

SUMMARY.

An extract from germinated peas was analyzed for sugars by the methods of *Somogyi*, *Hagedorn-Jensen* and by paper partition chromatography. While the last named method can be controlled and has been shown to give good and reliable results, both the reduction of copper in alkaline solution and the reduction of ferricyanide gave too high values for reducing sugar. The difference was especially great with ferricyanide as oxidising agent (more than 300% reducing sugar compared to the sum of the values for glucose and fructose obtained by paper chromatography). Determination of non-reducing sugar (only saccharose) by hydrolysis of the extract and measurement of its increase in reducing power by one of the first named methods was too unreliable as other substances were also hydrolyzed with liberation of reducing components. As the amount of surplus reduction by foreign substances cannot be foreseen and is different for different extracts the only reliable method for sugar analysis in biological fluids of varying composition is the separation of the soluble carbohydrates from the interfering substances by partition chromatography and determination of the isolated sugars by one of the classical methods.

Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich.

62. Über die Myokinase der Leber¹⁾

von F. Leuthardt und Hélène Bruttin.

(9. I. 52.)

Im Muskel haben *Colowick & Kalckar*²⁾ ein Ferment nachgewiesen, die Myokinase (oder ADP-Phosphomutase), welches die Dismutation von zwei Molekeln ADP (Adenosindiphosphat) zu einer Molekel AMP (Adenosinmonophosphat) und einer Molekel ATP (Adenosin-triphosphat) katalysiert: $2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$. Sie nahmen zunächst an, dass Myokinase in der Leber nicht vorkommt. Spätere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die obige Dismutation auch in der Leber möglich ist. *Barkulis & Lehninger*³⁾ sowie *Kielley & Kielley*⁴⁾ haben das Ferment in den Lebermitochondrien nachgewiesen. Nach *Kotel'nikova*⁵⁾ kommt es ausser im Skelettmuskel auch in Herz,

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

²⁾ *S. P. Colowick & H. M. Kalckar*, J. Biol. Chem. **148**, 117 (1943).

³⁾ *S. S. Barkulis & A. L. Lehninger*, J. Biol. Chem. **190**, 339 (1951).

⁴⁾ *W. W. Kielley & R. K. Kielley*, J. Biol. Chem. **191**, 485 (1951).

⁵⁾ *A. V. Kotel'nikova*, Biokhimiya **14**, 145 (1949), cit. nach Chem. Abstr. **1949**, 6263 i.

Leber, Niere und Erythrocyten vor. Die Myokinaseaktivität wurde in diesen Versuchen immer indirekt durch Koppelung mit einer ATP-abhängigen Reaktion gemessen.

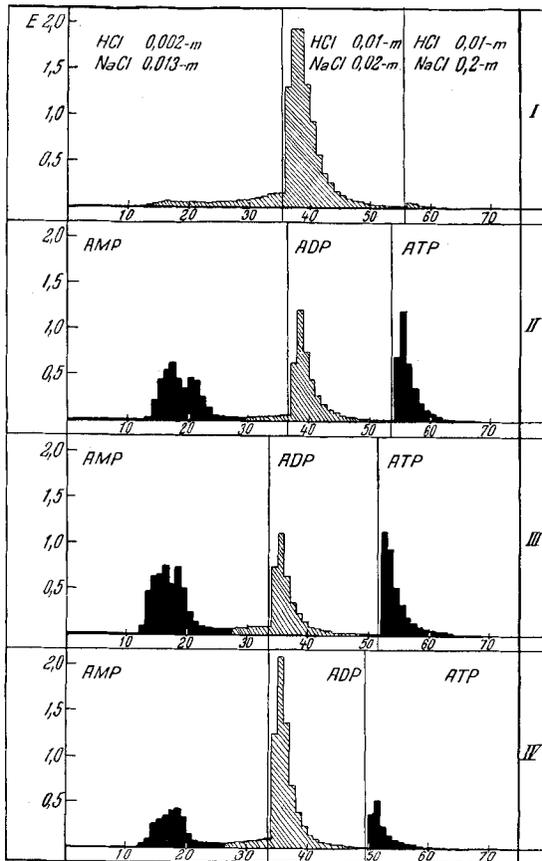


Fig. 1.

Austausch-Chromatogramm der Adeninnukleotide.

