

Anreicherung und Charakterisierung einer Triosekinase aus Leber

Zur Biochemie des Fructosestoffwechsels, III^{1, 2}

Von

Fritz Heinz und Walther Lamprecht

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Der Schriftleitung zugegangen am 1. Februar 1961)

Die zentrale Stellung des nicht phosphorylierten Glycerinaldehyds im Fructosestoffwechsel ist erst in den letzten Jahren erkannt worden. Der durch die Aldolasespaltung von Fructose-1-phosphat neben Dihydroxyacetonphosphat entstehende D-Glycerinaldehyd kann auf verschiedenen Stoffwechselwegen umgesetzt werden. Eine der Möglichkeiten ist die Reduktion zu Glycerin, welche DPNH*-abhängig durch Alkoholdehydrogenase^{3, 4} oder TPNH-abhängig durch die von Moore⁵ beschriebene Glycerindehydrogenase katalysiert wird. Eine andere Reaktionsmöglichkeit ist die Oxydation des D-Glycerinaldehyds zu D-Glycerinsäure mittels Aldehyddehydrogenase^{1, 6}. Beide Metaboliten münden nach der enzymatischen Phosphorylierung, einerseits des Glycerins zu L-Glycerin-1-phosphat⁷⁻⁹ oder andererseits des D-Glycerates zu 2-Phospho-D-glycerat², in die bekannten glykolytischen Abbauewege ein.

Eine unmittelbare Phosphorylierung von Glycerinaldehyd durch dialysierte Rattennierenextrakte hat zuerst Lindberg¹⁰ beobachtet. Hers und Kusaka^{11, 12} haben aus Meerschweinchenleber durch Am-

* Verwendete Abkürzungen: DPN^o, DPNH, TPN^o, TPNH = oxydiertes bzw. reduziertes Di- bzw. Triphosphopyridinnucleotid; ADP, ATP = Adenosindiphosphat bzw. -triphosphat; GA = Glycerinaldehyd; DHA = Dihydroxyaceton; TK = Triosekinase; GDH = L-Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase; TI = Triosephosphat-Isomerase.

¹ I. Mitteil.: W. Lamprecht u. F. Heinz, Z. Naturforsch. **13b**, 464 [1958].

² II. Mitteil.: W. Lamprecht, T. Diamantstein, F. Heinz u. P. Balde, diese Z. **316**, 97 [1959].

³ H. Holzer u. S. Schneider, Angew. Chem. **67**, 276 [1955]; Klin. Wschr. **33**, 1006 [1955].

⁴ F. Leuthardt u. H. P. Wolf, Helv. chim. Acta **36**, 1463 [1953]; **37**, 1732 [1954].

⁵ B. W. Moore, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5837 [1959].

⁶ A. Holldorf, C. Holldorf, S. Schneider u. H. Holzer, Z. Naturforsch. **14b**, 229 [1959].

⁷ C. Bublitz u. E. P. Kennedy, J. biol. Chemistry **211**, 951 [1954].

⁸ O. Wieland u. M. Suyter, Biochem. Z. **329**, 320 [1957].

⁹ W. Seitz, Diplomarbeit, Techn. Hochschule, München 1958.

¹⁰ O. Lindberg, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **7**, 349 [1951].

¹¹ H. G. Hers u. T. Kusaka, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **11**, 427 [1953].

¹² H. G. Hers, Le métabolisme du fructose, Ed. Arscia, Bruxelles 1957; derselbe, Kohlenhydratstoffwechsel im Kindesalter, S. 7, S. Karger-Verlag, Basel—New York 1959.

moniumsulfat-Fraktionierung eine Proteinfraktion erhalten, welche nach Inkubation mit D-Glycerinaldehyd und ATP die Bildung von Triosephosphaten und Fructose-1-phosphat katalysiert, gemessen am Entstehen alkali- und säurelabiler Phosphatester. Das für die Phosphorylierung des D-Glycerinaldehyds verantwortliche Enzym wurde von Hers „Triokinase“ genannt.

Eine weitere Anreicherung dieses Enzyms oder eine exakte Identifizierung der Reaktionsprodukte wurde bisher nicht unternommen. Im Rahmen unserer Arbeiten über den Fructosestoffwechsel erschien uns eine Klärung der Befunde von Hers notwendig, denn in den letzten Jahren wurden diese Ergebnisse, besonders nach der Kenntnis des reduktiven und oxydativen Stoffwechselweges des Glycerinaldehyds, immer stärker in den Hintergrund gedrängt und die Existenz einer „Triokinase“ angezweifelt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Anreicherung einer Triosekinase aus Leber beschrieben. Das Enzym phosphoryliert mit ATP D-Glycerinaldehyd zu 3-Phospho-D-glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton zu Dihydroxyacetonphosphat.

