

### 135. A. Stepanow und A. Kusun: Über die Synthese einer Kohlenstoffkette mit Hilfe von Enzymen, VI. Mitteil.: Zur Frage der Glykogen-Rücksynthese in den Muskeln.

[Aus d. Laborat. für organ. Chemie am I. Moskauer Medizin. Institut.]

(Eingegangen am 7. März 1934.)

Das Vorkommen der Carboligase in den Muskeln und in der Leber<sup>1)</sup> spricht für ihre Beteiligung an den Synthesen im Organismus. Auf das Acetyl-methyl-carbinol und seine Analoga, die bei den Versuchen von Neuberg<sup>2)</sup> das Produkt von Synthesen mittels der Carboligase bildeten, ist die Zahl solcher Synthesen jedoch nicht beschränkt; hierauf weist die von uns erreichte Bildung des Glykolaldehyds aus der Glyoxalsäure<sup>3)</sup>, sowie die nur eine Ausnahme bildende Auffindung des Acetyl-methyl-carbinols im Organismus hin. Eine der Reaktionen, an denen die Carboligase beteiligt sein könnte, ist die in der Biochemie des Organismus eine wesentliche Rolle spielende Rück-synthese des Glykogens aus Milchsäure<sup>4)</sup>, jedoch ist über den Mechanismus dieses Vorgangs nur wenig bekannt.

Meyerhof und andere Autoren haben gezeigt, daß das Glykogen sowohl aus Milchsäure wie aus Brenztraubensäure entsteht<sup>4)</sup>; ferner ist die Bildung des Glykogens, z. B. aus Glycerinsäure<sup>5)</sup>, aus Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Fumarsäure<sup>6)</sup>, aus der Dicarbonsäure des Glykolaldehyds (Oxy-oxo-bernststeinsäure) und dem Glykolaldehyd selber (Leber) bekannt<sup>5)</sup>. Von diesen Stoffen lenken im besonderen der Glykolaldehyd als einfachstes Kohlehydrat und die Oxy-oxo-bernststeinsäure, die beim Decarboxylieren leicht Glykolaldehyd liefert:  $\text{HO}_2\text{C} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO} \cdot \text{CO}_2\text{H} \rightarrow 2 \text{CO}_2 + \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CHO}$  unsere Aufmerksamkeit auf sich.

O. Meyerhof<sup>7)</sup> glaubt, daß Brenztraubensäure das Zwischenprodukt beim Übergang des Glykogens in Milchsäure bildet, und erwähnt das vorhandene Gleichgewicht zwischen Milchsäure und Brenztraubensäure. Es muß natürlich angenommen werden, daß auch bei der Rück-synthese von Kohlehydraten aus Milchsäure zunächst Brenztraubensäure gebildet wird. Ein Übergang von ihr zum Glykolaldehyd über den Acetaldehyd:  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_3 \cdot \text{CHO}$ ,  $\text{CH}_3 \cdot \text{CHO} \rightarrow \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CHO}$  ist wenig wahrscheinlich, da hier eine Hydroxylierung des Acetaldehyds stattfinden müßte. Mehr Wahrscheinlichkeit bietet die Annahme einer Hydroxylierung der Brenztraubensäure, deren Enolform Wasser anlagern könnte:  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CO}_2\text{H} \xrightarrow{+\text{H}_2\text{O}} \text{CH}_3 \cdot \text{C}(\text{OH})_2 \cdot \text{CO}_2\text{H} \xrightarrow{-\text{H}_2\text{O}} \text{CH}_2 \cdot \text{C}(\text{OH}) \cdot \text{CO}_2\text{H} \xrightarrow{+\text{H}_2\text{O}} \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO}_2\text{H}$ . Auf diesem Wege würde der Pro-

<sup>1)</sup> s. die voranstehende V. Mitteil.

<sup>2)</sup> Biochem. Ztschr. **115**, 282 [1921], **131**, 178 [1922], **140**, 299 [1923], **143**, 553 [1923].

