

Wirkungsmechanismus von Thiaminpyrophosphat

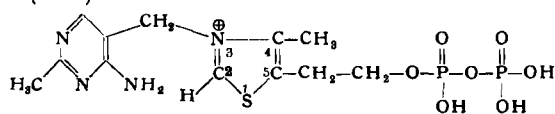
Von Prof. Dr. HELMUT HOLZER*)

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Freiburg im Breisgau

Nach der Inkubation von 2-¹⁴C-Pyruvat mit gereinigter Pyruvat-Decarboxylase konnte durch Papier- und Ionenaustausch-Chromatographie ein ¹⁴C-markiertes Derivat von Thiaminpyrophosphat (TPP) isoliert werden. Die Substanz wurde als 2-(α -Hydroxyäthyl)-TPP identifiziert. Dies steht im Einklang mit einem früheren Vorschlag von Breslow für die Struktur des „aktiven Acetaldehyds“. Neben 2-(α -Hydroxyäthyl)-TPP konnte eine Verbindung von Pyruvat mit TPP gefaßt werden, die wahrscheinlich 2-(α -Hydroxy- α -carboxyäthyl)-thiaminpyrophosphat ist. Diese Substanz kann in Analogie zum „aktiven Acetaldehyd“ als „aktives Pyruvat“ bezeichnet werden. Sie ist bei der Pyruvatdecarboxylierung die Vorstufe von 2-(α -Hydroxyäthyl)-TPP. Auch bei der Oxydation von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A mit Pyruvat-Oxydase konnte 2-(α -Hydroxyäthyl)-TPP als Zwischenprodukt gefaßt werden. Neuere Anschauungen zum Mechanismus der oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A werden diskutiert. Der von Racker als Zwischenprodukt der TPP-abhängigen Transketolase-Reaktion postulierte „aktive Glycolaldehyd“ konnte aus Ansätzen von Transketolase mit ¹⁴C-Fructose-6-phosphat gefaßt werden. Er wurde dadurch charakterisiert, daß er bei der Inkubation mit freiem Glykolaldehyd und Transketolase Erythrulose liefert.

I. Einleitung

1932 zeigte E. Auhagen¹⁾, daß für die 1911 von C. Neuberg²⁾ in Hefeextrakten entdeckte Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd ein kochbeständiges Coenzym notwendig ist. 1937 isolierten K. Lohmann und Ph. Schuster³⁾ die „Cocarboxylase“ und identifizierten sie als Pyrophosphorsäureester des Vitamins B₁, d. h. als Thiaminpyrophosphat (TPP).



Thiaminpyrophosphat (TPP)

Über den Mechanismus der Beteiligung von TPP an Decarboxylierungsreaktionen gibt es eine Reihe von Theorien. W. Langenbeck⁴⁾ nimmt an, daß die Aminogruppe des Pyrimidinteils mit der α -Ketosäure intermediär eine Schiff'sche Base bildet. P. Karrer und M. Viscontini^{5,6)} diskutieren eine Addition der α -Ketosäure an die nach hydrolytischer Öffnung des Thiazolrings zwischen den Atomen 1 und 2 entstehende SH-Gruppe. L. J. Reed⁷⁾ zieht den quaternären Stickstoff des Thiazolteiles als Bindungsstelle in Betracht, während K. Wiesner und Z. Valenta⁸⁾ sowie R. Breslow⁹⁾ in seinen ersten Arbeiten eine Ylidstruktur

zwischen der Methylengruppe, welche die beiden Ringe verbindet und dem N-Atom 3 des Thiazolrings als Reaktionsort diskutieren. Die jüngste, auf Modellversuche mit Thiamin begründete Theorie, stammt von R. Breslow^{10,11)} (vgl. auch¹²⁾). Er nimmt als Intermediärprodukt der Pyruvatdecarboxylierung einen am C-Atom 2 des Thiazolrings addierten Acetaldehyd an. L. O. Krampitz und Mitarbeiter¹³⁾ synthetisierten die phosphatfreie Verbindung, 2-(α -Hydroxyäthyl)-thiamin, und zeigten, daß diese Substanz im mikrobiologischen Test Vitamin-B₁-Wirksamkeit hat¹³⁾, daß sie im nicht-enzymatischen Modellsystem von S. Mizuhara und P. Handler¹⁴⁾ nach Zusatz von Acetaldehyd Acetoin liefert¹⁵⁾ und daß sie nach Inkubation mit ATP-liefernden und Thiaminpyrophosphokinase enthaltenden Hefepreparaten als Coenzym für die Decarboxylierung von Pyruvat dient¹³⁾.

II. „Aktiver Acetaldehyd“ und „aktives Pyruvat“ als Zwischenprodukte der enzymatischen Pyruvatdecarboxylierung

Auf Grund der Modellversuche von R. Breslow sowie von L. O. Krampitz und Mitarbeitern war im 2-(α -Hydroxyäthyl)-TPP das seit langem unter der Bezeichnung „aktiver Acetaldehyd“ postulierte Zwischenprodukt der Pyruvatdecarboxylierung zu vermuten. Wir konnten diese Verbindung als Zwischenprodukt enzymatischer, TPP-abhängiger Reaktionen beweisen. Darüber hinaus gelang es uns, als Vorstufe des „aktiven Acetaldehyds“ eine Verbindung von Pyruvat mit TPP zu fassen, für die wir die Be-

*) Nach Vorträgen am 26. Mai 1961 in München (Süddeutsche Chemiedozenten-Tagung) und am 23. Juni 1961 beim Joint Biochemistry and Virology Seminar in Berkeley, University of California (USA).

¹⁾ E. Auhagen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 204, 149 [1932]; 209, 20 [1932].

²⁾ C. Neuberg u. L. Karczag, Biochem. Z. 37, 170 [1911].

³⁾ K. Lohmann u. Ph. Schuster, Biochem. Z. 294, 188 [1937].

⁴⁾ W. Langenbeck in: Ergebnisse der Enzymforschung, Herausgeber: F. F. Nord u. R. Weidenhagen, Akadem. Verlagsgesellschaft mbH., Leipzig, 1933, Bd. II, S. 314.

⁵⁾ P. Karrer u. M. Viscontini, Helv. chim. Acta 29, 711 [1946].

⁶⁾ P. Karrer, Bull. soc. chim. France 149 [1947].

⁷⁾ L. J. Reed, Physiol. Revs. 33, 544 [1953].

⁸⁾ K. Wiesner u. Z. Valenta, Experientia 12, 190 [1956].

⁹⁾ R. Breslow, Chem. and Ind. 1956, R 28.

¹⁰⁾ R. Breslow, Chem. and Ind. 1957, 893; J. Amer. chem. Soc. 79, 1762 [1957].

¹¹⁾ R. Breslow, J. Amer. chem. Soc. 80, 3719 [1958].

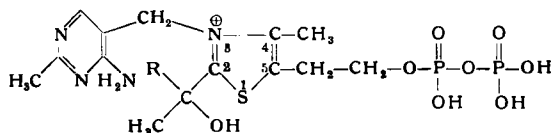
¹²⁾ J. Downes u. P. Sykes, Chem. and Ind. 1957, 1095.

¹³⁾ L. O. Krampitz, G. Greull, C. S. Miller, J. B. Bickling, H. R. Skeggs u. J. M. Sprague, J. Amer. chem. Soc. 80, 5893 [1958].

¹⁴⁾ S. Mizuhara u. P. Handler, J. Amer. chem. Soc. 76, 571 [1954].

¹⁵⁾ L. O. Krampitz, G. Greull u. I. Suzuki, Fed. Proc. 18, 266 [1959].

zeichnung „aktives Pyruvat“ und die Struktur 2-(α -Hydroxy- α -carboxyethyl)-TPP vorschlagen.