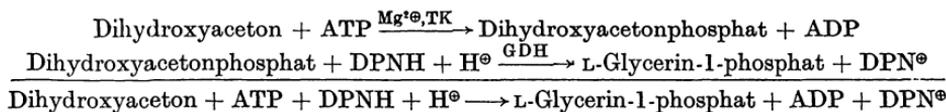
Methodik und Ergebnisse

Enzymatisch-optische Messung der Triosekinase-Aktivität

Auf Grund der Substratspezifität des Enzymes bieten sich für die Aktivitätsmessung zwei verschiedene Reaktionsansätze an:

a) Dihydroxyaceton-Test

Dihydroxyaceton wird mit ATP in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen zu Dihydroxyacetonphosphat phosphoryliert, letzteres wird DPNH-abhängig durch L-Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase zu L-Glycerin-1-phosphat reduziert. Die Änderung der DPNH-Extinktion in der Zeiteinheit erlaubt eine spektrophotometrische Aktivitätsbestimmung, wenn die Substratphosphorylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Reaktionsgleichungen für diesen gekoppelten Aktivitätstest lauten:



Testansatz: In eine Küvette der Schichtdicke 1 cm werden in der angegebenen Reihenfolge folgende Substanzen einpipettiert:

- 2,35 ml 0,05m Triäthanolaminpuffer, pH 7,5
- 0,1 ml Dihydroxyaceton (50 mg/ml)
- 0,1 ml $Na_2ATP \cdot 3 H_2O$ (krist., 50 mg/ml)
- 0,1 ml DPNH (10 mg/ml)
- 0,2 ml 0,2m $MgCl_2$
- 0,05 ml L-Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (1 mg/ml)
- 0,1 ml Triosekinase (10–100 EE./ml)*.

* EE. = Enzymeinheiten nach Bücher¹³, s. auch S. 91.

Nach der Triosekinasezugabe wird die Extinktionsänderung bei 20° und $366\text{ m}\mu$ gegen den gleichen Küvettenansatz, der anstelle von ATP Puffer enthält, alle 60 Sek. abgelesen.

Abb. 1 zeigt den Verlauf eines solchen Testes. Die Messung gegen einen Blindwert ohne ATP schließt die evtl. Reduktion des Substrates durch Leber-Alkoholdehydrogenase (Glycerindehydrogenase) oder die einer endogenen DPNH-Oxydation aus. Die Testung der Triosekinase-Aktivität gibt nur dann einwandfreie Ergebnisse, wenn die Alkoholdehydrogenase-Konzentration im Vergleich zur Triosekinase nicht dominiert.

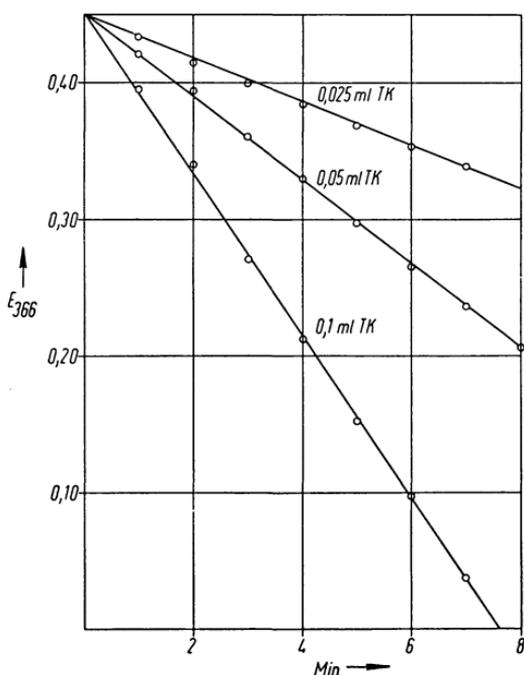
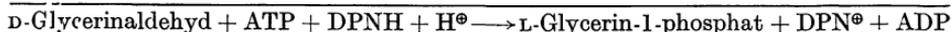
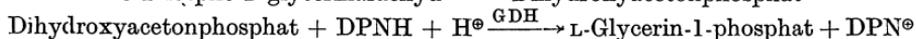
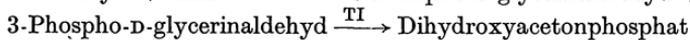
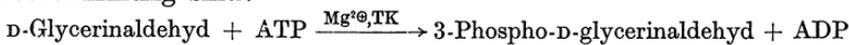


Abb. 1. Triosekinase-Aktivität mit Dihydroxyaceton als Substrat.

b) Glycerinaldehyd-Test

D-Glycerinaldehyd wird in Gegenwart von Mg^{2+} mit ATP zu 3-Phospho-D-glycerinaldehyd phosphoryliert. Das Reaktionsprodukt wird in einer enzymatisch gekoppelten und DPNH-abhängigen Reaktion mit Triosephosphat-Isomerase und L-Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase zu L-Glycerin-1-phosphat umgesetzt. Die Änderung der DPNH-Konzentration in der Zeiteinheit wird spektrophotometrisch bei $366\text{ m}\mu$ verfolgt und dient als Meßgröße. Die Reaktionsgleichungen zur Aktivitätsbestimmung sind:



Testansatz: In eine Küvette der Schichtdicke 1 cm werden in der angegebenen Reihenfolge folgende Substanzen einpipettiert:

2,3 ml 0,05*m* Triäthanolaminpuffer, pH 7,5

0,1 ml DPNH (10 mg/ml)

0,1 ml Na₂ATP · 3 H₂O (krist., 50 mg/ml)

0,2 ml DL-Glycerinaldehyd (20 mg/ml)

0,2 ml 0,2*m* MgCl₂

0,05 ml L-Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase
(1 mg/ml)

0,10 ml Triosekinase-Lösung (10—100 EE./ml).

