

# Biochemisches Grundpraktikum SS 25

## Protokoll zu Versuch

**Titel:** GAPDH: Kopplung enzymatischer Reaktionen:  
Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

**Praktikant/in:** Jannus Goecke    Praktikumsnummer: 524

**Praktikant/in:** Muhan Bao    Praktikumsnummer: 523

**Versuchsdatum:** 11.07.2025

**Versuchsbetreuung:** Olivya Wiriadisastra

**Kolloquium:** Alina Mirwald

Wir versichern, dass wir dieses Protokoll komplett eigenständig angefertigt haben.

**Datum:** 22. August 2025

**Unterschrift(en):** Jannus Goecke    Muhan Bao

# Hinweise zu benutzter Software

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden folgende Programme für die genannten Zwecke verwendet:

- Overleaf – Erstellung des Dokuments
- R – für Arbeit mit Daten und Erstellung der Graphiken
- GitHub – Teilen von R-Skripten/Notebooks und Rohdaten
- Zotero – Literaturverwaltung
- Sketch – Bildbearbeitung
- LanguageTool – Rechtschreibungsverbesserung
- Sprachmodelle (gpt-4o, o3, claude-sonnet-4) – Erstellung von Latex-Code für große Tabellen, Einbindung von Grafiken oder Nachbereitung Sonderzeichen-reicher Textabschnitte; Unterstützung bei R-Code-Erstellung; Feedback zur wissenschaftlichen Formulierung; Brainstorming.

Bei Fragen zur Nutzung von Software stehen wir gerne zur Verfügung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Durchführung</b>	<b>7</b>
2.1	Bestimmung der Gleichgewichtskonstante, freien Standardenthalpie und Einflüssen von Effektoren . . . . .	7
2.2	Quantitative Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat . . . . .	7
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>9</b>
3.1	Bestimmung der Gleichgewichtskonstante, freien Standardenthalpie und Einflüssen von Effektoren . . . . .	9
3.2	Quantitative Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat . . . . .	11
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>13</b>
4.1	Analyse des Reaktionsverlaufs und Einfluss von Effektoren . . . . .	13
4.2	Bestimmung der Gleichgewichtskonstante und freien Standardenthalpie . .	14
4.3	Quantitative Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat . . . . .	15
4.4	Diskussion des kinetischen Verhaltens nach TIM-Zugabe . . . . .	15
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>17</b>

# Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des von der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysierten Schritts . . . . .	6
2	Zeitlicher Verlauf der Extinktion bei 366 nm zur Charakterisierung von GAPDH. . . . .	10
3	Zeitlicher Verlauf der Extinktion bei 366 nm zur Bestimmung der FBP-Konzentration. . . . .	12

## Tabellenverzeichnis

1	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante. . . . .	7
2	Chronologische Abfolge der Reagenzzugaben und Messungen im Versuch zur GAPDH-Charakterisierung. . . . .	8
3	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur quantitativen Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat. . . . .	8
4	Berechnete Gleichgewichtskonstanten $K'$ der GAPDH-Reaktion bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen. . . . .	10
5	Gemessene Extinktionen bei 366 nm nach den schrittweisen Zugaben von Kaliumphosphatpuffer (2–4) und Triosephosphat-Isomerase (5). . . . .	17

# 1 Einleitung

Proteine sind die molekularen Maschinen der Zelle. Sie fungieren als Enzyme, die den Stoffwechsel antreiben, als strukturelle Gerüste, und als Signalüberträger, die auf Umweltreize reagieren. Lange Zeit herrschte in der Biochemie das Dogma "ein Gen, ein Protein, eine Funktion" vor. Dieses Modell lieferte die Grundlage für das Verständnis metabolischer Pfade wie der Glykolyse, in der eine Kaskade von Enzymen Zuckermoleküle schrittweise abbaut, um die Energiewährung der Zelle, Adenosintriphosphat (ATP), zu gewinnen.

Dieses klassische Bild hat sich in den letzten Jahrzehnten jedoch gewandelt. Es zeigt sich, dass eine erstaunlich hohe Zahl von Proteinen über sogenannte "Moonlighting-Funktionen" verfügt [6]. Diese Proteine sind fähig, neben ihrer etablierten Hauptfunktion eine oder mehrere völlig andere, oft nicht verwandte Aufgaben zu übernehmen. Ein Enzym aus dem Zuckerstoffwechsel könnte sich demnach unter bestimmten Bedingungen in ein Protein verwandeln, das an der Genregulation im Zellkern beteiligt ist. Dieses Phänomen ist kein seltener Sonderfall, sondern ein weit verbreiteter Mechanismus, der es Zellen ermöglicht, mit einem begrenzten Satz an Proteinen eine maximale funktionelle Komplexität und Anpassungsfähigkeit zu erreichen [5].

Das Beispiel für ein solches Moonlighting-Enzym ist die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das zentrale Enzym des vorliegenden Versuchs. Ihre Funktion ist unbestritten und seit fast einem Jahrhundert bekannt: Im Zytoplasma katalysiert sie den fünften/sechsten<sup>1</sup> Schritt der Glykolyse – die oxidative Phosphorylierung von Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) (Abbildung 1). Diese Reaktion nutzt die Energie einer Oxidation, um eine energiereiche Phosphatbindung zu erzeugen, die im nachfolgenden Schritt die erste Substratkettenphosphorylierung und somit den ersten Nettogewinn an ATP in der Glykolyse ermöglicht [1].