R = H, „aktiver Acetaldehyd“ 2-(α -Hydroxyethyl)-TPP
R = COOH, „aktives Pyruvat“ 2-(α -Hydroxy- α -carboxyethyl)-TPP

Stoppt man Ansätze von 2- 14 C-Pyruvat mit gereinigter Pyruvat-Decarboxylase aus Hefe¹⁶⁾ während der mit voller Geschwindigkeit ablaufenden Decarboxylierung durch Zusatz von heißem Methanol, so kann man im entweißten Extrakt radiopapierchromatographisch folgende Substanzen nachweisen (vgl. Abb. 1):

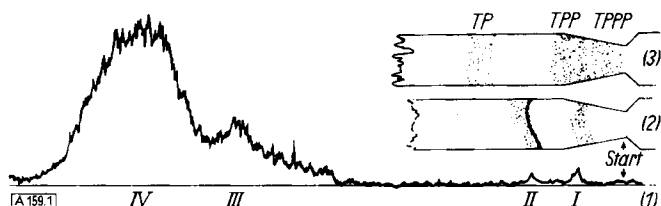


Abb. 1. Papierchromatogramm eines Ansatzes mit 2- 14 C-Pyruvat zur Gewinnung von „aktivem Acetaldehyd“ und „aktivem Pyruvat“¹⁸⁾. Das Bild zeigt von unten nach oben: (1) das Radiopapierchromatogramm des Ansatzes, (2) die UV-Absorption desselben Chromatogramms, (3) ein Vergleichschromatogramm mit Thiaminphosphat (TP), Thiaminpyrophosphat (TPP) und Thiamintriphosphat (TPPP). I: „aktiver Acetaldehyd“, II: „aktives Pyruvat“, III: Verunreinigung, IV: 2- 14 C-Pyruvat

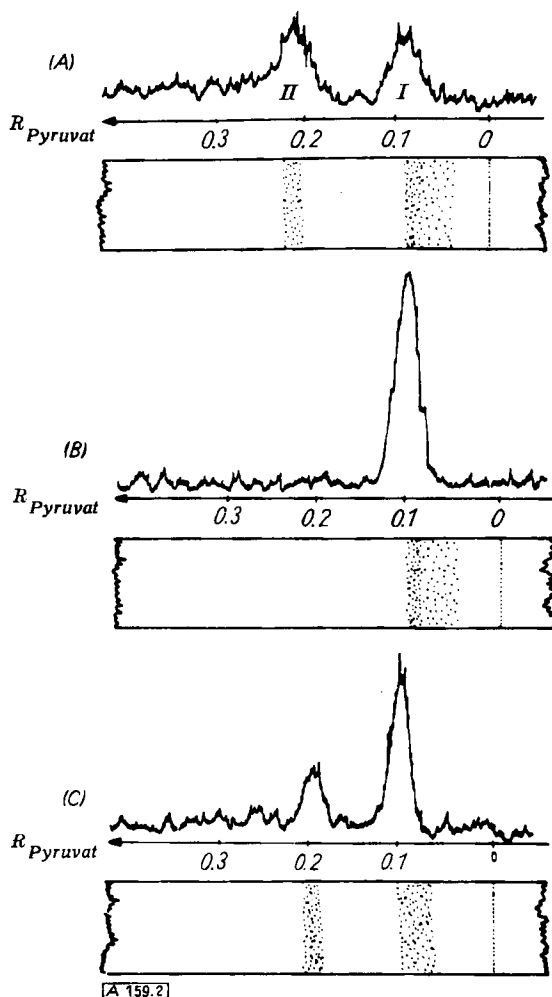


Abb. 2. (A) Papierchromatogramm eines Ansatzes von 2- 14 C-Pyruvat mit Pyruvat-Decarboxylase. (B) Rechromatogramm von „aktivem Acetaldehyd“ (Gipfel I in A). (C) Rechromatogramm von „aktivem Pyruvat“ (Gipfel II in A)¹⁸⁾

¹⁶⁾ H. Holzer, G. Schultz, C. Villar-Palasi u. J. Jüntgen-Sell, Biochem. Z. 327, 331 [1956].

nicht umgesetztes Pyruvat (Gipfel IV), eine im 14 C-Pyruvat enthaltene Verunreinigung (Gipfel III) sowie zwei bei der Rechromatographie einheitlich laufende radioaktive Substanzen (Gipfel I und II), die ähnliche R_F -Werte wie TPP aufweisen^{17,18)}. Verwendet man 1- 14 C-Pyruvat statt 2- 14 C-Pyruvat, so entsteht nur Gipfel II; dies dem zugrunde liegende Substanz liefert mit Apopyruvatdecarboxylase $^{14}\text{CO}_2$. Dagegen liefern die beiden mit 2- 14 C-Pyruvat entstehenden Gipfel I und II bei der Inkubation mit Apopyruvatdecarboxylase kein $^{14}\text{CO}_2$, sondern ^{14}C -Acetaldehyd. Auf Grund dieser Befunde war zu vermuten, daß den Gipfeln I und II „aktiver Acetaldehyd“ bzw. „aktives Pyruvat“, d. h. Verbindungen von Acetaldehyd bzw. Pyruvat mit TPP zugrunde liegen. Diese Ansicht wird durch den bei der Elution und beim Wiederauftragen zur Rechromatographie stattfindenden teilweisen Übergang von Gipfel II in Gipfel I weiter gestützt: man sieht aus Abb. 2, daß Gipfel I mit gleichbleibendem R_F -Wert rechromatographiert werden kann (Teil B), während Gipfel II bei der Rechromatographie sich in I und II aufspaltet (Teil C). Vermutlich liegt dem Übergang von I in II eine Decarboxylierung von „aktivem Pyruvat“ zu „aktivem Acetaldehyd“ zugrunde.

III. Struktur des „aktiven Acetaldehyds“

Zur Lokalisierung des ^{14}C -Acetaldehyds am TPP benutzen wir die Sulfit-spaltung nach R. R. Williams et al.¹⁹⁾. Man kann den bei der Spaltung entstehenden Pyrimidin-Teil (Fleck II in Abb. 3) leicht papierchromatographisch vom Phosphat enthaltenden Thiazol-Teil (Fleck I) trennen. Fleck I liegt an der Stelle des nicht substituierten Thiazol-Teils der aus TPP stammt, das den größten Teil unserer rohen Präparate von „aktivem Acetaldehyd“ ausmacht. Die daneben in geringerer Menge vorhandene ^{14}C -Acetaldehyd-TPP-Verbindung bzw. ihre Spaltprodukte können nur an der Radioaktivität erkannt werden.

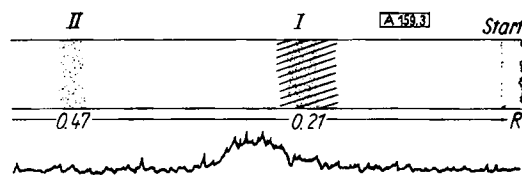


Abb. 3. ^{14}C -Radioaktivität, UV-Absorption (punktiert) und Phosphatreaktion (schraffiert) eines Papierchromatogramms nach Sulfit-spaltung von „aktivem Acetaldehyd“¹⁸⁾. I: Thiazolteil, II: Pyrimidin-Teil des TPP

Abb. 3 zeigt, daß sich die Radioaktivität in der Nähe von Fleck I, also dem Thiazolteil, findet. Die Differenz in der Lage des Schwerpunktes der UV-Absorption und der Radioaktivität dürfte auf Änderung des R_F -Wertes durch den Hydroxyäthylrest zurückzuführen sein: ebenso wie Hydroxyäthylthiamin einen größeren R_F -Wert aufweist als Thiamin (vgl. Abb. 4, Teil II), wandert das Hydroxyäthylthiazolderivat weiter als der nicht substituierte Thiazolteil.