Die Änderung der DPNH-Extinktion wird bei 260° und 366 mμ gegen den gleichen Küvettenansatz, der kein ATP enthält, alle 60 Sek. abgelesen. Abb. 2 zeigt den Verlauf dieses gekoppelten enzymatischen Testes.

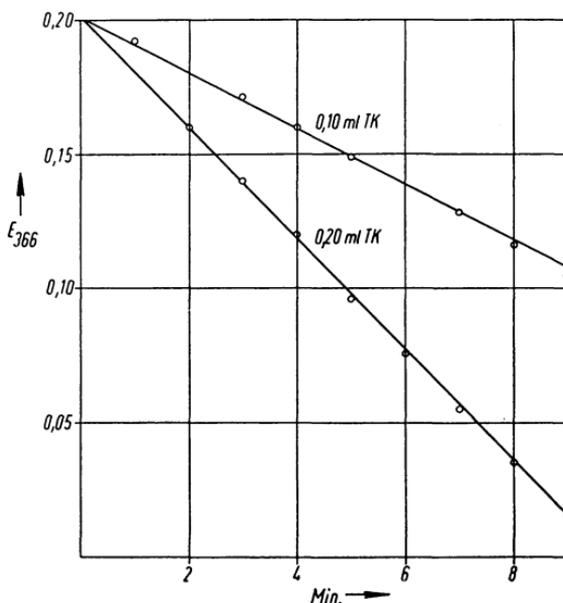


Abb. 2. Triosekinase-Aktivität mit D-Glycerinaldehyd als Substrat.

Definition der Enzymeinheit: Nach Bücher¹³ definieren wir eine Enzymeinheit (EE.) als die Enzymmenge, die bei 366 mμ eine DPNH-Extinktion um 0,100 in 100 Sek. ändert, bezogen auf 1 ml und die 10-mm-Küvette.

Definition der spezif. Aktivität des Enzymes: Als spezifische Aktivität werden Enzymeinheiten (EE.) pro mg Protein angegeben. Die Proteinbestimmung erfolgte spektrophotometrisch bei 260 und 280 mμ nach folgender Formel:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = 1,55 \cdot E_{280} - 0,76 \cdot E_{260}^{14}$$

Versuchsmaterial: Die verwendeten kristallisierten Enzyme und Coferente wurden von der Firma C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, bezogen. Die

¹³ G. Beisenherz, H. G. Boltze, Th. Bücher, R. Czock, K. H. Garbade u. G. Pfeiderer, Z. Naturforsch. **8b**, 555 [1953].

¹⁴ E. Layne in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, Bd. III, S. 447, Academic Press, New York 1957.

Substrate waren handelsübliche Produkte. Der käufliche (dimere) Glycerinaldehyd wurde durch kurzes Erhitzen im kochenden Wasserbad in die monomere Form übergeführt.

Darstellung des Enzyms

Ausgangsmaterial zur Anreicherung der Triosekinase war bei unseren ersten Versuchen Rattenleber. Im Laufe der weiteren Untersuchungen, die eine größere Menge Ausgangsmaterial erforderten, verwendeten wir Rinderleber. Die Leberstücke standen sofort nach der Schlachtung der Tiere zur Verfügung und wurden bis zur Verarbeitung in Eis gekühlt. Auch in eingefrorener Leber bleibt die Enzymaktivität über einige Wochen erhalten. — Alle folgenden Operationen wurden bei etwa 2° im Kälteraum durchgeführt.

Extraktion: 300 g Rinderleber (eingefroren und aufgetaut) werden im Starmix mit 1,5 l kalter isotonischer KCl-Lösung homogenisiert. Das Homogenat wird bei 4000 \times g 20 Minuten abzentrifugiert, das Sediment verworfen und der trübe Überstand im vorgekühlten „Batch Bowl Rotor“ einer präparativen Ultrazentrifuge (Spinco Modell L) 2 Stdn. bei 18000 U./Min. abzentrifugiert. Der noch leicht trübe Überstand (etwa 1280 ml) wird abgossen (Überstand I).

Erste Ammoniumsulfatfällung: Zum Überstand I wird unter Rühren langsam festes Ammoniumsulfat (p. a.) bis zu einer Sättigung von 0,5 hinzugegeben. Die Suspension wird nach beendeter Zugabe noch 10 Min. gerührt und der Niederschlag bei 4000 \times g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment ist eingefroren einige Tage haltbar.

