

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Erhitzen lagert sich das aus Tubotaiwin erhaltliche Indolenin Condyfolin teilweise in Tubifolin und reversibel in 20-*epi*-Condyfolin um. Tubifolin und Condyfolin liefern mit Kaliumboranat dasselbe Indol VIII, das sich durch Dehydrierung mit Sauerstoff wiederum in Tubifolin und Condyfolin zurückumwandeln lässt. Durch diese Umwandlungen finden die für Condylocarpin und Tubotaiwin aufgestellten Strukturen eine Bestätigung; gleichzeitig ist damit die absolute Konfiguration dieser Alkaloide und des Stemmadenins bestimmt. In allen diesen Alkaloiden besitzt das Zentrum 15 dieselbe absolute Konfiguration. Auf die mögliche Bedeutung des Indols X als Vorläufer für die Biogenese dieser Alkaloide wird hingewiesen.

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich

224. Die Stereospezifität der Leberalkoholdehydrogenase

von B. Hadorn, F. Leuthardt, E. Ménard und D. Vischer

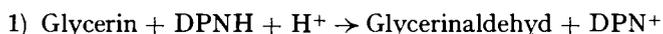
Herrn Prof. TH. POSTERNAK zum 60. Geburtstag gewidmet

(10. VII. 63)

In der Leber der Ratte haben LEUTHARDT & WOLF¹⁾ eine Dehydrogenase nachgewiesen, welche Glycerin dehydriert; HOLZER & SCHNEIDER²⁾ haben das Enzym mit der schon lange bekannten Alkoholdehydrogenase der Leber identifiziert. LEUTHARDT & WOLF³⁾ stellten fest, dass die Dehydrogenase den L-Glycerinaldehyd schneller hydriert als den D-Glycerinaldehyd. Die Alkoholdehydrogenase der Hefe reagiert, im Gegensatz zum Leberenzym, nicht mit Glycerin oder Glycerinaldehyd.

Die Frage, ob auch der umgekehrte Weg, die Dehydrierung des Glycerins, optisch spezifisch verläuft, d. h. vorwiegend oder ganz zum einen Enantiomeren des Aldehyds führt, war der Anlass für die vorliegenden Untersuchungen. Wir liessen Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber in Gegenwart von Diphosphopyridin-nucleotid auf Glycerin einwirken. Um die Natur des entstandenen Glycerinaldehyds festzustellen, kondensierten wir denselben enzymatisch mit Phosphodihydroxy-aceton. D-Glycerinaldehyd muss dabei D-Fructose-1-phosphat, L-Glycerinaldehyd L-Sorbose-1-phosphat liefern. Phosphodihydroxyaceton wurde im Versuchsansatz aus Hexosediphosphat durch zugesetzte kristallisierte Muskelaldolase und Triosephosphat-isomerase gebildet. Um das bei der Dehydrierung des Glycerins gebildete reduzierte Diphosphopyridin-nucleotid wieder zu oxydieren, wurde dem Ansatz BARANOWSKI-Ferment (α -Glycerophosphat-dehydrogenase) zugesetzt.

Es ergeben sich also folgende Teilreaktionen:



¹⁾ F. LEUTHARDT & H. P. WOLF, Helv. 36, 1463 (1953).

²⁾ H. HOLZER & S. SCHNEIDER, Klin. Wschr. 33, 1006 (1955); Angew. Chem. 67, 276 (1955).

³⁾ F. LEUTHARDT & H. P. WOLF, Helv. 37, 1732 (1954).

