

203. Über die Spezifität der Aldolasen.

IV. Mitteilung über den Stoffwechsel der Fructose in der Leber¹⁾

von **F. Leuthardt** und **H. P. Wolf**.

(19. VIII. 54.)

Wir haben in früheren Arbeiten¹⁾²⁾ gezeigt, dass in der Leber das Fructose-1-phosphat³⁾ durch ein von der *Meyerhof*'schen Muskelaldolase (1,6-Diphosphofruktaldolase) verschiedenes Enzym, die 1-Phosphofruktaldolase, in Phosphodioxyaceton und D-Glycerinaldehyd gespalten wird. Gleichzeitig wurde auch die Vermutung ausgesprochen, dass die von *Meyerhof*, *Lohmann* & *Schuster*⁴⁾ beobachtete Kondensation von nicht phosphorylierten Aldehyden mit Phosphodioxyaceton in Muskelextrakten durch die 1-Phosphofruktaldolase bewirkt wird.

Wir beschreiben in dieser Arbeit eine Reihe von Versuchen, welche die Existenz zweier verschiedener Aldolasen sicherstellen.

Wesentlich für die Entscheidung der Frage ist die Verwendung einer sehr reinen 1,6-Diphosphofruktaldolase. Es stand uns das schon bei unseren früheren Versuchen benützte kristallisierte Enzym aus Kaninchenmuskel zur Verfügung, das von Prof. *Th. Bücher*, Hamburg, dargestellt worden war (Beschreibung der Methode siehe *Beisenherz* u. Mitarb.⁵⁾). Als 1-Phosphofruktaldolase diente die ebenfalls schon früher beschriebene Proteinfraction aus Rattenleber (als „*Cori*-Fraktion“ bezeichnet). Diese Fermentlösung spaltet sowohl F-1-P als auch FDP³⁾. Wir können aber z. Zt. nicht entscheiden, ob es sich um ein Gemisch zweier verschiedener Aldolasen handelt oder ob die Proteinfraction ein einheitliches Enzym enthält, das beide Fructosephosphate angreift.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit neigen *Hers* & *Kusaka*⁶⁾ zur Ansicht, dass die beiden Substrate, FDP und F-1-P, durch das gleiche Ferment gespalten werden, das allerdings zum Diphosphat eine bedeutend grössere Affinität besitzt als zum Monophosphat (*Michaelis*-Konstante für das FDP: $2,24 \times 10^{-4}$ Mol/Liter, für das F-1-P: $1,84 \times 10^{-2}$ Mol/Liter).

¹⁾ III. Mitteilung: *F. Leuthardt, E. Testa & H. P. Wolf*, *Helv.* **36**, 227 (1953).

²⁾ *F. Leuthardt & H. P. Wolf*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **11**, C 62 (1953).

³⁾ Abkürzung: F-1-P = Fructose-1-phosphat, FDP = Fructose-1,6-diphosphat.

⁴⁾ *O. Meyerhof, K. Lohmann & Ph. Schuster*, *Bioch. Z.* **286**, 301 (1936).

⁵⁾ *G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt & G. Pfeleiderer*, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).

⁶⁾ *H. G. Hers & T. Kusaka*, *Biochem. Biophys. Acta* **11**, 427 (1953).

Die Fermentaktivität wurde in unsern Versuchen durch einen optischen Test bestimmt: Oxydation der hydrierten Cozymase durch das bei der Spaltung entstehende Phosphodioxyaceton bei Gegenwart des sog. *Baranowski*-Ferments (Glycerophosphat-Dehydrase). Wir haben eine Lösung der 1-Phosphofruktaldolase derart eingestellt, dass sie gegen FDP die gleiche Aktivität zeigte wie eine vorgegebene Lösung des kristallisierten Enzyms (30 γ Fermentprotein pro Ansatz), und anschliessend die gleichen Lösungen auf F-1-P einwirken lassen. Fig. 1 zeigt, dass das kristallisierte Enzym, wie wir schon früher mitgeteilt haben¹⁾, gegen F-1-P völlig inaktiv ist, während das Leberferment dieses Substrat angreift.

Als Mass für die Fermentaktivität dient der Extinktionsabfall pro Zeiteinheit nach Zugabe des Substrats. Beim Vergleich der Aktivitäten ist zu berücksichtigen, dass die Enzymlösung aus Leber neben der 1-Phosphofruktaldolase noch Triose-isomerase enthält. Sie bildet daher, wenn die Aktivität der letzteren genügend hoch ist, beim optischen Test aus einer Molekel FDP zwei Molekeln Phosphodioxyaceton, während aus F-1-P nur eine entsteht. Andererseits aber ist in der gleichen Proteinfraction, wie wir früher mitgeteilt haben²⁾, eine weitere Dehydrase enthalten, welche den Wasserstoff von der hydrierten Cozymase auf das zweite Bruchstück des F-1-P, den Glycerinaldehyd, überträgt und diesen damit ebenfalls aus dem Gleichgewicht entfernt. Das Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten von FDP und F-1-P durch die 1-Phosphofruktaldolase lässt sich aus diesem Grund nicht direkt aus dem Extinktionsabfall ablesen. Es muss durch einen zwischen den Werten 1 und 2 liegenden Faktor korrigiert werden.

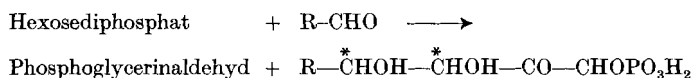
Der in Fig. 1 dargestellte Versuch lässt keine andere Erklärung zu, als dass die Leber eine Aldolase enthält, die vom kristallisierten Muskelenzym verschieden ist. Man findet nur bei sehr hohen Enzymkonzentrationen eine schwache Aktivität des letzteren gegen F-1-P (siehe Fig. 2). Nach Versuchen, die noch nicht abgeschlossen sind, scheint auch der Muskel zwei verschiedene Aldolasen zu enthalten. Wir können daher nicht sicher entscheiden, ob die beobachtete schwache Aktivität der 1,6-Diphosphofruktaldolase zuzuschreiben ist oder ob auch in dem hochgereinigten Enzym noch Spuren der 1-Phosphofruktaldolase vorhanden sind. Jedenfalls steht fest, dass das Ferment, welches in der Leber F-1-P spaltet, von der „klassischen“ *Meyerhof*'schen Aldolase verschieden ist.