Gelanlagerung: Das gesamte Sediment (evtl. aufgetaut) wird in etwa 200 ml eiskaltem Wasser aufgenommen. Nach Ermittlung der Proteinkonzentration wird die Enzymlösung mit soviel eiskaltem Wasser verdünnt, daß eine Lösung von etwa 15 mg Protein/ml resultiert. Davon wird ein aliquoter Teil (\sim 150 ml) entnommen und mit Calciumphosphatgel (Keilin und Hartree¹⁵) versetzt. Die Suspension wird 10 Min. gerührt, dann das Gel abzentrifugiert, der Rückstand verworfen und der Überstand nochmals mit Gel versetzt. Diese Operation wird so oft wiederholt, bis die spezif. Aktivität des Enzyms im Überstand nicht weiter ansteigt. Diese Methode hat sich als zweckmäßig erwiesen, denn die optimalen Anlagerungsbedingungen sind bekanntlich sehr stark vom Alter und der Beschaffenheit des Gels abhängig. Nach dem Ergebnis dieses Versuches wird die Hauptmenge der Enzymlösung mit der dafür berechneten Menge Gel versetzt. In einem typischen Versuch wurde folgendermaßen verfahren: 2550 ml der verdünnten Enzymlösung wurden mit 910 ml Calciumphosphatgel (28 mg Trockengewicht/ml) unter Rühren versetzt, die Suspension wurde 10 Min. gerührt, das Gel bei 4000 \times g abzentrifugiert und der Rückstand verworfen (Überstand II).

Zweite Ammoniumsulfatfällung: Zu dem klaren gelben Überstand II (2890 ml) wird unter Rühren festes Ammoniumsulfat bis zur Sättigung von 0,6 zugegeben, die Suspension noch 10 Min. gerührt und das Sediment bei 4000 \times g abzentrifugiert. Das Sediment wird in 0,5 gesätt. Ammoniumsulfatlösung suspendiert, so daß die Proteinkonzentration etwa 50 mg/ml beträgt (55 ml).

Die Ammoniumsulfatkonzentration wird unter Rühren durch langsame Zugabe von 17 ml eiskaltem Wasser auf 0,4 erniedrigt, die Suspension wird abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 50 ml zu 40% gesätt. kalter Ammoniumsulfatlösung resuspendiert (57 ml).

Die Ammoniumsulfatsättigung wird durch Zugabe von 19 ml kaltem Wasser auf 0,3 erniedrigt, die Suspension zentrifugiert (Überstand III) und das Sediment wird verworfen.

¹⁵ D. Keilin u. E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B. 124, 397 [1938].

Dritte Ammoniumsulfatfällung: Zu dem klaren Überstand III (73 ml) wird eine bei +2° gesättigte Ammoniumsulfatlösung bis zur Sättigung 0,33 zugegeben (3,8 ml). Der Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Zum klaren Überstand wird langsam gesätt. Ammoniumsulfatlösung bis 0,40 an Sättigung zugegeben (8,6 ml). Die Suspension wird zentrifugiert und das Sediment in wenig Wasser aufgenommen (17 ml Lösung). Die Enzymlösung ist eingefroren über Wochen haltbar.

Tab. 1 zeigt die Anreicherung von Triosekinase aus Rinderleber. Eine Aktivitätsbestimmung im Leberextrakt liefert infolge zu hoher Alkoholdehydrogenase-Aktivität keine reproduzierbaren Werte. Eine exakte Ausbeutebestimmung kann deshalb nicht angegeben werden.

Tab. 1. Reinigung von Triosekinase aus Rinderleber.

Reinigungsschritt	EE./ml (DHA-Test)	Gesamtakt. (EE.)	Spezifische Aktivität	$\frac{EE_{DHA}}{EE_{GA}}$
Leberextrakt	—	—	—	—
1. Ammoniumsulfatfällung	31	6300	0,17	1,24
Gelanlagerung	1,37	3950	0,8	1,59
2. Ammoniumsulfatfällung	62	3410	1,2	1,20
3. Ammoniumsulfatfällung	40	2910	3,3	1
Rückst. in Wasser gel. . .	92	1600	5,3	1,19

Reinheit des Enzyms

Unsere besten Enzympräparate enthalten als Verunreinigung Spuren an Alkoholdehydrogenase, Aldehyddehydrogenase und ein Enzym, das aus ATP die Bildung von ADP katalysiert, vermutlich Myokinase oder ATP-ase.

Wie Tab. 1 zeigt, ist der Quotient der Enzymaktivitäten im Dihydroxyaceton-Test zu denen im Glycerinaldehyd-Test ungefähr 1. Dieses Verhältnis bleibt während der Enzymanreicherung praktisch konstant. Die größte Abweichung wird auf der Stufe der Calciumphosphatgel-Anlagerung beobachtet, was wir auf die starke Verdünnung der Enzymlösung und die damit verbundene Ungenauigkeit beim optischen Test zurückführen.

Enzymatisch optische Aktivitätsmessungen, bei denen ein Gemisch von Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd als Substrat diente, zeigten keine Erhöhung oder Erniedrigung der Enzymaktivität im Vergleich zum Aktivitätstest mit Glycerinaldehyd oder Dihydroxyaceton.

Es kann demnach als bewiesen angesehen werden, daß Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd durch das gleiche Enzym phosphoryliert werden.

Bestimmung des pH-Optimums der Triosekinasereaktion

Das Aktivitätsmaximum der Triosekinasereaktion in Triäthanolaminpuffer liegt sowohl mit Dihydroxyaceton als auch mit Glycerinaldehyd bei pH 7,0.

Nachweis, daß bei der Triosekinase-Reaktion ADP entsteht

Das bei der Phosphorylierung von Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton mit ATP entstehende ADP wurde im gekoppelten enzymatischen Test mit Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase bestimmt.