Neben dieser fundamentalen Rolle im Energiestoffwechsel ist die GAPDH jedoch auch an einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse beteiligt. Sie kann in den Zellkern wandern und dort an der DNA-Reparatur und der Transkriptionsregulation mitwirken, sie ist am Transport von Vesikeln beteiligt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) [9]. Der molekulare Schalter, der zwischen diesen Funktionen entscheidet, ist oft der Redox-Zustand eines einzigen Aminosäurerestes im aktiven Zentrum des Enzyms: Cystein-149. Die Thiolgruppe dieses Cysteins ist für die katalytische Aktivität in der Glykolyse essentiell, da sie ein kovalentes Thioester-Intermediat mit dem Substrat bildet [10]. Gleichzeitig macht sie das Enzym anfällig für oxidative Modifikationen. Unter oxidativem Stress, einem Zustand, der mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson in Verbindung gebracht wird, kann Cys-149 oxidiert werden. Dies inaktiviert nicht nur die glykolytische Funktion der GAPDH, sondern löst auch ihre nukleäre Translokation und ihre pro-apoptotische Wirkung aus [3].

Vor diesem Hintergrund ist es wichtig zunächst die Hauptfunktion der GAPDH zu verstehen. Das Ziel des vorliegenden Versuchs ist, die grundlegenden biochemischen Eigenschaften

---

<sup>1</sup>abhängig davon, ob man die Isomerisierung zwischen Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat als Teil der Glykolyse zählt.

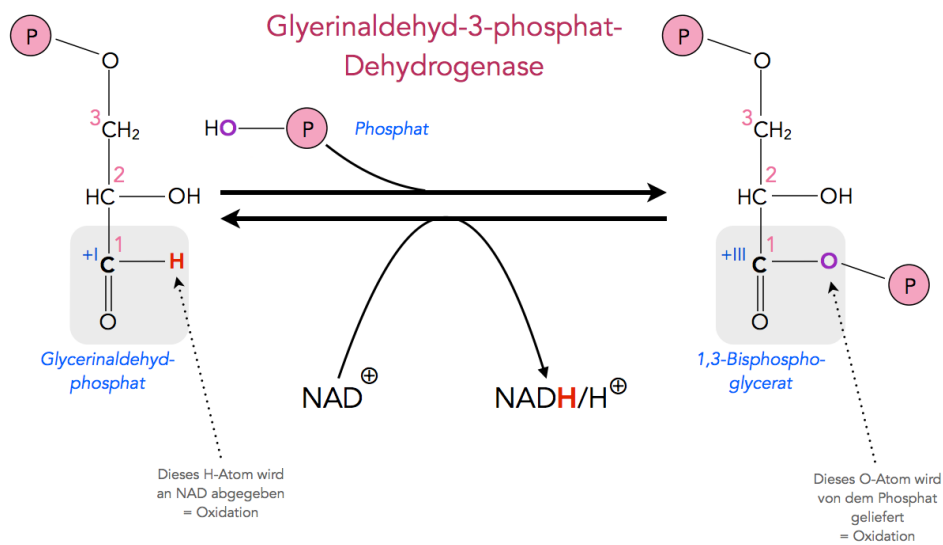


Abbildung 1: Schematische Darstellung des von der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysierten Schritts. (Darstellung aus [4])

der GAPDH zu charakterisieren. Zunächst wurden die thermodynamischen Parameter der von ihr katalysierten Reaktion bestimmt, indem die Gleichgewichtskonstante  $K'$  und die freie Standardenthalpie  $\Delta G'^{\circ}$  ermittelt wurden. Anschließend wurde die zentrale Bedeutung des reaktiven Thiol-Restes im aktiven Zentrum untersucht. Dies erfolgte durch gezielte Hemmung mit dem Thiol-spezifischen Reagenz p-Hydroxymercuribenzoat und die nachfolgende Reaktivierung durch 2-Mercaptoethanol. Die Wirkung von Arsenat als Entkoppler der Reaktion wurde ebenfalls analysiert. Schließlich wurde die Enzymaktivität in einem gekoppelten Testsystem genutzt, um die Konzentration einer unbekannten Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung quantitativ zu bestimmen.

## 2 Durchführung

Der Versuch umfasste die (i) Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der von der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysierten Reaktion sowie die (ii) Charakterisierung der Enzymaktivität in Anwesenheit verschiedener Effektoren und (iii) die Bestimmung der Konzentration einer unbekannten Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung (FBP-Lösung).

Zu Beginn wurde eine Enzymmischung aus Aldolase und GAPDH hergestellt. Hierfür wurden 6  $\mu\text{L}$  einer Aldolase-Stammlösung ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) mit 24  $\mu\text{L}$  einer GAPDH-Stammlösung ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in einem Reaktionsgefäß gemischt und die Mischung bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Dieser Schritt wurde bereits vor Beginn des Versuchs durch die Betreuerin durchgeführt.

### 2.1 Bestimmung der Gleichgewichtskonstante, freien Standardenthalpie und Einflüssen von Effektoren

Für die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante, freien Standardenthalpie und Einflüssen von Effektoren wurde ein Reaktionsansatz gemäß Tabelle 1 in einer Plastikkuvette vorbereitet.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante.

