinity regulation by the adenine nucleotides - Illustrated for the glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS Letters*, 587(17), pp. 2860–2867. doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.013.

Mesecar, A. D. and Nowak, T. (1997) 'Metal-Ion-Mediated Allosteric Triggering of Yeast Pyruvate Kinase 2. A Multidimensional Thermodynamic Linked-Function Analysis [†]', *Biochemistry*, 36(22), pp. 6803–6813. doi: 10.1021/bi962870s.

Mildvan, A. S. and Cohn, M. (1966) 'Kinetic and magnetic resonance studies of the pyruvate kinase reaction. II. Complexes of enzyme, metal, and substrates.', *The Journal of biological chemistry*, 241(5), pp. 1178–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5933875> (Accessed: 3 December 2017).

Miziorko, H. M. and Eckstein, F. (1984) 'The stereochemical course of the ribulose-5-phosphate kinase-catalyzed reaction.', *The Journal of biological chemistry*, 259(21), pp. 13037–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6490643> (Accessed: 29 November 2017).

Moosburger, K. (1995) *Die muskuläre Energiebereitstellung im Sport*. Available at: <http://www.dr-moosburger.at/wp-content/uploads/pub023.pdf> (Accessed: 8 January 2019).

Mor, I., Cheung, E. C. and Voudsen, K. H. (2011) 'Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions.', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 76, pp. 211–6. doi: 10.1101/sqb.2011.76.010868.

Moreno, F. *et al.* (1986) 'Hexokinase PII from *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by changes in the cytosolic Mg²⁺-free ATP concentration.', *European journal of biochemistry*, 161(3), pp. 565–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3539593> (Accessed: 27 November 2017).

Nair, A. V. *et al.* (2012) 'Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28), pp. 11324–9. doi: 10.1073/pnas.1113811109.

Nobuaki Ogasawara *et al.* (1982) 'AMP deaminase isozymes in human tissues', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Elsevier, 714(2), pp. 298–306. doi: 10.1016/0304-4165(82)90337-3.

Noguchi, T. *et al.* (1987) 'The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters.', *The Journal of biological chemistry*, 262(29), pp. 14366–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3654663> (Accessed: 9 September 2016).

Noguchi, T., Inoue, H. and Tanaka, T. (1986a) 'The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing.', *The Journal of biological chemistry*, 261(29), pp. 13807–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3020052> (Accessed: 5 December 2017).

Noguchi, T., Inoue, H. and Tanaka, T. (1986b) 'The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing.', *The Journal of biological chemistry*, 261(29), pp. 13807–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3020052> (Accessed: 8 September 2016).

Norton, G. E. and Feldman, I. (1980) 'Effects of free magnesium and alkali ions on the conformation and glucose-binding strength of yeast hexokinase isozymes.', *Biochimica et biophysica acta*, 611(1), pp. 99–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6985800> (Accessed: 27 November 2017).

O'Connell, K. *et al.* (2008) 'Lectin-based proteomic profiling of aged skeletal muscle: Decreased pyruvate kinase isozyme M1 exhibits drastically increased levels of N-glycosylation', *European Journal of Cell*

Biology, 87(10), pp. 793–805. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.04.003.

Opie, L. H., Owen, P. and Mansford, K. R. L. (1971) 'Metabolic adjustments to acute heart work: observations in the isolated perfused rat heart', *Cardiovascular Research*, 5(supp1), pp. 87–95. doi: 10.1093/cvr/5.suppl.87.

Oria-Hernández, J. *et al.* (2005) 'Pyruvate kinase revisited: the activating effect of K⁺.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(45), pp. 37924–9. doi: 10.1074/jbc.M508490200.

Otto, M. *et al.* (1974) 'A mathematical model for the influence of fructose 6-phosphate, ATP, potassium, ammonium and magnesium on the phosphofructokinase from rat erythrocytes.', *European journal of biochemistry*, 49(1), pp. 169–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4282073> (Accessed: 12 November 2017).

Ozawa, K. (1985) 'Purification and kinetic properties of phosphofructokinase from dental pulps of rat incisors.', *Archives of oral biology*, 30(7), pp. 577–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2933017> (Accessed: 7 November 2017).

Paetkau, V. and Lardy, H. A. (1967) 'Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties.', *The Journal of biological chemistry*, 242(9), pp. 2035–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4225717> (Accessed: 26 November 2017).

Page, S., Salem, M. and Laughlin, M. R. (1998) 'Intracellular Mg²⁺ regulates ADP phosphorylation and adenine nucleotide synthesis in human erythrocytes.', *The American journal of physiology*, 274(5 Pt 1), pp. E920–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612251> (Accessed: 9 June 2014).

