

Da die isolierten Spaltstücke identisch sind, wurde angenommen¹, daß der einzige Unterschied zwischen den beiden Substanzen in einem Mehrgehalt eines veresterten Phosphorsäuremoleküls der Codehydrase II bestehe.

Eine enzymatische Umwandlung zwischen den beiden Substanzen wäre also von vornherein nicht unwahrscheinlich. Da die beiden Co-Fermente in verschiedene Wege des Kohlehydratabbaues eingreifen², könnte eine solche Umwandlung auch eine wichtige biologische Bedeutung haben. V. EULER, ADLER und STEENHOFF-ERIKSEN³ haben bereits Versuche ausgeführt, die auf die Möglichkeit einer enzymatischen Umwandlung von Codehydrase II in Codehydrase I hinweisen. Von diesen Beobachtungen ausgehend wurde versucht, eine Umwandlung in entgegengesetzter Richtung durchzuführen. Als Enzympräparat kam ausgewaschene und wieder getrocknete Trockenhefe zur Anwendung (Apozymase) und als Phosphatdonator ein Überschuß von Adenosintriphosphorsäure. Als Beispiel wird hier ein Versuch mitgeteilt, der die Bildung eines Codehydrase-II-wirksamen Produktes unter diesen Bedingungen zeigt. Bei Weglassen einer der beiden Komponenten bleibt die Bildung von Codehydrase II aus.

Versuchsansatz 1: 2,5 ccm, enthaltend 0,1 g Apozymase + 2,5 mg Cozymase (Nr. 1533) + 4 γ -mol Adenosintriphosphorsäure + 1,0 ccm $\frac{m}{10}$ -Phosphat ($p_H = 7,0$). Inkubation 30 Minuten bei 30°. Hierauf 3 Minuten Erhitzen bei 100°.

Versuchsansatz 2: Wie vorher, jedoch ohne Cozymase.

Versuchsansatz 3: Ohne Adenosintriphosphorsäure.

Bestimmung von Codehydrase II im System der Hexosmonophosphatdehydrierung. Reaktionsmischung: Gesamtvolumen 2,0 ccm, enthaltend Hexosmonophosphat + Zwischenferment nach WARBURG und CHRISTIAN + Flavinenzym + 0,25 ccm $\frac{m}{2}$ -Phosphat, p_H 7,6 + 0,25 ccm 0,02 % Methylenblau + Codehydrase.

Codehydrase	Entfärbungszeit in Min.
0,20 ccm Kochsaft aus Versuchsansatz 1 . .	43
0,40 ccm Kochsaft aus Versuchsansatz 1 . .	17
0,40 ccm Kochsaft aus Versuchsansatz 1 ohne Hexosmonophosphat	> 200
0,40 ccm Kochsaft aus Versuchsansatz 2 . .	> 200
0,40 ccm Kochsaft aus Versuchsansatz 3 . .	106
Vergleichsversuche mit Codehydrase II:	
3 γ (nach spektr. Best.) Codehydrase II . .	75
5 γ	42
7 γ	23
10 γ	17

Andere Versuche haben gezeigt, daß die Bildung von Codehydrase II nach 30 Minuten (30°) maximal ist und das p_H -Optimum zwischen 7 und 8 liegt. Bei gesteigerter Cozymasemengen wird mehr Codehydrase II gebildet, die relative Ausbeute dagegen wird vermindert. Auch eine gesteigerte Adenosintriphosphorsäurekonzentration hat eine erhöhte Ausbeute zur Folge.

Die absolute Menge der gebildeten Codehydrase II ist gering und entspricht weniger als 10 % der verwendeten Cozymase. Was gegenwärtig mit Sicherheit gesagt werden kann, ist, daß eine Substanz gebildet wird, die als Codehydrase bei der Hexosmonophosphat-Dehydrierung wirksam ist und die zu ihrer Entstehung die Gegenwart von Cozymase erfordert. Es ist anzunehmen, daß zwischen Codehydrase I + Phosphatdonator und Codehydrase II ein Gleichgewicht besteht. Diese Reaktion wird näher untersucht werden, um die Identität des gebildeten Umwandlungsproduktes mit der Codehydrase II endgültig zu beweisen.

Stockholm, Biochemisches Institut der Universität, den 13. September 1937. RAGNAR VESTIN.

Die Einwirkung von Phosphoroxchlorid auf Cozymase.

Die Cozymase (Codehydrase I) unterscheidet sich in chemischer Hinsicht von der Codehydrase II (Triphosphopyridin-nukleotid, WARBURG Co-Ferment) durch den

¹ Siehe Fußnote 2 auf S. 667, rechte Spalte.