Testansatz: In eine Küvette der Schichtdicke 1 cm werden in der angegebenen Reihenfolge folgende Substanzen pipettiert:

- 2,2 ml 0,05*m* Triäthanolamin-Puffer, pH 7,5
- 0,1 ml DL-Glycerinaldehyd (20 mg/ml)
- 0,1 ml DPNH (10 mg/ml)
- 0,1 ml ATP (50 mg/ml)
- 0,2 ml 0,1*m* MgCl₂
- 0,1 ml 1*m* KCl
- 0,1 ml 0,1*m* Phosphoenolpyruvat
- 0,01 ml Pyruvatkinase (5 mg/ml)
- 0,01 ml Lactatdehydrogenase (5 mg/ml)
- 0,05 bzw. 0,1 ml Triosekinase.

Die Messung erfolgt bei 366 μ gegen eine Küvette, die an Stelle von Glycerinaldehyd Puffer enthält.

Wie Abb. 3 zeigt, wird bei Zusatz der doppelten Menge Triosekinase die doppelte Menge an ADP in der Zeiteinheit gebildet. Inosintriphosphat kann Adenosintriphosphat ersetzen, die Aktivität des Enzymes ist jedoch verringert.

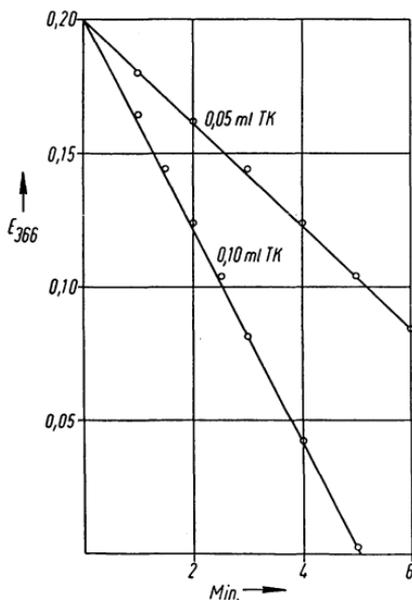


Abb. 3. ADP-Bildung durch die Triosekinase-Reaktion im gekoppelten enzymatischen Test mit Lactatdehydrogenase und Pyruvatkinase; Substrat: D-Glycerinaldehyd.

Substratspezifität

Die von Hers und Kusaka^{11, 12} aus Cytoplasma von Meer-schweinchenleber isolierte Enzymfraktion („Triokinase“), soll allgemein Triosen in Gegenwart von Mg²⁺ und Adenosintriphosphat phosphorylieren. Nach Inkubation dieser Enzymfraktion mit Dihydroxyaceton und

Adenosintriphosphat konnte Hers¹¹ einen alkalilabilen Phosphatester nachweisen. Hers hat diesen Ester nicht identifiziert, vermutet aber, daß es sich um Dihydroxyacetonphosphat handelt.

a) Phosphorylierung von Dihydroxyaceton

Mit Hilfe des enzymatisch-optischen Aktivitätstestes (DHA-Test) und dem von uns dargestellten Enzym konnten wir nachweisen, daß Triosekinase Dihydroxyaceton mit ATP zu Dihydroxyacetonphosphat phosphoryliert (Abb. 1).

b) Phosphorylierung von D-Glycerinaldehyd

Die primäre Bildung von 3-Phospho-D-glycerinaldehyd aus D-Glycerinaldehyd, ATP und Triosekinase haben wir enzymatisch-optisch bestimmt. Der durch Triosekinase entstandene 3-Phospho-D-glycerinaldehyd wird DPN-abhängig mit Hilfe der oxydierenden Gärungsfermentreaktion in Gegenwart von Arsenat zu 3-Phospho-D-glycerinsäure oxydiert, die Bildung von DPNH dient als Meßgröße. Ein Küvettenansatz ohne Adenosintriphosphat dient als Blindwert, um die bekannte, jedoch langsam verlaufende Direktoxydation des D-Glycerinaldehyds mit Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase auszuschließen.

Ausführung der Bestimmung: In eine Küvette der Schichtdicke 1 cm werden in der angegebenen Reihenfolge folgende Substanzen pipettiert:

- 2,4 ml 0,05*m* Triäthanolaminpuffer, pH 7,5
- 0,05 ml Cystein-hydrochlorid (40 mg/ml)
- 0,1 ml 5,4proz. Natriumarsenat
- 0,2 ml 0,1*m* MgCl₂
- 0,2 ml D-Glycerinaldehyd (20 mg/ml)
- 0,1 ml Na₂ATP · 3 H₂O (krist., 25 mg/ml)
- 0,05 ml Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase (2 mg/ml)
- 0,1 ml Triosekinase.

Die Messung erfolgt bei 366 m μ gegen einen Blindwert, der kein ATP enthält.

Wie Abb. 4 zeigt, findet mit D-Glycerinaldehyd, ATP und Triosekinase im Triosephosphat-Dehydrogenase-Test DPNH-Bildung statt. Dagegen wird im gleichen Testansatz mit Dihydroxyaceton als Substrat DPN[®] nicht reduziert.