Passonneau, J. V. and Lowry, O. H. (1964) 'The role of phosphofructokinase in metabolic regulation', *Advances in Enzyme Regulation*. Pergamon, 2, pp. 265–274. doi: 10.1016/S0065-2571(64)80018-2.

PASSONNEAU, J. V. and LOWRY, O. H. (1962) 'Phosphofructokinase and the Pasteur effect.', *Biochemical and biophysical research communications*, 7, pp. 10–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14484231> (Accessed: 4 October 2014).

Perkins, R. E. *et al.* (1983) 'The complete amino acid sequence of yeast phosphoglycerate kinase.', *The Biochemical journal*, 211(1), pp. 199–218. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6347186> (Accessed: 17 October 2018).

Peters, B. A. and Neet, K. E. (1977) 'Regulatory properties of yeast hexokinase PII. Metal specificity, nucleotide specificity, and buffer effects.', *The Journal of biological chemistry*, 252(15), pp. 5345–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461> (Accessed: 5 December 2017).

Pochmann, D. *et al.* (2008) 'AMP hydrolysis in soluble and microsomal rat cardiac cell fractions: kinetic characterization and molecular identification of 5'-nucleotidase', *Bioscience Reports*, 28(5), p. 267. doi: 10.1042/BSR20070039.

Polimeni, P. I. and Page, E. (1974) 'Further observations on magnesium transport in rat ventricular muscle.', *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*, 4, pp. 217–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4283211> (Accessed: 21 August 2018).

Ponce, J., Roth, S. and Harkness, D. R. (1971) 'Kinetic studies on the inhibition of glycolytic kinases of human erythrocytes by 2,3-diphosphoglyceric acid', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. Elsevier, 250(1), pp. 63–74. doi: 10.1016/0005-2744(71)90120-3.

Przybylski, F. *et al.* (1985) 'Inorganic phosphate amplifies the effects of AMP and fructose-2,6-bisphosphate on yeast phosphofructokinase.', *Biomedica biochimica acta*, 44(11–12), pp. 1559–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2936338> (Accessed: 7 December 2017).

Purich, D. L. and Fromm, H. J. (1972) 'Activation of brain hexokinase by magnesium ions and by magnesium ion--adenosine triphosphate complex.', *The Biochemical journal*, 130(1), pp. 63–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4655453> (Accessed: 5 December 2017).

Quamme, G. A. and Smith, C. M. (1984) 'Magnesium transport in the proximal straight tubule of the rabbit', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 246(5), pp. F544–F550. doi: 10.1152/ajprenal.1984.246.5.F544.

Ranieri-Raggi, M. *et al.* (1995) 'Regulation of skeletal-muscle AMP deaminase: involvement of histidine residues in the pH-dependent inhibition of the rabbit enzyme by ATP.', *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 309 (Pt 3)(Pt 3), pp. 845–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7639701> (Accessed: 16 November 2018).

Rassow, J. *et al.* (2016) *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Raźnikiewicz, M. L. and Schierbeck, B. (1977) 'Activation and inhibition of the phosphoglycerate kinase reaction by ATP.', *Biochimica et biophysica acta*, 481(1), pp. 283–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843540> (Accessed: 4 November 2018).

REGEN, D. M. *et al.* (1964) 'ADJUSTMENT OF GLYCOLYSIS TO ENERGY UTILIZATION IN THE PERFUSED RAT HEART. THE EFFECT OF CHANGES IN THE IONIC COMPOSITION OF THE MEDIUM ON PHOSPHOFRUCTOKINASE ACTIVITY.', *The Journal of biological chemistry*, 239, pp. 381–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14169134> (Accessed: 9 December 2018).

Renkema, K. Y. *et al.* (2008) 'Calcium and phosphate homeostasis: Concerted interplay of new regulators', *Annals of Medicine*, 40(2), pp. 82–91. doi: 10.1080/07853890701689645.

Reuben, J. and Cohn, M. (1970) 'Magnetic resonance studies of manganese (II) binding sites of pyruvate kinase. Temperature effects and frequency dependence of proton relaxation rates of water.', *The Journal of biological chemistry*, 245(24), pp. 6539–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4320606> (Accessed: 5 December 2017).

Reuter, R. *et al.* (2000) 'Purification, molecular and kinetic characterization of phosphofructokinase-1 from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for an unusual subunit composition.', *Yeast (Chichester*,

England), 16(14), pp. 1273–85. doi: 10.1002/1097-0061(200010)16:14<1273::AID-YEA621>3.0.CO;2-#.

