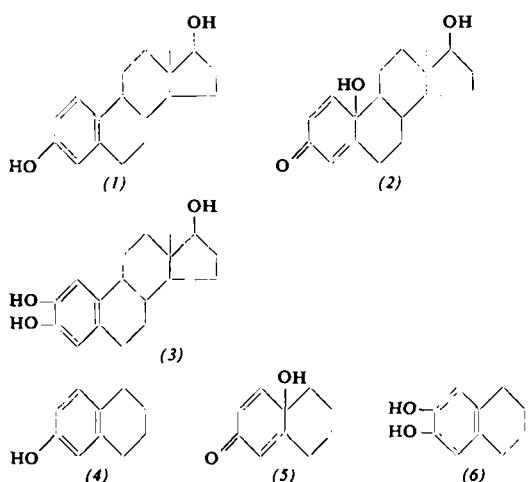


Aus Tetralol-(6)-[4-¹⁴C] entsteht bei 10 °C in 15 min Tetralin-p-chinol (5), das sich als 2,4-Dinitrobenzol-<1-azo-6>-tetralin isolieren läßt. Die Ausbeute durchläuft in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ein Maximum und erreicht nach 15 min ein Plateau. Die gleichzeitige Proteinbindungsreaktion ist linear. In demselben Zeitraum wird eine geringe aber signifikante Menge 6,7-Dihydroxy-tetralin (6) gebildet (als Dibenzoat gereinigt).



Der Nachweis von p- und o-Hydroxylierungsprodukten stützt den früher formulierten Mechanismus dieser enzymatischen Hydroxylierung als eine primäre Dehydrierung des Phenols zum Phenoxylradikal. Um zu prüfen, ob das chemisch möglich ist, wurde die Dehydrierung von Tetralol-(6) durch Hydroxyl-Radikale untersucht, die bei der Fe²⁺-katalysierten Zersetzung von Wasserstoffperoxyd (Fentons-Reagenz) generiert werden. Es gelingt nach entspr. Trennungen Tetralin-p-chinol als 2,4-Dinitrobenzol-<1-azo-6>-tetralin nachzuweisen und säulenchromatographisch zu isolieren. Aus analogen Ansätzen kann 6,7-Dihydroxy-tetralin durch Bleisalzfällung isoliert, papierchromatographisch gereinigt und spektrophotometrisch bestimmt werden.

Aktiver Glykolaldehyd als Zwischenprodukt der Transketolase-Reaktion

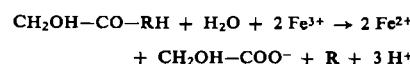
R. Kattermann und H. Holzer, Freiburg/Breisgau

Das am Pentosephosphat-Cyclus beteiligte Enzym Transketolase benötigt Thiaminpyrophosphat (TPP) als Coenzym. Seit langem vermutet man, daß bei der Einwirkung des Enzyms auf das Ketolsubstrat ein „aktiver Glykolaldehyd“ gebildet wird, der dann auf den Acceptor-aldehyd übertragen wird. In Inkubationsversuchen mit gereinigter Transketolase und uniform ¹⁴C-markiertem D-Fructose-6-phosphat finden Vorr., daß nach Abstoppen des Reaktionsansatzes mit heißem Methanol ca. 1 % der Radioaktivität bei der Chromatographie auf Dowex-2-Säulen zusammen mit dem TPP eluiert wird. Nach Abspaltung des Pyrophosphats mit saurer Phosphatase verhält sich der „aktive Glykolaldehyd“ bei Papierchromatographie und Elektrophorese wie Thiamin. Bei anschließender Behandlung mit Bisulfit findet Spaltung in Pyrimidin- und Thiazol-Teil statt, wobei letzterer die Radioaktivität trägt. Bei Inkubation des ¹⁴C-markierten „aktiven Glykoldehyds“ mit D-Ribose-5-phosphat bzw. Glykolaldehyd als Acceptor-aldehyde in Gegenwart von Apotransketolase werden radioaktives Seduheptulose-7-phosphat bzw. L-Erythrulose gebildet. L-Erythrulose kann mit DPNH und Polyol-dehydrogenase spektrophotometrisch erfaßt werden. Durch Einwirkung von Perjodsäure auf „aktiven Glykolaldehyd“ entsteht Formaldehyd, der entweder als Dimedon-Derivat oder colorimetrisch mit Acetylacetone und Ammoniumacetat nachgewiesen werden kann. Analog zu dem bei der Decarboxylierung bzw. Oxydation der Brenztraubensäure beschriebenen „aktiven Acetaldehyd“ (2-Hydroxyäthyl-TPP) dürfte im „aktiven Glykolaldehyd“ 2-(α,β -Dihydroxyäthyl)-TPP vorliegen.