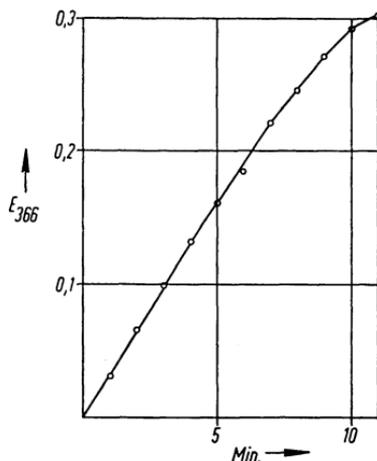


Abb. 4. 3-Phospho-D-glycerinsäure-Bildung durch die Triosekinase-Reaktion im gekoppelten enzymatischen Test mit Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase und Arsenat. Substrat: D-Glycerinaldehyd; Meßgröße ist die DPNH-Bildung.

Dies zeigt, daß unsere Enzympräparate weitestgehend von Triosephosphat-Isomerase befreit sind und das primäre Reaktionsprodukt beim Umsatz von D-Glycerinaldehyd mit ATP und Triosekinase 3-Phospho-D-glycerinaldehyd ist.

c) Substratspezifität gegen D- und DL-Glycerinaldehyd

Im besonderen interessierte die Frage, ob Triosekinase auch L-Glycerinaldehyd zu 3-Phospho-L-glycerinaldehyd mit ATP phosphoryliert.

L-Glycerinaldehyd stand uns nicht zur Verfügung, zudem sind direkte Bestimmungsmethoden für evtl. gebildeten 3-Phospho-L-glycerinaldehyd nicht bekannt. Zur Testung bedienten wir uns der spektrophotometrischen quantitativen Bestimmung des bei der Triosekinase-Reaktion im stöchiometrischen Verhältnis gebildeten ADP mit Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase. Diese Methode hat auch den Vorzug, damit unabhängig von der Konfiguration des eingesetzten Substrates zu sein.

Ausführung der Bestimmung: Gleiche Küvettenansätze wurden mit gleichen Mengen D- und DL-Glycerinaldehyd beschickt. Wird die D- und L-Form des Glycerinaldehyds mit Triosekinase vollständig phosphoryliert, so ist zu erwarten, daß sich in beiden Fällen gleiche Mengen an ADP bilden, angezeigt durch gleiche DPNH-Extinktionsänderungen. Wird nur eines der beiden optischen Isomeren umgesetzt, so ist zu erwarten, daß im Ansatz mit DL-Glycerinaldehyd nur die halbe Menge an ADP entsteht.

In eine Küvette der Schichtdicke 1 cm werden in der angegebenen Reihenfolge folgende Substanzen pipettiert:

2,5 ml 0,05*m* Triäthanolaminpuffer, pH 7,6

0,1 ml DPNH (10 mg/ml)

0,1 ml Na₂ATP · 3 H₂O (krist., 10 mg/ml)

0,1 ml einer Lösung, enthaltend 0,01*m* Phosphoenolpyruvat, 1,3*m* KCl und 0,4*m* MgSO₄

0,1 ml 0,001*m* DL- bzw. D-Glycerinaldehyd

0,04 ml Lactatdehydrogenase (2 mg/ml)

0,04 ml Pyruvatkinase (2 mg/ml).

Nach Umsetzung des im verwendeten ATP enthaltenen ADP wird die Reaktion durch Zugabe von Triosekinase gestartet, die Extinktionsänderung wird gegen einen Blindwert gemessen, der keinen Glycerinaldehyd enthält, um geringe durch Verunreinigungen bedingte und ADP-bildende Reaktionen auszuschließen (ATP-asen usw.).

Wie Abb. 5 zeigt, wird bei der Phosphorylierung von DL-Glycerinaldehyd mit Triosekinase und ATP im Vergleich zu einer äquimolaren Menge D-Glycerinaldehyd nur die halbe Menge ADP gebildet. Triosekinase phosphoryliert also mit ATP nur D-Glycerinaldehyd und nicht L-Glycerinaldehyd.

d) Prüfung der Substrat-Spezifität von Triosekinase auf Glycerin, Glucose, Fructose, D-Glycerat und Glykolaldehyd

Glycerin wird durch Triosekinase und ATP nicht zu L-Glycerin-1-phosphat phosphoryliert; die Prüfung erfolgte mit Hilfe des enzymatisch-optischen Testes nach Wieland und Suyter⁸.

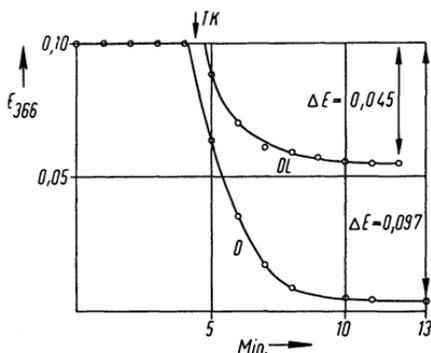


Abb. 5. Umsetzungsgeschwindigkeit von D- und DL-Glycerinaldehyd mit Triosekinase im gekoppelten enzymatischen Test mit Lactatdehydrogenase und Pyruvatkinase bei gleicher molarer Substratkonzentration ($3,25 \cdot 10^{-5}m$); Meßgröße ist das Verschwinden an DPNH.