Wir haben oben bereits darauf hingewiesen, dass möglicherweise das Enzym, welches nicht phosphorylierte Aldehyde mit Phosphodioxyaceton kondensiert, mit der 1-Phosphofruktaldolase identisch ist. Wie wir früher gezeigt haben¹⁾, liegt das Gleichgewicht der Aldolspaltung von F-1-P stark zugunsten des Fructoseesters, so dass sich die Reaktion nur dann nachweisen lässt, wenn eines der Spaltstücke aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Wir haben nun nachgewiesen, dass tatsächlich das kristallisierte Muskelenzym derartige Aldolkondensationen nur wenig aktiviert, während das Leber-

¹⁾ *F. Leuthardt, E. Testa & H. P. Wolf*, *Helv.* **36**, 227 (1953).

²⁾ *H. P. Wolf & F. Leuthardt*, *Helv.* **36**, 1463 (1953).

ferment aus verschiedenen Aldehyden mit Phosphodioxyaceton die entsprechenden in Stellung 1 phosphorylierten Ketosen aufbaut. Bei diesen Versuchen wurde Hexosediphosphat mit dem Aldehyd und dem Enzym inkubiert:



Die Zuckerphosphate wurden als Bariumsalze abgetrennt und nach Hydrolyse durch Säure oder durch Prostataphosphatase chromatographisch identifiziert. Die Fermentlösungen wurden so eingestellt, dass sie im optischen Test gegen FDP als Substrat gleiche Aktivität zeigten. Wir haben bei diesen Versuchen mit einer hohen Konzentration der 1,6-Diphosphofruktaldolase gearbeitet, um auch mit diesem Ferment eine schwache Reaktion zu erzwingen (10fache Konzentration gegenüber dem in Fig. 1 dargestellten optischen Test). Damit lässt sich der Einwand ausschliessen, der bei völlig negativem Resultat erhoben werden könnte, dass nämlich das hochgereinigte Enzym während der Inkubation inaktiviert worden ist. Da die Proteinfraktion aus Leber, wie erwähnt, Triose-isomerase enthält, können durch sie beide Spaltstücke des FDP zur Reaktion gebracht werden. Wenn die obige Gleichung vollständig von links nach rechts verläuft, wird daher mit dem Leberferment auch doppelt so viel des Kondensationsproduktes entstehen wie mit dem kristallinen Muskelferment. Die tatsächlichen Unterschiede sind aber viel grösser. Über die Interpretation der schwachen, aber im Verhältnis zum optischen Test doch deutlichen Aktivität des Muskelferments siehe unten.

Wir haben bisher folgende Aldehyde mit Phosphodioxyaceton kondensiert: Glycolaldehyd, DL-Glycerinaldehyd, D-Erythrose. Die Chromatogramme der dephosphorylierten Reaktionsprodukte sind in den Fig. 3 bis 5 dargestellt. Man erkennt, dass in den Versuchen mit der reinen 1,6-Diphosphofruktaldolase trotz der hohen Enzymkonzentration nur eben feststellbare Mengen der Kondensationsprodukte gebildet worden sind.

Da bei der Kondensation neue asymmetrische C-Atome entstehen (in der obigen Formel durch Sternchen bezeichnet), ist die Bildung isomerer Zucker möglich. *Meyerhof* und Mitarb.¹⁾ haben jedoch bei der Kondensation von Phosphodioxyaceton mit D-Glycerinaldehyd durch Muskelextrakt nur D-Fruktose-1-phosphat, mit L-Glycerinaldehyd nur L-Sorbose-1-phosphat gefunden. Bei der chemischen Kondensation von Dioxyaceton und D-Glycerinaldehyd durch Ba(OH)₂ entstehen nach *Fischer & Baer*²⁾ nebeneinander D-Fruktose und D-Sor-

¹⁾ *O. Meyerhof, K. Lohmann & Ph. Schuster, Bioch. Z.* **286**, 319 (1936).

²⁾ *H. O. L. Fischer & E. Baer, Helv.* **19**, 519 (1936).

bose, nicht aber die beiden andern möglichen Isomeren D-Psicose und D-Tagatose. Es scheint also die Transstellung der beiden Hydroxyle bevorzugt zu sein, während bei der enzymatischen Reaktion nur die eine der beiden möglichen trans-Konfigurationen entsteht.

DL-Glycerinaldehyd liefert ein Gemisch als Kondensationsprodukt, dessen beide Komponenten den R_f -Wert der Fructose besitzen; die eine Komponente ist nicht vergärbar. Wir vermuten daher auf Grund der Angaben von *Meyerhof* und Mitarb.¹⁾, dass es sich um das Gemisch von D-Fructose und L-Sorbose handelt.

Das Kondensationsprodukt, das aus Glycolaldehyd entsteht, ist nach seinem chromatographischen Verhalten (nach Abspaltung des Phosphatrestes) und nach seiner Farbreaktion mit Orcin-Salzsäure (Reaktion nach *Mejbaum*²⁾) eine Pentose. (Vgl. Fig. 4 und 4a.) Wenn man annimmt, dass auch hier eine trans-Konfiguration entsteht, könnte es sich um D- oder L-Xylulose handeln. Doch steht die Identität des entstandenen Zuckers noch nicht fest. (Der zweite im Chromatogramm sichtbare Fleck mit dem kleineren R_f -Wert ist die bei der Extraktion mit Pyridin gebildete Aldopentose; vgl. Experimenteller Teil). Die Bildung von Xylulose als Produkt einer Kondensation zwischen Glycolaldehyd und Triosephosphat ist von *McGeown & Malpress*³⁾ in Leberextrakten, von *Forrest* und Mitarb.⁴⁾ mit einem Enzym aus Erbsen festgestellt worden. *Glock*⁵⁾ erhielt mit einer Proteinfraction aus Leber sowie mit kristallisierter Aldolase ebenfalls ein Ketopentose-1-phosphat, welches sie als Xylulosephosphat betrachtet. Die Annahme liegt nahe, dass in allen diesen Fällen das wirksame Enzym die 1-Phosphofruktaldolase ist. *Weinhouse*⁶⁾ postuliert eine entsprechende Aldolspaltung von Ketopentose-1-phosphat, um gewisse Befunde von *Neish & Simpson*⁷⁾ über den Abbau von Pentosen bei *Aerobacter* erklären zu können.

Racker hat die Bildung von Pentose, und zwar Ribulose-5-phosphat, aus Phosphoglycerinaldehyd und „aktiviertem“ Glycolaldehyd durch die Transketolase beschrieben⁸⁾. Dieses Enzym reagiert aber nicht mit freiem Glycolaldehyd. Auch wenn in den oben erwähnten Versuchen die Fermentlösungen Transketolase enthalten haben, kann daher die Bildung der Pentose nur durch Kondensation der Phosphodioxyaceton-Hälfte des FDP mit dem Glycolaldehyd erklärt werden.

