

## 29. Der enzymatische Abbau des Fructose-1-phosphats in der Leber.

III. Mitteilung über den Stoffwechsel der Fructose in der Leber<sup>1)</sup>

von **F. Leuthardt, E. Testa** und **H. P. Wolf**.

(15. XII. 52.)

Fructose wird in der Leber bei Gegenwart von Adenosintri-phosphat (A.T.P.) und Magnesiumionen durch ein spezifisches Ferment zu Fructose-1-phosphat phosphoryliert<sup>2)</sup>3)4)5). Wir haben dieses Ferment, das auf Keto-hexosen eingestellt ist, als Ketokinase bezeichnet<sup>6)</sup>. Es stellt sich die Frage, auf welche Weise das Fructose-1-phosphat, das im klassischen Schema des Zuckerabbaues nicht erscheint, weiter umgesetzt wird. Neuerdings haben *Cori* und Mitarbeiter zwei Arbeiten über die Umwandlungen dieses Esters veröffentlicht. In Muskelextrakten<sup>7)</sup> wird Fructose-1-phosphat in Gegenwart von Magnesiumionen und A.T.P. in Stellung 6 phosphoryliert und in Fructose-1,6-diphosphat übergeführt (1-Phosphofructokinase); das für diese Reaktion verantwortliche Enzym scheint von der schon lange bekannten 6-Phosphofructokinase, welche Fructose-6-phosphat zu Hexosediphosphat phosphoryliert, verschieden zu sein. Aus der Leber haben *Cori* und Mitarbeiter<sup>4)</sup> durch Ammoniumsulfatfraktionierung eine Proteinfraction isoliert (im folgenden *Cori*-Fraktion genannt), welche das Fructose-1-phosphat in Hexose-6-phosphat umwandelt. Das entstehende Glucose-6-phosphat kann bei Gegenwart von *Warburg*'schem Zwischenferment<sup>8)</sup> und Triphosphopyridinnucleotid (T.P.N.) photometrisch bestimmt werden (Zunahme der Absorption bei 340 m $\mu$ ). Da das Fermentpräparat die *Lohmann*'sche Hexose-Isomerase<sup>9)</sup> enthält, lässt sich das primäre Reaktionsprodukt nicht direkt feststellen. Die Autoren nehmen an, dass eine Mutase (Phosphofructomutase) vorhanden ist, welche, ähnlich der Phosphoglucomutase, eine Verschiebung des Phosphatrests von Stellung 1 nach Stellung 6 bewirkt, wobei Glucose-6-phosphat entsteht. Wir werden auf diese Frage später zurückkommen.

<sup>1)</sup> I. Mitteilung siehe <sup>2)</sup>; II. Mitteilung siehe <sup>3)</sup>.

<sup>2)</sup> *F. Leuthardt & E. Testa*, *Helv.* **33**, 1919 (1950).

<sup>3)</sup> *F. Leuthardt & E. Testa*, *Helv.* **34**, 931 (1951).

<sup>4)</sup> *G. T. Cori, S. Ochoa, M. W. Slein & C. F. Cori*, *Biochem. Biophys. Acta* **7**, 304 (1952).

<sup>5)</sup> *A. Staub & C. S. Vestling*, *J. Biol. Chem.* **191**, 395 (1951).

<sup>6)</sup> *F. Leuthardt & E. Testa*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **8**, C 67 (1950).

<sup>7)</sup> *M. W. Slein, G. T. Cori & C. F. Cori*, *J. Biol. Chem.* **186**, 763 (1950).

<sup>8)</sup> *O. Warburg & W. Christian*, *Bioch. Z.* **254**, 438 (1932).

<sup>9)</sup> *K. Lohmann*, *Bioch. Z.* **262**, 137 (1933).

Ausser der Umwandlung in Hexose-6-phosphat lassen sich in Extrakten aus Rattenleber noch weitere Reaktionen des Fructose-1-phosphats beobachten. Wir haben bei den im folgenden beschriebenen Untersuchungen neben dem oben genannten *Cori*-Ferment einen Extrakt aus Acetontrockenpulver (Rattenleber) benützt. Bei Gegenwart von Fluorid wandelt dieser Extrakt das Fructose-1-phosphat in einen stabilen Ester um, der im Gegensatz zum Ausgangsmaterial beim Erhitzen auf 100° während 15 Minuten in 1-n. Salzsäure nicht hydrolysiert wird. Die Umwandlung lässt sich durch Aufstellung der P-Bilanz (Bestimmung des anorganischen und des 15-min. Phosphats) leicht verfolgen. Anorganisches Phosphat wird während der Inkubation nicht in nennenswerter Menge abgespalten. Durch den optischen Test (*Warburg'sches* Zwischenferment-T.P.N.) konnten wir feststellen, dass der gebildete stabile Ester nicht Hexose-6-Phosphat ist. Wird der Extrakt 24 Std. bei 0° gegen destilliertes Wasser dialysiert, so verliert er seine Aktivität, d. h. es wird nun aus Fructose-1-phosphat kein stabiler Ester mehr gebildet. Er kann aber durch Leberkochsaft oder durch das stark eingeeengte Dialysat reaktiviert werden. Die nähere Untersuchung hat gezeigt, dass der Aktivator mit der Cozymase (D.P.N.) identisch ist. Ausser Cozymase wurde noch eine Reihe weiterer Verbindungen geprüft (siehe S. 238). Alle diese Stoffe, mit Ausnahme der Dihydro-cozymase, waren inaktiv.

Die Cozymase wurde nach der Methode von *Neilands & Åkeson*<sup>1)</sup> an einer Säule von Dowex 2 chromatographisch gereinigt und der Reinheitsgrad nach *Bonnichsen*<sup>2)</sup> mittels Alkoholdehydrogenase aus Muskel photometrisch bestimmt (Messung der Absorption des (D.P.N.)H<sub>2</sub> bei 340 m $\mu$ ).

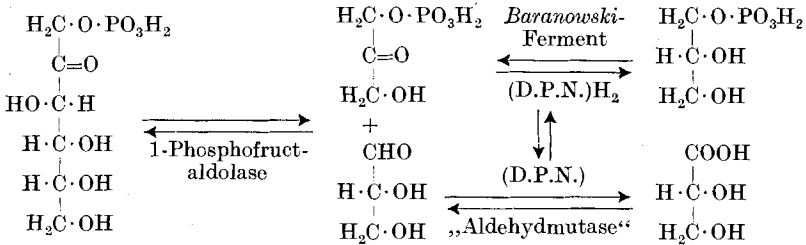
Für die optimale Reaktivierung des lange dialysierten Extrakts ist eine verhältnismässig grosse Menge D.P.N. nötig (ca. 40  $\gamma$ /ml). Dies wird durch die rasche Zerstörung der Cozymase im Rohextrakt erklärt.

Um die Natur des entstehenden Reaktionsproduktes aufzuklären, haben wir zunächst optisch die Bildung von Glucose-6-phosphat mittels des *Warburg'schen* Zwischenferments nachzuweisen versucht (Dehydrierung des Glucose-6-phosphats unter Reduktion des T.P.N.). Da die Extrakte eine sehr aktive Hexose-Isomerase enthalten, wird mit dieser Methode auch das Fructose-6-phosphat, also die gesamten Hexose-6-phosphate, erfasst. Es zeigte sich aber, dass die Stabilisierung des Phosphats nur zum kleinsten Teil auf der Bildung der genannten Hexose-Ester beruhen kann und dass daher andersartige Phosphorsäureester entstehen müssen. Auch der Nachweis von

<sup>1)</sup> J. B. Neilands & Å. Åkeson, J. Biol. Chem. **188**, 307 (1951).

<sup>2)</sup> R. K. Bonnichsen, Acta chem. Scand. **4**, 714 (1950).

3-Phosphoglycerinsäure mit der Methode von *Rapoport*<sup>1)</sup> (Farb-reaktion mit  $\alpha$ -Naphtoresorcin in konz. Schwefelsäure) oder in einem präparativen Ansatz nach *Meyerhof & Schulz*<sup>2)</sup> (Zunahme der Drehung bei Zusatz von Molybdat) fiel negativ aus. Es gelang uns schliesslich zu zeigen, dass Fructose-1-phosphat sowohl in Rohextrakten aus Acetontrockenpulver als auch in der *Cori*-Fraktion eine direkte Spaltung in D-Glycerinaldehyd und Phosphodioxyaceton erleidet. Bei Gegenwart von Cozymase tritt eine Dismutation der primären Spaltstücke zu Glycerinsäure und  $\alpha$ -Glycerinphosphorsäure ein.



Kürzlich haben *Hers & Kusaka*<sup>3)</sup> in einer vorläufigen Mitteilung über Versuche berichtet, welche sie ebenfalls zur Annahme einer direkten Aldolspaltung des Fructose-1-phosphats geführt haben. Sie nehmen aber an, dass die Spaltung durch die gleiche Aldolase bewirkt wird, die auch das Hexosediphosphat zum Zerfall bringt.

Die Bildung von Triosen aus dem Fructose-1-phosphat kann durch zwei verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Setzt man die  $\alpha$ -Glycerinphosphat-Dehydrase (*Baranowski-Ferment*<sup>4)</sup>) und hydrierte Cozymase zu, so wird das entstehende Dioxyacetonphosphat nach folgender Gleichung reduziert:



Die Reaktion kann daher durch Messung der Abnahme der Absorption bei 340  $m\mu$  verfolgt werden. Bei Verwendung von Rohextrakt aus Acetontrockenpulver wird die zugesetzte Dihydrocozymase nur teilweise dehydriert, weil die entstehende Cozymase durch den Glycerinaldehyd zurückhydriert wird. Es stellt sich dementsprechend ein Gleichgewichtszustand ein, in welchem oxydierte und reduzierte Form der Cozymase nebeneinander vorhanden sind. Verwendet man dagegen die durch Ammoniumsulfatfraktionierung nach *Cori* hergestellte Fermentlösung, so ist die Dehydrierung der reduzierten Cozymase vollständig, denn in dieser Lösung fehlt die Glycerinaldehyd-Dehydrase; die Cozymase kann daher nicht rück-

<sup>1)</sup> *S. Rapoport*, *Biochem. Z.* **289**, 406 (1937).

<sup>2)</sup> *O. Meyerhof & W. Schulz*, *Biochem. Z.* **297**, 60 (1938).

<sup>3)</sup> *H. G. Hers & T. Kusaka*, II<sup>e</sup> Congrès international de biochimie, Paris 1952, Résumés des communications, S. 281.

<sup>4)</sup> *T. Baranowski*, *J. Biol. Chem.* **180**, 535 (1949).

reduziert werden. Die Aldolspaltung des Fructose-1-phosphats in der *Cori*-Fraktion verläuft im Gegensatz zur Bildung des Hexose-6-phosphats auch ohne Zusatz von Magnesiumionen.

Unter den gleichen Bedingungen wird Fructose-1-phosphat von reiner, kristallisierter Muskelaldolase (Zymohexase) nicht angegriffen. Das Ferment, das die obige Spaltung bewirkt, muss also von der von *Meyerhof & Lohmann*<sup>1)2)</sup> entdeckten und von *Warburg & Christian*<sup>3)</sup> im kristallisierten Zustand dargestellten Aldolase verschieden sein. Wir schlagen für dasselbe vorläufig den Namen 1-Phosphofructaldolase vor, während wir die „alte“ *Meyerhof*'sche Aldolase als 1,6-Diphosphofructaldolase bezeichnen.

Unsere Enzymlösungen spalten stets auch Hexosediphosphat. Wir können zur Zeit noch nicht sagen, ob dieselben auch die *Meyerhof*'sche Aldolase enthalten oder ob die 1-Phosphofructaldolase gleichzeitig Fructose-1-phosphat und Fructose-1,6-diphosphat angreift. Diese Frage kann nur durch die Reindarstellung des Enzyms entschieden werden.

Mit der Entdeckung der 1-Phosphofructaldolase ist ein zweites Ferment bekannt geworden, welches eine Aldolspaltung der Hexosekette bewirkt. Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, dass damit die Reihe der „Aldolasen“ nicht erschöpft ist. Es existieren auch Enzyme, welche Pentosen in ein C<sub>2</sub>- und ein C<sub>3</sub>-Fragment zerlegen (vgl. die Übersicht von *Ochoa & Stern*<sup>4)</sup>).