Komponente	Konzentration [M]	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Bidestilliertes Wasser	-	730
TE-Puffer (pH 7,0)	1	80
Fructose-1,6-bisphosphat (FBP)	0,1	100
NAD <sup>+</sup>	0,1	50
<b>Gesamtvolumen (vor Enzymzugabe)</b>		<b>960</b>

Die Küvette wurde in einem Photometer (Pharmacia Ultrospec II) platziert und die Extinktion bei 366 nm auf null justiert. Die anschließende Versuchsdurchführung, bestehend aus sequenziellen Reagenzzugaben und photometrischen Messungen, ist in Tabelle 2 detailliert. Nach jeder Zugabe wurde der Inhalt der Küvette durch Auf- und Abpipetieren gemischt.

### 2.2 Quantitative Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat

Im zweiten Versuchsteil wurde die Konzentration einer unbekannten FBP-Lösung bestimmt. Der hierfür verwendete Messansatz ist in Tabelle 3 aufgeführt. Nach dem Nullabgleich im



Tabelle 2: Chronologische Abfolge der Reagenzzugaben und Messungen im Versuch zur GAPDH-Charakterisierung.

Schritt	Menge	Komponente	Vorgehen und Messung
1	10 $\mu$ L	Aldolase-GAPDH-Enzymmischung	Start der Reaktion. Der anfängliche Extinktionsanstieg wurde verfolgt, bis ein konstanter Wert ( $E_0$ ) erreicht war.
2–4	je 10 $\mu$ L	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) in den Konzentrationen 100 mM, 500 mM und 1 M	Nach jeder Zugabe Messung bei 366 nm für ca. 10 min in Intervallen von 15 s gemessen, bis zu neuem Gleichgewicht.
5	2 $\mu$ L	Triosephosphat-Isomerase (TIM), 5 mg mL <sup>-1</sup>	Messung bei 366 nm für ca. 10 min in Intervallen von 15 s bis zu neuem Gleichgewicht.
6	10 $\mu$ L	Natriumarsenat, 0,5 M	Beobachtung eines schnellen Extinktionsanstiegs (Entkopplung). Nächster Schritt nach 10 s.
7	20 $\mu$ L	p-Hydroxymercuribenzoat, 10 mM	Reaktion gehemmt; Messung bei 366 nm für ca. 1,5 min in Intervallen von 30 s; danach 3,5 min warten
8	20 $\mu$ L	2-Mercaptoethanol, 1 M	Reaktivierung der GAPDH; Messung bei 366 nm für ca. 4 min in Intervallen von 15 s

Photometer bei 366 nm wurde die Reaktion durch Zugabe von 10  $\mu$ L der Aldolase-GAPDH-Enzymmischung gestartet. Die Extinktion wurde in Minutenabständen gemessen, bis sie einen konstanten Wert erreichte. Anschließend wurden 2  $\mu$ L Triosephosphat-Isomerase (TIM; 5 mg mL<sup>-1</sup>) zugegeben und die Messung fortgesetzt, bis sich der Extinktionswert über einen Zeitraum von zwei Minuten nicht mehr änderte.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur quantitativen Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat.

Komponente	Konzentration [M]	Volumen [ $\mu$ L]
Bidestilliertes Wasser	-	760
TE-Puffer (pH 7,0)	1,0	100
NAD <sup>+</sup>	0,1	20
Natriumarsenat	0,5	10
FBP-Probeflösung	unbekannt	100
<b>Gesamtvolumen (vor Enzymzugabe)</b>		<b>1000</b>

### 3 Ergebnisse

Dieser Abschnitt stellt die Ergebnisse der enzymatischen Charakterisierung der GAPDH sowie der Konzentrationsbestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) dar. Beim Umgang mit Enzymen wurde auf Kühlung und die Vermeidung von Scherkräften in einem angemessenen Maße geachtet. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit sind alle Rohdaten und der zur Auswertung verwendete R-Code auf GitHub<sup>2</sup> öffentlich zugänglich.

#### 3.1 Bestimmung der Gleichgewichtskonstante, freien Standardenthalpie und Einflüssen von Effektoren

Zunächst wurde die Gleichgewichtskonstante  $K'$  der von der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) katalysierten Reaktion bestimmt. Die Reaktion wurde photometrisch bei 366 nm über die Bildung von NADH verfolgt. Abbildung 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Extinktionsänderungen nach den schrittweisen Zugaben verschiedener Reagenzien, wie sie in Tabelle 2 beschrieben sind. Die Rohdaten der Extinktion sind zum einen im oben genannten GitHub-Repository zu finden zum anderen sind die Extinktionswerte für die Zugaben der Phosphatpuffer und TIM auch in Tabelle 5 im Anhang zu finden. Die initiale Extinktion  $E_0$  nach Zugabe der Enzymmischung betrug 0,020. Die nachfolgenden Zugaben von Kaliumphosphatpuffer führten zu einem stufenweisen Anstieg der Extinktion, gefolgt von einem langsamen aber kontinuierlichen Anstieg. Lediglich nach der Zugabe der ersten Pufferlösung, stellte ich ein tatsächliches Plateau ein; In welchem allerdings über die 10 min auch Schwankungen zu erkennen sind. Die Zugabe von TIM bewirkte eine Abnahme der Extinktion von ca. 25%. Arsenat verursachte wiederum einen raschen Extinktionsanstieg, der durch p-Hydroxymercuribenzoat nur mäßig gestoppt bzw. verlangsamt wurde. Die abschließende Zugabe von 2-Mercaptoethanol führte zu kaum einer Veränderung der Kurve.