- 2) Hexosediphosphat \rightarrow 2 Phosphodihydroxyaceton
- 3) Glycerinaldehyd + Phosphodihydroxyaceton \rightarrow Ketose-1-phosphat
- 4) DPNH + H⁺ + Phosphodihydroxyaceton \rightarrow DPN⁺ + α -Glycerophosphat

Bilanz: Glycerin + Hexosediphosphat \rightarrow Ketose-1-phosphat + α -Glycerophosphat

Die Zuckerphosphate wurden nach Enteiweissung des Fermentansatzes als Bariumsalze gefällt und anschliessend im kochenden Wasserbad in 1 N H₂SO₄ während 20 Minuten hydrolysiert. Die so freigesetzten Ketohexosen wurden zunächst

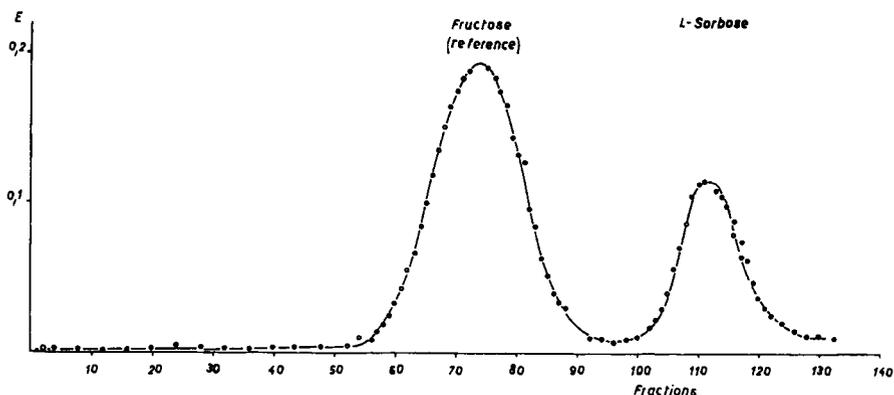


Fig. 1a. Säulenchromatogramm der enzymatisch gebildeten Ketohexosen (siehe Text)
Als Vergleichssubstanz wurden 10 mg Fructose aufgetragen.

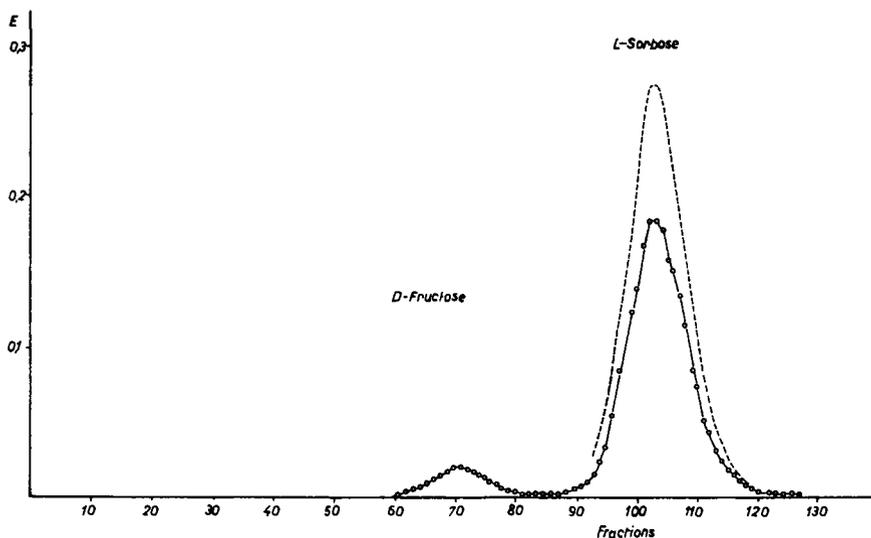


Fig. 1b. Säulenchromatogramm der Ketohexosen

Gipfel links: D-Fructose, Gipfel rechts: L-Sorbose. Gestrichelte Kurven: korrigierte Farbwerte der Sorbose zum Vergleich der gebildeten Menge L-Sorbose und D-Fructose.

durch Papierchromatographie und anschliessende Behandlung der Chromatogramme mit gewaschener Hefe nach WEINLAND & MAY⁴⁾ charakterisiert. Der im Fermentansatz gebildete Zucker zeigte den Rf-Wert einer Ketohehexose und wurde nicht vergärt. Es musste sich also unter den gegebenen Bedingungen um L-Sorbose handeln. Dieses Ergebnis liess somit vermuten, dass Glycerin vorwiegend zu L-Glycerinaldehyd oxydiert worden war.