Das Gleichgewicht zwischen Fructose-1-phosphat und den primären Spaltstücken liegt stark zugunsten des Fructoseesters. Werden die Triosen nicht durch eine sekundäre Reaktion aus dem Gleichgewicht entfernt, so lässt sich ihre Bildung nicht mit Sicherheit nachweisen, insbesondere tritt keine messbare Stabilisierung des Phosphats ein. Erst Zusatz von Cozymase zum lang dialysierten Extrakt ermöglicht die Wasserstoffverschiebung zwischen Dioxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd und damit die Bildung der säurestabilen Glycerinphosphorsäure. Im optischen Test mit der gereinigten Enzymfraktion nach *Cori* wird das entstandene Dioxyacetonphosphat durch die zugesetzte hydrierte Cozymase reduziert und dadurch aus dem Gleichgewicht entfernt.

Schon früher haben *Meyerhof* und Mitarbeiter<sup>5)</sup> die Kondensation verschiedener Aldehyde mit Phosphodioxyaceton unter der Wirkung von dialysierten Muskelextrakten beobachtet. Mit dem

1) *O. Meyerhof & K. Lohmann*, Naturwiss. **22**, 220 (1934).

2) *O. Meyerhof & K. Lohmann*, Bioch. Z. **271**, 89 (1934).

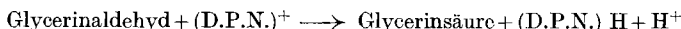
3) *O. Warburg & W. Christian*, Bioch. Z. **314**, 149 (1943).

4) *S. Ochoa & J. R. Stern*, Ann. Rev. Biochem. **21**, 547 (1952); siehe auch: *G. E. Glock*, Biochem. J. **52**, 575 (1952); *B. L. Horecker*, in „Phosphorus Metabolism“. Baltimore 1951, S. 117.

5) *O. Meyerhof, K. Lohmann & Ph. Schuster*, Bioch. Z. **286**, 319 (1936).

D-Glycerinaldehyd entstand Fructose-1-phosphat. Die Ausbeute war annähernd quantitativ und die Reaktion erwies sich als irreversibel. Wir vermuten, dass für diese Kondensation die beschriebene 1-Phosphofructaldolase verantwortlich ist. Wegen der ungünstigen Lage des Gleichgewichts lässt sich die umgekehrte Reaktion nicht direkt beobachten.

Damit die oben formulierte Dismutation stattfinden kann, müssen in der Fermentlösung offenbar zwei Enzyme vorhanden sein: ein erstes, das den Wasserstoff vom Glycerinaldehyd auf die Cozymase überträgt:



und ein zweites, das die Reduktion des Dioxycetonphosphats durch die hydrierte Cozymase bewirkt (nach der oben angeschriebenen Gleichung, S. 229).

Das erste Enzym ist offenbar ein Teil der von *Green, Needham & Dewan*<sup>1)</sup> beschriebenen „Aldehydmutase“, welche den Wasserstoff vom Aldehyd auf eine  $\alpha$ -Ketosäure oder ein zweites Molekül Aldehyd überträgt; das zweite Enzym ist das oben erwähnte *Baranowski-Ferment*<sup>2)</sup>. Wir haben beide durch einen optischen Test direkt nachgewiesen, das erste durch die Reduktion der Cozymase bei Gegenwart von D,L-Glycerinaldehyd, das zweite durch die Dehydrierung der reduzierten Cozymase bei Zugabe von Hexosediphosphat, kristallisierter Aldolase und Triose-Isomerase.

Man kann den Zerfall des Fructose-1-phosphats auch dadurch nachweisen, dass man dem Ansatz Hydrazin zusetzt. Die primär gebildeten Triosehydrazone werden nach der Methode von *Dounce & Beyer*<sup>3)</sup> (Modifikation von *Sibley & Lehninger*<sup>4)</sup>) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt und in alkalischer Lösung kolorimetrisch bestimmt. Wenn man das Fructose-1-phosphat mit der kristallisierten Muskelaldolase und Hydrazin bei 38° inkubiert, so gibt diese Methode eine schwache Färbung. Merkwürdigerweise gibt bei Zimmertemperatur die Inkubation mit Hydrazin keine stärkere Farbreaktion mit dem Dinitrophenylhydrazin als die Inkubation ohne Hydrazin. Es scheint daher zweifelhaft, ob der positive Ausfall der Farbreaktion mit Muskelaldolase überhaupt durch Bildung von Triosen erklärt werden darf. Immerhin kann eine geringe Spaltung des Fructose-1-phosphats durch die Muskelaldolase bei 38° nicht ausgeschlossen werden. (Im optischen Test, der stets bei Zimmertemperatur durchgeführt wurde, ist der Ester während 30 Min. völlig stabil.)

1) *E. Green, D. M. Needham & J. G. Dewan*, *Biochem. J.* **31**, 2327 (1937).

2) *T. Baranowski*, *J. Biol. Chem.* **180**, 535 (1949).

3) *A. L. Dounce & G. T. Beyer*, *J. Biol. Chem.* **173**, 159 (1948).

4) *J. A. Sibley & A. Lehninger*, *J. Biol. Chem.* **177**, 859 (1949).

Schliesslich konnten wir die Spaltung des Fructose-1-phosphats noch durch den direkten Nachweis und die Isolierung der Dismutationsprodukte – Glycerinsäure und Glycerinphosphat – sicherstellen. Die Glycerinsäure wurde als Chininsalz in analysenreinem Zustand erhalten und mit synthetischem Produkt verglichen<sup>1)</sup>; die Bildung von Glycerinphosphorsäure konnte durch Bestimmung des Glycerins in der Bariumfällung der Phosphorsäureverbindungen (nach *v. Bruchhausen*<sup>2)</sup>) bewiesen werden. Durch Erhitzen mit konz. Jodwasserstoffsäure wird Glycerin in Isopropyljodid übergeführt, das nach der *Zeisel*'schen Methoxylmethode destilliert und jodometrisch bestimmt wird. Nach *Meyerhof & Kiessling*<sup>3)</sup> geben Glycerinaldehyd und Glycerinsäure unter diesen Bedingungen kein Isopropyljodid; die Methode ist also soweit spezifisch für das Glycerin und seinen Phosphorsäureester. Die Glycerinphosphorsäure wurde ferner durch Papierchromatographie (Isopropyläther-Ameisensäure) identifiziert. Sie gibt bei Entwicklung des Chromatogramms mit Molybdatreagens und H<sub>2</sub>S (*Hanes & Isherwood*<sup>4)</sup>) eine braungelbe Färbung, welche sie leicht zu erkennen gestattet.

Wir haben einleitend bereits erwähnt, dass nach den Versuchen von *Cori* und Mitarbeitern das Fructose-1-phosphat durch Leberfermente in Hexose-6-phosphat verwandelt werden kann. Diese Reaktion erfolgt auch im fluoridfreien Extrakt und erfordert den Zusatz von Magnesiumionen. Wir haben gefunden, dass Magnesium durch Mangan und Cobalt ersetzt werden kann. Die oben beschriebene Aldolasespaltung des Fructose-1-phosphats verläuft im Gegensatz dazu auch ohne Magnesium. Es stellt sich die Frage nach dem enzymatischen Mechanismus dieser Reaktion.

*Cori* und Mitarbeiter<sup>5)</sup> vermuten eine Mutasereaktion, eine Verschiebung des Phosphatrests analog der Umwandlung von Glucose-1-phosphat durch die Phosphoglucomutase. Die von *Najjar*<sup>6)</sup> kristallisierte Phosphoglucomutase reagiert nicht mit Fructose-1-phosphat. Theoretisch wäre die Bildung des Glucose-6-phosphats auch über Glucose-1-phosphat als Zwischenstufe denkbar, weil das Fermentpräparat Phosphoglucomutase enthält. Wir konnten aber zeigen, dass bei hohen Magnesiumkonzentrationen (0,1-m.), welche die Phosphoglucomutase vollständig hemmen (*Cardini*<sup>7)</sup>), das Fructose-1-phosphat immer noch in das 6-Phosphat übergehen kann. Glucose-1-phosphat kann also nicht Zwischenstufe dieser Reaktion sein.

<sup>1)</sup> *E. Anderson*, Am. **42**, 422 (1909).

<sup>2)</sup> *F. v. Bruchhausen*, Z. Unters. Lebensm. **68**, 32 (1934).

<sup>3)</sup> *O. Meyerhof & W. Kiessling*, Bioch. Z. **264**, 40 (1933).

<sup>4)</sup> *C. S. Hanes & F. A. Isherwood*, Nature **164**, 1107 (1948).

<sup>5)</sup> *G. T. Cori, S. Ochoa, M. W. Slein & C. F. Cori*, Biochem. Biophys. Acta **7**, 304 (1952).

<sup>6)</sup> *V. A. Najjar*, J. Biol. Chem. **175**, 281 (1948).

<sup>7)</sup> *C. E. Cardini*, Enzymologia **15**, 44 (1951).

Neuerdings haben *Hers & Kusaka*<sup>1)</sup> die Frage aufgenommen und sind zu einer gänzlich verschiedenen Auffassung gelangt. Sie haben keinerlei Anhaltspunkte für das Vorkommen einer Mutase gefunden, welche Fructose-1-phosphat direkt in Fructose-6-phosphat überführen würde, und nehmen daher an, dass immer eine Spaltung des Esters in Phosphodioxyaceton und Glycerinaldehyd stattfindet. Das Phosphodioxyaceton liefert bei Gegenwart von Triose-Isomerase Phosphoglycerinaldehyd, der möglicherweise auch durch direkte Phosphorylierung des bei der Spaltung gebildeten Glycerinaldehyds entstehen könnte. Die beiden Phosphotriosen kombinieren sich unter der Wirkung der 1,6-Diphosphofruktaldolase zu Hexosediphosphat, welche durch eine Phosphatase in Stellung 1 dephosphoryliert wird.

Unsere eigenen Versuche stehen mit dieser Theorie in Übereinstimmung. Wir haben die Phosphatase von der 1-Phosphofruktaldolase abtrennen können. Durch Rekombination der beiden Fermente unter Zusatz von Triose-Isomerase und 1,6-Diphosphofruktaldolase und Hexose-Isomerase erhält man ein Enzymsystem, das Fructose-1-phosphat in Hexose-6-phosphat überzuführen imstande ist (siehe unten). Die Annahme einer besonderen Phosphofruktomutase ist also überflüssig. Der endgültige Beweis dafür, dass ein solches Enzym in unseren Lösungen nicht vorhanden ist, kann natürlich erst erbracht werden, wenn die 1-Phosphofruktaldolase und die Phosphatase in völlig reinem Zustand vorliegen.

Eine spezifisch auf Hexosediphosphat eingestellte Phosphatase der Leber ist von *Gomori*<sup>2)</sup> beschrieben worden. Schon früher haben *Tankó & Robison*<sup>3)</sup> die Bildung von Hexosemonophosphaten aus Hexosediphosphat durch die Wirkung der Knochenphosphatase beobachtet. Der Spezifitätsbereich der Leberphosphatase wurde von *Roche & Bouchilloux*<sup>4)</sup> genauer untersucht, während *De Duve* und Mitarbeiter<sup>5)</sup> die Verteilung in der Zelle studiert haben. Es scheint aber, dass noch nie in einwandfreier Weise nachgewiesen worden ist, welcher Fructoseester bei der Hydrolyse in der Leber entsteht. Aus der Tatsache, dass das Ferment Fructose-6-phosphat nicht angreift, hat *Roche* auf die Abspaltung des Phosphatrests in Stellung 1 geschlossen. Wir haben aus unseren Extrakten eine Fraktion erhalten, die keine Aldolase enthält, welche aber Fructose-1,6-diphosphat unter Bildung von Fructose-6-phosphat sehr rasch dephosphoryliert. Das letztere wurde nach Zusatz von Hexose-Isomerase und Zwischenferment optisch nachgewiesen. Dieses Ferment wird am besten als

1) *H. G. Hers & T. Kusaka*, II<sup>e</sup> Congrès international de biochimie, Paris 1952, Résumés des communications, S. 281.

2) *G. Gomori*, *J. Biol. Chem.* **148**, 139 (1943).

3) *B. Tankó & R. Robison*, *Biochem. J.* **29**, 961 (1935).

4) *J. Roche & S. Bouchilloux*, *Bl. Soc. Chim. Biol.* **32**, 739 (1950).

