

Beschränkt man sich lediglich auf die Darstellung von Guanosin und Adenosin, so ist es nicht notwendig, die Phosphorsäure zu entfernen, vielmehr kann man nach Entfernung des Eiweiß sofort Pikrinsäure zusetzen.

Die Darstellung der Nucleoside läßt sich beschleunigen, indem man die Hefenucleinsäure mit Alkali zu den Nucleotiden vorspaltet und das Nucleotid-Gemisch der Fermenteinwirkung unterwirft:

100 g Hefenucleinsäure werden in 200 ccm Wasser aufgeschlämmt und auf dem Wasserbade mit 2-n. Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert. Zur klaren Lösung werden 11.7 g NaOH, gelöst in wenig Wasser, gegeben und die gesamte Lösung 2 Stdn. auf dem Wasserbade erwärmt. Zur auf 40° abgekühlten Lösung werden 524 ccm 40° warme verd. Essigsäure (24 ccm Eisessig und 500 ccm Wasser) und sodann 500 ccm filtrierte Fermentlösung (10 g Ferment in 500 ccm Wasser) gegeben und der Ansatz, mit einigen Tropfen Toluol versetzt, bei 37° unter täglichem Umschütteln aufbewahrt. Nach 6—12 Tagen, je nach Reinheit des Fermentes, ist die Abscheidung des Guanosins beendet. Ausb. etwa 20 g. Die weitere Aufarbeitung zum Adenosinpikrat ist die gleiche wie oben. Ausb. an Adenosinpikrat: 45—50 g.

Darstellung der *d*-Ribose.

a)¹⁰⁾ 10 g Guanosin werden in 400 ccm 0.1-n. Schwefelsäure gelöst und 2 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wird zur Abscheidung von Guaninsulfat im Eisschrank aufbewahrt, sodann das Filtrat mit reiner Barytlösung neutralisiert. Nach Entfernen des Bariumsulfats wird die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft (40°). Der Rückstand wird in Alkohol/Benzol gelöst und die Lösung wieder eingedampft. Der Rückstand wird mit Alkohol aufgenommen und absol. Äther zugegeben. Vom Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wird in wenig Alkohol aufgenommen. Beim Stehenlassen im Eisschrank kristallisiert die *d*-Ribose aus. Ausb. 3.2 g. Die Substanz wird nochmals aus wenig Alkohol umkristallisiert.

b) Zur Spaltung mit organischen Säuren (Ameisensäure, Essigsäure) werden 15 g Guanosin mit 90 ccm 4-proz. Ameisensäure etwa 15 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten wird vom ausgefallenen Guanin abgesaugt und das Filtrat nach Einengen wie vorstehend aufgearbeitet.

69. Hans von Euler und Erwin Bauer: Umwandlung von Codehydrase I in Codehydrase II.

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Stockholm.]
(Eingegangen am 28. Dezember 1937.)

Das Co-Enzym der alkoholischen Gärung, die Cozymase¹⁾, ist, wie schon vor 10 Jahren von Euler und Nilsson²⁾ gezeigt wurde, als Coredoxase oder Codehydrase eine unentbehrliche Komponente vieler enzymatischer Oxydo-Reduktions- bzw. Dehydrierungs-Systeme. Durch weitere Versuche aus diesem Institut³⁾ konnte dann der Nachweis erbracht werden, daß die Cozymase als Wasserstoffüberträger wirkt, indem sie selbst Wasserstoff

¹⁾ Euler u. Myrbäck, Ztschr. physiol. Chem. **131**, 180 [1923].

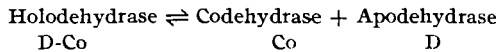
²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **162**, 264 [1927].

³⁾ Euler, Adler u. Hellström, Svensk Kem. Tidskr. **47**, 290 [1935].

aus einem Donatorsystem aufnimmt und in Dihydro-cozymase (später⁴) als Bariumsalz isoliert) übergeht, welche ihrerseits durch Flavinenzym (das „gelbe Ferment“ Warburgs) oder durch einen anderen Zwischenkatalysator⁵) zurückoxydiert wird.

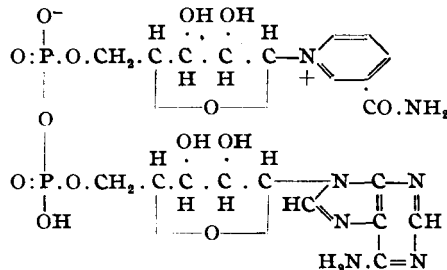
Die Cozymase fungiert als Codehydrase spezifisch, insofern sie nur gewisse Dehydrasen (Apodehydrasen) zu einem vollständigen Enzym ergänzt.