Abszisse: Nummer der Röhrcchen. Ordinate: Extinktion bei 260 m μ . Versuch I: ADP nicht inkubiert. Versuch II: 10 μ Mol ADP 30 Min. bei 38° mit Enzym inkubiert. Schwarze Flächen: durch Myokinase neu gebildete Nukleotide. Versuch III: wie II, aber Fermentlösung vor dem Versuch mit HCl bis 0,1-n. versetzt und 10 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Versuch IV: wie II, aber mit 0,06-m. NaF.

Wir haben bei einer Untersuchung¹⁾ über die Phosphorylierung des Aneurins durch ATP und ein Ferment der Rattenleber beobachtet, dass ADP zwar die Phosphatübertragung aus ATP hemmt, gleichzeitig aber als Phosphatdonator dienen kann, wenn auch in viel geringerer Masse als ATP. Da eine direkte Phosphatübertragung aus ADP nicht wahrscheinlich ist, vermuteten wir, dass unser Ferment-

¹⁾ F. Leuthardt & H. Nielsen, nicht publiziert. Wird in Helv. erscheinen.

präparat eine Myokinase enthält, die aus dem zugesetzten ADP das ATP bildet. Diese Annahme hat sich bestätigt. Da unser Fermentpräparat frei von Apyrasen ist, liessen sich die Reaktionsprodukte direkt nachweisen. Wir benützten dazu die chromatographische Trennung an einer Säule von Anionenaustauscher „Dowex 2“, wie sie von *Cohn & Carter*¹⁾ beschrieben worden ist.

Setzt man der Fermentlösung ADP zu, so findet man nach der Inkubation (30 Min.) AMP und ATP, und zwar sind alle drei Komponenten in ungefähr gleicher Konzentration vorhanden (siehe Fig. 1). Setzt man AMP und ATP in äquivalenter Menge zu, so wird der gleiche Endzustand erreicht, d. h. es wird ADP gebildet (Fig. 2). Die Reaktion ist also reversibel. Durch Fluorid wird sie gehemmt (Fig. 1).

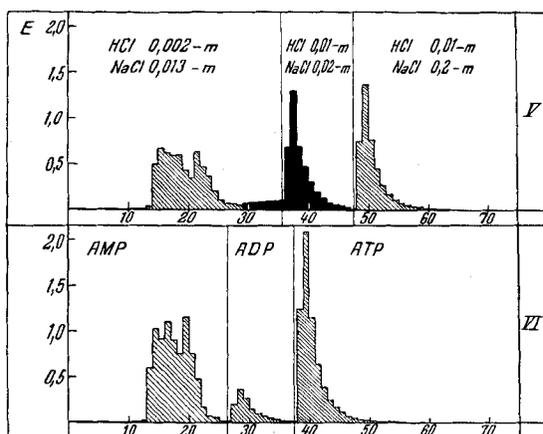


Fig. 2.

Versuch V: 5 μ Mol ATP + 5 μ Mol AMP 30 Min. bei 38° inkubiert. Versuch VI: dasselbe Gemisch nicht inkubiert. Das verwendete ATP enthielt etwa 10% ADP.

Wird die Fermentlösung bei Gegenwart von 0,1-n. HCl während 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, so bleibt die Aktivität erhalten (Fig. 1). Das Ferment verhält sich also wie die Muskelmyokinase (*Colowick & Kalckar*²⁾). Die Mitochondrienmyokinase ist nach *Barkulis & Lehninger*³⁾ unter diesen Bedingungen nicht stabil. Unser Ferment wurde durch fraktionierte Fällung aus den löslichen Anteilen des Leberhomogenats (aus dem Überstehenden nach hochtourigem Zentrifugieren) gewonnen. Wir können nicht streng ausschliessen, dass beim Homogenisieren die Mitochondrien leicht geschädigt werden und daher gewisse Bestandteile an die Lösung abgeben. Wir lassen aus diesem Grund die Frage offen, ob es in der Leberzelle nebeneinander zwei verschiedene Fermente, eine strukturgebundene und eine lösliche Myokinase, gibt.

¹⁾ W. E. Cohn & C. E. Carter, Am. Soc. **72**, 4273 (1950).

²⁾ S. P. Colowick & H. M. Kalckar, J. Biol. Chem. **148**, 117 (1943).

³⁾ S. S. Barkulis & A. L. Lehninger, J. Biol. Chem. **190**, 339 (1951).