5) *H. G. Hers, J. Berthet, L. Berthet & C. De Duve*, *Bl. Soc. Chim. Biol.* **33**, 21 (1951)

Diphosphofructose-1-phosphatase bezeichnet. Die Phosphatase ist nur in Gegenwart von  $Mg^{++}$  wirksam. Das letztere kann, wie erwähnt, durch  $Mn^{++}$  oder  $Co^{++}$  ersetzt werden. Damit ist, die Gültigkeit des Reaktionsschemas von *Hers & Kusaka* vorausgesetzt, erklärt, warum die Bildung des Hexose-6-phosphats aus Fructose-1-phosphat vom  $Mg^{++}$  abhängig ist.

Durch Fraktionierung des Acetontrockenpulver-Extrakts mit Ammoniumsulfat (pH 7,6) gelingt es, die Phosphatase abzutrennen. Die Phosphatase ist in der Fraktion enthalten, die bei 45 % Sättigung des Extrakts mit Ammoniumsulfat ausfällt. Durch kurzes Erwärmen auf 65° kann man sie praktisch frei von den übrigen Fermenten erhalten. Kombiniert man die beiden gereinigten Fermentlösungen mit Triose-Isomerase und Muskelaldolase, so wird aus Fructose-1-phosphat das 6-Phosphat gebildet (optischer Test mit Hexose-Isomerase, Zwischenferment und T.P.N.). Wir haben nicht genauer untersucht, wieviel Triose-Isomerase und *Meyerhof'sche* Aldolase in der gereinigten 1-Phosphofructaldolase noch vorhanden ist. Diese beiden Enzyme wurden zugesetzt, um sicher zu sein, dass sie nicht den die Reaktionsgeschwindigkeit begrenzenden Faktor darstellen. Es ist also sicher, dass auf dem von *Hers & Kusaka* angegebenen Weg Hexose-6-phosphat entstehen kann. Unsere Aldolaselösung zeigt noch eine schwache Aktivität auch ohne Zusatz der Phosphatase. Da aber die Fermentlösung noch nicht rein ist, beruht dies sehr wahrscheinlich auf einem geringen Gehalt an Phosphatase. Wir sind mit der weiteren Reinigung der Fermente beschäftigt.

Es ist uns nie gelungen, aus Fructose-6-phosphat den 1-Ester zu erhalten. Nach den von *Meyerhof* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> ermittelten Werten für die freie Energie der Hydrolyse der beiden Fructosemonoester sollte die Gleichgewichtskonstante  $k = \text{Fructose-6-phosphat}/\text{Fructose-1-phosphat}$  den Wert von etwa 0,7 haben. Eine vom 6-Ester ausgehende Einstellung des Gleichgewichts müsste also an der Bildung von säurelabilem Phosphat leicht erkennbar sein. Das negative Resultat unserer Versuche spricht gegen die Existenz einer Mutase.

Bei Gegenwart von Adenosintriphosphat ist noch ein anderer Weg für den Übergang des Fructose-1-Esters in den 6-Ester möglich. *Cori* und Mitarbeiter<sup>3)</sup> nehmen an, dass in der Leber ein Ferment vorkommt, welches Fructose-1-phosphat direkt in Stellung 6 zum Hexosediphosphat phosphoryliert und wahrscheinlich von der bekannten 6-Phosphofructokinase verschieden ist. Durch die Wirkung der Diphosphofructose-1-phosphatase kann anschliessend Fructose-

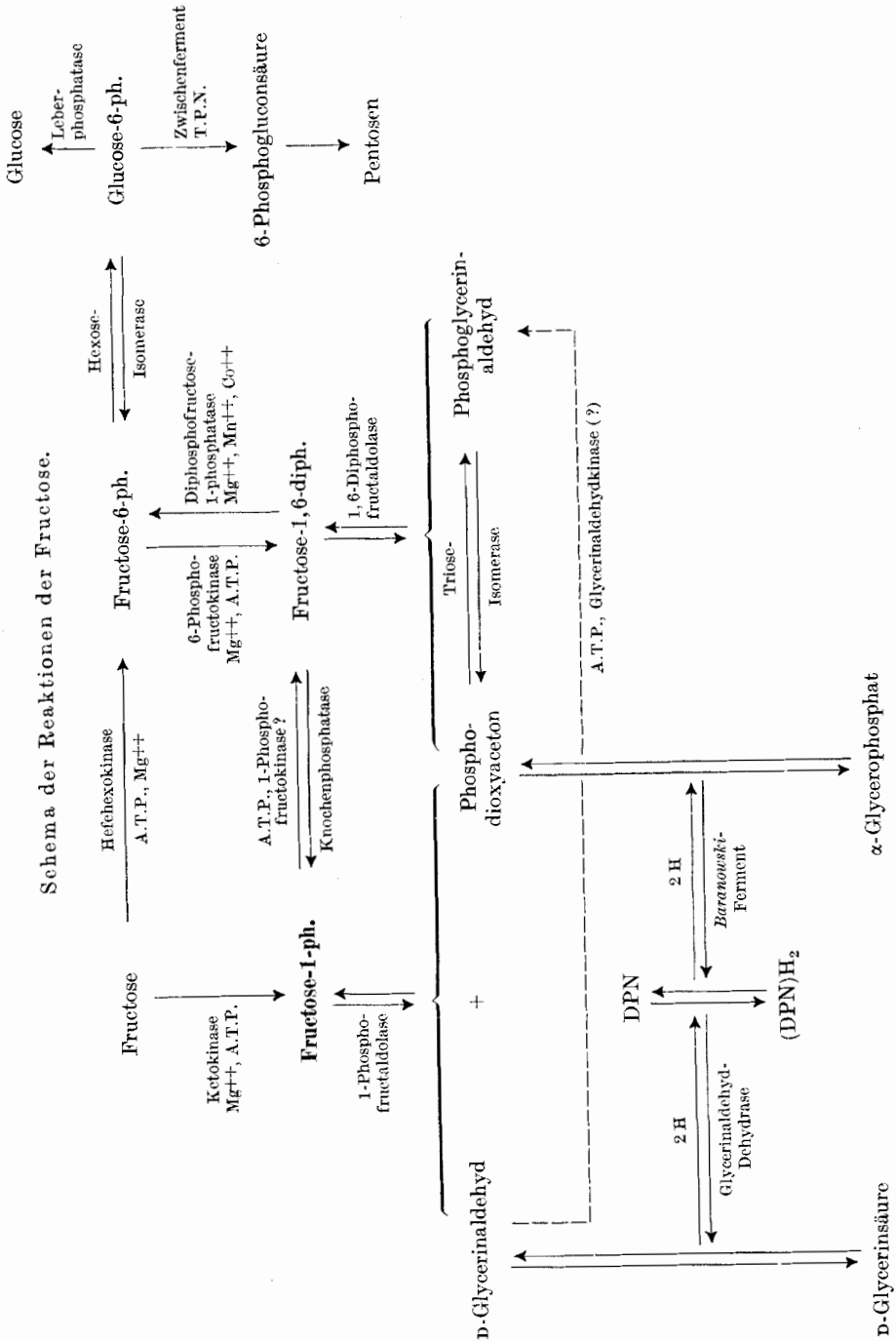
<sup>1)</sup> *O. Meyerhof & H. Green*, J. Biol. Chem. **178**, 655 (1949).

<sup>2)</sup> *O. Meyerhof & P. Oesper*, J. Biol. Chem. **179**, 1371 (1949).

<sup>3)</sup> *M. W. Slein, G. T. Gori & C. F. Cori*, J. Biol. Chem. **186**, 763 (1950).



Schema der Reaktionen der Fructose.



6-phosphat gebildet werden. Diese Reaktion kommt für die beschriebenen Versuche nicht in Frage, weil sie ohne Zusatz von A.T.P. durchgeführt wurden. Er würde aber in der lebenden Zelle den direktesten Weg darstellen, auf dem Fructose-1-phosphat in Fructose-6-phosphat übergehen könnte.

Die bisher bekannten Reaktionen der Fructose sind im vorstehenden Schema (siehe S. 235) zusammengefasst.

## Experimenteller Teil.

### A. Methoden.

1. Herstellung der Enzymlösungen. Alle Operationen wurden bei tiefer Temperatur durchgeführt (Kälteraum, Kältezentrifuge). Als Versuchstier haben wir, wo nichts anderes vermerkt ist, stets die weisse Ratte verwendet.

a) „*Cori-Fraktion*“. Die Tiere werden vor dem Versuch 24 bis 36 Std. auf Hunger gesetzt. Die Lebern werden vom rechten Vorhof aus mit isotonischer KCl-Lösung blutfrei gespült und im Apparat von *Potter & Elvehjem*<sup>1)</sup> mit dem gleichen Volumen isotonischer KCl-Lösung homogenisiert. Das Homogenat wird 15 Min. bei 16000 R.p.M. zentrifugiert und das Überstehende durch Watte filtriert. Hierauf wird mit Ammoniumsulfat von pH 7,8 fraktioniert. Die zwischen 45% und 55% Sättigung ausfallende Fraktion wird in einem möglichst kleinen Volumen 0,02-m. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgelöst und 3 Std. gegen die gleiche Lösung von Hydrogencarbonat dialysiert. Die trübe Lösung lässt sich durch Zentrifugieren (15 Min. bei 16000 R.p.M.) klären und ist mindestens 2 Wochen haltbar.

b) Extrakt aus Acetontrockenpulver. Die Lebern werden wie oben behandelt und nach Kühlung auf Eis mit 10 Vol. frisch destilliertem, kaltem Aceton  $\frac{1}{2}$  Min. im „Turmix“ zerkleinert. Die Suspension wird filtriert, der Rückstand auf der Nutsche nochmals mit Aceton behandelt und weitgehend trocken gesaugt. Zum vollständigen Verdunsten des Acetons wird das Pulver auf Filtrierpapier ausgebreitet und beständig umgerührt. Aufbewahren im Vakuumexsikkator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. 3 g Trockenpulver werden mit 15 cm<sup>3</sup> bidestilliertem Wasser und 5 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer (0,1-m.) vom pH 7,4 während 10 Min. unter ständigem Rühren bei 0° extrahiert. Nach Zentrifugieren (15 Min. bei 16000 R.p.M.) wird das Überstehende 5 Std. („kurz dialysierter Extrakt“) oder 24 Std. („lang dialysierter Extrakt“) gegen bidestilliertes Wasser unter Rühren dialysiert. Die Extrakte sind nicht lange haltbar.

Bei verschiedenen Versuchen wurde der Extrakt einer Fraktionierung durch Ammoniumsulfat unterworfen. Die Herstellung der Fraktionen wird bei Besprechung der einzelnen Versuche beschrieben.

2. Herstellung der Lösungen von Fructose-1-phosphat. Der Ester wurde nach der früher beschriebenen Methode synthetisch dargestellt<sup>2)</sup> und als Bariumsalz der Dipropylidenverbindung aufbewahrt. Aus dem letzteren wurde das Barium durch Behandeln mit H<sup>+</sup>-aktiviertem Kationenaustauscher (Ionac C 240) entfernt und das Aceton durch Kochen mit Wasser abgespalten. Es geht dabei etwas Substanz verloren. Ausserdem enthalten unsere Präparate wechselnde Mengen von BaCO<sub>3</sub> als Verunreinigung. Der exakte Gehalt der Lösungen ergibt sich aus dem säurelabilen Phosphat (Hydrolyse in 1-n. HCl während 15 Min. im siedenden Wasserbad). Die Lösungen wurden stets mit NaOH auf das gewünschte pH des Versuchsansatzes gebracht.

Es sei hier noch eine Präzisierung unserer Methode zur Hydrolyse der Diacetonverbindung beigefügt. In unserer ersten Veröffentlichung haben wir als Hydrolysezeit 35 Min. vorgeschlagen. Die genauere Untersuchung zeigt, dass unter diesen Bedingungen

<sup>1)</sup> *R. Van Potter & A. Elvehjem*, J. Biol. Chem. **114**, 195 (1936).

<sup>2)</sup> *F. Leuthardt & E. Testa*, Helv. **34**, 931 (1951).

die Spaltung der Diacetonverbindung nicht vollständig ist. Doch wird die nicht hydrolysierte Acetonverbindung bei der mehrfachen Umfällung des Ba-Salzes entfernt. Wird dasselbe nicht umgefällt, so muss man länger hydrolysieren, wobei allerdings ein Teil des Phosphats abgespalten wird. Der Verlauf der Acetonspaltung ist aus Tab. 1 ersichtlich (Acetonbestimmung nach *Shaffer & Marriot*<sup>1)</sup>).