² Zum Beispiel H. v. EULER u. E. ADLER, Hoppe-Seylers Z. 238, 233 (1936).

³ Hoppe-Seylers Z. 248, 227 (1937).

Mindergehalt eines veresterten Phosphorsäuremoleküls¹. Es erschien nicht ausgeschlossen, daß man Codehydrase I durch Behandeln mit Phosphoroxchlorid in Codehydrase II überführen könne, zumal eine entsprechende Reaktion auf enzymatischem Wege von VESTIN neuerdings² durchgeführt werden konnte, nachdem bereits EULER, ADLER und STEENHOFF-ERIKSEN Versuche mitgeteilt haben, welche den Ablauf der umgekehrten enzymatischen Reaktion erwarten ließen³. Das Experiment zeigte, daß die Reaktion



durchführbar ist.

Beispiel: 50 mg Codehydrase I (Präp. 1548, 2 Stunden im Hochvakuum bei 70° getrocknet) wurden in 30 ccm trockenem Äther suspendiert und mit 0,2 ccm POCl_3 versetzt. Nach 12stündigem Schütteln Zugabe von einigen Stückchen Eis, Abtrennen der wässrigen Schicht, Fällung mit überschüssigem Alkohol, der Niederschlag wurde mit absolutem Alkohol gewaschen und getrocknet. Nachweis der entstandenen Codehydrase II im WARBURG'schen System (Thunberg-Methodik).

Tabelle 1.

Dehydrierung von Hexosemonophosphorsäure (Robinson-ester). Zusammensetzung der Reaktionsmischung: 0,25 ccm $\frac{m}{10}$ -hexosemonophosphors.-Na, 0,3 ccm Co-Enzymlösung (vgl. Tabelle); Apodehydrase: 0,25 ccm Zwischenfermentlösung nach WARBURG u. CHRISTIAN; 0,25 ccm Flavin-Enzymlösung, enthält 1,25 γ Flavin/ccm; 0,5 ccm Methylenblau 1:5000; 0,2 ccm $\frac{m}{5}$ -Phosphatpuffer $p_H = 7,6$. Näheres vgl. ⁴.

Substrat	Co-Enzym	Entfärbungszeit
Hexosemonoph. desgl.	1 mg Cozymase 1548	53 Min.
desgl.	Codehydrase II, entspr. 0,016 mg reinem Präparat	3 1/2 Min.
desgl.	1 mg Cozymase mit POCl_3 behandelt	4 Min.
—	desgl.	mehrere Stunden

Es ist nicht anzunehmen, daß die deutliche Wirksamkeit des Reaktionsproduktes als Codehydrase II auf das Entstehen eines unbiologischen, neuen Co-Enzymes (z. B. durch Spaltung zum Pyridinmononukleotid oder durch Synthese eines mit dem WARBURG'schen Co-Ferment isomeren Triphosphopyridinnukleotides) zurückzuführen ist. Die Erfahrungen über die Spezifität der Bindung der Co-Enzyme an ihre Apo-Enzyme und den Substraten gegenüber sprechen dagegen.

Während dem Studium der enzymatisch reversiblen Umwandlung der beiden Codehydrasen ineinander im Hinblick auf den Mechanismus des Kohlehydratabbaues große Bedeutung zukommt, ist die beschriebene Gewinnung von Codehydrase II aus Cozymase wegen der wesentlich leichteren Zugänglichkeit letzterer präparativ aussichtsreich, allerdings nur dann, wenn es gelingt, die bisher schlechte Ausbeute durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen erheblich zu verbessern. Ferner hat die Reaktion mit Rücksicht auf die Konstitution der Codehydrase II Interesse: Als vor einiger Zeit die Konstitution der Cozymase mitgeteilt wurde, wurde eine analoge Formel für Codehydrase II in Betracht gezogen⁴. Der oben mitgeteilte experimentelle Befund zeigt aber, daß diese Konstitutionsformel für Codehydrase II modifiziert werden muß. Das Verhalten bei der Säurehydrolyse, die Titration und die Isolierung größerer Spaltstücke durch Alkalihydrolyse werden Auskunft über die Stelle der Veresterung des dritten Phosphorsäuremoleküls geben.

Stockholm, Biochemisches Institut der Universität, den 13. September 1937. F. SCHLENK.

¹ H. v. EULER u. F. SCHLENK, Hoppe-Seylers Z. 246, 64 (1936).

² R. VESTIN, siehe vorstehende Mitteilung.

³ H. v. EULER, E. ADLER u. T. STEENHOFF-ERIKSEN, Hoppe-Seylers Z. 248, 227 (1937).

⁴ H. v. EULER u. E. ADLER, Hoppe-Seylers Z. 238, 233 (1935).