<sup>3)</sup> B. **63**, 1147 [1930].

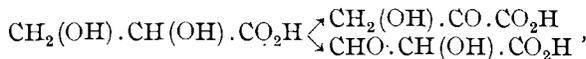
<sup>4)</sup> Meyerhof, Lohmann u. Meier, Biochem. Ztschr. **157**, 459 [1925]. — C. Pi-Suñer Bayo u. J. Folch-Pi, Biochem. Ztschr. **242**, 306 [1931]. — Dietrich u. Zeyen, Ztschr. klin. Mediz. **120**, 517.

<sup>5)</sup> Parnas u. Baer, Biochem. Ztschr. **41**, 404 [1912].

<sup>6)</sup> Majer u. Reisner, Biochem. Ztschr. **263**, 340 [1933]. — Ponsford u. Smedley, Biochem. Journ. **26**, 1340 [1932].

<sup>7)</sup> Meyerhof u. McEachern, Biochem. Ztschr. **260**, 417 [1933].

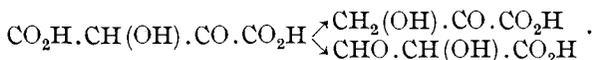
zeß über die Glycerinsäure verlaufen, deren Dehydrierung (analog dem Übergang von Milchsäure in Brenztraubensäure) zu Oxy-brenztraubensäure führt:



aus der dann weiterhin der Glykolaldehyd entsteht, oder der zu 1-Oxy-2-oxo-propionsäure (Tartronaldehydsäure), die dann selbst an der Synthese beteiligt sein könnte, was ganz plausibel erscheint, da die Carboligase nicht auf Acetaldehyd, sondern auf Brenztraubensäure (d. h. Acetaldehyd-carbonsäure) einwirkt. Die Synthese würde unter der Einwirkung der Carboligase unter gleichzeitiger Abspaltung von  $\text{CO}_2$  verlaufen:  $3 \text{CHO} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3 \text{CO}_2$  und weiter zur Glykogenbildung führen:  $n\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - n\text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ . In Analogie mit der Bildung des Acetoin's wäre dann der Reaktionsverlauf:  $\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CO} \cdot \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CHO} + \text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CHO} + \text{CHO} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH} \rightarrow \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CHO}$ ,  $\text{CH}_2(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CHO} + \text{CHO} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CO}_2\text{H} \rightarrow \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot [\text{CH}(\text{OH})]_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_2(\text{OH}) \cdot [\text{CH}(\text{OH})]_4 \cdot \text{CHO}$ .

Eine ursprüngliche Bildung der Ketose unter der Einwirkung von anorganischen Katalysatoren ist gleichfalls beobachtet worden, z. B. von Schmitz<sup>8)</sup> beim Kondensieren des Glycerinaldehyds.

Infolgedessen war es von großem Interesse, die Einwirkung der Carboligase und anderer Muskel-Fermente auf die einzelnen Zwischenprodukte der obigen Reaktionen, z. B. auf die Oxy-brenztraubensäure und die mit ihr isomere Tartronaldehydsäure, zu erproben. Die Schwierigkeit der Darstellung und die Unbeständigkeit der genannten Säuren veranlaßte uns, die Oxy-oxo-bernsteinsäure zu nehmen, die leicht unter intermediärer Bildung der beiden genannten Säuren decarboxylierbar ist:



Bereits im Jahre 1912 beobachteten Parnas und Baer<sup>5)</sup> die Bildung von Glykogen in der Leber, als sie durch das isolierte Organ eine Oxy-oxo-bernsteinsäure-Lösung leiteten. In Verbindung mit den obigen Überlegungen und unserer Entdeckung der Carboligase in den gestreiften Muskeln<sup>1)</sup>, sowie ihrer Auffindung durch Günther im Herzmuskel<sup>9)</sup> unternahmen wir es, die Einwirkung der Enzyme der gestreiften Muskeln auf Oxy-oxo-bernsteinsäure zu untersuchen. Das Muskelgewebe der Hinterbeine eines frischgetöteten Hundes, der zuvor gehungert hatte, wurde in zerriebenem Zustande verwendet, was selbstverständlich eine gewisse Zerstörung der koordinierten Enzym-Wirkung, sowie eine bei der Autolyse stattfindende Zersetzung des Glykogens zur Folge hatte. Die ohne Oxy-oxo-bernsteinsäure durchgeführten Kontrollversuche boten eine gewisse Korrektur in dieser Hinsicht.