Rivas-Pardo, J. A. *et al.* (2011) 'Divalent metal cation requirements of phosphofructokinase-2 from *E. coli*. Evidence for a high affinity binding site for Mn²⁺', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505(1), pp. 60–66. doi: 10.1016/j.abb.2010.09.020.

Robertson, S. P., David Johnson, J. and POTRER, J. D. (no date) *THE TIME-COURSE OF Ca²⁺ EXCHANGE WITH CALMODULIN, TROPONIN, PARVALBUMIN, AND MYOSIN IN RESPONSE TO TRANSIENT INCREASES IN Ca²⁺*, *Biophysical Journal*. doi: 10.1016/S0006-3495(81)84868-0.

Rolleston, F. S. and Newsholme, E. A. (1967) 'Control of glycolysis in cerebral cortex slices.', *The Biochemical journal*, 104(2), pp. 524–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4227784> (Accessed: 9 December 2018).

Rosano, C. *et al.* (1999) 'Binding of non-catalytic ATP to human hexokinase I highlights the structural components for enzyme-membrane association control.', *Structure Fold.Des.*, 7, pp. 1427–1437. doi: 10.2210/PDB1QHAPDB.

Rude, R. K. (1998) *Clinical Review Magnesium Deficiency: A Cause of Heterogenous Disease in Humans*. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1359/jbmr.1998.13.4.749> (Accessed: 16 October 2018).

SAKS, V. A. *et al.* (1975) 'Studies of Energy Transport in Heart Cells. Mitochondrial Isoenzyme of Creatine Phosphokinase: Kinetic Properties and Regulatory Action of Mg²⁺ Ions', *European Journal of Biochemistry*, 57(1), pp. 273–290. doi: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb02299.x.

Sales, C. H. and Pedrosa, L. de F. C. (2006) 'Magnesium and diabetes mellitus: their relation.', *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 25(4), pp. 554–62. doi: 10.1016/j.clnu.2006.03.003.

Schering, B. *et al.* (1982) 'Purification and properties of pyruvate kinase type M2 from rat lung.', *Biochimica et biophysica acta*, 717(2), pp. 337–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7115773> (Accessed: 6 October 2018).

Schlattner, U. *et al.* (2016) 'Cellular compartmentation of energy metabolism: creatine kinase microcompartments and recruitment of B-type creatine kinase to specific subcellular sites', *Amino Acids*, 48(8), pp. 1751–1774. doi: 10.1007/s00726-016-2267-3.

Schöneberg, T. *et al.* (2013) 'Structure and allosteric regulation of eukaryotic 6-phosphofructokinases.', *Biological chemistry*, 394(8), pp. 977–93. doi: 10.1515/hsz-2013-0130.

Schrag, D. *et al.* (2005) 'Cetuximab therapy and symptomatic hypomagnesemia.', *Journal of the National Cancer Institute*, 97(16), pp. 1221–4. doi: 10.1093/jnci/dji242.

Schröter, A. and Kopperschläger, G. (1996) '6-phosphofructo-1-kinase from the lipid accumulating, non-fermentative, red yeast *Rhodotorula glutinis*.', *FEMS microbiology letters*, 142(2–3), pp. 247–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810508> (Accessed: 18 April 2016).

Sjöros, T. J. *et al.* (2018) 'Increased insulin-stimulated glucose uptake in both leg and arm muscles after sprint interval and moderate-intensity training in subjects with type 2 diabetes or prediabetes', *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 28(1), pp. 77–87. doi: 10.1111/sms.12875.

Sola-Penna, M., Da Silva, D., Coelho, Wagner S, *et al.* (2010) 'Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism.', *IUBMB life*, 62(11), pp. 791–6. doi: 10.1002/iub.393.

Sola-Penna, M., Da Silva, D., Coelho, Wagner S., *et al.* (2010) 'Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism', *IUBMB Life*, 62(11), pp. 791–796. doi: 10.1002/iub.393.

Song, Y. *et al.* (2004) 'Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women.', *Diabetes care*, 27(1), pp. 59–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693967> (Accessed: 7 October 2016).

Song, Y. *et al.* (2006) 'Effects of oral magnesium supplementation on glycaemic control in Type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized double-blind controlled trials.', *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 23(10), pp. 1050–6. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01852.x.

Soong, C. and O'sullivan, W. J. (1975) *Properties and Mechanism of Human Erythrocyte Phosphoglycerate Kinase*, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Available at: <http://www.jbc.org/> (Accessed: 17 October 2018).