G. Ehrens-värd (Lund, Schweden) machte uns darauf aufmerksam, daß bei Behandlung des ^{14}C -Hydroxyäthyl-TPP mit HJ und anschließender alkalischer Hydrolyse radioaktive Propionsäure entstehen sollte. Tatsächlich konnten wir nach entsprechender Behandlung des bei der Sulfit-spaltung von ^{14}C -Hydroxyäthyl-TPP entstehenden Thiazolteils ^{14}C -Propionsäure papierchromatographisch identifizieren¹⁸⁾.

Diese Befunde machen für den von uns aus Enzymansätzen isolierten „aktiven Acetaldehyd“ die von R. Breslow vorgeschlagene Struktur äußerst wahrscheinlich: es handelt sich um 2-(α -Hydroxyäthyl)-thiaminpyrophosphat. Um diese Struktur sicherzustellen, inkubierten wir²⁰⁾ den ^{14}C -markierten „aktiven Acetaldehyd“ mit Phosphatase.

¹⁷⁾ H. Holzer u. K. Beaucamp, Angew. Chem. 71, 776 [1959].

¹⁸⁾ H. Holzer u. K. Beaucamp, Biochim. biophysica Acta 46, 225 [1961].

¹⁹⁾ R. R. Williams, R. E. Waterman, J. C. Keresztesy u. E. R. Buchman, J. Amer. chem. Soc. 57, 536 [1935].

²⁰⁾ H. Holzer, H. W. Goedde, K.-H. Göggel u. B. Ulrich, Biochem. biophys. Res. Commun. 3, 599 [1960].

Man sieht aus Teil I der in Abb. 4 wiedergegebenen Radio-papierchromatogramme, daß Hydroxyäthyl-TPP über Hydroxyäthyl-thiaminphosphat zu Hydroxyäthyl-thiamin gespalten wird. Ein Kontrollchromatogramm mit TPP, Thiaminphosphat, Thiamin und synthetischem Hydroxyäthyl-thiamin*) ist im Teil II der Abb. 4 wiedergegeben. Auch bei der Papierchromatographie mit anderen²¹⁾ Lösungsmitteln ergibt das aus unseren Präparaten erhaltene Hydroxyäthyl-thiamin identische R_F -Werte mit synthetischem Hydroxyäthyl-thiamin. Inkubiert man Hydroxyäthyl-thiamin mit der von Y. Kaziro²²⁾ beschriebenen Thiaminpyrophosphokinase und ATP, so erhält man, wie zu erwarten, Hydroxyäthyl-TPP zurück (Teil III der Abb. 4).

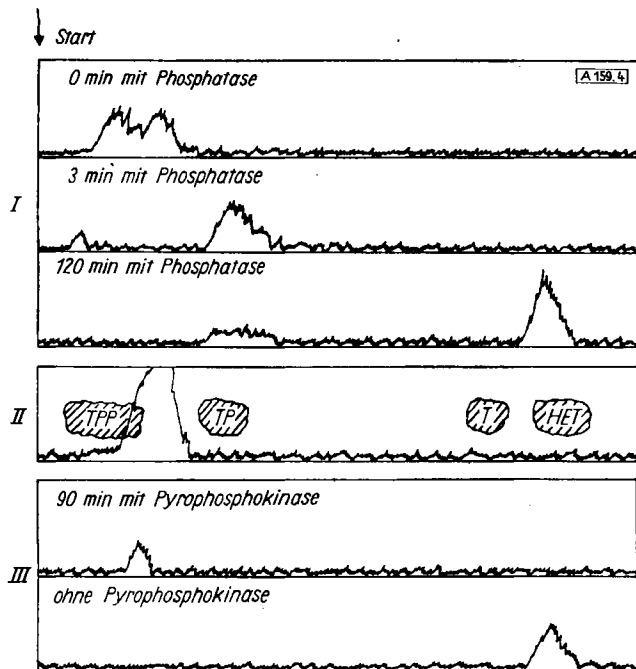


Abb. 4. Dephosphorylierung von ^{14}C -Hydroxyäthyl-TPP zu ^{14}C -Hydroxyäthyl-thiamin (Teil I) und Phosphorylierung von ^{14}C -Hydroxyäthyl-thiamin mit ATP und Thiaminpyrophosphokinase zu ^{14}C -Hydroxyäthyl-TPP (Teil III). Teil II zeigt das Chromatogramm von Vergleichssubstanzen²⁰⁾

TPP = Thiaminpyrophosphat, TP = Thiaminphosphat, T = Thiamin, HET = Hydroxyäthyl-thiamin

IV. Isolierung von 2-(α -Hydroxyäthyl)-TPP als Zwischenprodukt der Pyruvatoxydase-Reaktion

Hydroxyäthyl-TPP kann auch aus Ansätzen von 2- ^{14}C -Pyruvat mit Pyruvat-Oxydase aus Hefemitochondrien²⁰⁾ oder Schweineherz²³⁾ papierchromatographisch, oder besser säulenchromatographisch mit dem Anionenaustauscher Dowex 2 gewonnen werden. Ein Beispiel für die säulenchromatographische Auftrennung²⁴⁾ eines Ansatzes von Pyruvat-Oxydase aus Schweineherzmuskel mit 2- ^{14}C -Pyruvat ist in Abb. 5 wiedergegeben. Die so erhaltene Substanz ist im chemischen und enzymatischen Verhalten nicht von dem aus Pyruvatdecarboxylase-Ansätzen gewonnenen Hydroxyäthyl-TPP zu unterscheiden.

Auch synthetisches Hydroxyäthyl-TPP, das man nach Sprague und Miller²⁵⁾ aus Thiaminpyrophosphat und Acetaldehyd gewinnen kann, verhält sich chromatographisch und beim enzymati-

*) Wir danken Herrn Dr. Sprague von Merck, Sharp and Dohme, Rahway/USA, für dieses Präparat, das nach¹⁸⁾ hergestellt wurde.
²¹⁾ G. L. Carlson u. G. M. Brown, J. biol. Chemistry 235, PC3 [1960].
²²⁾ Y. Kaziro, J. Biochem. [Tokyo] 46, 1523 [1959].
²³⁾ P. Scriba u. H. Holzer, Biochem. Z. 334, 473 [1961].
²⁴⁾ H. Holzer, F. Da Fonseca-Wollheim, G. Kohlaw u. Ch. W. Woenckhaus, Ann. New York Acad. Sci., im Druck.
²⁵⁾ J. M. Sprague, persönliche Mitteilung.