Wir erinnern hier kurz an die nunmehr recht allgemein angenommene Nomenklatur dieses Institutes (Euler, Adler, Albers), nach welcher ein an sich katalytisch inaktives spezifisches Protein, eine Apodehydrase, D, durch Codehydrase, Co, zu einer Holodehydrase, D-Co ergänzt wird. Zwischen den beiden Komponenten der Holodehydrase besteht folgendes Dissoziations-Gleichgewicht:

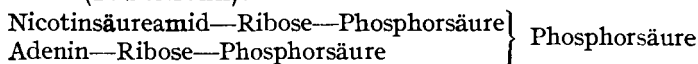


Die Apodehydrasen sind spezifisch auf verschiedene Substrate eingestellt. Die Mehrzahl dieser Dehydrasen (Alkohol-Dehydrasen und Milchsäure-Dehydrasen verschiedener Herkunft, Triosephosphorsäure-Dehydrase, Ameisensäure-Dehydrase u. a.) erlangen ihre dehydrierende Wirkung durch die Cozymase, welche wir auch als Codehydrase I bezeichnen. O. Warburg und W. Christian⁶) haben eine Dehydrase entdeckt, welche die Dehydrierung von Glucose-6-phosphorsäure (Robison-Ester) vermittelt und dabei nicht durch Cozymase, sondern ein anderes Co-Enzym aktiviert wird, die Codehydrase II, von Warburg und Christian zuerst, und zwar aus roten Pferdeblutzellen, isoliert.

Die beiden Codehydrasen sind nahe miteinander verwandt. Beide sind Dinucleotide; beide enthalten — wie die Untersuchungen des Stockholmer Institutes für Codehydrase I und die Untersuchungen des Dahlemer Institutes für Codehydrase II ergeben haben — einen Adenylsäure-Rest und als weitere Komponente Nicotinsäureamid-ribose-phosphorsäure. Codehydrase II enthält nach Warburg 3 PO₄-Reste. An der Aufklärung der Zusammensetzung und Konstitution der Cozymase waren besonders Myrbäck, Albers und F. Schlenk beteiligt; ihre Arbeiten haben zur folgenden Formulierung geführt:



Entsprechend kommt für die Codehydrase II die folgende Formulierung in Betracht (F. Schlenk):



⁴) Adler u. Euler, Sc. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 12 B, Nr. 36 [1937].

^{5a}) Adler, Euler u. Hellström, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 12 B, Nr. 38 [1937].

^{5b}) Euler u. Hellström, Ztschr. physiol. Chem. 251, [1938], im Druck.

⁶) Biochem. Ztschr. 254, 438 [1932]; 266, 377 [1933].

Sowohl Codehydrase I als auch II greifen in biologisch außerordentlich interessante Reaktionen ein, und die Tatsachen, welche einen Übergang der Codehydrasen ineinander betreffen, sind deswegen für das Verständnis zentraler biologischer Vorgänge von Wichtigkeit.

Vor einem halben Jahr haben Euler, Adler und Steenhoff Eriksen⁷⁾ Beobachtungen mitgeteilt, nach denen sie eine Dephosphorylierung der Codehydrase II zu Codehydrase I in Betracht zogen. Es hatte sich damals um das Auftreten einer Gärwirkung im synthetischen Enzymsystem mit Glucose als Substrat gehandelt⁸⁾. In Verfolgung und Erweiterung der erwähnten Versuche konnte in diesem Institut kürzlich R. Vestin⁹⁾ über eine Umwandlung von Codehydrase I in Codehydrase II berichten. Durch Inkubation von Codehydrase I und Adenosintriphosphat in Gegenwart von Apozymase entstand ein Reaktionsprodukt, das im System der Robison-Ester-Dehydrierung als Codehydrase II wirksam erschien. Vestin hat seine Versuche später auf Macerationssäfte übertragen und konnte den Effekt in etwa der gleichen Größenordnung auch bei kurz (6 Stdn.) dialysierten Macerationssäften nachweisen. Bei längerer Dialyse blieb er aus¹⁰⁾.

Bei Wiederholung der Vestinschen Versuche war es uns auch unter Einhaltung seiner Versuchsbedingungen nicht immer möglich, den von ihm im Thunberg-System¹¹⁾ beobachteten Effekt zu reproduzieren.

In der erwähnten Untersuchung war wegen der komplizierten Versuchsverhältnisse eine Beeinflussung des Ergebnisses durch mehrere Faktoren in wechselndem Ausmaß möglich. Außerordentlich störend erwies sich in dem von Vestin gewählten synthetischen Enzymsystem die wechselnde Phosphorylase-(= Heterophosphatase)-Aktivität des Test-Enzympräparates¹²⁾. Diese wechselnde Aktivität konnte unter Umständen bewirken, daß die durch die Codehydrase II katalysierte Dehydrierung des Robison-Esters in einem schwer kontrollierbaren Ausmaß von der Umwandlung des Hexosemonophosphates in ein Dehydrierungssubstrat der Codehydrase I überlagert wurde¹³⁾. In dem Bestreben, den u. U. als Codehydrase-II-Bildung zu deutenden Effekt sowie seine Messung zu verbessern und zu sichern, haben wir neue Versuche unter Abänderung der früheren Versuchsbedingungen ausgeführt. Eine Auswahl dieser Versuche wird unten kurz beschrieben.

