

## 209. Isotopieeffekte bei der Formiatoxydation durch Formicodehydrogenase aus Phaseolus

von H. Aebi, Eva Frei und Marlies Schwendimann.

(27. VIII. 56.)

Wie *Thunberg*<sup>1)</sup> gezeigt hat, besitzen nicht nur Bakterien und tierische Gewebe, sondern auch Pflanzen Formiat oxydierende Enzymsysteme, so z. B. die Samen verschiedener Leguminosen. *Adler & Sreenivasaya*<sup>2)</sup> haben das aus Erbsen gewonnene Enzym näher untersucht und festgestellt, dass die Formicodehydrogenase pflanzlicher Herkunft – im Gegensatz zu den andern – der Codehydrogenase I (DPN) als spezifischen H-Acceptors bedarf. Nach *Mathews & Vennesland*<sup>3)</sup> handelt es sich bei diesem System um das Zusammenwirken zweier Transhydrogenasen, welche sich durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung trennen lassen und deren Aktivität unter Verwendung des optischen Tests einzeln bestimmbar ist. Der Reaktionsablauf, wie er sich bei Gegenwart eines autoxydablen Farbstoffs abspielt, wird von diesen Autoren wie folgt formuliert:

- a. Dehydrierung des Formiats durch die Formicodehydrogenase ( $\text{DPN}^{\oplus} + \text{HCOO}^{\ominus} \rightarrow \text{DPN-H} + \text{CO}_2$ )
- b. H-Übertragung von DPN-H auf einen weiteren H-Acceptor (z. B. Methylenblau) durch ein DPN-oxydierendes Enzym.

Wie *Erlenmeyer, Schönauer & Süllmann*<sup>4)</sup>, sowie *Thorn*<sup>5)</sup> am Beispiel der Succinodehydrogenase zeigen konnten, sind bei enzymatischen Dehydrierungen dieser Art Isotopieeffekte von beträchtlichem Ausmass zu beobachten. Da uns die erste Stufe der obigen Reaktionsfolge zum Studium von Isotopieeffekten geeignet schien, wurde die Dehydrierung von „leichtem“ ( $\text{HCOO}^-$ ) und „schwerem“ ( $\text{DCOO}^-$ ) Formiat durch pflanzliche Formicodehydrogenase einer vergleichenden Prüfung unterzogen. Gleichzeitig wurde auch untersucht, in welcher Weise der Ersatz von  $\text{H}_2\text{O}$  durch  $\text{D}_2\text{O}$  als Lösungsmittel die Reaktionsgeschwindigkeit der Formiatoxydation zu beeinflussen vermag; dies besonders deshalb, weil nach *Shibata & Watanabe*<sup>6)</sup> nicht nur die Aktivität der Hydrolasen, sondern auch diejenige verschiedener Oxydasen und Dehydrogenasen in  $\text{D}_2\text{O}$  eine beträchtliche Verminderung erfahren soll.

1) *T. Thunberg*, Arch. int. Physiol. **18**, 601 (1921); Skand. Arch. Physiol. **74**, 16 (1936).

2) *E. Adler & M. Sreenivasaya*, Z. physiol. Chem. **249**, 24 (1937).

3) *M. B. Mathews & B. Vennesland*, J. Biol. Chem. **186**, 667 (1950).

4) *H. Erlenmeyer, W. Schönauer & H. Süllmann*, Helv. **19**, 1377 (1936).

5) *M. B. Thorn*, Biochem. J. **49**, 602 (1951).

6) *K. Shibata & A. Watanabe*, Acta phytochim. **15**, 169 (1949).

## Experimenteller Teil.

1. Methodisches. Die Darstellung der gereinigten Formicodihydrogenasepräparate erfolgte nach den Angaben von *Mathews & Vennesland*<sup>7)</sup>. Während ursprünglich Samen von *Pisum* als Ausgangsmaterial dienten, wurden in der Folge denen von *Phaseolus multiflorus L.* der Vorzug gegeben, weil sich die hieraus dargestellten Präparate — in Bestätigung der Befunde von *Davison*<sup>7)</sup> — durch eine grössere Stabilität auszeichnen. Es wurden jeweiligen Mengen von 200—400 g verarbeitet, wobei die getrockneten Bohnen zuerst fein zermahlen und dann pro 100 g Material mit 300 ml 0,1-m. sek. Na-Phosphatlösung bei 20° 1 Std. extrahiert wurden. Die weitere Aufarbeitung des nach Gazefiltration resp. Auspressen des Rückstandes resultierenden Extraktes geschah nach der oben zitierten Vorschrift. Die Ausbeute nach erfolgter Lyophilisierung betrug im Mittel 1,5 g pro 100 g Ausgangsmaterial.