Zur Berechnung der Gleichgewichtskonstante  $K'$  wurden die Extinktionsänderungen  $\Delta E$  nach den ersten drei Phosphatzugaben (Schritte 2–4) benutzt. Diese wurden aus den jeweiligen Endextinktionen  $E_i$  und dem initialen Wert  $E_0$  bestimmt ( $\Delta E_i = E_i - E_0$ ). Die Gleichgewichtskonstante wurde anschließend nach der Gleichung (1) aus [8] berechnet.

$$K' = k \cdot \frac{(\Delta E)^2}{[P_i]} \quad (1)$$

Hierbei ist  $[P_i]$  die molare Konzentration des anorganischen Phosphats in der Küvette und  $k$  ein Faktor mit dem Wert  $2,1 \cdot 10^{-3}$ , der stöchiometrische Verhältnisse und den Extinktionskoeffizienten zusammenfasst [8]. Als Beispielrechnung für die erste Phosphatzugabe mit einer Konzentration von  $[P_i] = 1,02 \text{ mM}$  und einer Extinktionsänderung von  $\Delta E_2 = 0,045$

---

<sup>2</sup>[https://github.com/jannusgoe/Biochemiepraktikum\\_GAPDH.git](https://github.com/jannusgoe/Biochemiepraktikum_GAPDH.git)

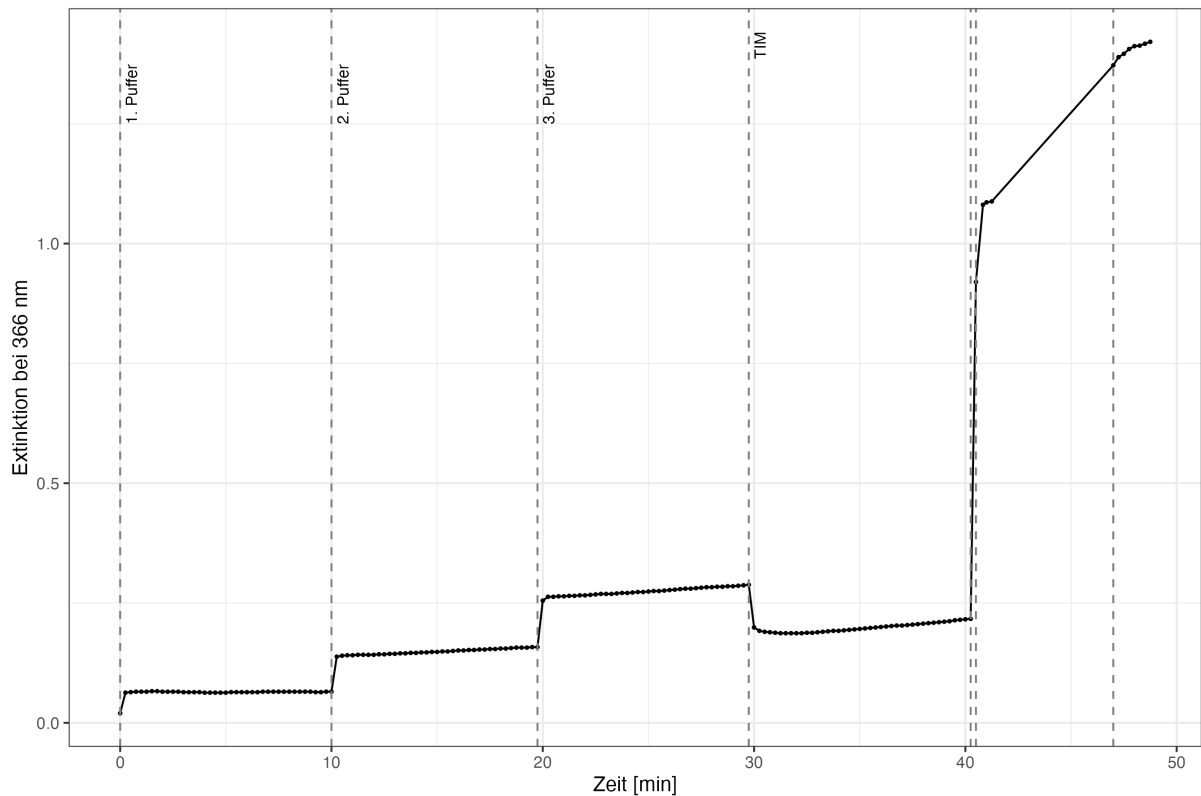


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Extinktion bei 366 nm zur Charakterisierung von GAPDH. Die gestrichelten Linien markieren die Zeitpunkte der Zugaben, wobei die Bezeichnungen der letzten drei aus Leserlichkeitsgründen weggelassen wurden: (1–3) Kaliumphosphatpuffer in steigender Konzentration (100 mM, 500 mM und 1 M), (5) Triosephosphat-Isomerase, (6) Arsenat, (7) p-Hydroxymercuribenzoat, (8) 2-Mercaptoethanol.

ergibt sich:

$$K' = 2,1 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{(0,045)^2}{1,02 \cdot 10^{-3} \text{ M}} = 0,0417$$

Die Berechnungen für alle drei Phosphatkonzentrationen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Aus den drei Einzelwerten wurde ein mittlerer Wert für die Gleichgewichtskonstante von  **$K' = 0,0671 \pm 0,0260$** .