Srivastava, D., Nandi, S. and Dey, M. (2019) 'Mechanistic and Structural Insights into Cysteine-Mediated Inhibition of Pyruvate Kinase Muscle Isoform 2.', *Biochemistry*, 58, pp. 3669–3682. doi: 10.2210/PDB6NU1/PDB.

Staal, G. E. J. *et al.* (1971) 'Human erythrocyte pyruvate kinase. Its purification and some properties', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 227(1), pp. 86–96. doi: 10.1016/0005-2744(71)90170-7.

Suárez, A. *et al.* (1995) 'Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesaemic rats.', *Diabetologia*, 38(11), pp. 1262–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582534> (Accessed: 9 June 2014).

Suelter, C. H. *et al.* (1966) 'Studies on the interaction of substrate and monovalent and divalent cations with pyruvate kinase.', *Biochemistry*, 5(1), pp. 131–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5938930> (Accessed: 3 December 2017).

Sugden, P. H. and Newsholme, E. A. (1975) 'The effects of ammonium, inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofructokinases from muscle and nervous tissues of vertebrates and invertebrates.', *The Biochemical journal*, 150(1), pp. 113–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/128356> (Accessed: 5 July 2018).

- Sui, D. and Wilson, J. E. (1997) 'Structural determinants for the intracellular localization of the isozymes of mammalian hexokinase: intracellular localization of fusion constructs incorporating structural elements from the hexokinase isozymes and the green fluorescent protein.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 345(1), pp. 111–25. doi: 10.1006/abbi.1997.0241.
- Takenaka, M. *et al.* (1989) 'Rat pyruvate kinase M gene. Its complete structure and characterization of the 5'-flanking region.', *The Journal of biological chemistry*, 264(4), pp. 2363–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2914912> (Accessed: 9 September 2016).
- Tamura, T., Shiraki, H. and Nakagawa, H. (1980) 'Purification and characterization of adenylate kinase isozymes from rat muscle and liver.', *Biochimica et biophysica acta*, 612(1), pp. 56–66. doi: 10.1016/0005-2744(80)90278-8.
- Tari, L. W. *et al.* (1997) 'Mg(2+)-Mn2+ clusters in enzyme-catalyzed phosphoryl-transfer reactions.', *Nature structural biology*, 4(12), pp. 990–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406547> (Accessed: 29 November 2017).
- Thuma, E., Schirmer, R. H. and Schirmer, I. (1972) 'Preparation and characterization of a crystalline human ATP:AMP phosphotransferase.', *Biochimica et biophysica acta*, 268(1), pp. 81–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5062950> (Accessed: 16 October 2018).
- Troncoso-Ponce, M. A. *et al.* (2011) 'Cloning, biochemical characterization and expression of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) hexokinase associated with seed storage compounds accumulation', *Journal of Plant Physiology*, 168(4), pp. 299–308. doi: 10.1016/j.jplph.2010.07.018.
- Tsuboi, K. K. and Chervenka, C. H. (1975) 'Adenylate kinase of human erythrocyte. Isolation and properties of the predominant inherited form.', *The Journal of biological chemistry*, 250(1), pp. 132–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/166983> (Accessed: 16 October 2018).
- Turner, W. L. and Plaxton, W. C. (2003) 'Purification and characterization of pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases from banana fruit.', *Planta*, 217(1), pp. 113–21. doi: 10.1007/s00425-002-0962-7.
- Valentini, G. *et al.* (2000) 'The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase. A SITE-DIRECTED MUTAGENESIS STUDY', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 275(24), pp. 18145–18152. doi: 10.1074/jbc.M001870200.
- Valentini, G. *et al.* (2002) 'Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia.', *The Journal of biological chemistry*, 277(26), pp. 23807–14. doi: 10.1074/jbc.M202107200.
- Varga, A. *et al.* (2009) 'Direct Kinetic Evidence That Lysine 215 Is Involved in the Phospho-Transfer Step of Human 3-Phosphoglycerate Kinase', *Biochemistry*. American Chemical Society, 48(29), pp. 6998–7008. doi: 10.1021/bi900396h.
- Vestergaard, H. (1999) 'Studies of gene expression and activity of hexokinase, phosphofructokinase and glycogen synthase in human skeletal muscle in states of altered insulin-stimulated glucose metabolism.', *Danish medical bulletin*, 46(1), pp. 13–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10081651> (Accessed: 24 May 2015).
- Voets, T. *et al.* (2004) 'TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption.', *The Journal of biological chemistry*, 279(1), pp. 19–25. doi: 10.1074/jbc.M311201200.
- Volpe, S. L. (2008) 'Magnesium, the metabolic syndrome, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus.', *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(3), pp. 293–300. doi: 10.1080/10408390701326235.
- Vora, S. *et al.* (1983) 'Regional assignment of the human gene for platelet-type phosphofructokinase (PFKP) to chromosome 10p: novel use of polyspecific rodent antisera to localize human enzyme genes.', *Human genetics*, 63(4), pp. 374–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6222962> (Accessed: 10 September 2016).
- Wallach, S. (1982) '*Magnesium: Its Biologic Significance*', by J. K. Aikawa', *Medical Physics*. Wiley-Blackwell, 9(4), pp. 588–589. doi: 10.1118/1.595176.
- Walldén, K. and Nordlund, P. (2011) 'Structural Basis for the Allosteric Regulation and Substrate Recognition of Human Cytosolic 5'-Nucleotidase II', *Journal of Molecular Biology*, 408(4), pp. 684–696. doi: 10.1016/j.jmb.2011.02.059.
- Wang, C. *et al.* (2001) 'Human erythrocyte pyruvate kinase: characterization of the recombinant enzyme and a mutant form (R510Q) causing nonspherocytic hemolytic anemia.', *Blood*, 98(10), pp. 3113–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698298> (Accessed: 29 October 2018).
- Watson, H. C. *et al.* (1982) 'Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase.', *Embo J.*, 1, pp. 1635–1640. doi: 10.2210/PDB3PGK/PDB.
- Wegener, G. *et al.* (1987) 'Properties of locust muscle 6-phosphofructokinase and their importance in the regulation of glycolytic flux during prolonged flight', *Journal of Comparative Physiology B*. Springer-Verlag, 157(3), pp. 315–326. doi: 10.1007/BF00693358.
- Wilson, J. E. (2003) 'Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function.', *The Journal of experimental biology*, 206(Pt 12), pp. 2049–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12756287> (Accessed: 6 September 2016).
- Yamazaki, D. *et al.* (2013) 'Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across epithelia: a mouse model.', *PLoS genetics*, 9(12), p. e1003983. doi: 10.1371/journal.pgen.1003983.
- Yoshida, A. (1975) 'Human phosphoglycerate kinase.', *Methods in enzymology*, 42, pp. 144–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1134351> (Accessed: 29 November 2017).
- Yu, J. P., Ladapo, J. and Whitman, W. B. (1994) 'Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus maripaludis*.', *Journal of Bacteriology*, 176(2), pp. 325–332. doi: 10.1128/jb.176.2.325-332.1994.
- Zeeck, Axel; Zeeck, Sabine; Grond, S. (2017) *Chemie für Mediziner*. 9. Auflage. Edited by A. Zeeck.