Ausser der verschiedenen Hitzeempfindlichkeit weisen die beiden Fermente noch einen anderen Unterschied auf. Das Mitochondrienferment von *Barkulis & Lehninger*¹⁾ wird durch 0,03-m. NaF vollständig gehemmt, während unser Ferment bei 0,03-m. NaF zwar verminderte Aktivität zeigt, aber immer noch wirksam ist.

Experimenteller Teil.

Enzympräparat. Wir beschreiben in einer anderen Arbeit die Darstellung eines Fermentpräparates aus Rattenleber, welches in Gegenwart von ATP Aneurin phosphoryliert²⁾. Wir haben diese Proteinfraction benützt, die gleichzeitig eine aktive Myokinase enthält.

Inkubation. Der Ansatz enthält 1,2 cm³ Enzymlösung, Phosphatpuffer pH 7,4 (Konzentration 0,0067-m.), Mg⁺⁺ (0,0033-m.), 10 μ Mol Adenosindiphosphat oder ein Gemisch von 5 μ Mol Muskeladenylsäure + 5 μ Mol ATP. Gesamtvolumen 3,0 cm³. Während 30 Min. bei 38° inkubiert. Am Schluss durch Erhitzen im siedenden Wasserbad enteiweiss. Nach Zentrifugieren wird das Überstehende zur chromatographischen Analyse verwendet.

Nach Abtrennung des Überstehenden von koaguliertem Eiweiss wurde die Lösung etwa 20fach verdünnt und durch Zufügen von starkem Ammoniak auf eine Konzentration von etwa 1-m. NH₃ gebracht.

Chromatographie. Wir verwenden zur Trennung und Bestimmung des Adeninnukleotids die Methode von *Cohn & Carter*³⁾. An Stelle des nicht erhältlichen Anionenaustauschers „Dowex 1“ verwendeten wir „Dowex 2“; es zeigte sich aber, dass die zur Trennung von Adenylsäure und Adenosindiphosphat nötigen HCl-NaCl-Gemische bei Verwendung dieses Austauschers geändert werden müssen. Zur Abtrennung der Adenylsäure dient eine Lösung, die 0,002-m. HCl und 0,013-m. NaCl enthält, zur Abtrennung des Adenosindiphosphats eine solche von 0,01-m. HCl und 0,02-m. NaCl, für die Abtrennung des Adenosintriphosphats eine solche von 0,01-m. HCl und 0,2-m. NaCl.

Die Säule von „Dowex 2“ (200—400 mesh), Höhe 1,5 cm, Querschnitt 1,5 cm², wird durch Waschen mit 1-n. HCl, Wasser und 1-n. NH₃ vorbereitet; darauf wird die ammoniakalische Lösung der Nukleotide aufgetragen und mit Wasser nachgewaschen, bis die Lösung annähernd neutral abläuft. Die drei Nukleotide werden sodann sukzessive durch die angegebenen HCl-NaCl-Gemische ausgewaschen. Durchlaufgeschwindigkeit etwa 1 cm³/Min. Fraktionen von 10 cm³ werden im „fraction collector“ (Modell Technicon International New York) gesammelt; die Konzentration der Nukleotide wird durch Messung der Lichtabsorption bei 260 μ im *Beckman*-Photometer gemessen.

Die Resultate sind in Fig. 1 und 2 dargestellt. In den Diagrammen ist als Abszisse die Nummer der Röhrchen, als Ordinate die Extinktion bei 260 μ aufgetragen. Die schraffierten Flächen bedeuten die zugesetzten, die schwarzen Flächen die neu gebildeten Nukleotide. Einzelheiten siehe Text zu den Figuren.

Die verwendete Muskeladenylsäure scheint aus zwei Komponenten zu bestehen, ebenso die aus ADP im Versuchsansatz entstandene Verbindung. Wir haben diese Frage nicht weiter verfolgt.

SUMMARY.

A protein fraction has been prepared from the “soluble” fraction of rat liver which contains an active myokinase. The enzyme is stable in n/10 HCl at 100° C., like muscle myokinase; it is only weakly inhibited by fluoride. The adenosine phosphates have been separated by ion-exchange on a bed of Dowex 2 (method of *Cohn & Carter*³⁾).

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

¹⁾ *S. S. Barkulis & A. L. Lehninger*, J. Biol. Chem. **190**, 339 (1951).

²⁾ *F. Leuthardt & H. Nielsen*, nicht publiziert. Wird in *Helv.* erscheinen.

³⁾ *W. E. Cohn & C. E. Carter*, Am. Soc. **72**, 4273 (1950).