Die manometrische resp. photometrische Bestimmung der Formicodihydrogenase-Aktivität wurde in Anlehnung an *Mathews & Vennesland*<sup>7)</sup> unter folgenden Bedingungen vorgenommen:

a) Zusammensetzung des *Warburg*-Ansatzes zur manometrischen Bestimmung: 0,5 ml einer 4—8-proz. Lösung des lyophilisierten Präparates (entspr. 20—40 mg Protein/Ansatz), je nach Aktivität; 0,25 ml 5-promill. Methylenblau („*Merck*“); 0,25 ml 5-promill. Diphosphopyridin-Nucleotid 75-proz. („*Boehringer*“); 1,0 ml 0,1-m. Phosphatpuffer pH = 7,0; aq. dest. ad 2,5 ml; im Seitenarm 0,5 ml 0,3-m. Na-Formiatlösung; im zentralen Einsatz 0,2 ml 20-proz. KOH. Versuchstemperatur 37°. Versuchsdauer 60 min; Temperaturengleichperiode 15 min. Gasphase: Luft. Da die verwendeten Präparate, welche der Fraktion P 8 von *Mathews & Vennesland* entsprechen, neben Formicodihydrogenase genügende Mengen von DPN-Oxydase (Diaphorase) enthielten, wurde von einer weiteren Zugabe abgesehen. Angabe der Resultate in  $\mu\text{l O}_2/\text{Ansatz/Stunde}$ .

b) Zur spektrophotometrischen Bestimmung der Formicodihydrogenase mit dem *Beckman*-Gerät, Modell DU, diente folgender Ansatz: 1,0 ml 0,1-m. Phosphatpuffer pH = 6,8; 0,5 ml 0,3-m. Na-Formiat; 0,5 ml 2,2-promill. DPN, 75-proz. („*Boehringer*“), Gehalt der Lösung ca. 0,002 m; 0,5 ml Enzym (2,5—5 mg/ml) gelöst in 0,03-m. Phosphatpuffer; aq. dest. ad 3,0 ml. Schichtdicke der Quarzcuvette 1,0 cm. Versuchstemperatur 27,5°. Als Bezugsbasis resp. Kontrolle diente je ein Ansatz ohne Enzym- resp. Formiatzusatz. Die Ablese der Extinktionszunahme (340 m $\mu$ ) nach Enzymzugabe erfolgte in der Regel in Intervallen von 2 min. Bei den Versuchen mit D<sub>2</sub>O (99,8 At.-% D) als Lösungsmittel wurde zur Herstellung des Puffers ein Gemisch von hitzgetrocknetem prim. und sek. Phosphat verwendet.

Bei den als Substrat verwendeten Substanzen handelte es sich um dieselben Na-Formiat-Proben, wie sie von *Aebi, Buser, & Lütthi*<sup>8)</sup> zum Studium der Oxydation mit KMnO<sub>4</sub> benützt worden waren. Das hier zur Anwendung gelangte „schwere“ Formiat (DCOO<sup>-</sup>), welches durch Verseifen von NaCN in D<sub>2</sub>O (99,8 At.-% D) dargestellt worden war, wies einen D-Gehalt von 94% auf.

2. Vergleich der Oxydationsgeschwindigkeiten von HCOO<sup>-</sup> und DCOO<sup>-</sup>. Wie aus Fig. 1 entnommen werden kann, wird „schweres“ Formiat, welches 94 At.-% D enthält, mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit umgesetzt als „leichtes“, und zwar je nach Temperatur und Versuchsdauer etwa 2—3mal langsamer. Die mit der manometrischen Methode und dem optischen Test erzielten Ergebnisse zeigen weitgehende Übereinstimmung. Letzterer Test ist indessen zu bevorzugen, nicht nur weil die spektrophotometrische Verfolgung der DPN-Reduktion rascher und genauer ist, sondern auch, weil ihr eine einstufige Umsetzung zugrunde liegt. Zudem erlaubt sie eine eindeutige Erfassung der Anfangsgeschwindigkeit ( $V_0$ ), während im *Warburg*-Versuch in den ersten 15 Min nach Zukippen der Substratlösung eine „lag-period“ zu beobachten ist. Wird mit einem genügend grossen Überschuss an Formiat und DPN gearbeitet, dann resultiert beim optischen Test — da es sich um eine Reaktion erster Ordnung handelt — ein praktisch

<sup>7)</sup> D. C. Davison, *Biochem. J.* **49**, 520 (1951).

<sup>8)</sup> H. Aebi, W. Buser & Chr. Lütthi, *Helv.* **39**, 944 (1956).

linearer Verlauf der Extinktionszunahme. Die bei länger dauernden Versuchen zu beobachtende Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit ist nach *Mathews & Vennesland*<sup>3)</sup> teils auf die Abnahme der Substratkonzentration, teils aber auch auf den gleichzeitig erfolgenden enzymatischen Abbau des DPN zurückzuführen.