Tabelle 1.

Hydrolysezeit (Min.):	15	30	45	60
Nicht hydrolysierte Diacetonverbindung . . . . .	67,5%	30,6%	12%	4,6%

3. Analytische Methoden. Das Phosphat wurde nach der Methode von *Berenblum* und *Chain*<sup>2)</sup> bestimmt. Die Bestimmung des Glycerins erfolgt nach der Methode von *v. Bruchhausen*<sup>3)</sup>.

Bei verschiedenen Versuchsanordnungen wurde zur Verfolgung der Fermentwirkungen der optische Test von *Warburg* verwendet, der darauf beruht, dass die reduzierten Pyridincofermente bei 340  $\mu$  eine starke Absorptionsbande aufweisen, die beim oxydierten Ferment nicht vorhanden ist. Die Durchführung des optischen Tests wird bei Besprechung der einzelnen Versuche beschrieben. Für die optischen Tests wurden folgende Fermente verwendet: kristallisierte Muskeldolase, kristallisierte Glycerinphosphorsäuredehydrase (*Baranowski*-Ferment), kristallisierte Triose-Isomerase. Diese Fermente, welche vollkommen rein waren, wurden uns von Dr. *Th. Bücher*, Hamburg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

*Warburg*'sches Zwischenferment (Glucose-6-phosphat-Dehydrase) wurde nach *LePage*<sup>4)</sup> dargestellt. Als Hexose-Isomerase diente eine Proteinfraction aus Kaninchenmuskel. Der zerkleinerte Muskel wurde zweimal mit dem gleichen Volumen kalter 0,02-m. KOH-Lösung extrahiert. Aus dem Extrakt wurde mit gesättigtem Ammoniumsulfat bei pH 7,8 die Fraktion zwischen 45% und 55% Sättigung abgetrennt, in destilliertem Wasser aufgenommen und 4 Std. gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wurde bei  $-16^{\circ}$  im gefrorenen Zustand aufbewahrt. Nach *Slein*<sup>5)</sup> enthält diese Fraktion auch die Phosphomannose-Isomerase.

Die Alkoholdehydrogenase wurde teils von *A.B. Astra*, Södertälje (Schweden), bezogen, teils haben wir Präparate benützt, die uns von Herrn Dr. *K. Wallenjels*, Tutzing, zur Verfügung gestellt wurden.

## B. Ergebnisse.

1. Stabilisierung des Phosphats. a) *Einfluss der Cozymase*. Der folgende Versuch zeigt, dass bei Inkubation von Fructose-1-phosphat mit Extrakt aus Aceton-trockenpulver ein stabiler Ester entsteht und dass dazu Cozymase nötig ist (siehe Tab. 2)

Versuchsansatz: 0,5  $\text{cm}^3$  Fructose-1-phosphat (aus 10 mg Ba-Salz in 3  $\text{cm}^3$ ), 0,5  $\text{cm}^3$  Veronalpuffer (pH 7,4), fluoridhaltig (9 Vol. 0,1-m. Veronalpuffer + 1 Vol. 1,8-m. NaF), 0,5  $\text{cm}^3$  Wasser, 1  $\text{cm}^3$  Fermentlösung (Extrakt aus Aceton-trockenpulver). Inkubation 15 Min. bei  $38^{\circ}$ , Entweissung durch 1  $\text{cm}^3$  30-proz. Trichloressigsäure. Wegen der raschen Fermentwirkung wurde zur Bestimmung der Phosphatfraktionen bei Versuchsbeginn die Trichloressigsäure vor dem Substrat zugesetzt.

<sup>1)</sup> Vgl. *P. B. Hawk, B. L. Oser & W. M. Summerson*, Practical physiological Chemistry. Philadelphia 1937, S. 873.

<sup>2)</sup> *J. Berenblum & E. Chain*, Biochem. J. **32**, 295 (1938).

<sup>3)</sup> *F. v. Bruchhausen*, Z. Unters. Lebensm. **68**, 32 (1934).

<sup>4)</sup> *G. A. LePage & G. C. Müller*, J. Biol. Chem. **180**, 975 (1949).

<sup>5)</sup> *M. W. Slein*, J. Biol. Chem. **186**, 753 (1951).

**Tabelle 2.**  
Phosphatbilanz.

Als labiles Phosphat wird die Fraktion bezeichnet, die nach 15 Min. Hydrolyse in 1-n. HCl im kochenden Wasserbad abgespalten wird. Die Menge des in stabile Bindung übergegangenen Phosphats ergibt sich als Differenz der Kolonnen b und d, das zu Beginn vorhandene labile Phosphat (zugesetztes Fructose-1-phosphat) als Differenz der Kolonnen b und a. In Kolonne f ist die Stabilisierung angegeben in % des zu Beginn vorhandenen labilen Phosphats:  $100 e/(b-a)$ . Eine kleine Menge Phosphat wird während der Inkubation als anorganisches Phosphat abgespalten (c-a). Die angegebenen Prozentzahlen für die Stabilisierung stellen einen Minimalwert dar, weil im Extrakt eine kleine Menge labiler Phosphatester vorhanden ist, die mitbestimmt werden (vgl. Fig. 1).

Enzymlösung		vor Inkubation		nach Inkubation		stabilisiert	
		anorg. P	lab. P + anorg. P	anorg. P	lab. P + anorg. P		
		$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$	%
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
I	kurz dialysierter Extrakt	44	160	59	100	60	52
II	lang dialysierter Extrakt	17	112	49	111	1	0
III	lang dialysierter Extrakt + 130 $\gamma$ Cozymase . .	17	125	21	63	62	58
IV	lang dialysierter Extrakt + 150 $\gamma$ hydr. Cozymase	73	432*	102	237	195	54

\* Die Menge des zugesetzten Fructose-1-phosphats ist in Versuch IV grösser als in den übrigen.

Um eine maximale Reaktivierung zu erhalten, waren pro Ansatz ca. 120  $\gamma$  Cozymase nötig. Wir haben ein Handelspräparat (*Schwarz*, New York) benützt, das nach *Neilands & Åkeson*<sup>1)</sup> an einer Säule von Dowex 2 chromatographiert wurde. Reinheit 80% (optisch mit Alkoholdehydrogenase bestimmt). Die Cozymase (ebenso das Triphosphopyridin-nucleotid) wird im Extrakt rasch abgebaut. Nach 15 Min. Inkubation fanden wir nur noch wenige Procente der zugesetzten Menge. Dies erklärt die relativ hohe Konzentration, die zur Aktivierung des lange dialysierten Extrakts nötig ist.

Der für die Stabilisierung des Phosphats verantwortliche Faktor wird durch die Dialyse entfernt; er kann im Dialysat nachgewiesen werden: Die Lebern von drei Ratten wurden mit dem gleichen Volumen Wasser homogenisiert, 3 Min. gekocht; dann wurde der Brei 60 Std. gegen vier Portionen von 200 cm<sup>3</sup> Wasser dialysiert. Die vereinigten Dialysate wurden auf 20 cm<sup>3</sup> eingeengt. 0,5 cm<sup>3</sup> dieser Lösungen genügten für die völlige Reaktivierung des lang dialysierten Extrakts. Folgende Substanzen wurden auf ihre Wirksamkeit geprüft und erwiesen sich in den angegebenen Mengen als inaktiv: 150  $\gamma$  Hefeadenylsäure, 250  $\gamma$  Muskeladenylsäure, 250  $\gamma$  A.D.P., 250  $\gamma$  A.T.P., 300  $\gamma$  eines Rohprodukts von Uridindiphosphoglucose aus Hefe (Coferment des Enzyms, welches Galactose-1-phosphat in Glucose-1-phosphat umwandelt (*Caputto* und Mitarbeiter<sup>2)</sup>), 150  $\gamma$  Nicotinsäureamidmononucleotid (*Kornberg*<sup>3)</sup>), 10  $\gamma$  Riboflavinphosphat, 10  $\gamma$  Glucose-1,6-diphosphat (Coferment der Phosphoglucomutase) (*Cardini* und Mitarbeiter<sup>4)</sup>), 10  $\gamma$

<sup>1)</sup> *J. B. Neilands & Å. Åkeson*, J. Biol. Chem. **188**, 307 (1951).

<sup>2)</sup> *R. Caputto, L. F. Leloir, C. E. Cardini & A. C. Paladini*, J. Biol. Chem. **184**, 333 (1950).

<sup>3)</sup> *A. Kornberg*, J. Biol. Chem. **182**, 779 (1950).

<sup>4)</sup> *C. E. Cardini, A. C. Paladini, R. Caputto, L. F. Leloir & R. E. Trucco*, Arch. Biochem. **22**, 87 (1949).

Fructose-1,6-diphosphat. Auch die nach Carter<sup>1)</sup> photochemisch abgebaute Cozymase besitzt keine Wirkung. Wir nehmen an, dass die im Dialysat enthaltene aktive Substanz mit der Cozymase identisch ist.

b) *Versuche in Gegenwart von Hydrazin.* Bei Gegenwart von Hydrazin lässt sich auch ohne Zusatz von Cozymase die Bildung von säurestabilem Phosphat nachweisen.

Versuchsansätze: 0,4 cm<sup>3</sup> Fructose-1-phosphat (entsprechend 20 mg Ba-Salz in 7 cm<sup>3</sup>), 0,25 cm<sup>3</sup> Hydrazin (0,56-m., aus Sulfat durch Neutralisation mit NaOH hergestellt), 1,0 cm<sup>3</sup> Enzym (lang dialysierter Extrakt), 0,5 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer 0,1-m. (pH 7,4). Mit Wasser ad 3,4 cm<sup>3</sup>. Inkubation 15 Min. bei 38°, Enteiweissung mit 2 cm<sup>3</sup> 20-proz. Trichloressigsäure. Bei der Bestimmung der Phosphatfraktionen zu Versuchsbeginn wurde die Trichloressigsäure vor dem Substrat zugesetzt. (Siehe Tab. 3.)

**Tabelle 3.**

Phosphatbilanz bei Gegenwart von Hydrazin. (Erklärung siehe Tab. 2.)

	vor Inkubation		nach Inkubation		Stabilisierung	
	anorg. P	lab. P + anorg. P	anorg. P	lab. P + anorg. P		
	μMol	μMol	μMol	μMol	μMol	%
Ohne Substrat . . . . .	0,6	0,7	0,54	0,75	0	
Mit Fructose-1-phosphat und Hydrazin . . . . .	0,75	3,55	0,75	2,50	1,05	37
Mit Fructose-1-phosphat ohne Hydrazin . . . . .	0,47	3,62	0,60	3,97	0	

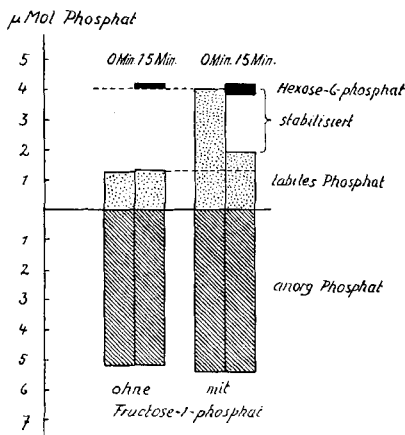


Fig. 1.

Phosphatbilanz.

*Ansatz:* Siehe unter b). Die Ansätze enthalten kein Hydrazin.

Schraffiert: Anorganisches Phosphat; punktiert: labiles Phosphat (nach 15 Min. Hydrolyse in 1-n.HCl); schwarz: Hexose-6-phosphat, optisch als Glucose-6-phosphat bestimmt.

<sup>1)</sup> C. E. Carter, Am. Soc. **72**, 1466 (1950).