Zhang, W. *et al.* (2012) 'Associations of dietary magnesium intake with mortality from cardiovascular disease: the JACC study.', *Atherosclerosis*, 221(2), pp. 587–95. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.034.

Zhu, X. *et al.* (1995) 'Role of Glycine 212 in the Allosteric Behavior of Phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*', *Biochemistry*, 34(8), pp. 2560–2565. doi: 10.1021/bi00008a021.

8. Danksagung

Im Folgenden möchte ich meinen Dank gegenüber einigen Personen ausdrücken, ohne deren Unterstützung das vorliegende Werk nicht hätte zustande kommen können.

Zunächst einmal danke ich außerordentlich meinem Doktorvater, Herrn Professor Georg W. Mayr, für die Betreuung meiner Arbeit, bei der er mir mit Rat und Tat sowie kritischen Kommentaren über viele Jahre hinweg zur Seite stand.

Eine große Unterstützung waren zudem der medizinisch-technische Assistent Herr Werner Fanick und die verstorbene Chemieingenieurin Frau Doktor rerum naturalium Hongying Lin welche mir bei der Durchführung der Experimente eine große Hilfe waren.

Ein ganz besonderer Dank gilt zudem meinen lieben Eltern und meiner großartigen Schwester, die mir über die lange Zeit hinweg nicht nur eine unverzichtbare moralische Stütze waren, sondern auch das Lektorat der Arbeit begleiteten.

Zuletzt danke ich Lisa Leypoldt und Jana Kirchner, die als gute Freundinnen stets aufmunternde Worte für mich bereithielten, wenn die Arbeit etwas schwerer fiel.

9. Lebenslauf

- Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt -

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Andrea Späth', written over a dotted line.