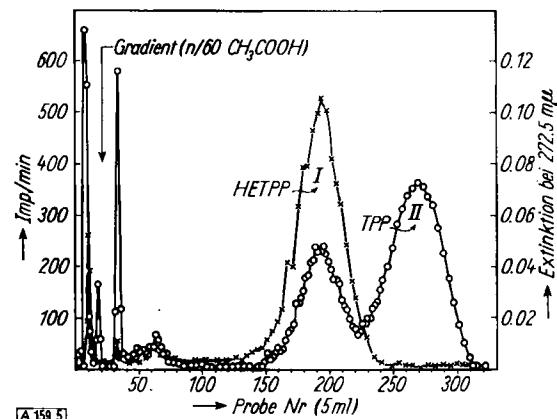


Abb. 5. Ionenaustausch-Chromatogramm eines Ansatzes von Pyruvat-Oxydase aus Schweineherzmuskel mit 2- ^{14}C -Pyruvat²⁴⁾. Säule: Dowex-2-Acetat X 10, 200–400 mesh, 24 cm x 3,14 cm²; Mischkammer: 250 ml H₂O, Zulauf: 0,0167 M Essigsäure; -o-o- Lichtabsorption der Fraktionen bei 272,5 mμ (isosbestischer Punkt für TPP) und d = 1 cm; -x-x- Radioaktivität (Impulse/min) in 0,2 ml

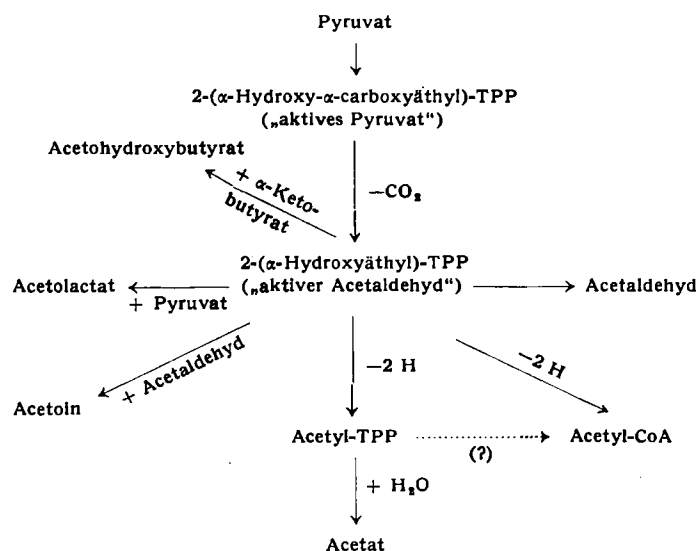
sehen Umsatz wie aus Enzymansätzen gewonnenes Hydroxyäthyl-TPP (vgl. jedoch Abschnitt VI). Hydroxyäthyl-TPP und nicht umgesetztes TPP lassen sich an Dowex 2 weitgehend trennen²⁶⁾.

V. Enzymreaktionen mit Hydroxyäthyl-TPP

„Aktiver Acetaldehyd“ sollte als Zwischenprodukt der im Schema 1 zusammengestellten, von Pyruvat ausgehenden Reaktionsfolgen auftreten. Tatsächlich dient das von uns aus Pyruvatoxydase- bzw. Pyruvatdecarboxylase-Ansätzen isolierte, sowie das synthetisch hergestellte Hydroxyäthyl-TPP als Substrat bei allen in das Schema eingetragenen, von „aktivem Acetaldehyd“ ausgehenden Reaktionen. Mit Apopyruvatdecarboxylase aus Hefe entsteht nach Gleichung (1) freier Acetaldehyd^{17, 18, 27, 43)}:



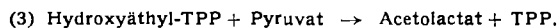
Bei Zusatz von freiem Acetaldehyd entsteht mit Apopyruvatdecarboxylase aus Hefe^{17, 18, 27)}, sowie mit Pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel²⁸⁾ nach Gleichung (2) Acetoin:



Schema 1. „Aktiver Acetaldehyd“ als Zwischenprodukt des Pyruvatabbaus (TPP = Thiaminpyrophosphat)

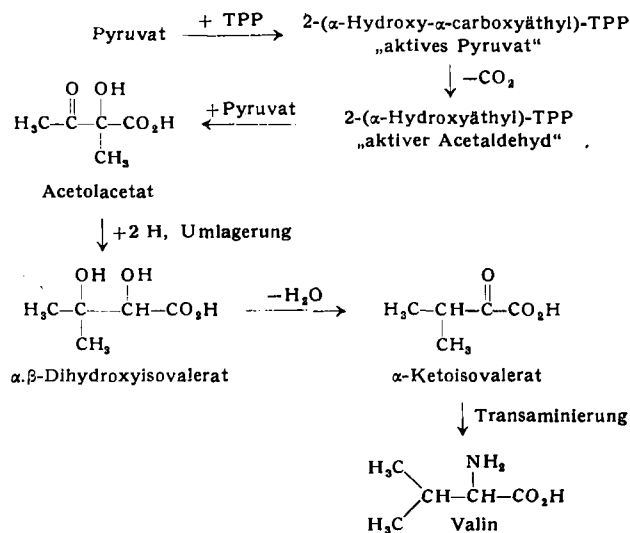
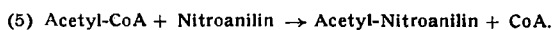
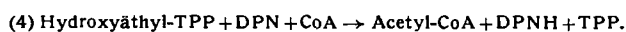
²⁶⁾ H. Holzer, H. W. Goedde u. B. Ulrich, Biochem. biophys. Res. Commun. 5, 447 [1961].
²⁷⁾ H. W. Goedde, K. G. Blume u. H. Holzer, unveröffentlicht.
²⁸⁾ H. Holzer u. G. Kohlaw, Biochem. biophys. Res. Commun. 5, 452 [1961].

Bei Zusatz von Pyruvat entsteht mit Pyruvat-Oxydase aus Herzmuskel²⁸⁾ oder Hefemitochondrien²⁹⁾ nach Gleichung (3) Acetolactat:



In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß Strassman et al.³⁰⁻³²⁾ Acetolactat in Hefe als Zwischenstufe der Valinsynthese aus Pyruvat identifizierten (vgl. Schema 2). Wahrscheinlich wird die Valin-Synthese in Hefe ebenso wie es Umbarger et al. bei *E. coli*^{33,34)} entdeckt haben, durch einen Rückkopplungsmechanismus („feed back“) gesteuert: aufgestautes Valin hemmt die Acetolactat-Synthese aus Pyruvat und bewirkt damit eine Hemmung der Valinsynthese, die so lange anhält, bis das aufgestaute Valin bei der Proteinsynthese und anderen Prozessen verbraucht wurde. Da uns Hydroxyäthyl-TPP zur Verfügung steht, können wir nun prüfen, an welchem vom Pyruvat zum Acetolactat führenden Reaktionsschritt die „feed back-Hemmung“ eingreift.

Mit Pyruvat-Oxydase aus Hefemitochondrien entsteht aus Hydroxyäthyl-TPP Acetyl-Coenzym A (Gleichung (4)), das nach Zusatz von Arylaminacetylase und Nitroanilin als Acetylnitroanilin (Gleichung (5)) identifiziert werden kann³⁵⁾:

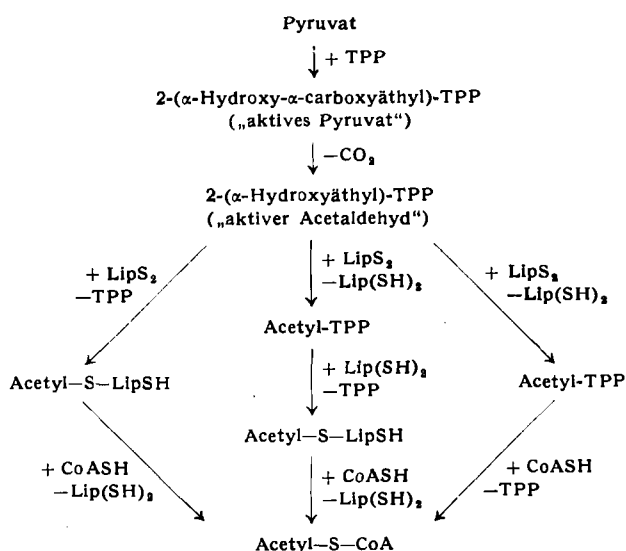


Schema 2. Biosynthese von Valin aus Pyruvat

Der Mechanismus der oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A schien bisher im Sinne des Vorschlages von Gunsalus³⁶⁾ geklärt. Dieser Mechanismus ist im linken Teil von Schema 3 wiedergegeben. Der mittlere und rechte Teil des Schemas zeigt zwei weitere Möglichkeiten für den Weg vom Pyruvat zum Acetyl-Coenzym A, die auf Grund der im folgenden dargestellten neueren Untersuchungen in Betracht gezogen werden müssen. Die Beobachtung³⁷⁾, daß Pyruvat an gereinigter Pyruvat-Decarboxylase aus Hefe in einer streng TPP-abhängigen Reaktion durch Dichlorphenol-indophenol in stöchiometrischen Mengenverhältnissen zu Essigsäure oxydiert wird, interpretierten wir^{37,38)} mit folgendem Reaktionsablauf:

Pyruvat $\xrightarrow{(+\text{TPP})}$ Hydroxy-carboxyäthyl-TPP $\xrightarrow{(-\text{CO}_2)}$ Hydroxyäthyl-TPP $\xrightarrow{(-2\text{H})}$ Acetyl-TPP $\xrightarrow{(+\text{H}_2\text{O})}$ Acetat.