¹⁾ *O. Meyerhof, K. Lohmann & Ph. Schuster, Bioch. Z.* **286**, 319 (1936).

²⁾ *W. Meybaum, Z. physiol. Ch.* **258**, 117 (1939).

³⁾ *M. G. McGeown & F. H. Malpress, Nature* **173**, 212 (1954).

⁴⁾ *R. S. Forrest, L. Hough & J. K. N. Jones, Chem. and Ind.* **1951**, 1093.

⁵⁾ *G. E. Glock, Biochem. J.* **52**, 575 (1952).

⁶⁾ *S. Weinhouse, Ann. Rev. Biochem.* **23**, 157 (1954).

⁷⁾ *A. C. Neish & F. J. Simpson, Bact. Proc.* **1953**, 83.

⁸⁾ *E. Racker, G. de la Haba & J. G. Leder, Am. Soc.* **75**, 1010 (1953).

Bei Zugabe von D-Erythrose zum Fermentansatz entstand ein Produkt, welches nach seinem R_f -Wert und der Orcin-Salzsäurereaktion als Sedoheptulose zu betrachten ist. (Vgl. Fig. 5 und 5a.) Im Versuch mit der 1,6-Diphosphofruktaldolase erscheint nur ein sehr schwacher Fleck, der nach Vergärung der Lösung mit Hefe oder bei Vergären auf dem Chromatogramm verschwindet. (Möglicherweise handelt es sich um Fructose, die aus dem FDP bei Behandlung mit Prostataphosphatase entstanden ist. Sedoheptulose und Fructose haben fast die gleichen R_f -Werte.)

Sedoheptulose wurde von *Hough & Jones*¹⁾ bei Inkubation von FDP und D-Erythrose mit einer Enzymlösung aus Erbsen unter den Reaktionsprodukten gefunden. Nach *Cardini*²⁾ kommt in Pflanzen (*Canavalia ensiformis*) eine Aldolase vor, die aus FDP mit Glycerinaldehyd F-1-P bildet. Die Annahme liegt nahe, dass es sich in allen Fällen um die 1-Phosphofruktaldolase handelt. Auch *Horecker & Smyrniotis* erhielten auf gleichem Wege wie wir durch Verwendung kristallisierter Muskelaldolase (hergestellt nach *Taylor* u. Mitarb.³⁾) Sedoheptulose-1-phosphat. Nach unsern Erfahrungen mit dem Muskelferment genügt aber die einfache Kristallisation nicht, um Präparate zu erhalten, die F-1-P nicht spalten. Wir möchten daher annehmen, dass die von den genannten Autoren verwendete Aldolase noch 1-Phosphofruktaldolase enthielt.

Trotz der sehr hohen Fermentkonzentration haben wir in allen Versuchen mit der reinen Muskelaldolase immer nur geringe Mengen der Kondensationsprodukte erhalten. Wir nehmen daher an, dass die von *Meyerhof* und Mitarb.⁴⁾ erstmals beobachtete Kondensation des Dioxyacetonphosphats mit Aldehyden im wesentlichen der Wirkung der 1-Phosphofruktaldolase zuzuschreiben ist.

*Racker*⁵⁾ hat neuerdings aus der Tatsache, dass die „Aldolase“ diese Reaktionen bewirkt, den Schluss gezogen: „since crystalline muscle aldolase catalyses the condensation between dihydroxyacetone phosphate and free aldehydes, it is difficult to see in what respects other than rate and substrate affinity the liver enzyme can differ from muscle aldolase“. Er übersieht dabei, dass im Falle der Muskelaldolase die Kristallisierbarkeit kein genügendes Kennzeichen der einheitlichen Wirkung ist. Man kann aus Kaninchenmuskel ausgezeichnet kristallisierte Präparate von Aldolase („Myogenaldolase“) herstellen, die sowohl FDP als auch F-1-P angreifen. Unsere Versuche zeigen aber, dass es eine Muskelaldolase gibt, welche mit F-1-P nicht reagiert oder jedenfalls zu diesem Substrat nur eine

¹⁾ *L. Hough & J. K. N. Jones*, Soc. **1953**, 342.

²⁾ *C. E. Cardini*, *Enzymologia* **15**, 303 (1952).

³⁾ *J. F. Taylor, A. A. Green & G. T. Cori*, *J. Biol. Chem.* **173**, 591 (1948).

⁴⁾ *O. Meyerhof, K. Lohmann & Ph. Schuster*, *Bioch. Z.* **286**, 301 (1936).

⁵⁾ *E. Racker*, *Adv. Enzymol.* **15**, 141 (1954).

geringe Affinität aufweist, und welche vom Leberferment, das wir als 1-Phosphofruktaldolase bezeichnet haben, sicher verschieden ist.

Kürzlich haben *Charalampous & Mueller*¹⁾ die Bildung von Erythrosephosphat aus Triosephosphat und Formaldehyd durch einen Extrakt aus Rattenleber beschrieben. Das Ferment ist von der *Meyerhof'schen* Aldolase verschieden. (Es wird bei Abwesenheit des Leberfermentes durch die Aldolase kein Formaldehyd fixiert.) Möglicherweise handelt es sich auch hier um die 1-Phosphofruktaldolase.

Wenn man auf den Chromatogrammen, Fig. 3 bis 5, die Intensität der Flecken vergleicht, so sieht man, dass mit dem Leberferment stets sehr viel mehr Kondensationsprodukt gebildet worden ist als mit der kristallisierten Muskelaldolase, mit der letzteren aber immerhin noch gut nachweisbare Mengen. Im optischen Test aber ist mit der gleichen hohen Fermentkonzentration (100 γ /ml Lösung) die Reaktionsgeschwindigkeit fast Null. Dies kann zum Teil dadurch bedingt sein, dass die Kondensation bei 38°, der optische Spaltungstest dagegen bei Zimmertemperatur durchgeführt wurde, doch spielen wahrscheinlich noch andere Faktoren eine Rolle. Wie bereits erwähnt, liegt das Gleichgewicht der Aldolasereaktion beim F-1-P stark auf der Seite des letzteren²⁾; man kann daher auch bei der Kondensation des Phosphodioxyacetons mit andern nicht phosphorylierten Aldehyden eine stark einseitige Lage des Gleichgewichts zugunsten des Kondensationsprodukts annehmen. Unter diesen Umständen ist die beobachtete schwache Kondensationsreaktion verständlich. Die strenge mathematische Behandlung der Kinetik einer Reaktion von der Art der Aldolasespaltung führt zu sehr komplizierten Ausdrücken (vgl. z. B. *Haldane*³⁾). Man kann sich aber ein angenähertes Bild der Verhältnisse machen, wenn man den einfacheren Fall der reversiblen monomolekularen Reaktion betrachtet, bei welcher das Substrat S in ein Reaktionsprodukt P übergeführt wird: $S \rightleftharpoons P$ (*Haldane* l. c.). Die Diskussion der Gleichungen zeigt, dass bei einseitiger Lage des Gleichgewichts unter den vorliegenden Bedingungen die Rückreaktion $P \rightarrow S$ schneller abläuft als die Reaktion $S \rightarrow P$. Es liegt also kein Widerspruch in unseren Befunden, nach welchen der kristallisierten Aldolase eine schwache kondensierende Wirkung zukommt, trotzdem sie F-1-P nicht merklich spaltet.