Tabelle 4: Berechnete Gleichgewichtskonstanten  $K'$  der GAPDH-Reaktion bei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen. Die Phosphatkonzentrationen  $[P_i]$  berücksichtigen alle vorherigen Zugaben und die daraus resultierende Verdünnung.

Zugabe	$[P_i]$ [mM]	$\Delta E$	$K'$
2 (100 mM Puffer)	1,02	0,045	0,0417
3 (500 mM Puffer)	6,06	0,138	0,0660
4 (1 M Puffer)	16,0	0,267	0,0936
<b>Mittelwert</b>			<b>0,0671 <math>\pm</math> 0,0260</b>

Aus der mittleren Gleichgewichtskonstante wurde die freie Standardenthalpie  $\Delta G'^{\circ}$  der Reaktion unter Verwendung der Gleichung (2) [8] bei einer angenommenen Raumtemperatur von  $T = 298,15 \text{ K}$  berechnet.

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln(K') \quad (2)$$

Mit der allgemeinen Gaskonstante  $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und dem ermittelten Mittelwert für  $K'$  von 0,0671 wurde die Berechnung wie folgt durchgeführt:

$$\Delta G'^{\circ} = -(8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}) \cdot (298,15 \text{ K}) \cdot \ln(0,0671) \approx 6695 \text{ J mol}^{-1}$$

Dies resultiert also in einem Wert von  $\Delta G'^{\circ} = \mathbf{6,70 \text{ kJ mol}^{-1}}$

### 3.2 Quantitative Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat

Im zweiten Versuchsteil wurde die Konzentration einer unbekannten Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung (FBP) unter Arsenolysebedingungen bestimmt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Aldolase-GAPDH-Enzymmischung gestartet und der Extinktionsanstieg bis zum Erreichen eines Plateaus verfolgt, wobei hier kein perfektes Plateau abgewartet wurde. Anschließend wurde TIM zugegeben, was zu einem weiteren Extinktionsanstieg führte, bis die Reaktion vollständig zum Erliegen kam. Der gesamte Reaktionsverlauf ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Endextinktion, bei der ein vollständiger Umsatz angenommen wurde, betrug  $E_{\text{final}} = 0,572$ . Die Konzentration des gebildeten NADH in der Küvette wurde mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ ) [10] bestimmt. Die Konzentration  $c$  wurde durch Umstellen der Formel und Einsetzen der gemessenen Endextinktion  $E_{\text{final}} = 0,572$ , des molaren Extinktionskoeffizienten für NADH von  $\varepsilon_{366 \text{ nm}} = 3400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und einer Schichtdicke von  $d = 1 \text{ cm}$  berechnet:

$$c_{\text{NADH}} = \frac{E_{\text{final}}}{\varepsilon_{366 \text{ nm}} \cdot d} = \frac{0,572}{3400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \approx 1,68 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Dies ergab eine NADH-Konzentration von 0,168 mM in der Küvette.

Da aus einem Molekül FBP stöchiometrisch zwei Moleküle NADH gebildet werden, entspricht die FBP-Konzentration in der Küvette der Hälfte der NADH-Konzentration [8], also 0,0841 mM. Unter Berücksichtigung der Verdünnung der Probelösung (Volumen der Probe: 100  $\mu\text{L}$ ; Gesamtvolumen in der Küvette nach allen Zugaben: 1012  $\mu\text{L}$ ) wurde die Konzentration der ursprünglichen FBP-Lösung berechnet.

$$[\text{FBP}]_{\text{original}} = [\text{FBP}]_{\text{Küvette}} \cdot \frac{V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}}} = 0,0841 \text{ mM} \cdot \frac{1012 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} = 0,8513 \text{ mM}$$

Die Konzentration der zur Verfügung gestellten Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung betrug somit **0,85 mM**.