In diesem Schema ist eine Oxydation von Hydroxyäthyl-TPP zu Acetyl-TPP als bisher nicht diskutierter Reaktionsschritt enthalten. Für diesen Reaktionsschritt spricht, daß freier Acetaldehyd in unserem System 40-mal langsamer als Pyruvat oxydiert wird³⁷⁾, die Reaktion also sicher nicht über freien Acetaldehyd läuft. Zudem konnten wir vor kurzem zeigen, daß aus Pyruvatoxydase-Ansätzen isoliertes Hydroxyäthyl-TPP mit Apopyruvatdecarboxylase und Dichlorphenol-indophenol oxydiert wird³⁹⁾. Eine solche Oxydation von Hydroxyäthyl-TPP zu Acetyl-TPP muß unseres Erachtens auch bei der Oxydation von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A in Betracht gezogen werden (vgl. den mittleren und rechten Teil von Schema 3). Dafür spricht, daß, wie seit langem bekannt, auch Pyruvat-oxydase mit künstlichen Elektronenacceptoren wie Dichlorphenol-indophenol oder Ferricyanid arbeitet, wobei als Oxydationsprodukt Acetat entsteht. Bei der physiologischen Pyruvatoxydation würde dann proteingebundene α -Liponsäure statt der künstlichen Oxydationsmittel die Oxydation zu Acetyl-TPP besorgen. Die Acetylgruppe würde entweder direkt auf Coenzym A (rechter Teil von Schema 3) oder zuerst auf α -Liponsäure und dann auf Coenzym A (mittlerer Teil von Schema 3) übertragen werden. Hinweise auf einen derartigen Reaktionsverlauf erbrachten Versuche von Das und Mitarbeitern⁴⁰⁾, wonach bei der ferricyanid-abhängigen Oxydation von Pyruvat mit dem TPP enthaltenden „Carboxylase“-Anteil aus *E. coli*-Pyruvatoxydase Acetylphosphat entsteht, wenn man hohe Konzentrationen von Orthophosphat zusetzt. Es ist anzunehmen, daß Orthophosphat eine Phosphorolyse von intermediär gebildetem Acetyl-TPP bewirkt. Modellversuche von Breslow und McNelis⁴¹⁾, sowie von White und Ingraham⁴²⁾ demonstrierten eine große Reaktionsfähigkeit



Schema 3. Möglichkeiten für die Oxydation von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A. TPP = Thiaminpyrophosphat; LipS₂ = oxydierte α -Liponsäure (an Protein gebunden); Lip(SH)₂ = reduzierte α -Liponsäure (an Protein gebunden); CoASH = Coenzym A

²⁸⁾ G. Kohlhaw, unveröffentlicht.

²⁹⁾ M. Strassman, A. J. Thomas u. S. Weinhouse, J. Amer. chem. Soc. 75, 5135 [1953].

³¹⁾ M. Strassman, A. J. Thomas u. S. Weinhouse, J. Amer. chem. Soc. 77, 1261 [1955].

³²⁾ R. L. Wixom, J. B. Shotton u. M. Strassman, J. biol. Chemistry 235, 128 [1960].

³³⁾ E. A. Adelberg u. H. E. Umbarger, J. biol. Chemistry 205, 475 [1953].

³⁴⁾ H. E. Umbarger, B. Brown u. E. J. Eyring, J. Amer. chem. Soc. 79, 2980 [1957].

³⁵⁾ H. W. Goedde, H. Inouye u. H. Holzer, Biochim. biophysica Acta, 50, 41 [1961].

³⁶⁾ I. C. Gunsalus: In The Mechanism of Enzyme Action. Herausgeber: William D. McElroy a. Bentley Glass. The John Hopkins Press, Baltimore. 1954, S. 545.

³⁷⁾ H. Holzer u. H. W. Goedde, Blochem. Z. 329, 192 [1957].

³⁸⁾ H. Holzer u. R. M. Crawford, Nature [London] 188, 410 [1960].

³⁹⁾ H. W. Goedde u. B. Ulrich, unveröffentlicht.

⁴⁰⁾ M. L. Das, M. Kolke u. L. J. Reed, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 753 [1961].

⁴¹⁾ R. Breslow u. E. McNelis, J. Amer. chem. Soc. 82, 2394 [1960].

⁴²⁾ F. G. White u. L. L. Ingraham, J. Amer. chem. Soc. 82, 4114 [1960].

der Acylgruppe von 2-Acyl-thiazoliumsalsen, so daß eine Acylierung der SH-Gruppen von α -Liponsäure bzw. Coenzym A energetisch sehr wohl möglich wäre. Die schnelle, spontane Hydrolyse von 2-Acyl-thiazoliumsalsen^{41, 42)} steht im Einklang damit, daß bei der enzymatischen, TPP-abhängigen Oxydation von Pyruvat mit künstlichen Oxydantien Acetat entsteht.

Die in den Gleichungen (1) bis (4) angegebenen enzymatischen Umsetzungen von Hydroxyäthyl-TPP laufen im Vergleich zum Umsatz von Pyruvat um etwa 4 Zehnerpotenzen langsamer ab³⁹⁾. Dies scheint mit unserem Postulat, daß Hydroxyäthyl-TPP ein Zwischenprodukt des Pyruvatumsatzes ist, nicht vereinbar. Wir können jedoch Gründe angeben, weshalb als Substrat angebotenes Hydroxyäthyl-TPP langsamer reagiert als im Zuge des Pyruvatumsatzes an den jeweiligen Enzymen entstandenes Hydroxyäthyl-TPP:

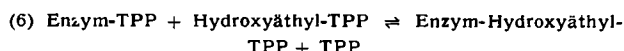
$\mu\text{Mol } ^{14}\text{C-Hydroxyäthyl-TPP}$	0,01	0,01
Radioaktivität [Imp/min]	30700	30700
$\mu\text{Mol TPP}$	—	1,0
Hydroxyäthyl-TPP-Gehalt in % der Summe		
Hydroxyäthyl-TPP + TPP	55 %	1 %
Radioaktivität des als Dinitrophenylhydrazon		
abgefangenen Acetaldehyds [Imp/min]	6980	1230
Ausbeute an $^{14}\text{C-Acetaldehyd}$	23 %	4 %

Tabelle 1. Hemmung der enzymatischen Freisetzung von Acetaldehyd aus Hydroxyäthyl-TPP durch TPP⁴³⁾

TPP hemmt den Umsatz von Hydroxyäthyl-TPP⁴³⁾. Die zweite Spalte in Tabelle 1 zeigt, daß wir beim Umsatz eines 45 % TPP enthaltenden Hydroxyäthyl-TPP-Präparates mit Apopyruvatdecarboxylase 23 % freien Acetaldehyd erhalten. Wird einer Paralleprobe TPP zugesetzt, so daß nunmehr 99 % TPP neben 1 % Hydroxyäthyl-TPP vorliegen (dritte Spalte in Tabelle 1), so geht unter sonst gleichen Bedingungen die Ausbeute an freiem Acetaldehyd auf 4 % zurück. Da alle in unseren früheren Versuchen verwendeten Hydroxyäthyl-TPP-Präparate viel TPP enthielten, war diese Konkurrenzhemmung am langsamen enzymatischen Umsatz beteiligt. Inzwischen steht uns weitgehend reines Hydroxyäthyl-TPP zur Verfügung. Da auch dieses um mehrere Zehnerpotenzen langsamer enzymatisch umgesetzt wird als Pyruvat, müssen hierfür noch andere Gründe vorliegen.