Wir haben in einer früheren Mitteilung⁴⁾ darauf hingewiesen, dass unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die Bildung der Kondensationsprodukte am FDP und dem Aldehyd möglicherweise auch durch eine direkte Übertragung der Ketotriosehälfte der FDP auf den Aldehyd erfolgen könnte. Die Aldolasen würden nach dieser

¹⁾ *F. C. Charalampous & G. C. Mueller*, J. Biol. Chem. **201**, 161 (1953).

²⁾ *F. Leuthardt, E. Testa & H. P. Wolf*, Helv. **36**, 227 (1953).

³⁾ *J. B. S. Haldane*, Enzymes, London 1930, S. 80.

⁴⁾ *F. Leuthardt & H. P. Wolf*, Helv. physiol. pharmacol. acta **11**, C 62 (1953).

Vorstellung auch als gruppenübertragende Enzyme wirken können, in dem Sinne, dass das Phosphodioxyaceton, das bei der Spaltung des FDP oder des F-1-P entsteht, gar nicht vom Fermentprotein abgelöst, sondern direkt auf den Akzeptoraldehyd übertragen wird („Phosphodioxyaceton-Transferase“). In diesem Zusammenhang wäre es wichtig zu wissen, ob die schwache Aktivität der kristallisierten Muskelaldolase, die man im optischen Test bei sehr hohen Fermentkonzentrationen findet, dem Enzym selbst zukommt oder ob sie auf der Gegenwart von Spuren der 1-Phosphofruktaldolase beruht. Die schwache kondensierende Wirkung der kristallisierten Muskelaldolase könnte nämlich auch im Sinne der oben ausgesprochenen Hypothese durch eine gruppenübertragende Wirkung des Ferments erklärt werden: Wenn man annimmt, dass das Fermentprotein auch zum F-1-P eine gewisse Affinität besitzt, so ist es denkbar, dass zwar keine messbare Spaltung dieses Substrats, wohl aber ein Austausch seiner „Aldehydhälfte“ (C₄ bis C₆) gegen einen andern Aldehyd in gewissem Umfange stattfinden kann. Diese Reaktion könnte der von *Horecker & Smyrniotis*¹⁾ beschriebenen Transaldolasereaktion zur Seite gestellt werden, bei welcher eine nicht phosphorylierte Dioxyacetongruppe übertragen wird.

Zur Benennung der Aldolasen. Wir haben für das Leberenzym, welches F-1-P spaltet, die Bezeichnung 1-Phosphofruktaldolase vorgeschlagen²⁾, um es vom Muskelferment (1,6-Diphosphofruktaldolase), welches FDP, nicht aber F-1-P angreift, zu unterscheiden. Dabei wurde die Frage offengelassen, ob die Aktivität unserer „Cori-Fraktion“ aus Leber gegen FDP der 1-Phosphofruktaldolase zukommt, oder ob sie durch die Gegenwart von 1,6-Diphosphofruktaldolase bedingt ist. Im ersten Fall wäre die Leberaldolase ein Ferment, das einen weitem Spezifitätsbereich besitzt als die kristallisierte Muskelaldolase. *Hers & Kusaka*³⁾ haben unsere Bezeichnung kritisiert. Sie gehen davon aus, dass in der Leber ein und dasselbe Ferment sowohl F-1-P als auch FDP angreift und dass dieses Enzym eine grössere Affinität zum FDP besitzt als zum F-1-P: „Au stade actuel de nos connaissances, le terme 1-phosphofruktaldolase est difficilement applicable à un enzyme, qui, d'après nos résultats, pourrait avoir plus d'affinité pour le FDP que pour le F-1-P.“ Bis zur Abklärung der Frage, ob die Leberaldolase ein einheitliches Ferment ist oder nicht, scheint uns aber der vorgeschlagene Name für die Benennung des Ferments gut geeignet, weil er diejenige Aktivität bezeichnet, die das Enzym von der „klassischen“ Muskelaldolase unterscheidet. Wir behalten uns vor, später auf die Nomenklatur der Aldolasen zurückzukommen.

Experimenteller Teil.

I. Die Enzymlösung aus Rattenleber, von uns als „Cori-Fraktion“ bezeichnet, wurde entsprechend unseren früheren Angaben hergestellt³⁾. Die kristallisierte Muskelaldolase war das schon früher benutzte, von *Th. Bücher* hergestellte Präparat.

II. Prüfung der Wirksamkeit der beiden Aldolasen im optischen Test. Die Spaltung von FDP und F-1-P wurde an der Hydrierung des entstehenden Phosphodioxyacetons durch die Glycerophosphatdehydrase (*Baranowski-Ferment*) und Dihydrocozymase ((DPN)H₂) verfolgt. In Fig. 1 ist die Wirkung der beiden Aldolasen auf FDP und F-1-P dargestellt, Fig. 2 zeigt das Ausbleiben einer Spaltung von F-1-P durch die Muskelaldolase und deren geringe Aktivität bei sehr hoher Enzymkonzentration.

¹⁾ *B. L. Horecker & P. Z. Smyrniotis*, Am. Soc. **75**, 2021 (1953).

²⁾ *F. Leuthardt, E. Testa & H. P. Wolf*, Helv. **36**, 227 (1953).

³⁾ *H. G. Hers & T. Kusaka*, Biochem. biophys. acta **11**, 427 (1953).

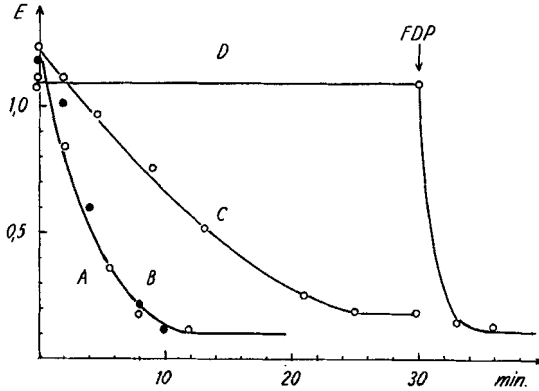


Fig. 1.