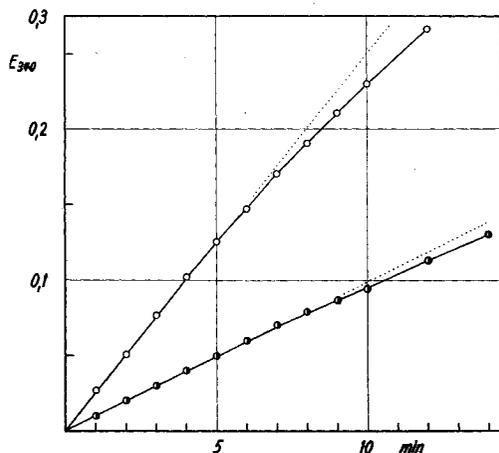


Fig. 1.

Oxydation von  $\text{HCOO}^-$  (○) und von  $\text{DCOO}^-$  (●) gemessen im optischen Test.  
Ordinate: Extinktion bei 340  $\mu$ .

3. Oxydation von  $\text{HCOO}^-/\text{DCOO}^-$ -Gemischen verschiedener Zusammensetzung. Da  $\text{HCOO}^-$  und  $\text{DCOO}^-$  als zwei verschiedene Substrate betrachtet werden dürfen, die von demselben Enzym mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden, ist die von *Thorn*<sup>9)</sup> sowie von *Whittaker & Adams*<sup>10)</sup> formulierte „2-Substrat-Gleichung“ auch auf diesen Fall anwendbar. Zur Diskussion dieser Gleichung ist die Kenntnis der Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_0$ ) als Funktion des Mischungsverhältnisses der beiden Substrate Voraussetzung. Wie aus Fig. 2 hervorgeht, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem Deuterierungsgrad des Substrates ab, wobei eine Durchbiegung der resultierenden Verbindungslinie nicht nachweisbar ist.

4. Bestimmung der *Michaelis*-Konstanten ( $K_m$ ) für  $\text{HCOO}^-$  und  $\text{DCOO}^-$ . Wird die hier meist verwendete Substratkonzentration von 50 m molar schrittweise herabgesetzt, so kommt es zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit; das in Fig. 1 zur Darstellung gebrachte Verhältnis zwischen den beiden Reaktionsgeschwindigkeiten ändert sich indessen bei gleichbleibender Temperatur nicht messbar. Dieser Befund spricht dafür, dass die Dissoziationskonstanten der Enzym-Substrat-Zwischenverbindung für  $\text{HCOO}^-$  und für  $\text{DCOO}^-$  von ungefähr gleicher Grösse sind. Die graphische Auswertung zweier entsprechender pS-Kurven nach *Lineweaver & Burk*<sup>11)</sup> ist in Fig. 3 dargestellt und ergibt ein Verhältnis zwischen den beiden *Michaelis*-Konstanten ( $K_{m(\text{DCOO}^-)} : K_{m(\text{HCOO}^-)}$ ), welches nur wenig über 1 liegt. In je 5 Bestimmungen umfassenden Versuchsreihen (optischer Test) sind für 27,5° die folgenden Absolutwerte ermittelt worden:  $K_{m(\text{HCOO}^-)} = 2,7 \cdot 10^{-3}$ -m. (Extremwerte: 2,6 — 2,8 · 10<sup>-3</sup>);  $K_{m(\text{DCOO}^-)} = 3,1 \cdot 10^{-3}$ -m. (Extremwerte: 2,8 — 3,6 · 10<sup>-3</sup>). Der auf den Mittelwerten beruhende Quotient beträgt somit  $K_{m(\text{DCOO}^-)} : K_{m(\text{HCOO}^-)} = 1,15$ . Orientierende Versuche bei anderen Temperaturen haben ergeben, dass eine Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten besteht. Bei 37,5° sind sie grösser, bei 17,5° dagegen 20—25% kleiner.

<sup>9)</sup> M. B. Thorn, *Nature* **164**, 27 (1949).

<sup>10)</sup> V. P. Whittaker & D. H. Adams, *Nature* **164**, 315 (1949).

<sup>11)</sup> H. Lineweaver & D. Burk, *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 658 (1934).

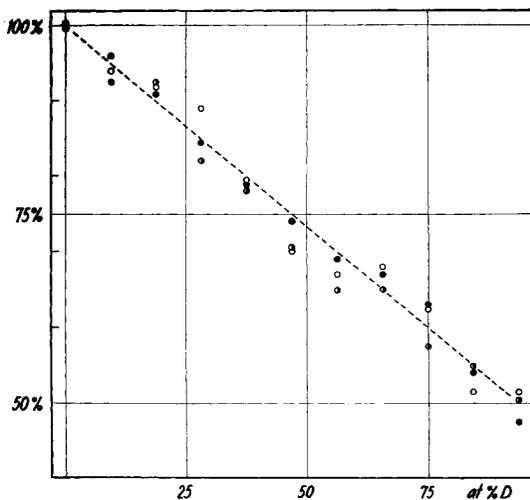


Fig. 2.

Abhängigkeit der Oxydationsgeschwindigkeit vom Mischungsverhältnis des Substrates ( $\text{DCOO}^-/\text{HCOO}^-$ ). Daten aus 3 Warburg-Versuchen.