Eine besonders schlechte Affinität von Hydroxyäthyl-TPP zu den Apoenzymen wäre eine Erklärungsmöglichkeit. Wir haben deshalb die Michaeliskonstanten von TPP⁴⁴⁾ und Hydroxyäthyl-TPP³⁹⁾ mit Apopyruvatdecarboxylase aus Hefe gemessen und fanden beide in der Größenordnung 10^{-4} bis 10^{-5} Mol/l. Mißt man die Bildung von freiem Acetaldehyd aus Hydroxyäthyl-TPP mit Apopyruvatdecarboxylase bei Hydroxyäthyl-TPP-Sättigung, so findet man trotzdem nur $1/20000$ der Reaktionsgeschwindigkeit von Pyruvat. Schlechte Affinität scheidet demnach als Ursache des langsamen Umsatzes aus.

In jüngsten Versuchen fanden wir Anhaltspunkte dafür, daß der Ersatz von TPP, das seinen Acetaldehydest abgegeben hat, durch Hydroxyäthyl-TPP der extrem langsame, geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Hydroxyäthyl-TPP-Umsatz ist. Beim Pyruvatumsatz ist ein solcher Austausch von TPP gegen Hydroxyäthyl-TPP nicht notwendig, da hier TPP durch Reaktion mit Pyruvat wieder mit Acetaldehyd beladen wird. Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, diese Möglichkeit weiter zu prüfen, insbesondere im Hinblick darauf, ob es sich bei der postulierten langsamen Reaktion



um eine Verdrängung von TPP durch Hydroxyäthyl-TPP oder um eine Übertragung des Aldehyds von Hydroxyäthyl-TPP auf Enzym-TPP handelt. Unser Befund³⁹⁾, daß Hydroxyäthylthiamin mit Holopyruvatdecarboxylase keinen Acetaldehyd freisetzt, spricht allerdings gegen eine Übertragung und für eine Verdrängung, da bei letzterer der Aldehyddonor ebenso wie der Acceptor seine für die Bindung ans Enzymprotein notwendige Pyrophosphatgruppe besitzen muß. Die geschwindigkeitsbestimmende langsame Reaktion (8) würde nicht nur den langsamen Umsatz von Hydroxyäthyl-TPP, sondern, wenn man die Reaktion von rechts nach links betrachtet, auch die langsame Anhäufung

von Hydroxyäthyl-TPP bei der Inkubation von Pyruvat und TPP mit Pyruvatoxydase aus Schweineherz²³⁾ bzw. Hefemitochondrien²⁰⁾ erklären.

VI. Bestimmung von Hydroxyäthyl-TPP

Die Freisetzung von Acetaldehyd aus Hydroxyäthyl-TPP mit Pyruvatdecarboxylase (Gleichung 7) kann zu einem optischen Test für Hydroxyäthyl-TPP nach Warburg⁴⁵⁾ benützt werden. Man läßt dazu den Acetaldehyd mit DPNH und Alkoholdehydrogenase reagieren und mißt die Abnahme der Lichtabsorption bei 340 oder 366 μ .

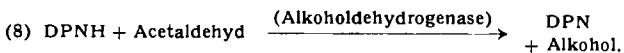
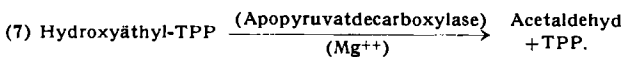
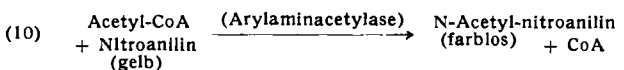
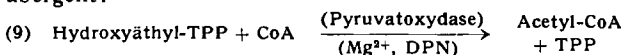


Tabelle 2 enthält einige Ergebnisse²⁶⁾. Man sieht, daß 40–50 % der auf Grund des Thiochromtestes zu erwartenden Hydroxyäthyl-TPP-Menge wiedergefunden werden (Hydroxyäthyl-TPP spricht im Thiochromtest ebenso an wie TPP). Da bei der nicht-enzymatischen Synthese von Hydroxyäthyl-TPP die beiden (auf Grund der Asymmetrie am α -C-Atom des Hydroxyäthylrestes möglichen) optischen Isomeren zu je 50 % entstehen, deutet das Ergebnis unserer enzymatischen Analysen mit Apopyruvatdecarboxylase darauf hin, daß nur einer der beiden Antipoden enzymatisch umgesetzt wird.

	Synthetisches DL-Hydroxyäthyl-TPP		Pyruvat
Eingesetzt [μMol]	0,150	0,300	0,240
Acetaldehyd gefunden [μMol]	0,065	0,122	0,202
Acetaldehyd in % des Eingesetzten	43 %	41 %	84 %

Tabelle 2. Bestimmung von Hydroxyäthyl-TPP durch Messung des mit Apopyruvatdecarboxylase freigesetzten Acetaldehyds mit DPNH und Alkoholdehydrogenase im optischen Test²⁶⁾

Auch die Oxydation von Hydroxyäthyl-TPP zu Acetyl-Coenzym A kann zu einem optischen Test benutzt werden. Dazu setzt man das mit Pyruvat-Oxydase aus Hydroxyäthyl-TPP gebildete Acetyl-Coenzym A mit Arylaminacetylase aus Leber und Nitroanilin um, wobei das gelb gefärbte Nitroanilin in das farblose N-Acetyl-nitroanilin übergeht:



Da der molare Extinktionskoeffizient von Nitroanilin bekannt ist, kann nach Ablauf der Reaktion ermittelt werden, wieviel Hydroxyäthyl-TPP eingesetzt wurde.

VII. Bestimmung von Hydroxyäthyl-TPP neben TPP

Zur Trennung von Hydroxyäthyl-TPP und TPP kann die Säulenchromatographie mit dem Anionenaustauscher Dowex 2 und Gradientenelution benutzt werden (vgl. Abb. 5): Ein einfaches papierchromatographisches Trennverfahren für Hydroxyäthyl-TPP und TPP konnten wir bisher nicht ausfindig machen. Es gelingt jedoch leicht, nach Angaben von G. L. Carlson und G. M. Brown²¹⁾ die dephosphorylierten Verbindungen, nämlich Hydroxyäthylthiamin und Thiamin, papierchromatographisch zu trennen. Da man Hydroxyäthyl-TPP und TPP mit käuflicher

⁴³⁾ P. Scriba, S. Schneider u. H. Holzer, Blochim. biophysica Acta 54, 115 [1961].

⁴⁴⁾ E. Holzer, H. D. Söling, H. W. Goedde u. H. Holzer, In H.-U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., im Druck.

⁴⁵⁾ O. Warburg: Wasserstoffübertragende Fermente. Werner Saenger, Berlin 1948.

Phosphatase in die nicht phosphorylierten Verbindungen überführen kann²⁰⁾, haben wir auf dieser Basis ein Verfahren zur Bestimmung von TPP neben Hydroxyäthyl-TPP ausgearbeitet²⁷⁾, das schneller und mit geringeren Verlusten arbeitet als die Trennung am Ionenaustauscher. Man inkubiert das zu analysierende Präparat mit Phosphatase und chromatographiert den Ansatz. Die auf dem Papierchromatogramm durch UV-Fluoreszenzlöschung lokalisierten Flecke von Hydroxyäthyl-thiamin und Thiamin (siehe z. B. Teil II von Abb. 4) werden eluiert und mit Hilfe des Thiochromtestes bzw. der Absorptionsmessung bei 272,5 m μ analysiert. Einige Ergebnisse zeigt Tabelle 3.