Spezifität der Aldolasen im optischen Test.

Abszisse: Zeit in Min. *Ordinate:* Extinktion bei 340 μ . Kurven A und B: Substrat FDP. Kurve A: —●— Leberferment; Kurve B: —○— Muskelferment. Der gleiche Extinktionsabfall (Zusammenfallen der Kurven A und B) zeigt, dass die beiden Lösungen gegen FDP gleich aktiv sind. Kurven C und D: Substrat F-1-P. Kurve C: Leberferment. Kurve D: Muskelferment. Während im Ansatz mit der „Cori-Fraktion“ die Extinktion abnimmt, bleibt sie bei der Muskelaldolase konstant, es tritt hier also keine Spaltung ein. Beim Pfeil (Kurve D) Zusatz von FDP: sofortige Spaltung des Diphosphats. *Ansätze mit FDP:* 1,5 ml Veronalpuffer pH 7,4 (0,1 ml (DPN) H_2 -Lösung, entspr. 0,33 μ Mol/ml Ansatz Endkonzentration), 0,01 ml Glycerophosphatdehydrase, 0,3 ml FDP-Lösung (8 mg Bariumsalz/ml, mit Kationenaustauscher Ionac C 240 behandelt und neutralisiert), 30 γ Meyerhof'sche Muskelaldolase bzw. 0,03 ml „Cori-Fraktion“. *Ansätze mit F-1-P:* Gleich wie bei FDP, nur wurde statt FDP 0,3 ml F-1-P-Lösung zugesetzt (6,5 mg Bariumsalz, mit Ionac C 240 behandelt und neutralisiert).

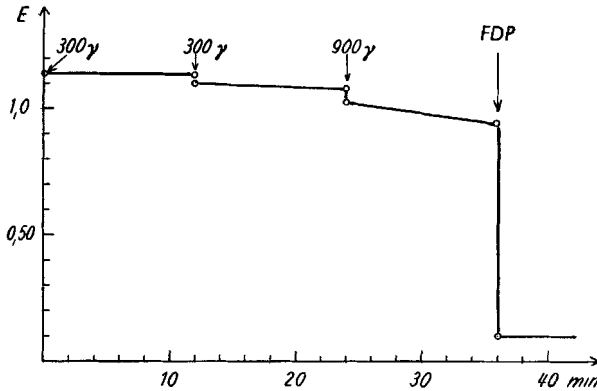


Fig. 2.

Aktivität hochgereinigter Muskelaldolase gegen F-1-P bei hoher Enzymkonzentration.

Ansatz zum optischen Test: 1,5 ml Veronalpuffer pH 7,4 (0,1 ml (DPN) H_2 -Lösung, entspr. 0,33 μ Mol/ml Ansatz), 0,4 ml F-1-P-Lösung (10 mg Bariumsalz/ml, mit Ionac C 240 (Kationenaustauscher) behandelt und neutralisiert), 0,03 ml Glycerophosphatdehydrase. Stufenweise Zugabe der an die Kurve angeschriebenen Mengen Muskelaldolase (Gesamtmenge 1500 γ). Bei Zugabe von FDP (Pfeil) fällt die Extinktion augenblicklich ab.

III. Enzymatische Aldolkondensationen mit der 1-Phosphofruktaldolase.

1. Keto-hexose-1-phosphat aus Phosphodioxyaceton und DL-Glycerinaldehyd. Ansätze: 3,5 ml Veronalpuffer (0,1-m.), 480 mg DL-Glycerinaldehyd in 5 ml Wasser, 344 mg Bariumsalz des Fructose-1,6-diphosphats (mit Kationenaustauscher behandelt und neutralisiert) in 5 ml Wasser wurden bei 38° mit einer Mischung von 95% N₂ und 5% CO₂ gesättigt. Zu diesen Ansätzen wurde gegeben: *Ansatz C*: 1,5 ml „Cori-Fraktion“ (die 1-Phosphofruktaldolase enthaltend). *Ansatz M*: 0,05 ml (entspr. 1500 γ) kristallisierte Muskelaldolase und 1,45 ml Wasser. *Ansatz B*: 1,5 ml Wasser. Die Enzymmengen in den Ansätzen C und M sind so bemessen, dass sie (nach entsprechender gleicher Verdünnung) im optischen Test identische Aktivität ergeben. Bei Inkubation der Muskelaldolase mit Puffer konnte während 1 Std. bei 38° keine Abnahme der Aktivität gegenüber FDP festgestellt werden. Das Ausbleiben der Aldolkondensation (siehe unten) ist also nicht durch eine Inaktivierung des hochgereinigten Enzyms während der Inkubation bedingt. Inkubation der 3 Ansätze: 1 Std. bei 38° (Gasatmosphäre 95% N₂, 5% CO₂).

Am Ende des Versuches wurde zu jedem Ansatz 1 ml 40-proz. Trichloressigsäure zugegeben und die Fällung abzentrifugiert. Das Überstehende wurde mit 2-n. NaOH genau neutralisiert und darauf mit 3 ml 25-proz. Bariumacetat versetzt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde nochmals in Säure gelöst, neuerdings wie oben gefällt und aus-zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen, die beiden überstehenden Lösungen vereinigt und mit Alkohol bis zu einer Endkonzentration von 60–65 Proz. Alkohol versetzt, 3 Std. im Kühlraum stehengelassen und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde noch einmal mit Alkohol umgefällt. Ausbeute der getrockneten Niederschläge: *Ansatz C*: 272 mg; *Ansatz M*: 269 mg; *Ansatz B*: 244 mg. Bei dieser Art der Aufarbeitung treten keine Verluste an Keto-hexose-1-phosphat ein, wie wir in entsprechenden Versuchen feststellen konnten und auch von andern Autoren¹⁾ beschrieben worden ist.

Bestimmung der Ketosen nach Roe²⁾ und Papierchromatographie: Jeweils 19 mg der getrockneten Ba-Niederschläge wurden in 3 ml Wasser gelöst und durch Behandeln mit Ionac C 240 in die freien Phosphorsäureester umgewandelt (0,5 g Kationenaustauscher). Je 1 ml der Lösungen wurde mit je 1 ml 2-n. Schwefelsäure 15 Min. bei 100° hydrolysiert. Nach Abkühlen wurde mit Ba(OH)₂ neutralisiert und der Niederschlag abzentrifugiert. Die nicht hydrolysierten Zuckerphosphate werden bei dieser Behandlung vollständig mitgefällt. Die überstehenden Lösungen wurden durch Austauscherkolonnen filtriert, die 3,5 g Amberlite IR 4B (Anionenaustauscher) und 2,0 g Amberlite IR 120 (Kationenaustauscher) enthielten. Der Anionenaustauscher darf nicht mit NaOH aktiviert werden. (Veränderung der Zucker! Mit Na₂CO₃ aktivierter Anionenaustauscher verändert die Zucker nicht.) Die aufgefangenen Lösungen wurden unter dauernder Kontrolle des pH im Vakuum bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 2 ml Wasser aufgenommen.