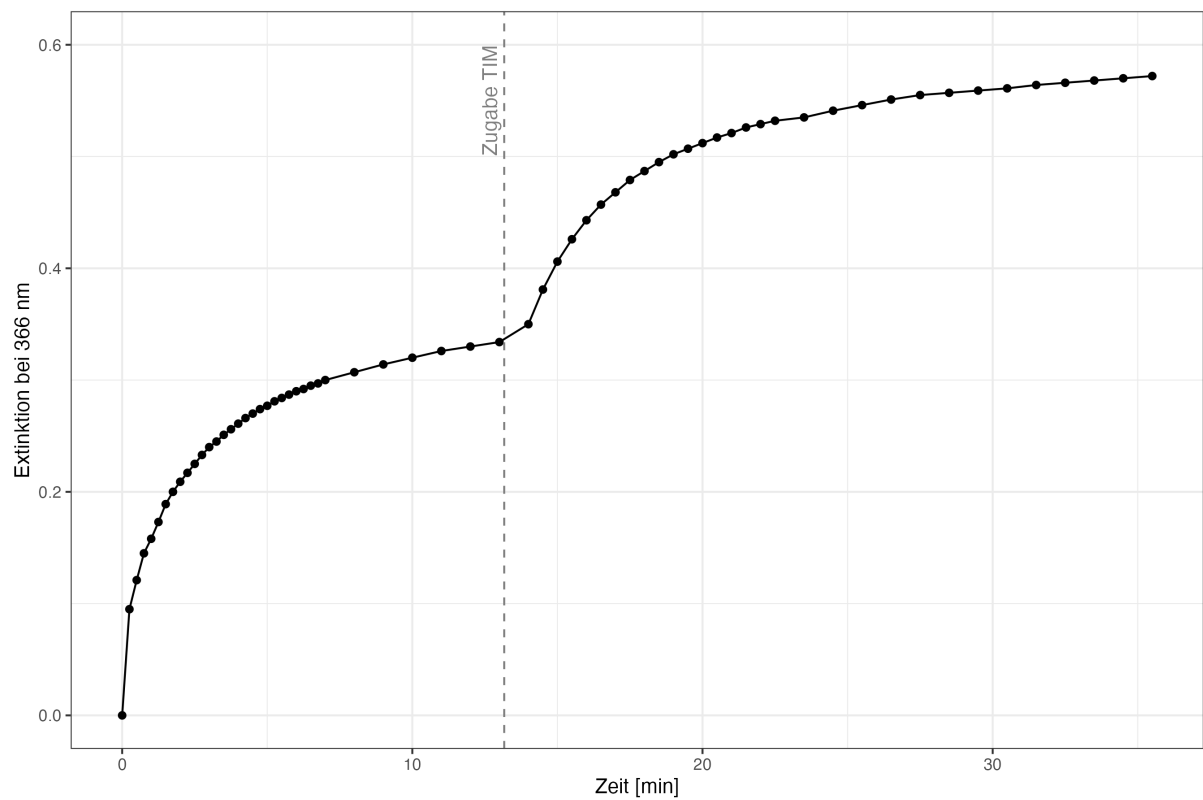


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Extinktion bei 366 nm zur Bestimmung der FBP-Konzentration. Die Reaktion wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  durch Zugabe der Enzymmischung gestartet. Die gestrichelte Linie markiert die Zugabe von Triosephosphat-Isomerase nach 790 s ( $\approx 13$ min).

## 4 Diskussion

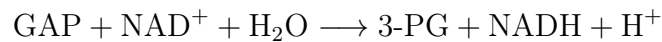
Ziel des Versuchs war die thermodynamische und kinetische Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Im ersten Teil wurde die Gleichgewichtskonstante  $K'$  und die freie Standardenthalpie  $\Delta G'^{\circ}$  der von der GAPDH katalysierten Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) bestimmt. Des Weiteren wurden die Effekte verschiedener Substanzen auf die Enzymaktivität untersucht. Im zweiten Teil wurde die Konzentration einer unbekannten Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung (FBP) mittels eines gekoppelten optischen Tests unter Arsenolysebedingungen quantifiziert.

### 4.1 Analyse des Reaktionsverlaufs und Einfluss von Effektoren

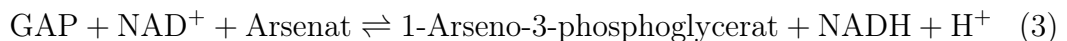
Die Charakterisierung der GAPDH erfolgte durch die schrittweise Zugabe von Substraten und Effektoren, deren Wirkung photometrisch über die Bildung von NADH bei 366 nm verfolgt wurde (Abbildung 2). Der initiale Extinktionsanstieg nach Zugabe der Enzymmischung ist auf geringe Phosphatverunreinigungen in den Reagenzien zurückzuführen, die eine minimale Grundreaktion ermöglichten. Die sukzessiven Zugaben von Kaliumphosphatpuffer erhöhten die Konzentration des Substrats anorganisches Phosphat ( $[P_i]$ ), was gemäß dem Prinzip von Le Chatelier das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Produkte verschiebt [10]. Dies führte zu einem stufenweisen Anstieg der NADH-Konzentration und somit der Extinktion, aus deren Plateaus die Gleichgewichtskonstante berechnet wurde. Die Zugabe von Triosephosphat-Isomerase (TIM) hatte eine Extinktionsabnahme zur Folge. TIM katalysiert die Isomerisierung von GAP zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und verschiebt das Gleichgewicht der Triosephosphate stark auf die Seite von DHAP (DHAP:GAP  $\approx$  96:4)[8]. Dadurch wird GAP dem Gleichgewicht entzogen, was zu einer Rückreaktion von 1,3-BPG zu GAP unter Verbrauch von NADH führte. Die anschließende Zugabe von Arsenat bewirkte einen rapiden Extinktionsanstieg. Arsenat agiert als Analogon zu Phosphat und führt zur Bildung von 1-Arseno-3-phosphoglycerat. Diese Verbindung hydrolysiert spontan und irreversibel zu 3-Phosphoglycerat und Arsenat, wodurch die Gesamtreaktion stark in Richtung der Produkte getrieben und die Glykolyse effektiv von der ATP-Synthese entkoppelt wird [10]. Die Hemmung durch p-Hydroxymercuribenzoat (p-HMB), das spezifisch mit dem Thiolrest des aktiven Cystein-149 der GAPDH reagiert [10], fiel im Versuch nur mäßig aus. Der Extinktionsanstieg wurde lediglich verlangsamt, aber nicht vollständig gestoppt. Dies könnte auf eine zu geringe Inhibitorkonzentration durch Pipetierfehler oder eine unzureichende Durchmischung zurückzuführen sein. Folglich zeigte auch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol, das durch Reduktion der Quecksilber-Schwefel-Bindung die Hemmung aufheben sollte [10], kaum eine Wirkung, da die vorherige Inhibition unvollständig war.