<sup>2)</sup> C. E. Carter, Am. Soc. **72**, 1835 (1950).

c) *Nachweis, dass der stabile Ester nicht Hexose-6-phosphat ist.* Wenn aus Fructose-1-phosphat Hexose-6-phosphat entsteht, so kann dieses bei Gegenwart von Hexose-Isomerase, Warburg'schem Zwischenferment und Triphosphopyridinnucleotid (T.P.N.) optisch bestimmt werden, indem man die Zunahme der Absorption bei 340 m $\mu$  misst. Wir haben nach dieser Methode gleichzeitig mit der Stabilisierung des Phosphats das Hexose-6-phosphat bestimmt. Die Lösungen wurden für den optischen Test durch Perchlorsäure deproteinisiert; die letztere wurde aus dem Filtrat durch Kalilauge quantitativ entfernt. Extinktionskoeffizient des reduzierten T.P.N.  $E = 6,22 \text{ cm}^2/\gamma \text{ Mol}$ . Herstellung des Zwischenferments nach LePage<sup>1</sup>). Zusatz von Hexose-Isomerase ist nicht nötig, da die Enzymlösung dieses Ferment enthält. Fig. 1 zeigt die Phosphatbilanz. Man erkennt, dass nur ein sehr kleiner Teil des in stabile Bindung überangegangenen Phosphats (etwa 9%) auf Hexose-6-phosphat entfällt.

2. Nachweis der Aldolspaltung von Fructose-1-phosphat. a) *Optischer Nachweis der Bildung von Phosphodioxyaceton.* Diese Verbindung lässt sich bei Gegenwart von reduzierter Cozymase und Baranowski-Ferment optisch durch die Abnahme der Absorption bei 340 m $\mu$  nachweisen. Die Reaktion wird bei Zimmertemperatur direkt in der Quarzküvette des Photometers durchgeführt. Ein Versuch ist in Fig. 2a und 2b dargestellt.

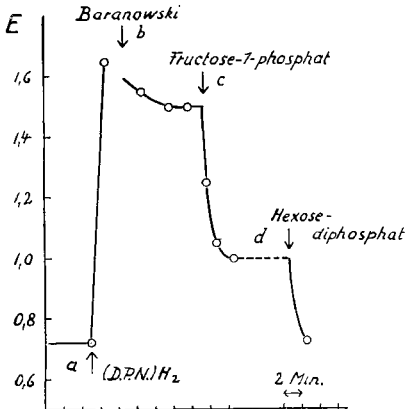


Fig. 2a.

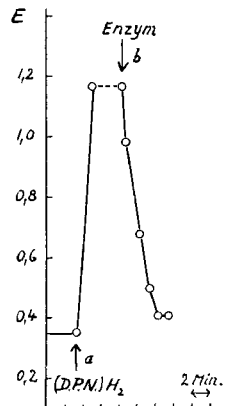


Fig. 2b.

#### Bildung von Phosphodioxyaceton.

2a) Mit *Acetonrockenpulverextrakt*, 24 Std. dialysiert. Der Ansatz enthält 1,5 cm<sup>3</sup> Hydrogencarbonatpuffer pH 7,4 (4,2 g NaHCO<sub>3</sub> + 0,25 g Trilon B in 250 cm<sup>3</sup> Wasser, mit CO<sub>2</sub> bis pH 7,4 gesättigt), 0,6 cm<sup>3</sup> Extrakt. Beim Pfeil a werden 0,3 cm<sup>3</sup> (D.P.N.)H<sub>2</sub> zugesetzt, bei b 0,03 cm<sup>3</sup> *Baranowski*-Ferment. Die Reaktion wird bei c durch Zusatz von 0,4 cm<sup>3</sup> Fructose-1-phosphat (aus 20 mg Ba-Salz in 2 cm<sup>3</sup>) ausgelöst. Die Kurve ist nicht für die daraus resultierende Verdünnung korrigiert. Bei d werden zur Kontrolle 0,03 cm<sup>3</sup> 1,6-Diphosphofructaldolase + 0,4 cm<sup>3</sup> Hexosediphosphat zugesetzt.

2b) Mit *Cori-Fraktion*. Der Ansatz enthält 1,5 cm<sup>3</sup> Hydrogencarbonatpuffer pH 7,4, 1,2 cm<sup>3</sup> Wasser, 0,4 cm<sup>3</sup> Fructose-1-phosphat, 0,03 cm<sup>3</sup> Triose-Isomerase, 0,03 cm<sup>3</sup> 1,6-Diphosphofructaldolase. Beim Pfeil a werden 0,2 cm<sup>3</sup> (D.P.N.)H<sub>2</sub> zugesetzt. Die Reaktion wird bei b durch Zusatz von 0,4 cm<sup>3</sup> *Cori*-Fraktion ausgelöst. Die Kurve ist für die Verdünnung korrigiert.

b) *Abfangen der Triosen durch Hydrazin.* Versuchsansatz: 0,5 cm<sup>3</sup> Fructose-1-phosphat (Na-Salz, aus 10 mg Ba-Salz pro cm<sup>3</sup> Lösung), 1 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer (pH 7,4), fluoridhaltig (siehe unter 1a), 0,25 cm<sup>3</sup> Hydrazin (0,56-m., aus Sulfat durch Neutralisation mit

<sup>1</sup>) G. A. LePage & G. C. Müller, J. Biol. Chem. **180**, 975 (1949).

NaOH auf pH 7,4), 1 cm<sup>3</sup> Extrakt aus Acetontrockenpulver, 24 Std. dialysiert, oder 1 cm<sup>3</sup> *Cori*-Fraktion. Inkubation 15 Min. bei 38°. Enteiweissung mit 2 cm<sup>3</sup> Trichloressigsäure 20-proz. 1 cm<sup>3</sup> der enteweissten Lösung wird zur Hydrolyse des alkalilabilen Triosephosphats 10 Min. mit 1 cm<sup>3</sup> 0,75-n. NaOH bei Zimmertemperatur stengelassen, dann mit 1 cm<sup>3</sup> einer sauren Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (1-proz. in 2-n. HCl) versetzt, 10 Min. bei 38° inkubiert und die Lösung mit 0,75-n. NaOH auf 10 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Die Extinktion wird nach 10 Min. bei 540 m $\mu$  im *Beckman*-Photometer gemessen. Sie gibt ein approximatives Mass für die Menge der gebildeten Triosen. (Siehe Tab. 4.)

**Tabelle 4.**

Nachweis der in Gegenwart von Hydrazin gebildeten Triosen durch die Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Ansätze	Rohextrakt E =	<i>Cori</i> -Fraktion E =
Fructose-1-phosphat + Hydrazin . . . . .	1,36	1,70
Fructose-1-phosphat ohne Hydrazin . . . . .	0,185	0,049
Ohne Substrat + Hydrazin . . . . .	0,145	0,127

Der gleiche Versuch wurde mit einer grösseren Menge Fructose-1-phosphat (entsprechend 70 mg Ba-Salz) wiederholt. Nach Behandlung des Trichloressigsäurefiltrats mit Dinitrophenylhydrazin, wie oben angegeben, wurde eingeeengt; dabei bildet sich, wie von *Sibley & Lehninger* beschrieben worden ist, eine orange Fällung, welche mit Magnesia-mixtur eine Blaufärbung und mit alkoholischer KOH eine purpurne Farbe ergibt. Diese Reaktionen sollen für die Triosen charakteristisch sein.

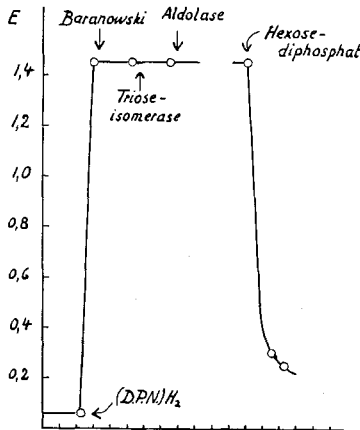


Fig. 3.

Prüfung der Aktivität von 1,6-Diphosphofructaldolase gegen Fructose-1-phosphat. *Versuchsansatz* siehe Text. Ordinate: Extinktion; Abszisse: Zeit. Die Pfeile geben den Zusatz der angeschriebenen Substanzen an. Es bedeutet (D.P.N.)<sub>2</sub>: hydrierte Cozymase, *Baranowski*: Glycerinphosphorsäuredehydrase; *Aldolase*: kristallisierte Muskelaldolase (1,6-Diphosphofructaldolase).

c) *Spezifität der 1-Phosphofructaldolase*. Wenn man zu Fructose-1-phosphat kristallisierte Muskelaldolase und *Baranowski*-Ferment zusetzt, so wird hydrierte Cozymase auch nach längerem Stehen nicht dehydriert. Es entsteht also kein Phosphodioxyaceton. Unter den gleichen Bedingungen führt, wie oben beschrieben wurde, Zusatz unserer Fermentlösungen aus Leber zu einer raschen Reaktion.

Versuchsansatz: Hydrogencarbonatpuffer pH 7,4 (siehe Legende Fig. 2), 0,8 cm<sup>3</sup> Wasser, 0,4 cm<sup>3</sup> Fructose-1-phosphat (aus 10 mg Ba-Salz pro cm<sup>3</sup>), 0,2 cm<sup>3</sup> hydrierte Cozymase. Nach Einstellung eines konstanten Wertes der Extinktion Zusatz von 0,03 cm<sup>3</sup> *Baranowski*-Ferment, 0,05 cm<sup>3</sup> Triose-Isomerase und schliesslich 0,05 cm<sup>3</sup> Muskelaldolase. Die Extinktion bleibt während einer Beobachtungszeit bis zu 30 Min. praktisch konstant. Zur Kontrolle des Tests wird zum Schluss Hexosediphosphat zugesetzt: rasche Bildung von Phosphodioxyaceton, kenntlich an der Dehydrierung der reduzierten Cozymase. (Vgl. Fig. 3.)

Der optische Test wurde immer bei Zimmertemperatur ausgeführt. Inkubiert man Fructose-1-phosphat mit kristallisierter Muskelaldolase bei 38° in Gegenwart von Hydrazin, so ergibt sich nach der Methode von *Sibley & Lehninger*<sup>1)</sup> mit Dinitrophenylhydrazin eine Färbung, welche auf die Entstehung von Triosen hindeutet (Fructose-1-phosphat und Fructose reagieren nicht). Die Färbung ist bedeutend schwächer als in den oben beschriebenen Versuchen mit 1-Phosphofructaldolase. Eine schwache Reaktion tritt auch bei Zimmertemperatur ein. Tab. 5 zeigt einen derartigen Versuch.

**Tabelle 5.**

Bildung von „Triosen“ nach Inkubation  
mit kristallisierter Aldolase, gemessen nach *Sibley & Lehninger*.

Ansätze	Extinktion E der alkalischen Lösung der Dinitrophenylhydrazone nach Inkubation	
	40 Min. bei Zimmertemp. (18–20°)	15 Min. bei 38°
	E =	E =
Vollständiger Ansatz . . . . .	0,14	0,27
Ohne Hydrazin . . . . .	0,14	0,29
Ohne Fructose-1-phosphat . . .	0,04	0,04
Ohne Enzym und Hydrazin . . .	0,05	0,04
Mit <i>Cori</i> -Fraktion statt kristallisi- erter Aldolase . . . . .	0,15	0,61

Vollständiger Versuchsansatz: 1,0 cm<sup>3</sup> Hydrogencarbonatpuffer pH 7,4 (siehe oben), 0,4 cm<sup>3</sup> Fructose-1-phosphat (aus 10 mg Ba-Salz/cm<sup>3</sup>), 0,25 cm<sup>3</sup> Hydrazin (0,56-m.), 0,03 cm<sup>3</sup> 1,6-Diphosphofructaldolase, 0,3 cm<sup>3</sup> Wasser. 40 Min. bei Zimmertemperatur oder 15 Min. bei 38° inkubiert. Enteiweisst mit Trichloressigsäure. In den Kontrollversuchen wurde der fehlende Bestandteil nach der Enteiweissung nachträglich zugesetzt, um die Bestimmung stets unter gleichen Bedingungen durchzuführen.

Da der optische Test mit 1,6-Diphosphofructaldolase bei Zimmertemperatur ein völlig negatives Resultat ergibt und da man ohne Hydrazin keine Stabilisierung von Phosphat findet, ist es fraglich, ob die Farbreaktion, die man mit Dinitrophenylhydrazin sogar ohne Hydrazinzusatz erhält, durch die Bildung von Triosen erklärt werden darf. Diese Resultate bedürfen weiterer Abklärung.

Die Fermentlösungen aus Leber sind im optischen Test völlig inaktiv gegen die übrigen Hexosephosphate: Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat und Glucose-1-phosphat. Wir verzichten auf die detaillierte Wiedergabe dieser Versuche.