Bestimmung der Keto-hexosen mit Resorcin nach Roe²⁾: Verwendet wurden je 0,2 ml der nach obiger Aufarbeitung erhaltenen Lösungen. Gefunden wurden: *Ansatz B* (Kontrolle): 7,4 γ Keto-hexose; *Ansatz M*: 28,1 γ Keto-hexose, korrigiert 20,7 γ Keto-hexose; *Ansatz C*: 126 γ Keto-hexose, korrigiert 118,6 γ Keto-hexose.

Papierchromatische Bestimmung: Lösungsmittelgemisch: Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5; absteigend. Laufzeit: 60 Std. Die Flecken wurden durch Besprühen des getrockneten Chromatogramms mit Benzidin-Reagens (0,5 g Benzidin in 20 ml Eisessig und 80 ml abs. Alkohol³⁾) entwickelt. Beim Erwärmen des Chromatogramms im Trockenschrank auf 105° werden die Flecken sichtbar.

Bei der Kondensation von Phosphodioxyaceton (aus FDP) und DL-Glycerinaldehyd entsteht neben Fructose-1-phosphat auch L-Sorbose-1-phosphat. Die daraus durch

¹⁾ G. A. Le Page & W. W. Umbreit, in: *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*, Minneapolis 1945.

²⁾ J. H. Roe, *J. Biol. Chem.* **107**, 15 (1934).

³⁾ R. H. Horrocks, *Nature* **164**, 444 (1949).

Hydrolyse freiwerdende Sorbose kann im Papierchromatogramm nicht von der Fructose unterschieden werden, da beide Ketosen nahezu den gleichen R_f -Wert besitzen. Die von *Weinland & May*¹⁾ beschriebene Vergärung der Zucker auf dem Chromatogramm gestattet in zwei parallelen Ansätzen einwandfreie Unterscheidung der beiden Ketosen. Das erste Chromatogramm (Fig. 3) wird wie üblich nach dem Trocknen mit dem Benzidin-Reagens sichtbar gemacht. Das zweite Chromatogramm (Fig. 3a) wird nach dem Trocknen mit einer Suspension von Bäckerhefe in gekochtem Leitungswasser besprüht und 90 Min. in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 38° aufgehängt. Dann wird getrocknet und in der angegebenen Weise mit Benzidin-Reagens behandelt. Die Fructose ist verschwunden, die Sorbose bleibt sichtbar.



Fig. 3.



Fig. 3a.

Bildung von Keto-hexose-1-phosphat bei Inkubation von FDP und DL-Glycerinaldehyd mit Aldolasen.

Chromatogramme der freien Zucker. Ansätze und Aufarbeitung siehe Text. F: Vergleichschromatogramm mit D-Fructose. S: Vergleichschromatogramm mit L-Sorbose. C: Ansatz mit Leberferment. M: Ansatz mit Muskelferment. Fig. 3 vor Vergärung, Fig. 3a nach Vergärung mit Hefe. Nach der Behandlung der Chromatogramme mit Hefe ist in der Regel die Farbentwicklung etwas schwächer, so dass die schwachen Flecken bei den Ansätzen mit dem Muskelferment nicht mehr sichtbar werden.

2. Pentose-1-phosphate aus Phosphodioxyaceton und Glycolaldehyd. Der Glycolaldehyd wurde aus Weinsäure über Dioxymaleinsäure als Zwischenstufe und nachfolgender Decarboxylierung in Pyridin dargestellt²⁾.

Ansätze: 0,5 ml 8,4-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung, 318 mg Glycolaldehyd in 5 ml Wasser und 344 mg FDP (Bariumsals mit Austauschere behandelt und neutralisiert) in 8 ml Wasser wurden bei 38° mit einer Mischung von 95 Proz. N_2 und 5 Proz. CO_2 gesättigt. Dann wurden zugegeben: in *Ansatz M*: 1500 γ Muskelaldolase in 3 ml Wasser; in *Ansatz C*: 3 ml „*Cori*-Fraktion“. Auch hier wurden die Enzymmengen durch den optischen Test auf gleiche Aktivität gegen FDP eingestellt. 1 Std. bei 38° inkubiert (Gasatmosphäre 95 Proz. N_2 und 5 Proz. CO_2). Danach wurde mit 1 ml 40-proz. Trichloroessigsäure denaturiert und abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde genau neu-

¹⁾ *H. Weinland & F. May, Z. physiol. Ch.* **293**, 153 (1953).

²⁾ *H. O. L. Fischer & L. Feldmann, B.* **60**, 865 (1929).

traliert und mit 3 ml 25-proz. Bariumacetat versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und getrocknet. Ausbeuten (1. Niederschlag): Ansatz C: 225 mg Bariumniederschlag; Ansatz M: 100 mg Bariumniederschlag. Das Überstehende wurde mit Alkohol bis zu einer Endkonzentration von 60 Proz. versetzt, der entstandene Niederschlag ebenfalls abzentrifugiert und getrocknet. Ausbeuten (2. Niederschlag): Ansatz C: 165 mg Bariumniederschlag; Ansatz M: 300 mg Bariumniederschlag. Bei weiterem Alkoholzusatz wurde keine Fällung mehr erhalten. Die vereinigten, getrockneten Bariumfällungen betragen also für C: 390 mg, und für M: 400 mg.

Zum Nachweis der gebildeten Pentosen wurde die Orcin-Reaktion nach *Mejbaum*¹⁾ (mit einem für Pentosen typischen Absorptionsmaximum bei 665 $m\mu$) und die Papierchromatographie verwendet.

Orcin-Reaktion: Je 19 mg Bariumsalz wurden in 100 ml Wasser gelöst. Davon wurde je 1 ml zur Bestimmung verwendet. Das Spektrum des gebildeten Farbstoffes wurde zwischen 600 und 700 $m\mu$ aufgenommen; das Maximum liegt bei der für Pentosen charakteristischen Wellenlänge von 665 $m\mu$.