Die Versuche zeigten, daß trotz der im Haupt- und im Kontrollversuch parallel verlaufenden Glykogen-Autolyse die Menge des Glykogens am Schluß der Versuche stets dort fast doppelt so groß war, wo Oxy-oxo-bernsteinsäure

<sup>8)</sup> B. 46, 2327 [1913].

<sup>9)</sup> Biochem. Ztschr. 254, 12 [1932].

(unter Zusatz von Alkaliphosphaten als Puffer, so daß das  $p_H$  der Reaktionslösung nicht verändert wurde) zugefügt war. Auch der Gehalt an Monosacchariden (Glykose?) nahm in diesen Fällen zu, was mit der obigen Annahme übereinstimmt.

### Beschreibung der Versuche.

Bevor die Hunde durch Einblasen von Luft in das Herz (Herz-Embolie) getötet wurden, mußten sie 2–3 Tage hungern. Von den frisch getöteten Hunden wurden die gestreiften Muskeln der hinteren Gliedmaßen präpariert und durch eine Fleischmaschine durchgedreht. In dieser Form dienten sie für die weiteren Versuche. In allen Versuchen (Haupt- und Kontrollversuchen) wurde die Einwirkung der Muskel-Fermente in der Dauer von 24 Stdn. bei  $35^0$  und  $p_H = 6.4$ , was durch Zusatz von Kaliumphosphat-Gemisch erreicht wurde, geprüft.

#### Glykogen-Bestimmung.

Nach 24-stdg. Einwirkung von 100 g Muskeln in 200 ccm Wasser, die 2 g Oxy-oxo-bernsteinsäure (in Form ihres Kaliumsalzes) enthielten, wurde die Flüssigkeit abfiltriert und dann abgepreßt.

Das Filtrat wurde durch die doppelte Menge 96-proz. Äthylalkohols gefällt und der Niederschlag zur vorher abgepreßten Hauptmasse gefügt. Im weiteren Verlauf bestimmten wir das Glykogen nach dem Verfahren von Pflüger. Genau ebenso wurde der Kontrollversuch gehandhabt.

Versuchsnummer	I	II	III	IV
Glykogen in mg { Hauptversuch . . . . .	17	20	46	38
{ Kontrollversuch . . . . .	7	6	18	17

Für jeden Versuch wurde ein neues Tier verwendet.

Die Annahme, daß der zurückbleibende Glykolaldehyd möglicherweise eine Polymerisation erleidet, deren Produkt bei der eigentlichen Glykogen-Bestimmung (2-stdg. Erhitzen des Muskelgewebes mit 30-proz. Alkalilauge) mitbestimmt werden könnte, veranlaßte uns, die Einwirkung 30-proz. Lauge auf Glykolaldehyd zu kontrollieren. Der Versuch zeigte, daß dabei keine Bildung von Substanzen stattfindet, die das Glykogen bei seiner weiteren Bestimmung vortäuschen könnten.

Monosaccharid-Bestimmung: Die Versuche wurden analog den früheren angestellt. Nach 24-stdg. Reaktion wurde die Flüssigkeit abgepreßt, die in ihr enthaltenen Eiweißstoffe durch Sublimat-Lösung gefällt, die Quecksilber-Ionen durch Schwefelwasserstoff abgeschieden, der letztere durch Erhitzen der angesäuerten Flüssigkeit unter vermindertem Druck bei gleichzeitigem Durchleiten von Luft entfernt, die Flüssigkeit filtriert und auf Zuckerstoffe untersucht. Genau ebenso wurde im Kontrollversuch, bei dem keine Oxy-oxo-bernsteinsäure vorhanden war, verfahren.