<sup>1)</sup> *J. A. Sibley & A. Lehninger*, *J. Biol. Chem.* **177**, 859 (1949).



d) *pH-Abhängigkeit der 1-Phosphofruktaldolase*. Gemessen an der Stabilisierung des Phosphats bei Gegenwart von Cozymase ist das Ferment unterhalb pH 6,4 wenig wirksam. (Versuchsbedingungen siehe unter 1a.) Zwischen pH 6,7 und 7,8 ist kaum eine Änderung der Aktivität festzustellen. Zu diesen Versuchen wurde der kurz dialysierte Extrakt aus Acetonrockenpulver benützt.

3. Isolierung der Dismutationsprodukte. Um den bei Gegenwart von Cozymase entstehenden stabilen Ester zu fassen, wurde eine etwas grössere Menge Fructose-1-phosphat eingesetzt. 10 g Acetonrockenpulver wurden, wie oben angegeben, mit Veronalpuffer extrahiert und der Extrakt 5 Std. dialysiert. Der Extrakt (30 cm<sup>3</sup>) wurde mit 25 cm<sup>3</sup> einer Lösung von Na-Fructose-1-phosphat (aus 400 mg Ba-Salz bereitet) und mit 15 cm<sup>3</sup> fluoridhaltigem Veronalpuffer pH 7,4 versetzt. Das Gemisch wurde 40 Min. bei 38° inkubiert und nach Abkühlen auf 0° mit 30 cm<sup>3</sup> 30-proz. Trichloressigsäure gefällt. Abzentrifugieren der Proteine nach 1stündigem Stehen. Der Niederschlag wurde zweimal mit wenig Wasser nachgewaschen, die vereinigten Lösungen mit 10-proz. NaOH auf pH 8,5 gebracht, mit 5 cm<sup>3</sup> 2-m. Ba-Acetat, und nach 30 Min., mit 250 cm<sup>3</sup> Aceton versetzt. Nach 2-tägigem Stehen Abzentrifugieren der Ba-Salze, die dreimal mit Aceton, einmal mit Aceton-Äther (1 : 1) und schliesslich mit Äther gewaschen wurden. Im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Gewicht der Rohbariumfällung 995 mg. Die Fällung wurde mit dem optischen Test auf Hexose-6-phosphat geprüft; Resultat negativ. Auch 3-Phosphoglycerinsäure konnte mit der polarimetrischen Methode von Meyerhof & Schulz<sup>1)</sup> nicht nachgewiesen werden.

a) *Isolierung der Glycerinsäure*. 400 mg der Rohbariumfällung wurden in 4 cm<sup>3</sup> Wasser und 2 cm<sup>3</sup> 2-n. HCl gelöst, die Lösung mit 0,5 cm<sup>3</sup> gesättigtem Ammoniumsulfat versetzt, das Ba-Sulfat auszentrifugiert und mit 0,5 cm<sup>3</sup> Wasser nachgewaschen. Aus der mit 12 Tropfen konz. NH<sub>3</sub> versetzten Lösung wurde das anorganische Phosphat mit Magnesiummixtur gefällt. Die Lösung wurde mit Eisessig auf pH 6, dann mit 5-n. Salpetersäure auf pH 4 gebracht und mit 1 cm<sup>3</sup> 30-proz. Bleiacetat versetzt. Niederschlag auszentrifugiert, verworfen; Überstehendes mit NaOH so stark alkalisch gemacht, dass das Bleihydroxyd in Lösung geht; der verbleibende Niederschlag verworfen. Die Lösung mit 5-n. HNO<sub>3</sub> auf pH 7 gebracht, nach 2 Std. das ausgefällte Bleisalz abgetrennt, in 2 cm<sup>3</sup> Wasser suspendiert und mit H<sub>2</sub>S zerlegt. Nach Durchlüften mit 2-n. NaOH auf pH 8,5 gebracht und mit 0,7 cm<sup>3</sup> 50-proz. Ba-Acetat und 3 Vol. Alkohol versetzt. Das Ba-Salz wurde in das Chininsalz verwandelt, indem es in 0,5 cm<sup>3</sup> Wasser suspendiert und mit 40 mg Chininsulfat, gelöst in heissem Wasser, versetzt wurde. Die Suspension wird erhitzt und heiss zentrifugiert. Aus der überstehenden Lösung kristallisiert das Chininsalz der Glycerinsäure in Büscheln von weissen Nadeln. Mehrfaches Umkristallisieren aus heissem Wasser. Über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum getrocknet. Smp. (Kofler-Block) 187—187,5°. Misch-Smp. mit dem nach Anderson<sup>2)</sup> dargestellten Chininsalz der D-Glycerinsäure (Smp. 187—187,5°) keine Depression.

*Optische Drehung*: 3,32 mg in 0,6025 g Wasser + 0,100 g Alkohol gelöst. 1 cm<sup>3</sup> (= 0,977 g) Lösung enthält 4,62 mg. Drehung im 0,5 dm-Rohr  $\alpha = -0,303^{\circ}$  (Mittel aus 6 Ablesungen),  $\alpha_D = -123^{\circ}$  (nach Anderson 127°).

3,041 mg Subst. gaben 0,176 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (23°, 722 mm Hg);

4,290 mg Subst. gaben 9,786 mg CO<sub>2</sub> und 2,549 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, H<sub>2</sub>O Ber. C 61,80 H 7,16 N 6,27%

Gef. „ 62,25 „ 6,65 „ 6,34%

b) *Nachweis der  $\alpha$ -Glycerinphosphorsäure*. Glycerin gibt beim Erhitzen mit konz. Jodwasserstoffsäure Isopropyljodid, das nach der Zeisel'schen Methoxybestimmung destilliert und jodometrisch bestimmt werden kann (v. Bruchhausen<sup>3)</sup>). Meyerhof & Kiessling<sup>4)</sup> haben diese Methode verwendet und festgestellt, dass weder Glycerinaldehyd

<sup>1)</sup> O. Meyerhof & W. Schulz, Biochem. Z. **297**, 60 (1938).

<sup>2)</sup> E. Anderson, Am. **42**, 422 (1909).

<sup>3)</sup> F. v. Bruchhausen, Z. Unters. Lebensm. **68**, 32 (1934).

<sup>4)</sup> O. Meyerhof & W. Kiessling, Bioch. Z. **264**, 40 (1933).

noch Glycerinsäure noch Phosphoglycerinsäure reagieren. Insofern keine anderen Verbindungen vorhanden sind, die flüchtige Jodide ergeben, ist die Methode für Glycerin und Glycerinsphosphat spezifisch.

Die Rohbariumfällung wurde wie oben beschrieben durch Magnesiummischung vom anorganischen Phosphat befreit und die Bariumsalze erneut mit Ba-Acetat und Aceton gefällt. Das Glycerinphosphat ist in dieser Fällung vorhanden, die getrocknet wurde. Einwaage 15,11 mg. Verbrauch: 1,52 cm<sup>3</sup> n/30 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Leerwert 0,09 cm<sup>3</sup>, daraus Ba-Glycerinphosphat (C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>PBa) 2,46 mg entsprechend 16,3% der Einwaage. Wahrscheinlich wird das Glycerophosphat während der Inkubation z. T. durch Phosphatasewirkung hydrolysiert; ein Teil bleibt bei der ersten Ba-Fällung in Lösung, so dass der Niederschlag vorwiegend das Ba-Salz der Glycerinsäure enthält.

Das Glycerinphosphat lässt sich auch papierchromatographisch nach *Hanes & Isherwood*<sup>1)</sup> nachweisen. Lösungsmittel: Isopropyläther (frisch destilliert) + 90-proz. Ameisensäure im Verhältnis 3:2. Zur Entwicklung wird mit Molybdatreagens besprüht (5 cm<sup>3</sup> 60-proz. Perchlorsäure, 10 cm<sup>3</sup> 1-n. HCl, 25 cm<sup>3</sup> 4-proz. Ammoniummolybdat, mit Wasser ad 100 cm<sup>3</sup>), zur Hydrolyse der Phosphate 10 Min. im strömenden Wasserdampf erhitzt und dann mit H<sub>2</sub>S behandelt. Bei der Reduktion mit H<sub>2</sub>S liefert die Glycerinphosphorsäure keinen blauen, sondern einen gelbbraunen Fleck. Die Lösungen wurden vor dem Auftragen durch H<sup>+</sup>-aktivierte Kationenaustauscher vom Ba befreit (vgl. Fig. 4).

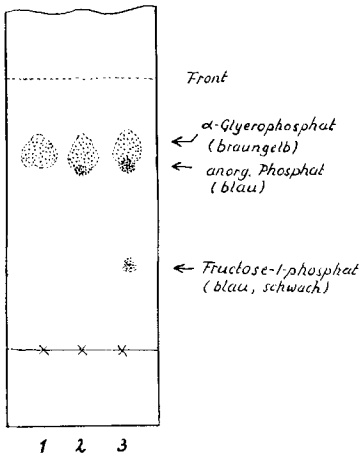


Fig. 4.

Papierchromatographie der Glycerinphosphorsäure.

Chromatogramm 1: α-Glycerinphosphorsäure (Vergleichssubstanz); 3: Ba-Fällung aus Versuchsansatz; 2: dasselbe + Vergleichssubstanz.

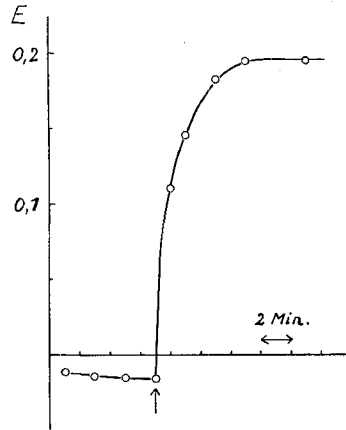


Fig. 5.

Nachweis der Glycerinaldehyd-Dehydrase.

Ordinate: Extinktion; Abszisse: Zeit. Beim Pfeil wird DL-Glycerinaldehyd zugefügt.

4. Nachweis der für die Dismutation zwischen Glycerinaldehyd und Phosphodioxyaceton verantwortlichen Enzyme und der Triose-Isomerase. a) *Glycerinaldehyd-Dehydrase*. Dieses Ferment gibt sich durch die Reduktion der Cozymase bei Gegenwart von Glycerinaldehyd zu erkennen; es kann also durch einen optischen Test nachgewiesen werden.

Versuchsansatz: 0,5 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer pH 7,4 (fluoridhaltig), 1,5 cm<sup>3</sup> Wasser, 0,6 cm<sup>3</sup> lang dialysierter Extrakt, 0,2 cm<sup>3</sup> Cozymase (entspr. 2 mg). Die Reaktion wird durch Zusatz von 10 μMol DL-Glycerinaldehyd ausgelöst (siehe Fig. 5). Die Glycerin-

<sup>1)</sup> C. S. Hanes & F. A. Isherwood, Nature **164**, 1107 (1948).

aldehyd-Dehydrase fehlt in der *Cori*-Fraktion, welche aus diesem Grund auch keine Dismutation der primären Spaltstücke des Fructose-1-phosphats herbeiführt.

b) *Baranowski-Ferment*. Das Gleichgewicht zwischen Phosphodioxyaceton und Glycerinphosphat liegt stark auf der Seite des letzteren. Bei einem Überschuss von hydrierter Cozymase wird praktisch das gesamte Phosphodioxyaceton hydriert. Um dieses Ferment nachzuweisen, genügt es, der Enzymlösung hydrierte Cozymase und Hexosediphosphat zuzufügen. Sowohl der Rohextrakt aus Acetontrockenpulver als auch die *Cori*-Fraktion spalten das Hexosediphosphat und liefern damit das Substrat für die Glycerinphosphat-Dehydrase.

Versuchsansatz: In der Quarzküvette des *Beckman*-Photometers 2,0 cm<sup>3</sup> Hydrogencarbonatpuffer (siehe oben), 0,5 cm<sup>3</sup> Fermentlösung (*Cori*-Fraktion), 0,2 cm<sup>3</sup> Wasser, 0,2 cm<sup>3</sup> Dihydrocozymase. Die Reaktion wird durch Zusatz des Hexosediphosphats eingeleitet (siehe Fig. 6). Der Versuch beweist, dass in der Fermentlösung sowohl Aldolase als auch *Baranowski*-Ferment vorhanden ist.

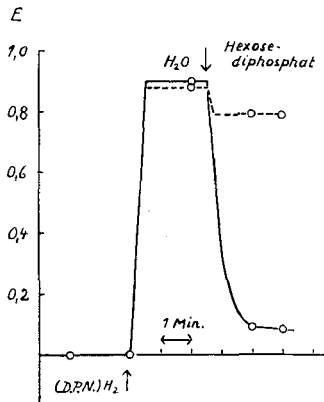


Fig. 6.