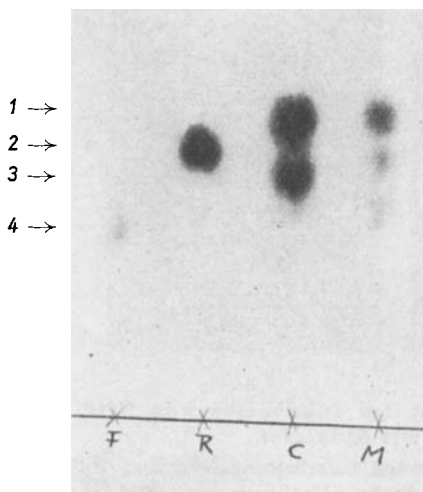


Fig. 4.



Fig. 4a.

Bildung von Ketopentose-1-phosphat bei Inkubation von FDP und Glycolaldehyd mit Aldolasen.

Chromatogramme der freien Zucker. Ansätze und Aufarbeitung siehe Text. F: Vergleichschromatogramm mit Fructose. R: Vergleichschromatogramm mit Ribose. C: Ansatz mit Leberferment. M: Ansatz mit Muskelferment. 1 = Ketopentose (Xylulose?). 2 = Ribose. 3 = Aldopentose, wahrscheinlich bei der Pyridinextraktion aus der Ketose entstanden. 4 = Fructose. Dritter, schwacher Fleck auf den Chromatogrammen C und M unterhalb Fleck 3 nicht identifiziert. Fig. 4 vor Vergärung, Fig. 4a nach Vergärung mit Hefe (vgl. Text zu Fig. 3).

Chromatogramme: Je 100 mg der Bariumniederschläge wurden durch Behandlung mit Kationenaustauscher gelöst und mit 2-n. NaOH genau neutralisiert. Endvolumen der neutralisierten Lösung: 25 ml. Die Lösung wurde zur Hydrolyse der Zuckerphosphate mit 4,5 ml Acetatpuffer pH 4,5 (0,3-m.) und 0,5 ml einer Enzymlösung von Prostataphosphatase 30 Min. bei 38° inkubiert. Enteiweissung durch Erhitzen bei 100° während 15 Min. Nach Abzentrifugieren der denaturierten Proteine wurde das Überstehende im

¹⁾ W. *Mejbaum*, Z. physiol. Ch. **258**, 117 (1939).

Vakuum im siedenden Wasserbad zur Trockne eingedampft. Der trockene Rückstand wurde 10 Min. am Rückfluss mit frisch destilliertem Pyridin bei 100° extrahiert, die abgekühlte Lösung filtriert und das Pyridin durch Vakuumdestillation entfernt. Die Badtemperatur soll dabei 40° nicht überschreiten, um eine Isomerisierung der Zucker so weit als möglich zu verhindern¹⁾. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser gelöst und auf das Filterpapier aufgetragen. Lösungsmittelgemisch für das Chromatogramm: Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5. Entwicklung der Flecken wie bei den Hexosen mit Benzidin-Reagens. Auch hier wurden jeweils zwei Chromatogramme parallel angesetzt; das eine wurde nach 60 Std. Laufzeit mit Benzidin behandelt, das andere wurde vor Benzidinbehandlung mit Hefe besprüht und 1½ Stunden bei 38° vergären gelassen²⁾. Wie Fig. 4 und 4a zeigen, erscheinen in dem für Pentosen typischen Bereich der R_f -Werte zwei Flecken, die nicht vergärbare sind. Durch Entwickeln der Flecke mit Benzidin und auf

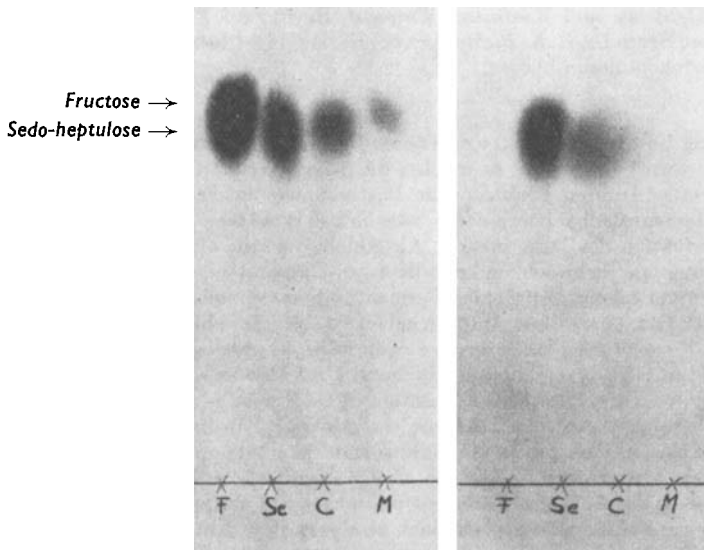


Fig. 5.

Fig. 5a.

Bildung von Sedoheptulose-1-phosphat bei Inkubation von FDP
und D-Erythrose mit Aldolasen.

Chromatogramme der freien Zucker. Ansätze und Aufarbeitung siehe Text. F: Vergleichschromatogramm mit Fructose. Se: Vergleichschromatogramm mit Sedoheptulose. C = Ansatz mit Muskelferment. Fig. 5 vor Vergärung, Fig. 5a nach Vergärung mit Hefe (vgl. Text zu Fig. 3).

einem zweiten Chromatogramm mit Naphtoresorcin (spezifisches Reagens auf Ketosen³⁾) konnten wir feststellen, dass es sich beim rascher laufenden Fleck um eine Ketopentose, beim unteren Fleck um eine Aldopentose handelt, die wahrscheinlich durch Isomerisierung bei der Pyridinextraktion entstanden ist.

3. Sedoheptulose-1-phosphat aus Phosphodioxyaceton und D-Erythrose. Ansätze wie in 2. Anstelle des Glykolaldehyds wurden 640 mg D-Erythrose zugesetzt. Inkubation, Aufarbeitung und Isolierung der Bariumsalze wie in 2. Ausbeute:

¹⁾ F. H. Malpress & A. B. Morrison, Nature **164**, 963 (1949).

²⁾ H. Weinland & F. May, Z. physiol. Ch. **293**, 153 (1953).

³⁾ S. M. Partridge, Biochem. J. **42**, 238 (1948).

Ansatz C (mit „Cori-Fraktion“): 1. Fällung 355 mg Bariumniederschlag; Ansatz M (mit Muskelaldolase): 1. Fällung 91 mg Bariumniederschlag. Nach Versetzen der Lösung mit Alkohol (2. Fällung): Ansatz C: 165 mg Bariumniederschlag; Ansatz M: 300 mg Bariumniederschlag. Die 1. und die 2. Fällung wurden vereint und gut durchgemischt.