Ordinate:  $\text{O}_2$ -Verbrauch / 30 min in den Ansätzen mit  $\text{HCOO}^- = 100\%$ .

Abszisse: Prozentualer Anteil  $\text{DCOO}^-$  im Formiat.

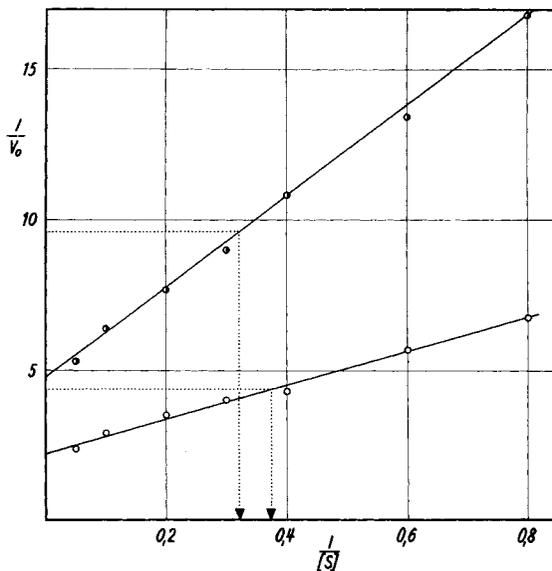


Fig. 3.

Reaktionsgeschwindigkeit bei variabler Substratkonzentration von  $\text{HCOO}^-$  (○) und  $\text{DCOO}^-$  (●).

Ordinate:  $1/V_0$ . Abszisse:  $1/S$  (mMol/l).

Die mit der manometrischen Methodik für 37,5° ermittelten *Michaelis*-Konstanten sind wesentlich grösser und liegen im Bereich des von *Adler & Sreenivasaya*<sup>2)</sup> gefundenen Wertes von  $K_m = 7 \cdot 10^{-3}$ -m. Wird der in den ersten 30 min gemessene  $O_2$ -Verbrauch nach Abzug des Blindwertes der Berechnung zugrundegelegt, dann ergeben sich im Mittel von je 5 Einzelbestimmungen folgende Grössen:  $K_{m(HCOO^-)} = 5,9 \cdot 10^{-3}$ -m. (Extremwerte 5,4—6,8  $\cdot 10^{-3}$ );  $K_{m(DCOO^-)} = 6,1 \cdot 10^{-3}$ -m. (Extremwerte 5,0—8,4  $\cdot 10^{-3}$ ). Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich diese Werte auf die bei Versuchsbeginn herrschende Substratkonzentration beziehen, welche während der Inkubierung besonders in den Ansätzen mit geringer Substratkonzentration stark abfällt. Aus diesen methodischen Gründen müssen die manometrisch ermittelten *Michaelis*-Konstanten als zu hoch angesehen werden.

5. Einfluss der Versuchstemperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Bei systematischer Variation der Versuchstemperatur hat sich gezeigt, dass die enzymatische Dehydrierung des „schweren“ Formiats ( $DCOO^-$ ) stärker temperaturabhängig ist als diejenige von  $HCOO^-$ . Mit der manometrischen Methodik ergeben sich beim Vergleich zwischen 27 und 37° Unterschiede in der  $O_2$ -Aufnahme, welche  $Q_{10}$ -Werten von 1,9 ( $HCOO^-$ ), resp. 2,4 ( $DCOO^-$ ) entsprechen. Die Temperaturabhängigkeit der im optischen Test im Bereich von 16—37° gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten ( $V_0$ ) zeigt dasselbe Verhalten: Während bei 16° das Verhältnis der beiden Reaktionsgeschwindigkeiten  $V_0(HCOO^-) : V_0(DCOO^-) \sim 3$  beträgt, verkleinert sich dieser Quotient mit steigender Temperatur und ist bei 37° nur noch  $\sim 2$ . Die auf Grund der *Arrhenius*'schen Gleichung ausgeführte Berechnung der für die Umsetzung dieser beiden Substrate erforderlichen Aktivierungsenergien ( $E$ ) führt zu den in Tab. 1 angegebenen Werten.

Tabelle 1.

Versuch Nr.	Enzymmenge	Aktivierungsenergie der Formicodehydrogenase Substrat:	
		$HCOO^-$	$DCOO^-$
52	5,0 mg	11 680 cal/mol	15 220 cal/mol
53	2,5 mg	11 690	15 250
54	2,5 mg	11 710	14 700
55	2,5 mg	12 510	14 570
61	2,5 mg	11 890	—
Mittel	—	11 900 $\pm$ 150	14 935 $\pm$ 170