Ebenso kann durch Triosekinase und ATP nicht D-Glycerat (zu 2-Phospho-D-glycerat; Testung nach l. c.¹), Glucose oder Fructose und Glykolaldehyd phosphoryliert werden.

Bestimmung der Michaelis-Konstanten

In Tab. 2 sind die im enzymatisch-optischen Test gefundenen Michaelis-Konstanten für Dihydroxyaceton, D- und DL-Glycerinaldehyd aufgeführt.

Tab. 2. K_M -Werte von Triosekinase für Dihydroxyaceton, D- und DL-Glycerinaldehyd.

Substrat	K_M
Dihydroxyaceton . . .	$2,0 \cdot 10^{-5}$
D-Glycerinaldehyd . . .	$1,25 \cdot 10^{-4}$
DL-Glycerinaldehyd . . .	$3,3 \cdot 10^{-4}$

Der für DL-Glycerinaldehyd gefundene Wert ist auf Grund der gegenüber D-Glycerinaldehyd gefundenen Spezifität zu halbieren. Der Wert liegt um ein Geringes höher als der für die reine D-Verbindung gefundene.

Diskussion

In früheren Arbeiten^{1,2} haben wir die noch offen stehenden Fragen nach der Verwertung des D-Glycerinaldehyds im Stoffwechsel der Leber ausführlich diskutiert, nachdem wir gefunden hatten, daß D-Glycerinaldehyd von Glycerinaldehyd-Dehydrogenase zu D-Glycerinsäure oxidiert wird¹. Auch mit der Auffindung einer Glyceratkinase, welche D-Glycerat mit ATP zu 2-Phospho-D-glycerat phosphoryliert², mußten die aus dem Jahre 1953 von Hers und Kusaka¹¹ datierenden Befunde offengelassen werden. Unsere Zurückhaltung haben wir damit begründet, daß die von Hers angereicherte „Triokinase“ eine relativ rohe Enzymfraktion darstellt, wie auch die Identifizierung der Reaktionsprodukte in Form alkalilabiler und säurelabiler Phosphatester wenig befriedigte.

So ist u. E. die Annahme berechtigt, daß die von Hers gewonnene „Triokinase“ Glycerinkinase enthält, welche bekanntlich L-Glycerinaldehyd mit ATP phosphorylieren kann. Hers hat aus dem Umsatz von DL-Glycerinaldehyd, der etwa 90% des Umsatzes vom D-Glycerinaldehyd beträgt, geschlossen, daß auch L-Glycerinaldehyd von „Triokinase“ phosphoryliert wird. Unsere Enzympräparate enthalten keine nachweisbaren Mengen an Glycerinkinase und unter diesen Bedingungen wird L-Glycerinaldehyd von Triosekinase nicht phosphoryliert.

Bei der Inkubation von „Triokinase“ mit D-Glycerinaldehyd und ATP hat Hers ferner die Bildung eines säurelabilen Esters neben dem Entstehen eines alkalilabilen Phosphatesters beschrieben. Hers gibt an, die Enzymfraktion enthalte Aldolase und Triosephosphat-Isomerase, so daß der gebildete 3-Phospho-D-glycerinaldehyd (alkalilabil) mit Triosephosphat-Isomerase zu Dihydroxyacetonphosphat isomerisiert, das mit Hilfe der Aldolase-Reaktion mit überschüssigem D-Glycerinaldehyd zu Fructose-1-phosphat (säurelabil) kondensiert. Auch dies zeigt, daß die „Triokinase“-Fraktion relativ viel Fremdaktivitäten enthält.

Mit Dihydroxyaceton als Substrat hat Hers im Inkubationsansatz nur das Entstehen eines alkalilabilen Phosphatesters nachgewiesen, diesen Ester jedoch nicht identifiziert, aber vermutet, daß es sich um Dihydroxyacetonphosphat handelt.

Um so mehr ist es unser Anliegen, die Ergebnisse von Hers und Kusaka in den Vordergrund zu stellen und anzuerkennen; in voller Übereinstimmung bestätigen wir die Existenz einer „Triokinase“. Das aus Rinderleber isolierte Enzym phosphoryliert mit ATP D-Glycerinaldehyd zu 3-Phospho-D-glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton zu Dihydroxyacetonphosphat. Die von Hers¹² angenommene Phosphorylierung von L-Glycerinaldehyd trifft dagegen nicht zu.

Bei der Frage zur Nomenklatur erscheint es uns korrekter, den Namen Triosekinase anstelle von „Triokinase“ zu gebrauchen, obwohl sich dieser seit den Arbeiten von Hers bereits eingebürgert hat und obwohl es sicher berechtigter wäre, dieses Enzym „D-Glycerinaldehyd-Kinase“ zu nennen.

Die Michaelis-Konstante des Enzymes liegt, wie wir gemessen haben, für D-Glycerinaldehyd zwischen 1,2 und $1,7 \cdot 10^{-4}m$, während der Wert für Dihydroxyaceton $2 \cdot 10^{-5}m$ beträgt.