Nachweis des *Baranowski*-Ferments  
und der 1,6-Diphosphofruktaldolase in der *Cori*-Fraktion.

Ordinate: Extinktion; Abszisse: Zeit.

(D.P.N.)H<sub>2</sub>: Zusatz von hydrierter Cozymase. Beim Pfeil werden zu einem Versuchsansatz 0,2 cm<sup>3</sup> Hexosediphosphatlösung, zum anderen 0,2 cm<sup>3</sup> Wasser zugesetzt (punktierte Linie). Die Abnahme der Extinktion im letzteren Fall beruht auf Verdünnung.

c) *Nachweis der Triose-Isomerase*. Enthält die Fermentlösung ausser der Aldolase auch Triose-Isomerase, so werden beide aus dem Hexosediphosphat entstehenden Triosephosphate durch *Baranowski*-Ferment und hydrierte Cozymase zu  $\alpha$ -Glycerophosphat hydriert. Fehlt die Triose-Isomerase, so wird nur das Phosphodioxyaceton reduziert. Setzt man zu einer Lösung, welche hydrierte Cozymase im Überschuss, *Baranowski*-Ferment und Aldolase, aber keine Triose-Isomerase enthält, Hexosediphosphat zu, so sinkt die Extinktion bei 340 m $\mu$  um einen bestimmten Betrag ab; setzt man jetzt noch Triose-Isomerase zu, so wird die Extinktion nochmals um den gleichen Betrag vermindert. Ist dagegen in der Lösung zum vornherein Triose-Isomerase vorhanden, so bewirkt ein Zusatz dieses Ferments keinen weiteren Abfall der Extinktion. Wir haben durch diese Methode das Vorhandensein der Trioseisomerase sowohl im Rohextrakt als auch in der *Cori*-Fraktion nachgewiesen.

5. Bildung vor Hexose-6-phosphat aus Fructose-1-phosphat. a) *Einfluss des Magnesiums*. Nach *Cori* und Mitarbeiter<sup>1)</sup> erhält man Hexose-6-phosphat, wenn man

<sup>1)</sup> G. T. Cori, S. Ochoa, M. W. Stein & C. F. Cori, *Biochem. Biophys. Acta* **7**, 304 (1952).

die aus Loberhomogenat zwischen 45% und 55% Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfallende Proteinfraction mit Fructose-1-phosphat inkubiert. Das Hexose-6-phosphat wird optisch durch die Reduktion des Triphosphopyridinnucleotids bei Gegenwart von Warburg'schem Zwischenferment und Hexose-Isomerase nachgewiesen. Wie Fig. 7 zeigt, ist diese Reaktion von  $Mg^{++}$  abhängig, während die oben beschriebene Aldolasespaltung des Fructose-1-phosphats von  $Mg^{++}$ -Zusatz völlig unabhängig ist.

Versuchsansatz: 0,5 cm<sup>3</sup> 0,1-m. Veronalpuffer pH 8,1, 0,5 cm<sup>3</sup> 1-proz. Na-Hydrogencarbonat, 0,2 cm<sup>3</sup> Zwischenferment, 500  $\gamma$  T.P.N., 1 cm<sup>3</sup> Cori-Fraktion, 0,4 cm<sup>3</sup> MgSO<sub>4</sub> (50  $\mu$ Mol).

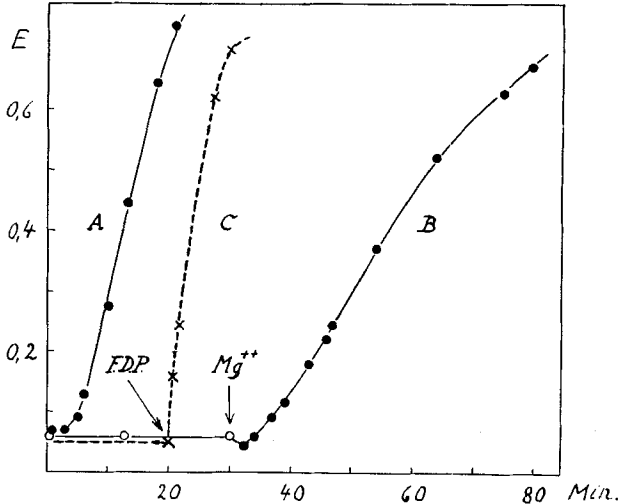


Fig. 7.

Bildung von Hexose-6-phosphat aus Fructose-1-phosphat und Fructose-1,6-diphosphat. Ordinate: Extinktion; Abszisse: Zeit in Min.

Kurven A und B: Enzymlösung Cori-Fraktion, Substrat Fructose-1-phosphat.

Kurve A: Versuchsansatz enthält von Anfang an Magnesium.

Kurve B: Versuchsansatz ohne Magnesium;  $Mg^{++}$  erst beim Pfeil zugesetzt.

Für die beiden Versuche wurden verschiedene Enzymlösungen verwendet.

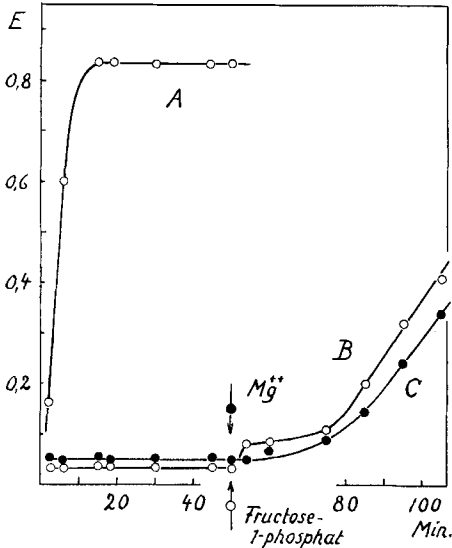
Kurve C: Enzymlösung gereinigte Diphosphofructose-1-phosphatase, Substrat Fructose-1,6-diphosphat, beim durch „F.D.P.“ bezeichneten Pfeil zugesetzt.

Wie Fig. 8 zeigt, wird die Phosphoglucomutase durch 0,1-m.  $Mg^{++}$  vollständig gehemmt, während die Überführung von Fructose-1-phosphat in den 6-Ester noch möglich ist. Dies beweist, dass Glucose-1-phosphat nicht Zwischenprodukt beim Übergang von Fructose-1-phosphat in Hexose-6-phosphat sein kann.

Versuchsansatz in der Quarzküvette des Beckman-Photometers: 0,5 cm<sup>3</sup> Cori-Fraktion, 0,5 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer pH 8,1, 0,5 cm<sup>3</sup> 1-proz. Na-Hydrogencarbonat, 0,2 cm<sup>3</sup> Zwischenferment, 500  $\gamma$  T.P.N., 1 cm<sup>3</sup> Wasser, 0,4 cm<sup>3</sup> Substrat (Glucose-1-phosphat: 2,7 mg K-Salz/cm<sup>3</sup>; Fructose-1-phosphat aus 8 mg Ba-Salz/cm<sup>3</sup>). In den Versuchen mit  $Mg^{++}$  wurde eine 1-m. Magnesiumsulfatlösung bis zur Endkonzentration 0,1-m. zugesetzt. Diese hohe  $Mg^{++}$ -Konzentration verlangsamt die Umwandlung des Fructose-1-phosphats in den 6-Ester, ohne sie aber völlig zu hemmen.

Wenn zu der Magnesium-haltigen Enzymlösung Fructose-1-phosphat zugesetzt wird (oder umgekehrt das Ferment zur Substratlösung), so setzt in der Regel die Reaktion erst nach einer Latenzzeit von einigen Min. ein (vgl. z. B. Fig. 10). Löst man dagegen die Reaktion in der  $Mg^{++}$ -freien Lösung durch Zusatz von Magnesiumsalz aus, so setzt sie

rasch mit voller Geschwindigkeit ein (vgl. Fig. 9). Wahrscheinlich ist die Latenzzeit dadurch zu erklären, dass zuerst die Zwischenprodukte (Triosen und Hexosediphosphat) in genügender Menge gebildet werden müssen, bevor die Bildung von Hexose-6-phosphat und damit die Reduktion des T.P.N. beginnen kann.



Ordinate: Extinktion;  
 Abszisse: Zeit in Min.  
 Versuchsansatz siehe Text.  
 Kurve A: Glucose-1-phosphat ohne  $Mg^{++}$ -Zusatz.  
 Kurve B: Glucose-1-phosphat.  
 Kurve C: Fructose-1-phosphat ohne  $Mg^{++}$ ; beim Pfeil Zusatz von  $Mg^{++}$ .

Fig. 8.

Bildung von Glucose-6-phosphat aus Glucose-1- und Fructose-1-phosphat.

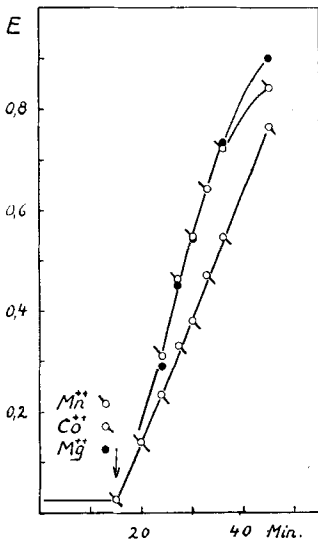


Fig. 9.

Hydrolyse von Hexosediphosphat unter Bildung von Fructose-6-phosphat.

Ordinate: Extinktion; Abszisse: Zeit in Min.  
 Ansatz: 0,5 cm<sup>3</sup> Fermentlösung, 1 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer pH 8,1, 0,5 cm<sup>3</sup> 1-proz. Na-Hydrogencarbonat, 0,4 cm<sup>3</sup> Fructosediphosphat (aus 1,6 mg Ba-Salz/cm<sup>3</sup>), 0,2 cm<sup>3</sup> Hexose-Isomerase, 500  $\gamma$  T.P.N. Beim Pfeil Zusatz von 0,04 cm<sup>3</sup>  $MgSO_4$ -,  $MnSO_4$ - oder  $CoCl_2$ -Lösung.  
 Endkonzentrationen:  $Mg^{++}$   $6 \cdot 10^{-3}$ -m.,  $Mn^{++}$  und  $Co^{++}$   $0,5 \cdot 10^{-3}$ -m.  
 Als Enzymlösung wurde die bis 45% Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfallende, dialysierte Proteinfraktion benutzt.

b) *Fraktionierung der Extrakte aus Acetontrockenpulver.* Bei der Fraktionierung mit Ammoniumsulfat erhält man zwischen 45% und 60% Sättigung eine Fraktion, die aus Fructose-1-phosphat nur sehr langsam Hexose-6-phosphat bildet, welche dagegen Aldolaseaktivität zeigt. Setzt man eine Lösung zu, welche durch kurzes Erwärmen der bei 45% Sättigung ausfallenden Fraktion auf 65° erhalten wurde, so erhält man eine starke Aktivierung der Bildung von Hexose-6-phosphat. Es zeigt sich, dass das im erhitzten Extrakt vorhandene, in der Ammoniumsulfatfällung zwischen 45% und 60% Sättigung aber fehlende Ferment eine Phosphatase ist, welche aus Fructosediphosphat den Phosphatrest in Stellung 1 abspaltet.

*Herstellung der Lösung von 1-Phosphofructaldolase:* Acetontrockenpulver wird wie oben angegeben mit Veronalpuffer extrahiert. Zum Extrakt wird gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 7,8) bis zu einer Sättigung von 45% zugesetzt, die Fällung verworfen und zum Überstehenden weiter Ammoniumsulfat bis 60% Sättigung zugegeben. Der Niederschlag wird auszentrifugiert, in wenig 0,02-m. Na-Hydrogencarbonat aufgenommen und 4 Std. gegen die gleiche Hydrogencarbonatlösung dialysiert.

*Herstellung der PhosphataseLösung:* Der Extrakt wird mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Sättigung von 45% versetzt, der Niederschlag auszentrifugiert, in 0,02-m. Na-Hydrogencarbonat aufgenommen und wie oben dialysiert. Die Lösung wird mit Essigsäure auf pH 6 gebracht, in einem Wasserbad von 85° bis auf 65° erwärmt und dann rasch abgekühlt. Der Eiweissniederschlag wird auszentrifugiert und die überstehende Lösung verwendet. In dieser Lösung sind folgende Fermente nicht mehr enthalten: 1-Phosphofructaldolase, 1,6-Diphosphofructaldolase, Triose-Isomerase, *Baranowski-Ferment* (Nachweis durch den optischen Test).