Die Zucker wurden darauf als Boratkomplexe auf einer Säule von Dowex 1 nach KHYM & ZILL⁵⁾ identifiziert. Entwickelt man das Chromatogramm mit einem linear ansteigenden Gradienten von Natriumtetraborat (0,018–0,036 M), so wird D-Fructose rascher eluiert als L-Sorbose; die beiden Ketohehexosen lassen sich sauber voneinander trennen (vgl. Fig. 1 a und 1 b).

Man erkennt, dass im Fermentansatz vorwiegend L-Sorbose entstanden ist, neben wenig D-Fructose. Die Dehydrierung des Glycerins durch die Alkoholdehydrogenase der Pferdeleber führt daher fast ausschliesslich zum L-Glycerinaldehyd. Fig. 2 veranschaulicht in schematischer Weise, wie je nach der Bindung der Glycerinmolekel an das Fermentprotein die Dehydrierung einmal zur Bildung der L-Form, das andere Mal zur Bildung der D-Form des Glycerinaldehyds führen kann. Offenbar ist die erste Bindungsart stark bevorzugt. Unsere Beobachtungen liefern einen neuen Beweis für die «biologische Asymmetrie» des Glycerins⁶⁾.

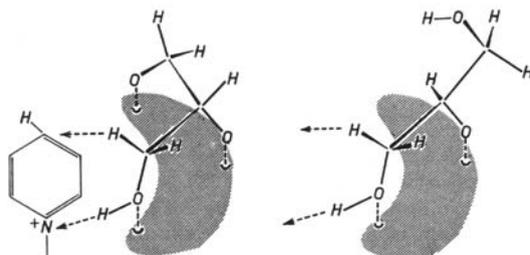


Fig. 2. Schematische Darstellung der Bindung des Glycerins an das Fermentprotein (schraffierte Fläche)

Links: bei Dehydrierung zum L-Glycerinaldehyd;
rechts: bei Dehydrierung zum D-Glycerinaldehyd.

LEUTHARDT & WOLF³⁾ haben für die MICHAELIS-Konstante der Glycerinaldehyddehydrogenase (Alkoholdehydrogenase) der Rattenleber gegenüber D-Glycerinaldehyd den Wert von $1,1 \times 10^{-2}$ Mol/l bei 18° gefunden. Die MICHAELIS-Konstante der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber gegenüber Glycerin ergab bei 40° den Wert von $1,0 \times 10^{-1}$ Mol/l (vgl. Fig. 3).

Schliesslich wurde der Versuch noch unter Verwendung von Glycerin-[1-¹⁴C] durchgeführt. Die gebildete Ketohehexose zeigte, wie zu erwarten war, die halbe spezifische Aktivität des eingesetzten Glycerins (vgl. Tabelle 2).

⁴⁾ H. WEINLAND & F. MAY, Z. physiol. Chem. 293, 153 (1953).

⁵⁾ J. X. KHYM & P. ZILL, J. Amer. chem. Soc. 73, 2399 (1951); 74, 2090 (1952).

⁶⁾ H. O. L. FISCHER & E. BAER, J. biol. Chemistry 128, 491 (1939); M. KARNOWSKY, G. HAUSER & D. ELWYN, *ibid.* 226, 881 (1957).

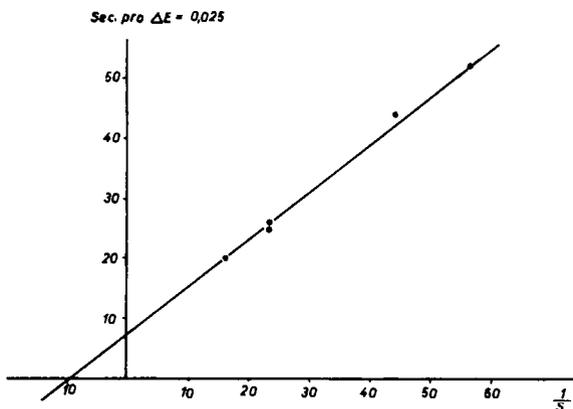


Fig. 3. Bestimmung der MICHAELIS-Konstanten der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber mit Glycerin als Substrat