## 4.2 Bestimmung der Gleichgewichtskonstante und freien Standardenthalpie

Aus den Daten der Phosphatzugaben wurde eine mittlere Gleichgewichtskonstante von  $K' = 0,0671 \pm 0,0260$  bestimmt. Daraus errechnete sich eine freie Standardenthalpie von  $\Delta G'^{\circ} = 6,70 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem Literaturwert von  $6,3 \text{ kJ mol}^{-1}$  überein [2, 7]. Die Abweichung ergibt sich aus experimentellen Unsicherheiten, wie beispielsweise die Temperatur, die am Versuchstag über den angenommenen  $25^{\circ}\text{C}$  lag. Diese und weitere Unsicherheiten kommen auch in der relativ hohen Standardabweichung des  $K'$ -Wertes zum Ausdruck. Die positive freie Standardenthalpie bestätigt, dass die Reaktion unter Standardbedingungen endergonisch ist und in der Zelle nur durch die nachfolgenden, stark exergonischen Schritte der Glykolyse vorangetrieben wird. Die Entkopplung durch Arsenat macht die Gesamtreaktion von GAP zu 3-Phosphoglycerat stark exergon. Die freie Standardenthalpie für diesen Prozess lässt sich wie folgt abschätzen. Die Gesamtreaktion in Anwesenheit von Arsenat lautet:



Diese lässt sich in zwei Teilschritte zerlegen: die Bildung des instabilen 1-Arseno-3-phosphoglycerats (Gleichung (3)) und dessen spontane Hydrolyse (Gleichung (4)).

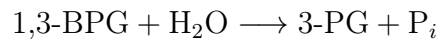


Gemäß [8] wird angenommen, dass die freie Standardenthalpie für die Bildung des 1-Arseno-3-phosphoglycerat (Gleichung (3)) der von 1,3-BPG entspricht. Für diese Reaktion wurde experimentell ein Wert von  $\Delta G'_1 = 6,70 \text{ kJ mol}^{-1}$  ermittelt.

Die freie Standardenthalpie der Hydrolyse des 1-Arseno-3-phosphoglycerat nach  $3\text{-PG} + \text{Arsenat}$ ,  $\Delta G'_{\text{hydrolyse}}$ , kann aus den im Skript angegebenen Werten hergeleitet werden. Aus den Reaktionen



ergibt sich durch Umkehrung der zweiten Reaktion die freie Standardenthalpie der ATP-Hydrolyse zu  $\Delta G'^{\circ} = -30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die Summe der ersten Reaktion und der ATP-Hydrolyse beschreibt die Hydrolyse von 1,3-BPG:



Die freie Standardenthalpie hierfür beträgt

$$\Delta G'_{\text{hydrolyse}} = (-18,5 \text{ kJ mol}^{-1}) + (-30,5 \text{ kJ mol}^{-1}) = -49,0 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

Unter der Annahme, dass die Hydrolyse (Gleichung (4)) einen vergleichbaren Energiegewinn liefert [8], also  $\Delta G'_2 \approx -49,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ , kann die freie Standardenthalpie der Gesamtreaktion berechnet werden:

$$\Delta G'_{\text{gesamt}} = \Delta G'_1 + \Delta G'_2 = 6,70 \text{ kJ mol}^{-1} + (-49,0 \text{ kJ mol}^{-1}) = -42,3 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Dieser stark negative Wert erklärt die im Versuch beobachtete schnelle und irreversible Umsetzung in Anwesenheit von Arsenat.

### 4.3 Quantitative Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat

Im zweiten Versuchsteil wurde der Effekt von TIM zur quantitativen Bestimmung von Fructose-1,6-bisphosphat genutzt. Die ermittelte Konzentration der FBP-Probelösung betrug 0,85 mM. Der Verlauf in Abbildung 3 zeigt, dass nach Start der Reaktion zunächst nur das durch die Aldolase aus FBP gebildete GAP umgesetzt wurde. Das entstandene DHAP akkumulierte, bis durch die Zugabe von TIM auch dieses in GAP umgewandelt und verbraucht wurde. Kritisch ist anzumerken, dass vor der TIM-Zugabe kein stabiles Plateau abgewartet wurde, was auf einen noch nicht vollständigen Umsatz des primär entstandenen GAPs hindeutet. Da für die Berechnung jedoch die finale Extinktion nach vollständigem Umsatz beider Triosephosphate herangezogen wurde, wird der berechnete Endwert als zuverlässig angenommen.

### 4.4 Diskussion des kinetischen Verhaltens nach TIM-Zugabe

Das unterschiedliche Verhalten der Extinktion nach TIM-Zugabe in beiden Versuchsteilen lässt sich durch die jeweiligen Reaktionsbedingungen erklären. In Versuch 4.1 lag ein reversibles Gleichgewicht vor. Die Zugabe von TIM entzog diesem Gleichgewicht GAP, was zu einer Rückreaktion und somit zu einem NADH-Verbrauch (Extinktionsabnahme) führte. In Versuch 4.2 hingegen sorgte Arsenat für eine irreversible Reaktion. Das durch TIM aus dem akkumulierten DHAP-Pool nachgelieferte GAP wurde sofort weiter umgesetzt, was zu einer zusätzlichen NADH-Produktion, und damit Extinktionszunahme, führte.