Das Ergebnis dieser Versuche wollen wir einstweilen folgendermaßen formulieren: Die Annahme einer Umwandlung von Codehydrase I in Codehydrase II wird durch unsere vorliegenden Versuche gestützt.

Schon nach den oben erwähnten Erfahrungen des Instituts wird die Existenz eines Gleichgewichtes zwischen den beiden Codehydrasen wahrscheinlich. Ob es sich hierbei um ein mehr oder weniger einfaches Gleichgewicht Codehydrase I \rightleftharpoons Codehydrase II unter Aufnahme von anorganischem Phosphat handelt, wobei u. U. die Phosphorylierung mit einem Oxydoreduk-

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **248**, 227 [1937].

⁸⁾ s. hierzu auch Euler u. Adler, Ztschr. physiol. Chem. **251** [1938], im Druck.

⁹⁾ Naturwiss. **25**, 667 [1937].

¹⁰⁾ Diese Versuche werden demnächst in Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi veröffentlicht.

¹¹⁾ Der Thunberg-Versuch mit Robison-Ester (Glucose-6-phosphorsäure) als Substrat bildet einen gebräuchlichen und einfachen Test zum Nachweis der Codehydrase II.

¹²⁾ Euler u. Adler, Ztschr. physiol. Chem. **235**, 122 [1935].

¹³⁾ Erwin Bauer, Ztschr. physiol. Chem. **242**, 29 [1936].

tionsvorgang gekoppelt ist, oder ob ein Gleichgewicht meßbar ist zwischen Nicotinsäureamid-ribose-phosphorsäure einerseits, mit Adenylsäure oder Adenosindiphosphorsäure andererseits, müssen weitere Versuche zeigen¹⁴⁾.

Wir brauchen kaum zu betonen, daß das Problem über die gegenseitige Stellung und Umwandlung der beiden Codehydrasen durch unsere Versuche keineswegs endgültig gelöst ist; es bildet im Gegenteil die Einleitung zu weiteren Untersuchungen mit anderen Methoden, spektrophotometrischer und besonders präparativer Art.

Beschreibung der Versuche.

Versuchsbedingungen.

Auf Grund früherer Erfahrungen des Instituts haben wir Versuchsbedingungen gewählt, von denen wir folgende besonders erwähnen wollen:

1) Als Inkubationsenzym wird gut dialysierte CO_2 -Fällung aus Lebedew-Saft verwendet, die phosphorylasewirksam ist, und andererseits die Möglichkeit einer H_2 -Donatorbildung für Co I oder Co II während der Inkubation verringert.

2) Als Testferment dient ein nach der Methode der selektiven Thermo-inaktivierung¹³⁾ phosphorylase-verarmtes dialysiertes Zwischenferment (= CO_2 -Fällung aus Lebedew-Saft mindestens 16 Stdn. dialysiert, hierauf durch Thermobehandlung bei p_{H} 8.5, 40°, 10 Min. inaktiviert). Dadurch scheint gewährleistet zu sein, daß einerseits der Übergang von Hexosemonophosphat in Dehydrierungs-Substrat für Codehydrase I (CoH_2 I) unterbunden ist, und andererseits auch nicht die sonst mögliche Zubildung von Codehydrase II zu u. U. bereits vorhandener während der Messung in störendem Ausmaße erfolgt.

3) Das relative Verhältnis Codehydrase I:ATP wird verringert.

4) Wir verwenden vorzugsweise CoH_2 I an Stelle von Co I und arbeiten in verdünnter H_2 -Atmosphäre. CoH_2 I scheint in unseren Versuchen der Cozymase überlegen zu sein, sei es nun aus konstitutionellen oder anderen Gründen.

In dieser Weise erhalten wir nun Beschleunigungen der Methylenblau-Entfärbungszeit, die, bezogen auf die eingesetzte Cozymase, einer 30- und mehrprozentigen Umwandlung in Codehydrase II entsprechen würden. Zur Verdeutlichung geben wir folgende typische Versuche an:

Versuche.