Papierchromatogramm zum Nachweis der gebildeten Sedoheptulose: Die Abspaltung des Phosphorsäurerestes durch Prostataphosphatase und die Isolierung des Zuckers wurden wie bei 2. ausgeführt. Als Entwicklungsgemisch wurde ein Gemisch n-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4) verwendet, um eine teilweise Umwandlung der Sedoheptulose in Sedoheptulosan im sauren Milieu zu vermeiden. Laufzeit: 48 Std.

Die als Vergleichssubstanz verwendete Sedoheptulose wurde aus *Sedum spectabile* nach *Hudson & La Forge*¹⁾ gewonnen und als Sedoheptulosan-hydrat identifiziert.

Wir danken Herrn Prof. *Th. Bücher*, Marburg, für die Überlassung hochgereinigter kristalliner Muskelaldolase und *Baranowski-Ferment*, Herrn Prof. *F. Weygand*, Tübingen, für die D-Erythrose, Herrn Dr. *N. K. Richtmyer* vom National Institute of Health, Bethesda, für eine Probe Sedoheptulosan-hydrat.

Anmerkung bei der Korrektur. Während der Drucklegung ist eine Arbeit von *Tung* und Mitarbeitern²⁾ erschienen, in welcher die Substratspezifität der Muskelaldolase untersucht wird. Die Autoren benutzen zur Bestimmung der Fermentaktivität einen optischen Test, indem sie bei Gegenwart von Triose-isomerase und Triosephosphat-dehydrase die Reduktion des DPN messen. Als Aldolase wurde ein nach *Cori* und Mitarbeitern³⁾ dargestelltes, mehrfach umkristallisiertes Präparat oder Myogen-A-Aldolase nach *Baranowski*⁴⁾ verwendet. Mit beiden Fermentpräparaten stellten sie eine schwache Spaltung des F-1-P fest. Auch diese Autoren gehen von der Annahme aus, dass sich eine Spaltung des F-1-P nachweisen lassen müsse, weil nach *Meyerhof* die Kondensation von D-Glycerinaldehyd mit Dioxyacetonphosphat durch Muskelaldolase Fructose-1-phosphat liefert: "Since aldolase catalyzes the condensation of DAP with D- and L-glyceraldehyde it must perforce catalyze the reverse reaction, the cleavage of D-fructose-1-phosphate... Removal of one of the cleavage products should permit detection of the reaction although *Leuthardt* et al. were unsuccessful in doing so. Using a similar test system we have found that both fructose-1-phosphate and sorbose-1-phosphate are cleaved by the aldolase in myogen A and by crystalline aldolase, although at a very slow rate."

Nachdem wir in der vorstehenden Arbeit gezeigt haben, dass genügend reine Muskelaldolase im Gegensatz zum Leberferment nur eine sehr geringe kondensierende Wirkung hat, dürfte die von genannten Autoren wie auch von *Racker* erwähnte Schwierigkeit beseitigt sein und nichts der Annahme im Wege stehen, dass sowohl die Spaltung als auch die Bildung der F-1-P durch ein von der *Meyerhof*'schen Aldolase verschiedenes Ferment katalysiert werden.

Wir vermuten, dass in den Versuchen von *Tung* und Mitarbeitern mit einem der verwendeten Fermente, am ehesten mit dem als Triose-isomerase verwendeten Muskel-extrakt, etwas 1-Phosphofructaldolase eingeschleppt worden ist. Kristallisiertes Myogen A spaltet auch nach unsern Befunden Fructose-1-phosphat.

In einer gleichzeitig erschienenen Arbeit haben *Byrne & Lardy*⁵⁾ die bei der Kondensation von Glykolaldehyd mit Phosphodioxyaceton durch Muskelaldolase entstehende Pentose als Xylulose-1-phosphat identifiziert.

1) *F. B. La Forge & C. S. Hudson*, J. Biol. Chem. **30**, 61 (1917).

2) *T.-C. Tung, K.-H. Ling, W. L. Byrne & H. A. Lardy*, Biochim. biophys. acta **14**, 488 (1954).

3) *G. Cori, M. Stein & C. Cori*, J. Biol. Chem. **173**, 605 (1948).

4) *T. Baranowski & T. R. Nederland*, J. Biol. Chem. **180**, 543 (1949).

5) *W. L. Byrne & H. A. Lardy*, Biochim. biophys. acta **14**, 495 (1954).

SUMMARY.

1. Previous findings disproving the identity of liver aldolase (1-phosphofructaldolase) and crystalline muscle aldolase (1,6-diphosphofructaldolase) have been confirmed and extended. Highly purified muscle aldolase does not split fructose-1-phosphate even at concentrations of 0,5 mg enzyme/ml. (Optical method: oxydation of (DPN)H₂ in the presence of phosphoglycerol dehydrogenase). High purity of the enzyme is essential to prove its specificity for fructose diphosphate.

2. Liver aldolase is much more active than pure muscle aldolase in condensing aldehydes with the ketotriose part of fructose diphosphate. (Incubation of fructose diphosphate with the aldehyde in presence of the aldolase.) Condensing reactions attributed to „aldolases“ are mainly due to 1-phosphofructaldolase.

3. Pure muscle aldolase shows a weak but still detectable condensing activity, although, under the same experimental conditions, no splitting of fructose-1-phosphate by the enzyme may be detected. Two possible explanations of this fact are discussed: the equilibrium between the ketose-1-phosphates, favouring the condensation reaction, and a hypothetical group transferring action of the aldolases.

Zürich, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität.

204. Die Isolierung von Podophyllotoxin-glucosid aus dem indischen *Podophyllum emodi* Wall.

2. Mitteilung über mitosehemmende Naturstoffe¹⁾

von A. Stoll, J. Renz und A. von Wartburg.

(21. VIII. 54.)

Die im Himalaja-Gebiet verbreitete Berberidacee *Podophyllum emodi* Wall. und die in Nordamerika heimische, nahe verwandte *P. peltatum* L. enthalten besonders in ihren Rhizomen reichliche Mengen Harz, das bei beiden Drogen eine ähnliche chemische Zusammensetzung aufweist, und das wegen seiner anthelmintischen, purgierenden und emetischen Eigenschaften schon seit langem sowohl in Indien, als auch in Nordamerika medizinische Verwendung fand. Neuerdings kommt den Inhaltsstoffen dieser Pflanzen vermehrtes Interesse zu, nachdem festgestellt wurde, dass die wasserunlöslichen Harzfraktionen, das Podophyllin oder Resina Podophylli, eine mitose-

¹⁾ Vorläufige 1. Mitteilung: Am. Soc. **76**, 3103 (1954).