Diese Einzelbestimmungen beruhen auf den mit demselben Ansatz Enzymlösung bei 4—5 verschiedenen Temperaturen im Bereich von 14—37,5° optisch gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten. Es ergibt sich im Mittel ein Unterschied zwischen den beiden Aktivierungsenergien ( $E$ ) von ca. 3000 cal/Mol. Die in Tab. 1 angegebenen Werte erhält man dann, wenn das Enzym völlig mit Substrat gesättigt ist. Bei der dort verwendeten Formiatkonzentration von 50 molar ( $[S] \gg K_m$ ) ist dies der Fall. Wenn dagegen bei kleinerer Substratkonzentration gearbeitet wird ( $[S] \sim K_m$ ), so ergeben sich infolge der bestehenden Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstante der Enzym-Substrat-Zwischenverbindung ( $K_m$ ) zu niedrige Werte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass nun nicht nur die Umsetzungsgeschwindigkeit an sich, sondern auch der variable Sättigungsgrad des Enzyms mit Substrat den Reaktionsablauf mitbestimmt. Die Auswertung der bei verschiedener Temperatur aufgenommenen pS-Kurven ergibt für eine Anfangskonzentration von 5-m molar (scheinbare) Beträge für die Aktivierungsenergie von  $E(HCOO^-) \sim 9000$  und  $E(DCOO^-) \sim 12000$  cal/mol.

6. Vergleich des Reaktionsablaufes in  $H_2O$  und  $D_2O$ . Wählt man als Lösungsmittel  $D_2O$  anstelle von  $H_2O$ , so ist im optischen Test bei 27,5° eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_0$ ) von 25% festzustellen. Wird  $DCOO^-$  als Substrat gewählt, so ist bei dieser Versuchstemperatur überhaupt keine Verzögerung der Reaktion erkennbar.

In beiden Fällen ist indessen die Temperaturabhängigkeit in  $D_2O$  grösser. Fig. 4 zeigt, dass sich die beiden Regressionslinien für  $HCOO^-$  im obersten Teil des experimentell zugänglichen Temperaturbereiches recht nahe kommen, während sich diejenigen für  $DCOO^-$  in der Gegend von  $25-28^\circ$  überschneiden. Dies erklärt den Befund, dass „schweres“ Formiat in  $D_2O$  mit grösserer Geschwindigkeit dehydriert wird als in  $H_2O$ , sofern eine genügend hohe Versuchstemperatur gewählt wird. Die Grösse der Aktivierungsenergie der in

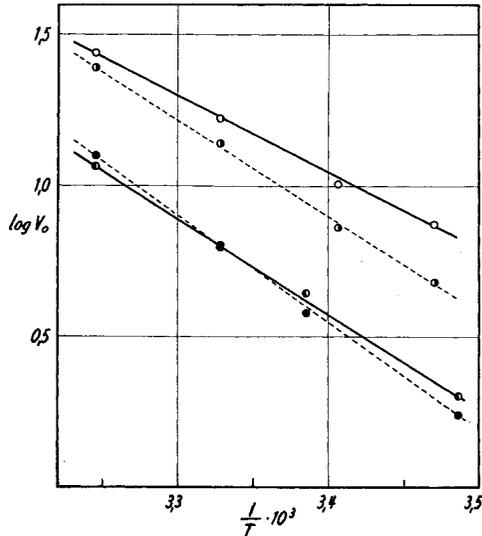


Fig. 4.

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur.

- a) Lösungsmittel  $H_2O$ : —○— =  $HCOO^-$   
                                   —●— =  $DCOO^-$   
 b) Lösungsmittel  $D_2O$ : - -○ - - =  $HCOO^-$   
                                   - -● - - =  $DCOO^-$

schwerem Wasser ablaufenden Reaktionen ist für  $HCOO^-$  im Mittel von 3 Bestimmungen zu  $E = 14330 \pm 260$  cal/Mol. und für  $DCOO^-$  zu  $E = 16010 \pm 120$  cal/Mol. bestimmt worden. Die Differenz zwischen diesen beiden in  $D_2O$  gemessenen Grössen von 1680 cal/Mol. ist somit wesentlich kleiner als diejenige von ca. 3000 cal/Mol., wie sie zwischen den in  $H_2O$  gemessenen Aktivierungsenergien besteht.

7. Die Dehydrierung der reduzierten Co-Dehydrogenase I (DPN). Bei Gegenwart von reduziertem DPN, sowie von Methylenblau als H-Acceptor lässt sich nach *Mathews & Vennesland*<sup>3)</sup> auch die zweite Stufe des oben erwähnten Dehydrierungsvorganges photometrisch verfolgen. Zu diesem Zweck ist als Substrat auf enzymatischem Wege reduziertes DPN verwendet worden, hergestellt nach den Angaben obiger Autoren unter Benützung von  $HCOO^-$  und  $DCOO^-$ . Da die Reduktion des DPN durch  $DCOO^-$  langsamer vor sich geht und sich auf enzymatischem Wege in beiden Fällen nur unvollständig durchführen lässt, ist durch entsprechende Wahl der Inkubierungszeit ein übereinstimmender Gehalt der Ansätze an reduziertem DPN zu erzielen versucht worden (40—75%). Vergleicht man die Geschwindigkeiten, mit denen diese beiden reduzierten DPN-Präparate dehydriert werden, so lässt sich bei  $27,5^\circ$  kein signifikanter Unterschied feststellen. Während das Ausbleiben eines Aktivitätsunterschiedes gewisse Folgerungen erlaubt, darf aus den im optischen Test beobachteten Extinktionsabnahmen nicht auf die Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_0$ ) selbst geschlossen werden. Deswegen nicht, weil das verwendete