1) Aeröb unter Belüftung: Ansatz von 4 ccm Gesamtvolumen, enthaltend 0.75 γ -Mol Co I, 4 γ -Mol ATP, je 2.5 γ -Mol MgSO_4 und MnSO_4 , 0.625 ccm $m_{1/2}$ -Phosphatpuffer von p_{H} 7.6, und 2 ccm 17 Stdn. gegen fließendes Leitungswasser durch Cellophan dialysierte CO_2 -Fällung aus Macerationssaft. Während der Inkubation wird ein mäßiger Luftstrom eingeleitet. Unterbrechung der Reaktion durch Einpipettieren von 1 ccm des Reaktionsgemisches in 1 ccm auf 85° vorerwärmte Salzsäure von solcher Konzentration, daß das sich ergebende p_{H} annähernd 3 beträgt. Nach 10 Min. wird auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die Probe ohne Inkubation wird so gezogen, daß 0.5 ccm CO_2 -Fällung mit HCl 1 Min. vorerwärmt und dann erst das restliche Reaktionsgemenge zupipettiert wird. Vor Anstellung der Thunberg-Teste werden die Kochproben mit einer der vorgegebenen HCl äquivalenten Menge NaOH versetzt, nach kurzem Stehenlassen von der Fällung abzentrifugiert und die klare Restlösung verwendet.

¹⁴⁾ s. auch Euler u. Adler, Ztschr. physiol. Chem. 251 [1938], im Druck.

2) Anaerob, in verdünnter H₂-Atmosphäre: Ansatz wie oben, statt Cozymase (Co I) hier Dihydrocozymase (CoH₂ I), deren Konzentration nach dem übereinstimmenden Gär- und spektrophotometrischen Test bemessen worden war. Die Inkubation erfolgt im Thunberg-Rohr, das Ferment ist in einem Einsatzrohr enthalten. Der Reaktionsraum steht durch Vermittlung einer mit Pyrogallol beschickten Waschflasche und eines Hg-Ventils einerseits mit einer H₂-Bombe, andererseits durch Vermittlung einer Vorlage mit einer kräftigen Wasserstrahlpumpe in Verbindung. Zunächst wird mehrmals abwechselnd evakuiert und H₂ eingeleitet, endgültig evakuiert und dann vermischt. Die Unterbrechung der Reaktion erfolgt durch Einstellen des Thunberg-Rohres in ein Bad von 85° während 10 Min. Vor dem Thunberg-Test wird abzentrifugiert und die klare Restlösung verwendet. O-Probe: Reaktionsgemisch ohne Ferment 3 Min. vorerwärmen, Ferment einpipettieren, nach 10 Min. auf Zimmertemperatur abkühlen. Weitere Aufarbeitung wie vorher.

Thunberg-Teste: Gesamtvolumen 2.1 ccm, enthaltend 0.25 ccm Phosphatpuffer *m*₂, p_H 7.6, 0.25 ccm Flavinenzym, 0.25 ccm *m*₂₀-Robison-Ester bzw. *m*₁₀-Fructose, 0.25 ccm Testferment (dargest. aus dem in den Inkubationsversuchen gebrauchten Ferment: 8.0 ccm Ferment + Veronalacetat-Salzsäurepuffer nach Michaelis entspr. 1.9 ccm Veronalacetat-Stamm-lösung, 11' bei 40.5°), 0.5 ccm Methylenblau 1:5000. Kochsaft entspricht ¹/₂₀ des Inkubationsversuches, ebenso Co I (1629), CoH₂ I und ATP. In den Fructosedehydrierungsversuchen dagegen ist die ATP-Menge 0.4 γ-Mol.; Co II in der angegebenen Menge.

	Inkubationszeit in Min.	Thunberg-Test	30/Min. mit Kochsaft entspr. ¹ / ₂₀ des Inkub.-Gemisches	% „Umwandl.“ bezogen auf eingesetzte CoI,
Belüftung	0	mit Robis.-E.	0.1 >	—
		ohne „	0.1 >	—
	30	mit „	0.45	8
		ohne „	0.1 >	—
H ₂	0	mit „	0.1 >	—
		ohne „	0.1 >	—
	30	mit „	1.0	27
		ohne „	0.1 >	—

Die verwendeten Enzympräparate verhielten sich wie folgt:

Ferment	Substrat	Co II in γ	30/T	Bemerkung
Inkubations-enzym	Robison-Ester	18.6	9.0	*) an Stelle von Co II: CO I + ATP in w. o. angegebener Menge
	Fructose	18.6	3.0	
	Robison-Ester	*)	1.3	
Testenzym ..	Robison-Ester	18.6	3.7	**) an Stelle v. Co II: CoH ₂ I + ATP in angegebener Menge
	„	9.3	1.3	
	„	4.6	0.52	
	„	0.0	0.1 >	
	Robison-Ester	*)	0.1 >	
	„	**)	0.1 >	
	Robison-Ester ohne „	18.6	1.4	
	ohne „	18.6	0.1 >	