Bei sämtlichen Versuchen ging eine Prüfung auf Oxy-oxo-bernsteinsäure und Glykolaldehyd, die die Fehlingsche Lösung in der Kälte reduzieren, voraus; hierbei wurde das völlige Verschwinden der beiden nachgewiesen.

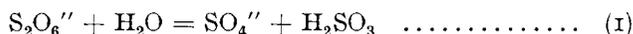
Versuchs- Nummer	Untersuchungs-Verfahren	Resultate im	
		Haupt- versuch	Kontroll- versuch
1	Bestimmung d. Zuckerstoffe nach Bertrand (umgerechnet auf Glykose)	0.72 g	0.36 g
2	„	0.50	0.18
3	„	0.12	0.00
4	„	0.22	0.05
5	Bestimmung d. Drehung d. Ebene d. polarisiert. Licht.	+0.15°	—0.05°
6	„	+0.12°	—0.07°
7	Darstellung d. <i>p</i> -Nitrophenyl-osazons.....	0.071 g	0.008 g

### 136. Hellmuth Stamm und Roland Adolf: Zur Kenntnis des Zerfalls der Dithionsäure.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Halle.]

(Eingegangen am 20. März 1934.)

Der Zerfall der Dithionsäure in Schwefelsäure und schweflige Säure ist mehrfach Gegenstand reaktions-kinetischer Untersuchungen gewesen. J. A. Muller<sup>1)</sup> fand, daß der Zerfall der Säure in verd. wäßriger Lösung bei Gegenwart von viel HCl den Gesetzen einer monomolekularen (bzw. pseudo-monomolekularen) Reaktion folgt. Zum gleichen Resultat kamen später Fusao Ishikawa und Hiroshi Hagiwara<sup>2)</sup> bei verd., rein wäßrigen Lösungen der freien Säure. Yost und Pomeroy<sup>3)</sup> stellten fest, daß die Geschwindigkeit der Zersetzung der Konzentration an  $S_2O_6''$  und an  $H^+$  proportional ist, solange  $[H^+]$  einen gewissen Wert nicht überschreitet, oberhalb dieses Wertes aber schneller steigt als  $[H^+]$ ; daraus ziehen die Verfasser, unter Hinweis auf analoge Verhältnisse bei der Rohrzucker-Inversion, den Schluß, daß es sich bei der Zersetzung der Dithionsäure nicht um einen monomolekularen Zerfall von  $S_2O_6''$  bzw.  $HS_2O_6'$ , sondern um eine durch  $H^+$  katalysierbare Hydrolyse des Dithionat-Ions handle, im Sinne der Gleichung:



P. Goldfinger und H. D. Graf v. Schweinitz<sup>4)</sup> ergänzten diese Messungen und beobachteten auch in neutraler und in alkalischer Lösung eine Zersetzung von Dithionat in Sulfit und Sulfat, die freilich viel langsamer verläuft als der Zerfall im sauren Gebiet. Sie konstatierten ferner, daß unter keinen Umständen eine Spaltung von Dithionsäure in Monothionsäure ( $HSO_3$ ) nachweisbar ist; der gemessene Vorgang wird vielmehr auch nach der Ansicht dieser Forscher durch die Gleichung (1) wiedergegeben.

Im folgenden seien einige Beobachtungen mitgeteilt, die, wie wir glauben, einen neuen Gesichtspunkt für die Erklärung der Dithionsäure-Spaltung liefern. Bekanntlich sind bei Zimmer-Temperatur nicht nur die Lösungen

<sup>1)</sup> Bull. Soc. chim. France [4] **9**, 183 [1911].

<sup>2)</sup> Science Reports Tohoku Imp. Univ. [1] **21**, 484 [1932] (C. **1933**, I 2036).

<sup>3)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. **49**, 703 [1927].

<sup>4)</sup> Ztschr. physikal. Chem. (B) **22**, 117 [1933].