Zum Wirkungsmechanismus der Phosphoketolase

W. Schröter und H. Holzer, Freiburg/Breisgau

Gereinigte Phosphoketolase aus *Lactobacillus plantarum* reduziert Eisen(III)-cyanid mit den Substraten Xylulose-5-phosphat, Hydroxypyruvat und Fructose-6-phosphat. Das Geschwindigkeitsverhältnis ist in der Reihenfolge der Substrate 100:56:14. Als Oxydationsprodukt entsteht pro Mol Fe(III)-cyanid 0,5 Mol Glycolsäure.



In Gegenwart von Orthophosphat und bei Abwesenheit von Fe(III)-cyanid wird mit den genannten Substraten im gleichen Geschwindigkeitsverhältnis Acetylphosphat gebildet, wenn man 1 Mol Acetylphosphat äquivalent zwei Molen Fe(II)-cyanid setzt. Beide Reaktionen sind von Thiaminpyrophosphat abhängig. Durch Zusatz von Orthophosphat wird die Geschwindigkeit der Reduktion von Fe(III)-cyanid um $1/3$ vermindert.

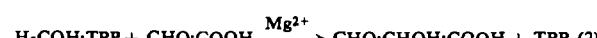
Aus Analogiegründen zur Transketolasereaktion sowie zur oxydative Decarboxylierung von Pyruvat und Hydroxypyruvat wird als erstes, beiden durch Phosphoketolase katalysierten Reaktionen gemeinsames Zwischenprodukt „aktiver Glykolaldehyd“ (2-[α,β -Dihydroxyäthyl]-thiaminpyrophosphat) angenommen. Die Kinetik der Reaktionen und weitere Zwischenstufen, insbesondere die Dehydratisierung von „aktivem Glykolaldehyd“ zu 2-[α -Hydroxyvinyl]-thiaminpyrophosphat und dessen Tautomerisierung zu Acetyl-thiaminpyrophosphat als Zwischenstufen der Acetylphosphatbildung, wurden besprochen.

Zum Mechanismus der Carboligase-Reaktion. Ein neuer „aktiver“ Formaldehyd

J. Koch und L. Jaenicke, Köln

Ein auf Oxalsäure wachsendes Bakterium der Gattung *Pseudomonas* braucht für den Abbau des Oxalats neben Coenzym A als weiteren Cofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP). Die zunächst über Oxalyl-CoA entstehende Glyoxylsäure wird in der TPP-abhängigen Glyoxylat-Carboligase-Reaktion zu Tartronaldehydsäure ($\text{CHO}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{COOH}$) umgewandelt und nach Reduktion zu Glycerinsäure in den Stoffwechsel eingeführt. Bei anderen analogen „Carboligasen“ treten wie bekannt TPP-bindene Aldehyde als Zwischenstufen auf.

Das daher in der Glyoxylat-Carboligase-Reaktion zu erwartende Intermediärprodukt 2-Hydroxymethyl-TPP wurde von den Vortr. durch Kondensation von TPP mit Formaldehyd bei pH = 5 bis 6 synthetisiert und seine Struktur durch Abbau bewiesen. Hierzu wurden folgende neue Verfahren entwickelt: 1. Durch Spaltung des 2-Hydroxymethyl-thiazol-Ringes mit Hydroxylamin wurde Glykolylydroxamsäure erhalten. 2. Nach Öffnen des Thiazol-Ringes mit Alkali, Methylierung und saurer Spaltung wurde Methoxyessigsäure als Abbauprodukt isoliert. Extrakte aus *Pseudomonas* sp. bilden aus ¹⁴C-Hydroxymethyl-TPP und Glyoxylsäure markierte Tartronaldehydsäure. Ihre spezifische Aktivität entspricht etwa derjenigen des eingesetzten Hydroxymethyl-TPP. Der Mechanismus der Carboligase-Reaktion ist daher als Acetoin-Kondensation anzusehen: Nach TPP-katalysierter Decarboxylierung eines Moleküls Glyoxylsäure (1), wird das entstandene TPP-bindene Formaldehyd-Bruchstück mit einem zweiten Molekül Glyoxylsäure kondensiert (2).



Bei der Carboligase-Reaktion tritt also der Formaldehyd als nucleophiler Partner auf, während bei den bisher bekannten Formaldehyd-Übertragungen mittels Tetrahydro-folsäure nucleophile Reaktionspartner erforderlich sind.