Die Beobachtung, dass die Reaktion in Versuch 4.2 nach TIM-Zugabe deutlich beschleunigt wurde, lässt sich mit der Michaelis-Menten-Kinetik begründen. Vor der TIM-Zugabe war die Konzentration des GAPDH-Substrats GAP der limitierende Faktor, weshalb die GAPDH im unteren, substratabhängigen Bereich ihrer Sättigungskurve arbeitete. Da GAP durch die GAPDH-Reaktion kontinuierlich verbraucht wurde, verschob sich das Gleichgewicht der Triosephosphate. Die Zugabe von TIM katalysierte nun die schnelle Isomerisierung des angereicherten DHAP zu GAP und füllte so den limitierenden Substratpool schlagartig auf. Dieser starke Anstieg der Substratkonzentration führte zu einer deutlichen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, da die Wahrscheinlichkeit, dass sich Enzym und Substrat zufällig treffen erhöht ist. Die Tatsache, dass die Extinktionsänderung vor und nach der TIM-Zugabe von ähnlicher Größenordnung war ( $\Delta E_1 \approx 0,32$ ;  $\Delta E_2 \approx 0,27$ ), bestätigt die 1:1-Stöchiometrie der Aldolase-Reaktion, bei der ein Molekül FBP in je ein Molekül GAP und DHAP gespalten wird.

Zusammenfassend konnten die thermodynamischen Parameter der GAPDH-Reaktion erfolgreich bestimmt und in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten validiert werden. Die Experimente demonstrierten zudem das Prinzip der Gleichgewichtsverschiebung, sowie die Entkopplung metabolischer Reaktionen. Die enzymatische Hemmung und "Entgiftung" konnten nicht eindeutig gezeigt werden.



## Literatur

- [1] Jeremy M. Berg u. a. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage. Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum, 2018. ISBN: 978-3-662-54619-2.
- [2] Navdeep S. Chandel. „Glycolysis“. eng. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13.5 (Mai 2021), a040535. ISSN: 1943-0264. DOI: 10.1101/cshperspect.a040535.
- [3] De-Maw Chuang, Christopher Hough und Vladimir V. Senatorov. „Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases“. eng. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (2005), S. 269–290. ISSN: 0362-1642. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095902.
- [4] *Glycolyse, Schritt 5 - dritte Aktivierung und Oxidation*. URL: <https://www.u-helmich.de/bio/stoffwechsel/reihe3/1-Glycolyse/Schritt-5.html> (besucht am 21.08.2025).
- [5] Constance J. Jeffery. „An introduction to protein moonlighting“. eng. In: *Biochemical Society Transactions* 42.6 (Dez. 2014), S. 1679–1683. ISSN: 1470-8752. DOI: 10.1042/BST20140226.
- [6] Constance J. Jeffery. „Moonlighting proteins—an update“. eng. In: *Molecular bioSystems* 5.4 (Apr. 2009), S. 345–350. ISSN: 1742-2051. DOI: 10.1039/b900658n.
- [7] David L. Nelson und Michael M. Cox. *Lehninger Biochemie*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl., Übers. der 5. amerikan. Aufl., korr. Nachdr. Springer-Lehrbuch. Berlin [u.a.]: Springer, 2011. ISBN: 978-3-540-68637-8.
- [8] Arne Skerra. „Biochemisches Grundpraktikum“. Publisher: Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München. 2025.
- [9] Carlos Tristan u. a. „The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments“. eng. In: *Cellular Signalling* 23.2 (Feb. 2011), S. 317–323. ISSN: 1873-3913. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.08.003.
- [10] Donald Voet, Judith G. Voet und Charlotte W. Pratt. *Lehrbuch der Biochemie*. John Wiley & Sons, Apr. 2019. ISBN: 978-3-527-82123-5.

## A Anhang

Tabelle 5: Gemessene Extinktionen bei 366 nm nach den schrittweisen Zugaben von Kaliumphosphatpuffer (2–4) und Triosephosphat-Isomerase (5).

Zugabe 2 100 mM P <sub>i</sub>		Zugabe 3 500 mM P <sub>i</sub>		Zugabe 4 1 M P <sub>i</sub>		Zugabe 5 TIM	
Zeit [s]	E	Zeit [s]	E	Zeit [s]	E	Zeit [s]	E
0	E <sub>0</sub> =0,020	630	0,140	1230	0,263	1830	0,190
30	0,064	660	0,141	1260	0,264	1860	0,188
60	0,065	690	0,142	1290	0,265	1890	0,187
90	0,066	720	0,142	1320	0,266	1920	0,187
120	0,065	750	0,143	1350	0,268	1950	0,188
150	0,065	780	0,144	1380	0,269	1980	0,189
180	0,064	810	0,145	1410	0,270	2010	0,191
210	0,064	840	0,146	1440	0,271	2040	0,192
240	0,063	870	0,147	1470	0,273	2070	0,194
270	0,063	900	0,148	1500	0,274	2100	0,196
300	0,063	930	0,149	1530	0,275	2130	0,198
330	0,064	960	0,151	1560	0,277	2160	0,200
360	0,064	990	0,152	1590	0,279	2190	0,202
390	0,064	1020	0,153	1620	0,280	2220	0,203
420	0,065	1050	0,154	1650	0,282	2250	0,205
450	0,065	1080	0,155	1680	0,283	2280	0,207
480	0,065	1110	0,156	1710	0,284	2310	0,209
510	0,065	1140	0,157	1740	0,285	2340	0,211
540	0,065	1170	0,158	1770	0,287	2370	0,214
600	E <sub>2</sub> =0,065	1200	E <sub>3</sub> =0,158	1800	E <sub>4</sub> =0,287	2400	0,216