Abszisse: Reziproke Substratkonzentration ($l \cdot \text{Mol}^{-1}$). Ordinate: Reziproke Geschwindigkeit der Reaktion (Sekunden für $\Delta E = 0,025$ bei $366 \text{ m}\mu$). Schnittpunkt ergibt $K_M = 1,05 \cdot 10^{-1} \text{ Mol/l}$.

Experimenteller Teil

A. Methoden⁷⁾. – 1. Vorbereitung der Enzymlösungen für den enzymatischen Ansatz.

a) *Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber* (bezogen von BOEHRINGER, Mannheim). Da die im Handel erhältliche Enzymsuspension 10% Äthanol enthält, wurden 6 ml = 6 mg Protein dieser Suspension während 3 Stunden und nach Wechseln des Dialysierbades während weiterer 3 Stunden bei 4° gegen 6 l 6-proz. wässrige Glycerinlösung dialysiert. Alkoholdehydrogenase ist nur in Gegenwart eines Substrats stabil.

b) *Enzymgemisch bestehend aus: Aldolase aus Kaninchenmuskel⁸⁾, α -Glycerophosphat-dehydrogenase und Triosephosphat-isomerase aus Kaninchenmuskel* (bezogen von BOEHRINGER, Mannheim). Von einer Suspension kristallisierter Muskelaldolase aus Kaninchenmuskel in 1,9M Ammoniumsulfat wurden 3 ml (3 mg Enzymprotein) mit 2 ml (4 mg des Enzymgemisches) von α -Glycerophosphat-dehydrogenase und Triosephosphat-isomerase (BOEHRINGER, Mannheim) (Verhältnis GDH/TIM: 10 : 1 bezogen auf Protein, ca. 1 : 3 bezogen auf Aktivitäten) vermischt und gegen 7 l 0,05M Tris-HCl-Puffer vom pH 7,5 bei 4° während 12 Std. dialysiert.

2. *Enzymatischer Ansatz*. Enzyme, Substrate und Coenzym wurden in den in der Tabelle 1 angegebenen Mengenverhältnissen in 50 ml 0,05M Tris-HCl-Puffer vom pH 7,5 gelöst und während 3 Std. im Wasserbad bei 40° inkubiert. Nach 2 Std. Inkubation wurden jeweils 30 mg Alkoholdehydrogenase = ca. 5500 BÜCHER-Einheiten⁹⁾ zugegeben, um Verluste an aktivem Enzymprotein auszugleichen.

3. *Isolierung des im enzymatischen Ansatz gebildeten Ketosemonophosphats*. Der Ansatz wurde mit Trichloressigsäure enteisst und mit wasserfreier Soda unter Kühlung mit Eis neutralisiert. Anschliessend wurde das Volumen des Ansatzes am Rotationsverdampfer (maximale Temperatur: 40°) auf 5 ml eingengt. Die gesamten Zuckerphosphate wurden durch Zusatz von gesättigter Bariumacetatlösung und anschliessender Zugabe des 3fachen Volumens an Äthanol gefällt. Die Fällung wurde nach 15stdg. Stehen (bei 4°) auszentrifugiert und zuerst mit Alkohol-Wassergemisch 3 : 1 und schliesslich mit absolutem Äthanol gewaschen, im Hochvakuum getrocknet und gewogen. Es wurden 300–400 mg Bariumsalz gewonnen, welches neben Hexosemonophosphat

⁷⁾ Abkürzungen: FDP-Na = Fructose-1,6-diphosphat-Natriumsalz; DPN = Diphosphopyridin-nucleotid; Komplexon III = Dinatriumsalz der Äthylendiamin-tetraessigsäure; Tris = Tris-hydroxymethyl-aminomethan.