Präparat	Analyse der Eluate aus dem Papierchromatogramm nach enzymatischer Dephosphorylierung		Hydroxyäthyl-TPP in % von Hydroxyäthyl-TPP + TPP
	μ g Hydroxyäthyl-thiamin	μ g Thiamin	
Synthetisches Hydroxyäthyl-TPP ²⁸⁾	10,0	0,6	94 %
Hydroxyäthyl-TPP aus einem Ansatz von Hefe-Pyruvat oxydase mit Pyruvat ²⁰⁾ .	17,0	3,6	79 %

Tabelle 3. Bestimmung von Hydroxyäthyl-TPP neben TPP durch Dephosphorylierung, papierchromatographische Trennung von Hydroxyäthyl-thiamin und Thiamin und Bestimmung des eluierten Hydroxyäthyl-thiamins und Thiamins mit dem Thiochromtest²⁷⁾

VIII. „Aktiver Glykolaldehyd“

Das am Pentosephosphatcyclus beteiligte, Glykolaldehyd-Einheiten übertragende Enzym Transketolase benötigt, wie E. Racker und Mitarbeiter⁴⁶⁾ sowie B. L. Horecker und Mitarbeiter⁴⁷⁾ fanden, TPP als Coenzym. Es war zu vermuten, daß bei der Transketolase-Reaktion in Analogie zum „aktiven Acetaldehyd“ an TPP gebundener Glykolaldehyd („aktiver Glykolaldehyd“) als Zwischenprodukt auftritt. Tatsächlich konnten A. G. Datta und E. Racker^{48, 49)} aus einem Ansatz von Transketolase mit TPP und den Glykolaldehyd-Donatoren Fructose-6-phosphat oder Erythrulose ein Proteid abtrennen, das bei der Inkubation mit Glykolaldehyd Erythrulose lieferte. Auch bei der Inkubation mit Ribose-5-phosphat gab das Proteid seinen Glykolaldehyd ab und lieferte ein neues Zuckerphosphat, wahrscheinlich Sedoheptulose-7-phosphat. Das Proteid besaß also die Eigenschaften eines an Transketolaseprotein gebundenen „aktiven Glykolaldehyds“, der wie im linken Teil von Schema 4 angegeben entstanden war und entsprechend der rechten Hälfte von Schema 4 weiterreagiert hatte. Eine nähere Charakterisierung des Proteins bzw. des darin zu vermutenden „aktiven Glykolaldehyd“-Anteils wurde bisher nicht mitgeteilt.

Mit den am „aktiven Acetaldehyd“ gewonnenen Erfahrungen versuchten wir „aktiven Glykolaldehyd“ zu isolieren⁵⁰⁾. Mit Ionenaustauschchromatographie an Dowex 2 kann man aus einem Ansatz von uniform ¹⁴C-markiertem Fructose-6-phosphat mit Transketolase eine ¹⁴C-haltige Substanz gewinnen, die sich bei der Chromatographie ähnlich wie TPP verhält (vgl. Abb. 6). Nach der Inkubation dieser Substanz (ein Rechromatogramm auf Papier gibt

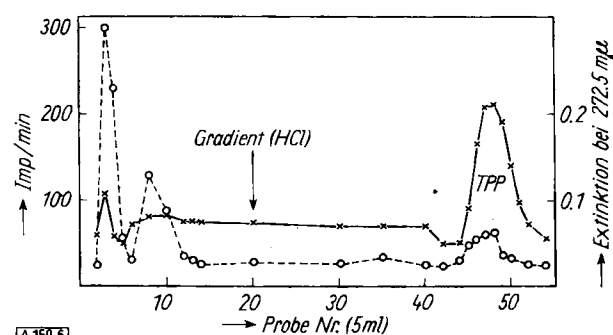


Abb. 6. Ionenaustausch-Chromatogramm eines Ansatzes von uniform ¹⁴C-markiertem Fructose-6-phosphat mit Transketolase und TPP⁵⁰⁾. Säule: Dowex-2-Chlorid X 10, 200–400 mesh, 15 cm x 2,4 cm³; Mischkammer: 250 ml H₂O, Zulauf: 250 ml 0,004 N HCl. -o-o- Radioaktivität (Impulse/min) in 0,2 ml; -x-x- Lichtabsorption der Fraktionen bei 272,5 m μ und d = 1 cm (Der erste Radioaktivitätsgipfel vor dem Gradienten entspricht freier Hexose, der zweite wurde noch nicht identifiziert.)

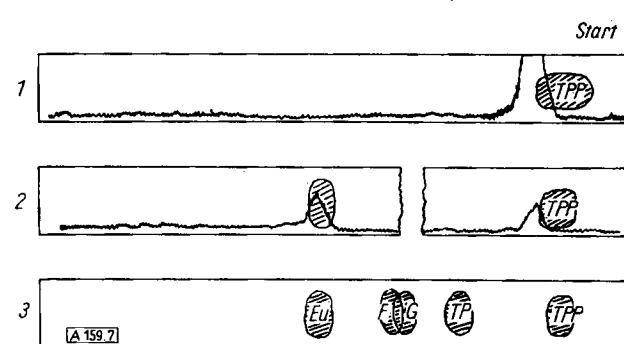
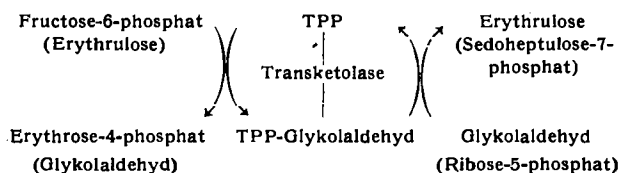
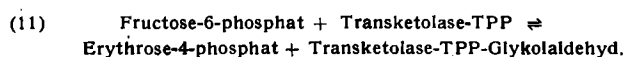


Abb. 7. Radiopapierchromatographischer Nachweis des Umsatzes von ¹⁴C-markiertem „aktivem Glykolaldehyd“ mit freiem Glykolaldehyd zu Erythrulose⁵⁰⁾. Papier: Schleicher und Schüll 2043b; Butanol/Eisessig/H₂O = 5:2:3. (1) Radiopapierchromatogramm (Rechromatogramm) von Ionenaustausch-chromatographisch gereinigtem (vgl. Abb. 6) „aktivem Glykolaldehyd“ aus Ansätzen von Transketolase mit ¹⁴C-Fructose-6-phosphat. (2) Umsatz von ¹⁴C-markiertem „aktivem Glykolaldehyd“ mit freiem Glykolaldehyd und Transketolase zu ¹⁴C-Erythrulose. Rechromatogramm der aus dem ersten Chromatogramm eluierten Radioaktivitätsgipfel. (3) Vergleichschromatogramm. TPP = Thiaminpyrophosphat, TP = Thiaminphosphat, F = Fructose, G = Glucose, Eu = Erythrulose

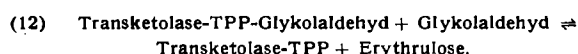
Teil 1 in Abb. 7 wieder) mit Transketolase und nicht-radioaktivem Glykolaldehyd erhält man Radioaktivität an der Position von Erythrulose im Papierchromatogramm (Teil 2 in Abb. 7). Die von uns isolierte Substanz besitzt demnach die vom „aktiven Glykolaldehyd“ zu erwartenden Eigenschaften: sie entsteht nach der durch Transketolase vermittelten Teilreaktion



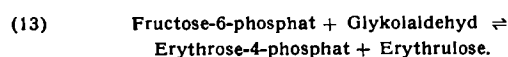
Schema 4. Wirkungsmechanismus von Thiaminpyrophosphat (TPP) bei der Übertragung von Glykolaldehyd durch Transketolase



und liefert dann mit Glykolaldehyd Erythrulose nach der weiteren Teilreaktion



Als Bilanz der Gleichungen (11) und (12) ergibt sich die seit langem bekannte, durch Transketolase katalysierte Gesamtreaktion



⁴⁶⁾ E. Racker, G. de la Haba u. I. G. Leder, J. Amer. chem. Soc. 75, 1010 [1953].