Fig. 7 (gestrichelte Kurve C) zeigt einen Versuch mit der nach obiger Methode gereinigten Phosphatase. Versuchsansatz: (in der Quarzküvette des Photometers): 1 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer pH 8,1, 0,5 cm<sup>3</sup> Na-Hydrogencarbonat, 0,5 cm<sup>3</sup> Enzymlösung, 0,2 cm<sup>3</sup> Zwischenferment, 500  $\gamma$  T.P.N. Beim Pfeil wurden 0,4 cm<sup>3</sup> Fructosediphosphatlösung (F.D.P.) zugesetzt (hergestellt aus 1,6 mg Ba-Salz/cm<sup>3</sup>).

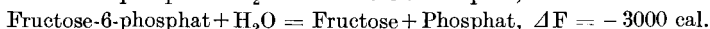
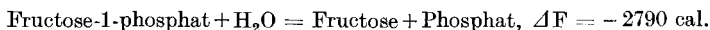
c) *Nachweis der Diphosphofructose-1-phosphatase.* Für diese Versuche wurde entweder direkt die bis 45% Sättigung ausfallende Fraktion oder die unter b) beschriebene, durch Erwärmen gereinigte Lösung verwendet. Die Spaltung des Hexosediphosphats kann optisch verfolgt werden, wenn man Hexose-Isomerase, Zwischenferment und T.P.N. zusetzt. Die Phosphatase ist nur in Gegenwart von Magnesium, Cobalt oder Mangan wirksam. Im Versuch, der in Fig. 9 dargestellt ist, wurde die Reaktion durch Zugabe von Mg<sup>++</sup> ausgelöst. Bei Verwendung des gereinigten Ferments tritt ohne Hexose-Isomerase keine Hydrierung des T.P.N. ein; dies beweist, dass das Hydrolyseprodukt Fructose-6-phosphat ist.

Die Hydrolyse des Hexosediphosphats wurde auch direkt durch Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats verfolgt. (In 40 Min. wurden z. B. bei pH 8,1 und Zimmertemperatur (gleiche Bedingungen wie im optischen Test) aus 1  $\mu$ Mol Hexosediphosphat 0,93  $\mu$ Mol Phosphat abgespalten.)

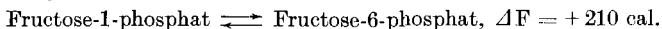
d) *Rekombination von Aldolase und Phosphatase.* Wir haben ein Enzymsystem aus den folgenden Komponenten aufgebaut: Aldolaselösung (unter b) beschrieben), PhosphataseLösung (unter b) beschrieben), kristallisierte Muskelaldolase (1,6-Diphosphofructaldolase), Triose-Isomerase, Hexose-Isomerase, Zwischenferment, T.P.N. Wenn der von *Hers & Kusaka*<sup>1)</sup> beschrittene Weg gangbar ist, so muss dieses System zur Bildung von Glucose-6-phosphat, also zur Reduktion des T.P.N., führen. Dies ist tatsächlich der Fall (Fig. 10). Lässt man die PhosphataseLösung weg, so findet, wie bereits erwähnt, nur eine geringe Bildung von Hexose-6-phosphat statt, die wahrscheinlich durch einen geringen Gehalt der Aldolaselösung an Phosphatase zu erklären ist.

<sup>1)</sup> *H. G. Hers & T. Kusaka*, II<sup>e</sup> Congrès international de biochimie, Paris 1952, Résumés des communications, S. 281.

e) Gleichgewicht zwischen Fructose-1- und -6-phosphat (?). Die freie Energie der Hydrolyse der beiden Ester ist von Meyerhof & Green<sup>1)</sup> (Fructose-1-phosphat) und Meyerhof & Oesper<sup>2)</sup> (Fructose-6-phosphat) bestimmt worden. Daraus lässt sich die Lage des Gleichgewichts berechnen, das sich bei Vorhandensein einer Fructomutase einstellen müsste:



Daraus folgt:



Aus  $\Delta F = -2,30$ . R.T. log k ergibt sich:

$$k = \frac{\text{Fructose-6-phosphat}}{\text{Fructose-1-phosphat}} = 0,71.$$

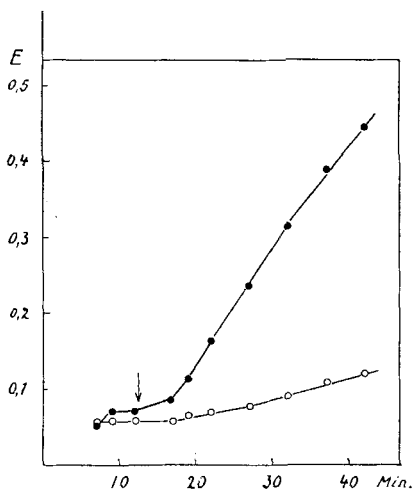


Fig. 10.

Bildung von Hexose-6-phosphat  
aus Fructose-1-phosphat durch ein kombiniertes Enzymsystem.

Abszisse: Zeit in Min. Ansatz: 1,0 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer pH 8,1, 0,5 cm<sup>3</sup> 1-proz. Na-Hydrogencarbonat, 0,04 cm<sup>3</sup> Mg-Sulfat (vgl. Legende Fig. 9), 0,4 cm<sup>3</sup> Fructose-1-phosphat (aus 10 mg Ba-Salz/cm<sup>3</sup>), 0,2 cm<sup>3</sup> Zwischenferment, 500  $\gamma$  T.P.N., 0,05 cm<sup>3</sup> 1,6-Diphosphofructaldolase, 0,03 cm<sup>3</sup> Triose-Isomerase, 0,2 cm<sup>3</sup> Hexose-Isomerase, 0,4 cm<sup>3</sup> Phosphatase-lösung (Diphosphofructose-1-phosphatase). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,4 cm<sup>3</sup> Aldolaselösung beim Pfeil ausgelöst.

- vollständiger Ansatz; ○ Vergleichsansatz ohne Phosphatase und die übrigen Fermente, beim Pfeil 1-Phosphofructaldolase zugesetzt.

Wenn man Fructose-6-phosphat mit dem dialysierten Extrakt aus Acetonrockenpulver inkubiert, so kann man keine Bildung von labilem Phosphat (Fructose-1-phosphat) feststellen (siehe Tab. 5). Der Versuchsansatz enthält 1,0 cm<sup>3</sup> Enzym (5 Std. dialysiert), 0,4 cm<sup>3</sup> Fructose-1- oder Fructose-6-phosphat, Fluorid. Gesamtvolumen 24 cm<sup>3</sup>, Inkubation 30 Min. Durchführung siehe unter 1a).

Wie man aus Tab. 6 ersieht, entsteht kein säurelabiles Phosphat. Es wird also aus dem Fructose-6-phosphat kein 1-Ester gebildet.

<sup>1)</sup> O. Meyerhof & H. Green, J. Biol. Chem. **178**, 655 (1949).

<sup>2)</sup> O. Meyerhof & P. Oesper, J. Biol. Chem. **179**, 1371 (1949).

**Tabelle 6.**  
Verhalten des Fructose-6-phosphats.

Substrat	Anorg. Phosphat		Labiles und anorg. Phosphat		Zunahme des labilen Phosphats
	0 m	30 m	0 m	30 m	
	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$	
Fructose-6-phosphat . .	74	86	112	126	2
Fructose-1-phosphat . .	66	88	182	135	- 69

Wir möchten Herrn Dr. *Th. Bücher*, Hamburg, für die Überlassung der hochgereinigten Fermentpräparate (Aldolase, *Baranowski*-Ferment, Triose-Isomerase) unseren verbindlichen Dank sagen. Ebenso danken wir Herrn Dr. *K. Wallenfels*, Tutzing, aufs beste für die freundliche Überlassung verschiedener Präparate von Cozymase und der Alkoholdehydrase.

Zusatz bei der Korrektur. Versuche nach dem Abschluss dieser Arbeit zeigen, dass auch im Muskel zwei verschiedene Aldolasen vorhanden sind. Eine zum „Myogen A“ von *Baranowski*<sup>1)</sup> gehörende, kristallisierte Fraktion spaltet nur Hexosediphosphat<sup>2)</sup>, während eine weitere Fraktion sowohl Fructose-1-phosphat als auch Fructose-1,6-diphosphat angreift.

#### SUMMARY.

1. In liver extracts fructose-1-phosphate is split into dihydroxyacetone-phosphate and glyceric aldehyde by an enzyme („1-phosphofructaldolase“) which is different from crystalline muscle aldolase („1,6-diphosphofructaldolase“). The reaction is independent of  $Mg^{++}$ -ions. (Most of the reactions described in this paper have been followed by optical tests using the reduction of D.P.N. or the oxidation of (D.P.N.)  $H_2$ .)

2. Fructose-1-phosphate is not attacked by crystalline muscle aldolase under the conditions of the optical test.

3. The protein solutions from liver containing 1-phosphofructaldolase also act on hexose-diphosphate. We do not know whether the new aldolase is capable of splitting both substrates or whether the breakdown of hexose-diphosphate is due to the presence of 1,6-diphosphofructaldolase in the enzyme solutions.

4. In the presence of cozymase the primary split products undergo a dismutation into glyceric acid and  $\alpha$ -glycerophosphate. Two enzymes depending on D.P.N. are responsible for this reaction: glyceraldehyde dehydrogenase and glycerophosphate dehydrogenase (enzyme of *Baranowski*).

5. The equilibrium between fructose-1-phosphate and its split products lies almost completely on the side of the fructose ester.

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. **260**, 43 (1939).

<sup>2)</sup> Vgl. *O. Meyerhof & L. V. Beck*, J. Biol. Chem. **156**, 109 (1944); *J. F. Taylor, A. A. Green & G. T. Cori*, J. Biol. Chem. **173**, 591 (1948); *T. Baranowski & T. R. Niederaand*, J. Biol. Chem. **180**, 543 (1949).



The breakdown becomes appreciable only if the trioses are trapped by hydrazine or if they undergo further reactions, such as the above-mentioned dismutation.

6. In the presence of  $Mg^{++}$ -ions fructose-1-phosphate is partly transformed into hexose-6-phosphate by a protein fraction from liver, first described by *Cori* and coworkers. We have been able to confirm the scheme of this reaction proposed by *Hers & Kusaka*: splitting of fructose-1-phosphate into two 3-carbon chains, formation of glyceraldehyde-phosphate from dihydroxyacetone-phosphate, condensation of the two triose-phosphates to form hexose-diphosphate, dephosphorylation of the latter in position 1 by the action of specific phosphatase (diphosphofructose-1-phosphatase).

7. The phosphatase has been obtained free from the other enzymes. It has been definitely proved that the split product is fructose-6-phosphate. The activity of the phosphatase depends on the presence of  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  or  $Co^{++}$ .

8. In combining 1-phosphofructaldolase (free from phosphatase), phosphatase (free from aldolase), crystalline muscle aldolase, triose isomerase and hexose isomerase, we have obtained an enzyme system transforming fructose-1-phosphate into glucose-6-phosphate.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

---

### 30. Recherches dans la série des cyclitols XVI. Sur quelques cyclohexane-tétrols-1,2,3,4

par Th. Posternak et H. Friedli.

(15 XII 52)

Si dans la nature on rencontre assez fréquemment des cyclohexane-hexols (inositols) et des cyclohexane-pentols (quercitols) on n'a signalé jusqu'à présent qu'un seul cyclohexane-tétrol naturel, le bétitol isolé de la mélasse de sucre de betterave<sup>1</sup>). On a décrit par contre un certain nombre de cyclohexane-tétrols synthétiques ou semi-synthétiques; ajoutons que la configuration exacte de la plupart de ces substances était inconnue.

Nous nous sommes proposé de préparer des cyclohexane-tétrols de constitution et de configuration bien déterminées dans le but de procéder à diverses expériences biochimiques (étude de l'action vitaminique, oxydation par *Acetobacter suboxydans*, etc.). Le présent mémoire concerne des cyclohexane-tétrols-1,2,3,4. Parmi les tétrols

<sup>1</sup>) *E. v. Lippmann*, B. 34, 1159 (1901).