⁸⁾ Herrn Dr. H. GÖSCHKE danken wir für die Präparation der kristallisierten Muskelaldolase.

⁹⁾ G. BEISENHERZ, H. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. *8b*, 555 (1953).

Tabelle 1. *Zusammensetzung des enzymatischen Ansatzes*

Die in der Tabelle aufgeführten Mengen der Substrate, Enzyme und Coenzyme wurden in 50 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer vom pH 7,5 gelöst

Substrate, Enzyme und Coenzym in mg pro Ansatz (Vol.: 50 ml)	Enzymaktivitäten in Einheiten nach BÜCHER	Endkonzentration der Substrate im Ansatz
100 mg FDP-Na		$3,6 \cdot 10^{-3} M$
92 mg Glycerin		$2,0 \cdot 10^{-2} M$
10 mg DPN		$2,5 \cdot 10^{-6} M$
3 mg Muskelaldolase	ca. 6100 Einheiten	
4 mg Enzymgemisch (GDH/TIM)	ca. 5600 Einheiten GDH ca. 17000 Einheiten TIM	
60 mg Alkoholdehydrogenase	ca. 1100 Einheiten	
25 mg Komplexon III		$1,3 \cdot 10^{-3} M$

auch Hexosediphosphat und etwas Bariumsulfat enthielt. Dieses Gemisch wurde in wenigen ml destilliertem Wasser unter leichtem Erwärmen (Wasserbad 40°) aufgenommen. Der unlösliche Rückstand (Ba-Hexosediphosphat und Bariumsulfat) wurde mit kleinen Volumina Wasser bei 40° gewaschen. Die Waschwässer wurden mit dem ursprünglichen Überstand vereinigt. Diese Lösung enthielt zur Hauptsache das Hexosemonophosphat. Das Barium wurde mit der äquivalenten Menge an H₂SO₄ gefällt. Die saure Hydrolyse des Hexosemonophosphats erfolgte mit einer Endkonzentration von 1 N H₂SO₄ im siedenden Wasserbad während 20 Min. Die H₂SO₄ wurde mit wasserfreier Soda neutralisiert. Die Salze wurden durch Versetzen mit dem 4fachen Volumen Äthanol gefällt; die freie Keto-hexose bleibt in Lösung. Zur Entfernung der verbleibenden Salze wurde nach Vertreiben des Alkohols die Lösung auf eine mit Kationenaustauscher (Amberlite JR 120, H-Form) und Anionenaustauscher (Amberlite JR 4B, OH-Form) beschickte Säule aufgetragen. Auswaschen der Säule mit dem 4fachen Volumen Wasser.

4. *Trennung und Identifizierung der im enzymatischen Ansatz gebildeten Keto-hexosen.* Polyhydroxyverbindungen lassen sich, wie KHYM & ZILL⁵⁾ gezeigt haben, als Boratkomplexe auf stark basischen Anionenaustauschern trennen. Als Austauschersäule diente eine Dowex 1 Anionenaustauschersäule (cross linking 4%, 200/400 mesh) von 12 cm Länge und 1 cm Durchmesser. Die mit 0,1 M Natriumtetraboratlösung aktivierte und anschließend neutral gewaschene Säule wurde vor dem Auftragen der Keto-hexose mit 0,01 M Boraxlösung ins Gleichgewicht gebracht. Die Keto-hexoselösung wurde mit Natriumtetraborat ebenfalls auf eine Molarität von 0,01 M gebracht. Durchflussgeschwindigkeit ca. 50 ml/Std. Die Elution von der Säule erfolgte mit linearem Gradient von 0,018 bis 0,036 M Na-tetraborat. Volumen der Fraktionen: 9 ml Bestimmung der Keto-hexosen nach ROE¹⁰⁾. L-Sorbose gibt bei dieser Methode nur ca. 2/3 des Farbwertes der D-Fructose.