Da Triosekinase D-Glycerinaldehyd, aber nicht L-Glycerinaldehyd, jedoch Dihydroxyaceton phosphoryliert, taucht die Frage nach den möglichen Bindungsstellen im Enzym-Substrat-Komplex auf. In diesem Zusammenhang scheint uns ein Vergleich mit dem Enzym Glycerinkinase von besonderem Interesse zu sein. Aus den Arbeiten von Bublitz und Kennedy⁷ sowie von Wieland und Suyter⁸ wissen wir, daß Glycerinkinase das „optisch inaktive“ Dihydroxyaceton und Glycerin

phosphoryliert, das Enzym zeigt jedoch eine Stereospezifität gegenüber den optischen Antipoden von Glycerinaldehyd, da nur L-Glycerinaldehyd und nicht D-Glycerinaldehyd mit ATP umgesetzt wird. Triosekinase weist damit eine gewisse Parallelität auf, denn das Enzym phosphoryliert ebenso das optisch „inaktive“ Dihydroxyaceton, dagegen nicht L-Glycerinaldehyd, jedoch ist D-Glycerinaldehyd das „eigentliche“ Substrat der Triosekinase. Auch in den Michaelis-Konstanten der beiden Enzyme Glycerinkinase und Triosekinase finden sich Parallelen: Beide Enzyme haben zum Dihydroxyaceton, dem „nicht physiologischen“ Substrat, eine größere Affinität als in einem Falle Glycerinkinase zu Glycerin oder im anderen Triosekinase zu D-Glycerinaldehyd.

Die Bedeutung der Phosphorylierung des D-Glycerinaldehyds, wie sie in den Arbeiten von Hers und Kusaka^{11,12} besonders hervorgehoben wird, ist für die Frage nach dem bevorzugten Stoffwechselweg des D-Glycerinaldehyds, beispielsweise im Zuge des Fructoseabbaues der Leber, noch keineswegs sichergestellt. Bei der Bekanntgabe der Existenz einer „Triokinase“ stand Hers ausschließlich der reduktive Weg des Glycerinaldehyds zu Glycerin mit Glycerindehydrogenase⁴ (Leber-Alkoholdehydrogenase³) zur Diskussion. Auch von den meisten Autoren wird nunmehr die Reduktion von Glycerinaldehyd auf Grund der großen Michaelis-Konstante des Enzymes zu Glycerin als untergeordnete Reaktionsmöglichkeit betrachtet. Erst in den letzten Jahren haben die Arbeiten aus unserem Arbeitskreis andere Wege für die Verwertung des D-Glycerinaldehyds¹ aufgezeigt. Der Arbeitskreis von Holzer und Mitarbeitern hat inzwischen unsere Ergebnisse weitgehend bestätigen können⁶, wie auch kürzlich unsere Angaben experimentell bewiesen werden konnten, wonach der Weg D-Glycerinaldehyd → D-Glycerinsäure in der Leber bevorzugt zu sein scheint, denn nach Fructosebelastung finden Holzer und Mitarbeiter¹⁶ einen etwa 10fachen Anstieg an Glycerinsäure.

Untersuchungen über das Zusammenwirken aller am Glycerinaldehyd-Stoffwechsel beteiligten Enzyme und Coenzyme, die Verhältnisse in vivo betreffend, zur Klärung der Frage nach der tatsächlichen Verwertung des D-Glycerinaldehyds sind im Gange.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für die großzügige Unterstützung dieser Arbeiten unseren besonderen Dank auszusprechen.

Für die sorgfältig durchgeführte technische Hilfe danken wir Fräulein Ingrid Hagenloh.

Zusammenfassung

Das Enzym Triosekinase wurde aus Rinderleber isoliert und etwa auf das 50fache angereichert. Triosekinase phosphoryliert mit ATP D-Glycerinaldehyd zu 3-Phospho-D-glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton zu Dihydroxyacetonphosphat; L-Glycerinaldehyd wird nicht umgesetzt.

¹⁶ R. Kattermann, U. Dold u. H. Holzer, *Angew. Chem.* **73**, 43 [1961].

Die Michaelis-Konstanten betragen für D-Glycerinaldehyd $1,25 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und für Dihydroxyaceton $2,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Das Aktivitätsmaximum der Triosekinase-Reaktion liegt bei pH 7,0.

Triosekinase phosphoryliert nicht Glycerin, Glucose, Fructose, D-Glycerinsäure oder Glykolaldehyd.

Das Enzym ist identisch mit einer von Hers 1953 beschriebenen „Triokinase“.

Summary

Triosekinase has been isolated from bovine liver and purified about 50-fold. With ATP as the phosphate donor, it phosphorylates D-glyceraldehyde to 3-phospho-D-glyceraldehyde, and dihydroxyacetone to dihydroxyacetone phosphate; L-glyceraldehyde is not attacked.

The Michaelis constants are 1.25×10^{-4} mol. per litre for D-glyceraldehyde and 2.0×10^{-5} mol. per litre for dihydroxyacetone. The pH-activity optimum is about 7.0.

Glycerin, glucose, fructose, D-glyceric acid and glycolaldehyde are not phosphorylated by triose kinase.

The enzyme is identical with „Triokinase“ (Hers, 1953).

Priv.-Doz. Dr. Walther Lamprecht, Organisch-Chemisches Institut der Techn. Hochschule, München 2, Arcisstr. 21 und I. Medizinische Klinik der Universität, München 15, Ziemssenstr. 1.