Enzympräparat neben der hier untersuchten DPN-oxydierenden Aktivität auch noch Formicodehydrogenase enthält und weil das verwendete Substrat infolge der unvollständigen Hydrierung noch beträchtliche Mengen an oxydiertem DPN aufweist. Das Bestehen eines ausgeprägten Isotopie-Effektes bei der Dehydrierung des Formiates, sowie das Ausbleiben eines solchen bei der Wasserstoffübertragung von DPN auf Methylenblau, lässt sich im gleichen Versuchsansatz demonstrieren. Dieses Vorgehen ermöglicht zugleich eine orientierende Beurteilung der beiden hier interessierenden Enzymaktivitäten. Es besteht darin, dass zunächst die Bestimmung der Formicodehydrogenase-Aktivität in beschriebener Weise vorgenommen wird, wobei die DPN-Konzentration nicht zu gross zu wählen ist, damit die Reduktion des überwiegenden Teiles des DPN innert ca. 1 Std. erfolgen kann.

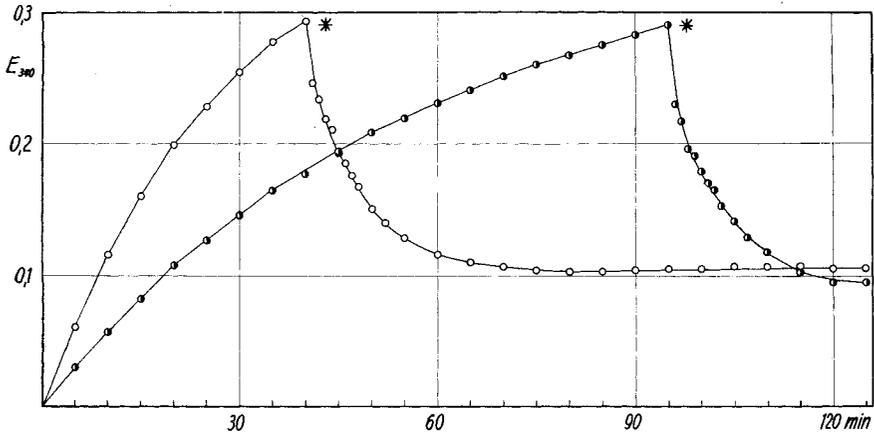


Fig. 5.

Zeitlicher Verlauf der Reduktion und Re-Oxydation von DPN durch Formicodehydrogenase resp. DPN-Oxydase.

Ordinate: Extinktion bei 340  $\mu$ .

Substrat: HCOO<sup>-</sup> (○); DCOO<sup>-</sup> (●). Methylenblauzugabe bei \*.

Sobald die Extinktion nur noch wenig ansteigt, wird Methylenblau (0,3 ml 0,5-promill.) zugesetzt. Der nun zu beobachtende Extinktionsabfall dient als Mass für die Dehydrierungsgeschwindigkeit des in der ersten Phase gebildeten reduzierten DPN. Fig. 5 gibt den in beiden Fällen analogen Kurvenverlauf wieder, wie er nach Abzug der dem Methylenblau selbst zukommenden Extinktion resultiert. Bei einer Endkonzentration von 0,05<sup>0/100</sup> (= 1,57 · 10<sup>-4</sup>-m.) Methylenblau beträgt diese Ext. <sub>340</sub> = 0,54. Die sich nach der Methylenblauzugabe neu einstellende Gleichgewichtslage dürfte vor allem durch das Aktivitätsverhältnis, das zwischen beiden Enzymen besteht, gegeben sein. Es kann aus dieser Darstellung ferner entnommen werden, dass im hier verwendeten Präparat (P 8) die Aktivität bezüglich Dehydrierung von DPN-H diejenige der Formicodehydrogenase zu überwiegen scheint. Diese Feststellung ist auch im Hinblick auf die oben beschriebenen Warburg-Versuche von Bedeutung, indem sie die dort gemachte Annahme stützt, wonach die Formicodehydrogenase-Aktivität als der umsatzbegrenzende Faktor des Systems anzusehen ist.