B. Ergebnisse. – Wie oben erwähnt, ergaben Vorversuche mit papierchromatographischer Trennung und anschließender Vergärung der Zucker, dass im enzymatischen Ansatz eine nicht vergärbare Keto-hexose, wahrscheinlich L-Sorbose, entstanden war. Wir verzichten auf eine detaillierte Beschreibung dieser Versuche.

Die beschriebene säulenchromatographische Trennung bestätigte dieses Ergebnis: es zeigte sich, dass das Hauptprodukt der enzymatischen Dehydrierung von Glycerin durch die Alkoholdehydrogenase der Leber immer der L-Glycerinaldehyd ist¹¹⁾.

¹⁰⁾ J. H. ROE, J. biol. Chemistry 107, 15 (1934).

¹¹⁾ In einzelnen Versuchen trat im Chromatogramm ein dritter Gipfel auf, der sich als Dihydroxy-aceton erwies. Derselbe tritt allerdings nur wenig in Erscheinung, weil Dihydroxyaceton mit Resorcin-HCl nur eine sehr geringe Färbung gibt. Offenbar erfolgt unter gewissen Bedingungen die Aldolasespaltung des Fructosediphosphats rascher als die Kondensation des gebildeten Glycerinaldehyds mit dem Phosphodihydroxyaceton. Das letztere wird bei der Aufarbeitung der Ansätze auf die Keto-hexosen mitgeführt.

In den mit Glycerin-[1-¹⁴C] durchgeführten Ansätzen wurden die beiden im enzymatischen Ansatz gebildeten Ketoexosen nach der säulenchromatographischen Trennung aufgesammelt und auf einer HCl-aktivierten Kationenaustauschersäule (Amberlite JR 120) von Na⁺ befreit. Die Borsäure wurde durch Einengen des Ansatzes auf ein kleines Volumen ausgefällt. Die Radioaktivität wurde direkt im PACKARD-Scintillationszähler gemessen. Da die Ketoexosephosphate durch Kondensation einer Molekel D- oder L-Glycerinaldehyd-[1-¹⁴C] mit einer Molekel nicht markiertem Dihydroxyacetonphosphat entstanden sind, sollten sie die Hälfte der spezifischen Radioaktivität des eingesetzten Glycerins aufweisen. Wie die Tabelle 2 zeigt, ist diese Annahme angenähert erfüllt. Die Werte liegen indes etwas unter 50%. Wir können noch nicht angeben, wie diese Unstimmigkeit zu erklären ist.

Tabelle 2. *Mit Glycerin-[1-¹⁴C] durchgeführte Ansätze*

Lösungen	spezifische Radioaktivität Imp./Min. μ Mol
Glycerin der Ausgangslösung	1. Messung: $8,6 \cdot 10^4$ 2. Messung: $8,9 \cdot 10^4$
L-Sorbose	1. Messung: $3,6 \cdot 10^4$ 2. Messung: $3,8 \cdot 10^4$
D-Fructose	1. Messung: $4,0 \cdot 10^4$ 2. Messung: $4,0 \cdot 10^4$

Die MICHAELIS-Konstante der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber gegenüber Glycerin bestimmten wir nach der Methode von LINEWEAVER & BURK¹²⁾ zu $1,05 \cdot 10^{-1}$ Mol/l bei 40°.

In Analogie zur Blutalkoholbestimmung benützten wir einen Pyrophosphat-Glycocoll-Semicarbazid-Puffer vom pH 8,7. Die Geschwindigkeit der Reaktion wurde im optischen Test bei 366 m μ verfolgt (vgl. Fig. 3).

SUMMARY

The main product of the oxydation of glycerol by horse liver alcohol dehydrogenase is L-glyceraldehyde; only a small amount of D-glyceraldehyde is formed. This is a new proof of the «biological asymmetry» of glycerol. The two forms of the glyceraldehyde were identified by enzymatic condensation with phosphodihydroxyacetone and separation of the ketoexoses formed (L-Sorbose and D-Fructose) as borate complexes on a Dowex-1-column.

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Zürich

¹²⁾ H. LINEWEAVER & D. BURK, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934).