### Diskussion.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die ausgeprägten Isotopie-Effekte, welche bei der Formicodehydrogenase bestehen, nur zum kleinsten Teil auf die Ungleichheit der *Michaelis*-Konstanten (*K<sub>m</sub>*) zurückzuführen sind. Es ist hiefür vielmehr die recht unterschiedliche Grösse der Aktivierungsenergie (*E*) verantwortlich zu machen,

welche ihrerseits die Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) massgeblich beeinflusst. Vergleicht man in dieser Hinsicht die Formicodehydrogenase mit der von *Thorn*<sup>5)</sup> untersuchten Succinodehydrogenase, so ist ein gegensätzliches Verhalten festzustellen. Während bei der Formicodehydrogenase die Affinität Enzym-Substrat ( $1/K_m$ ) durch die Art des Wasserstoffisotops praktisch nicht beeinflusst wird, ist dies bei der Succinodehydrogenase in ausgesprochenem Masse der Fall. Nach *Thorn*<sup>5)</sup> beträgt der Quotient aus den direkt bestimmten *Michaelis*-Konstanten  $K_m^{(D)} : K_m^{(H)} = 1,8$ , wobei zu berücksichtigen ist, dass das verwendete Tetradeutero-succinat in den  $CH_2$ -Gruppen einen D-Gehalt von nur 77 At-% aufweist. Es ist wahrscheinlich, dass dieses Verhältnis bei Verwendung eines Substrates von höherem Deuterierungsgrad noch grösser ausgefallen wäre. Demgegenüber differieren die Aktivierungsenergien für Succinat und Tetradeutero-succinat nur um 1450 cal/Mol., was etwa der Hälfte des hier gemessenen Unterschiedes entspricht. Es scheinen somit die beiden Faktoren (Aktivierungsenergie und Affinität Enzym-Substrat) am Zustandekommen von Isotopieeffekten je nach Ferment in verschiedenem Ausmass beteiligt zu sein.

Welcher der beiden Faktoren vorherrscht, lässt sich u. a. dadurch entscheiden, dass bei konstanter Substratkonzentration das Mischungsverhältnis H : D variiert wird. Besteht kein Affinitätsunterschied ( $K_m^{(D)} = K_m^{(H)}$ ), so resultiert eine lineare Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_0$ ) und Mischungsverhältnis (vgl. Fig. 2). Je mehr dagegen der Quotient  $K_m^{(D)} : K_m^{(H)}$  über 1 ansteigt, desto stärker wird die Durchbiegung der nach oben konvexen Kurve. Dies ist darauf zurückzuführen, dass nun dasjenige der beiden Substrate, gegenüber welchem das Enzym die grössere Affinität aufweist, bevorzugt umgesetzt wird. Die Verwendung dieses Funktionsverlaufes zur Bestimmung des Verhältnisses  $K_m^{(D)} : K_m^{(H)}$  hat – neben einer genauen Methodik – zur Voraussetzung, dass derjenige Abschnitt der Kurve experimentell zugänglich ist, in welchem Steigung und Konvexität ein Maximum erreichen ( $D \gg H$ ;  $D \rightarrow 100$  At.-%). Diese Voraussetzungen sind in dieser Arbeit nur teilweise, bei *Thorn*<sup>5)</sup> in noch geringerem Ausmass erfüllt. Die von diesem Autor ausgeführte Extrapolation (von 77 auf 100%) ist angesichts des asymmetrischen Kurvenverlaufs kaum statthaft und ergibt zu niedrige Werte. Die Diskussion der enzymkinetischen Aspekte dieses Problems ist an anderer Stelle vorgesehen.

Gegen beide dieser Untersuchungen lässt sich einwenden, dass nicht oder nur wenig gereinigte Enzympräparate zur Verwendung gelangt sind. Es ist durchaus möglich, dass die ermittelten Absolutwerte bei Verwendung von Reinenzymen gewisse Korrekturen erfahren werden. Die Isotopieeffekte an sich dürften kaum beeinflusst werden.

Das Bestehen eines Isotopie-Effektes, sowie dessen Ausmass erlauben nun gewisse Aussagen über den Mechanismus zu machen, der dieser Reaktion zugrundeliegt. Nach *Bartlett & Tate*<sup>12)</sup> ist der Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{(H)}/k_{(D)}$ , dann klein ( $\sim 2$ ), wenn es sich beim limitierenden Vorgang um eine Übertragung von H- bzw. D-Atomen handelt; er ist dagegen gross (4–10) bei einem Transfer von Protonen. Bei der Dehydrierung von Formiat durch pflanzliche Formicodehydrogenase dürfte das erstere zutreffen, während bei der Formiatoxydation durch alkalisches  $KMnO_4$  nach *Wiberg & Stewart*<sup>13)</sup>, sowie *Aebi, Buser & Lüthi*<sup>8)</sup> das letztere der Fall ist.

Die Tatsache, dass bei der Dehydrierung des durch  $HCOO^-$  resp.  $DCOO^-$  reduzierten DPN ein Isotopie-Effekt ausbleibt, steht in scheinbarem Widerspruch zu den oben gemachten Angaben. Zum Verständnis dieses Befundes sind Untersuchungen von *Vennesland* und Mitarbeiter<sup>14)</sup> wegweisend. Sie haben in einer Reihe von glänzenden Tracer-Versuchen gezeigt, dass die enzymatische Hydrierung und Dehydrierung von DPN einer strengen Stereospezifität unterliegt, welche für die betreffende Transhydrogenase typisch ist. Bei mehrstufigen Reaktionen kann dies eine „indirekte“ H-Übertragung zur Folge haben. Dabei wird vom Pyridinring des reduzierten DPN nicht dasselbe H (resp. D)-Atom abgenommen, welches zuvor vom Donatorsystem übertragen worden ist, sondern das jenem gegenüberliegende. Es ist möglich, dass auch bei der Formiatoxydation eine Situation vorliegt, wie sie von *Levy, Graves & Vennesland*<sup>15)</sup> für das System (Glucose-1-Dehydrogenase, DPN, Milchsäuredehydrogenase) beschrieben worden ist.

Der Schweizerischen Studienkommission für Atomenergie sei für finanzielle Unterstützung sowie für Versuchsmengen von  $D_2O$  hiermit bestens gedankt.

#### SUMMARY.

The oxidation of  $HCOO^-$  and  $DCOO^-$  by plant formicodehydrogenase in presence of DPN has been measured manometrically and spectrophotometrically. There is an isotopic effect, the factor of reaction rates varying with temperature from 2 to 3.

The apparent activation energies have been determined as  $E(HCOO^-) = 11900$  and  $E(DCOO^-) = 14900$  cal/mol. Using  $D_2O$  as a solvent the figures are 10–20% higher.

<sup>12)</sup> *P. D. Bartlett & F. A. Tate*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 91 (1953).

<sup>13)</sup> *K. B. Wiberg & R. Stewart*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1214 (1956).

<sup>14)</sup> *H. F. Fisher, E. E. Conn, B. Vennesland & F. H. Westheimer*, J. Biol. Chemistry **202**, 687 (1953); *F. A. Loewus, F. H. Westheimer & B. Vennesland*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5018 (1953); *F. A. Loewus, P. Ofner, H. F. Fisher, F. H. Westheimer & B. Vennesland*, J. Biol. Chemistry **202**, 699 (1953).

<sup>15)</sup> *H. R. Levy, J. L. Graves & B. Vennesland*, Fed. Proc. **15**, 300 (1956).

There is only a slight difference between the corresponding *Michaelis* constants ( $K_{m(\text{HCOO}^-)} = 2,7 \cdot 10^{-3}\text{-m.}$ ;  $K_{m(\text{DCOO}^-)} = 3,1 \cdot 10^{-3}\text{-m.}$ ). Consequently there is an almost linear relationship between the rates of reaction and the ratio ( $\text{HCOO}^-/\text{DCOO}^-$ ).

No isotopic effect can be observed in the reoxidation of the reduced DPN.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern.

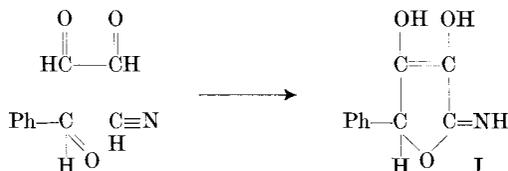
## 210. Über 5,6-Diaryl-3,4,5-trihydroxy-5,6-dihydro-2-pyridonimide.

6. Mitteilung über Reduktone<sup>1)</sup>

von H. Dahn, R. Fischer und Lotte Loewe.

(27. VIII. 56.)

In früheren Mitteilungen<sup>2)3)</sup> wurde gezeigt, dass sich aromatische und heterocyclisch-aromatische Aldehyde mit Glyoxal und Cyanidionen in wässrigem Milieu von pH 6–9 bei Zimmertemperatur leicht in guter Ausbeute zu 4-Aryl-2-hydroxytetronimiden, z. B. I verbinden. Stoffe von diesem Typus beanspruchen Interesse, weil sie als konjugiert stabilisierte Endiole zur Klasse der Reduktone<sup>4)</sup> gehören.



Bei systematischen Versuchen zur Verbesserung der Ausbeute an I fanden wir, dass unter veränderten Mengenverhältnissen aus den gleichen Komponenten Benzaldehyd, Glyoxal und Kaliumcyanid im gleichen Milieu ein neues Redukton vom Zersetzungspunkt  $198^\circ$  neben oder an Stelle von I gebildet wird. Dabei erwies sich das Molverhältnis Benzaldehyd : Cyanid als ausschlaggebend: bei Cyanidüberschuss entstand I, bei Anwendung molarer Verhältnisse bildeten sich nebeneinander etwa gleiche Mengen an I und an neuem Redukton, das noch erheblich schwerer löslich ist als I und sich daher leicht abtrennen liess. Die optimale Ausbeute an diesem Stoff (45%) wurde

<sup>1)</sup> 5. Mitteilung: H. Dahn & H. Hauth, Helv. **39**, 1366 (1956).

<sup>2)</sup> H. Dahn, J. S. Lawendel, E. F. Hoegger, R. Fischer & E. Schenker, Experientia **10**, 245 (1954).

<sup>3)</sup> H. Dahn, J. S. Lawendel, E. F. Hoegger & E. Schenker, Helv. **37**, 1309 (1954).

<sup>4)</sup> H. v. Euler & H. Hasselquist, Die Reduktone (Stuttgart 1950).