⁴⁷⁾ B. L. Horecker u. P. Z. Smyrniotis, J. Amer. chem. Soc. 75, 1009 [1953].

⁴⁸⁾ A. G. Datta u. E. Racker, Arch. Biochem. Biophysics 82, 489 [1959].

⁴⁹⁾ A. G. Datta u. E. Racker, J. biol. Chemistry 236, 624 [1961].

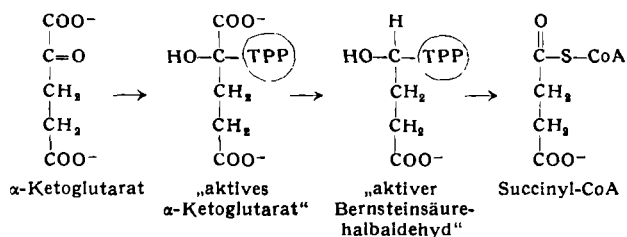
⁵⁰⁾ H. Holzer, D. Busch u. R. Kattermann, unveröffentlicht.

Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, die Struktur des „aktiven Glykolaldehyds“ mit ähnlichen Methoden, wie wir sie beim „aktiven Acetaldehyd“ angewendet haben, zu studieren. Wahrscheinlich handelt es sich in Analogie zum „aktiven Acetaldehyd“ um 2-(α , β -Dihydroxyäthyl)-TPP.

IX. „Aktiver Bernsteinsäurehalbaldehyd“

Wir haben einige erste Anhaltspunkte dafür, daß bei der Oxydation von α -Ketoglutarat mit α -Ketoglutarat-Oxydase zu Succinyl-Coenzym A als Zwischenprodukte „aktives α -Ketoglutarat“ und „aktiver Bernsteinsäurehalbaldehyd“ auftreten⁵¹⁾. Versuche zur Isolierung und Charakterisierung dieser Zwischenprodukte sind im Gange. In Analogie zu den vorstehend geschilderten TPP-abhängigen Reaktionen ist zu erwarten, daß bei diesen Zwischenprodukten Bernsteinsäurehalbaldehyd bzw. α -Ketoglutarat an das C-Atom 2 des Thiazolrings von TPP gebunden sind, so daß sich der im Schema 5 skizzierte Reaktionsverlauf ergibt.

⁵¹⁾ I. Witt, unveröffentlicht.



Schema 5. Vorschlag für den Reaktionsweg der oxydativen Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA

Schluß

Man kann hoffen, daß mit den nun zur Verfügung stehenden Methoden bald die letzten Einzelheiten des Wirkungsmechanismus von Thiaminpyrophosphat geklärt werden. Damit wird ein halbes Jahrhundert nach der Entdeckung des ersten TPP-abhängigen Enzyms durch Carl Neuberg²⁾ und ein Viertel-Jahrhundert nach der Entdeckung der Stoffwechselfunktion des Vitamins B₁ als Thiaminpyrophosphat durch Karl Lohmann³⁾ ein besonders interessantes und daher viel bearbeitetes Kapitel der biochemischen Forschung zu Ende geschrieben werden können.

Eingegangen am 4. August 1961 [A 159]

C₂₁-Steroide des Pflanzenreiches

Von Prof. Dr. RUDOLF TSCHESCHE

Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

Es wird über die N-freien C₂₁-Steroid-glykoside und ihre Konstitutionsbestimmung berichtet. Die Aglykone gehören entweder dem Δ^5 -Pregnen- oder dem 5 α -Pregnan-Typ an oder sie weisen das Skelett des C-Nor-D-homopregnens auf. Vom normalen Steroid-Typ lassen sich durch Aminierung in Stellung 3 und/oder 20 die zahlreichen Alkaloide dieser Gruppe ableiten. Es werden die biochemischen Fragestellungen behandelt, die mit der Entdeckung dieser neuen Steroidgruppe zusammenhängen.

Einleitung

Während im Tierreich C₂₁-Steroide in Gestalt des Gelbkörperhormons Progesteron und der Nebennierenrinden-Hormone Cortison, Hydrocortison, Aldosteron usw. gut untersucht und seit längerer Zeit bekannt sind, wurden im Pflanzenreich analoge Verbindungen erst in den letzten Jahren zahlreicher beobachtet und in ihrem chemischen

Aufbau zum Teil geklärt. C₂₁-Steroide des Pflanzenreiches treten mit Ausnahme der Alkaloide als Glykoside auf. Sie wurden erstmals in verschiedenen Spezies der Gattung *Digitalis* gefunden und erhielten daher die Bezeichnung Digitanol-Derivate¹⁾. Diese Bezeichnung soll beibehalten werden, auch nachdem in anderen Pflanzen solche Verbindungen gefunden

¹⁾ R. Tschesche u. G. Buschauer, Liebigs Ann. Chem. 603, 59 [1957].

Glykosid	Zusammensetzung	Zucker *)	Vorkommen	Aglykon	Zusammensetzung
Pregnan-Derivate					
Diginin ³⁾	C ₂₈ H ₄₀ O ₇	1 Dn	<i>Digitalis purpurea</i> u. <i>lanata</i>	Diginigenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₄
Digitalonin ⁴⁾	C ₂₈ H ₄₀ O ₈	1 Dig	<i>D. spec.</i>	Diginigenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₄
Digifolein ^{1,4)}	C ₂₈ H ₄₀ O ₈	1 Dn	<i>D. purpurea</i> u. <i>lanata</i>	Digifologenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₅
Lanafolein ¹⁾	C ₂₈ H ₄₀ O ₈	1 Ol	<i>D. lanata</i>	Digifologenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₅
Digipronin ^{3,5,6)}	C ₂₈ H ₄₀ O ₉	1 Dig	<i>D. spec.</i>	Digiprogenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₆
Digipurpurin ⁴⁾	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₄	3 Dx	<i>D. purpurea</i>	Digipurpurogenin	C ₂₁ H ₃₂ O ₄
Purpnin ^{6,7)}	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₃	3 Dn	<i>D. spec.</i>	Purpnigenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₄
Purpronin ⁷⁾	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₄	3 Dn	<i>D. spec.</i>	Purprogenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₅
Digacetin ⁹⁾	C ₄₃ H ₆₄ O ₁₆	3 Dx	<i>D. spec.</i>	Digacetigenin	C ₂₁ H ₃₈ O ₅ + 1 Acetyl
nicht isoliert ⁸⁾	—	1 Essigs.			
nicht isoliert ⁸⁾	—	x Glu	<i>Xysmalobium undulatum</i> R.Br.	5 α -Pregnan-3 β -ol-20-on	C ₂₁ H ₃₄ O ₂
nicht isoliert ⁸⁾	—	x Glu	<i>X. undulatum</i> R.Br.	Δ^6 -Pregnen-3 β -ol-20-on	C ₂₁ H ₃₆ O ₂
C-Nor-D-homopregnen-Derivate					
nicht isoliert ¹⁰⁾	—	1 Glu	<i>Sarcostemma australe</i> R.Br.	Sarcostin	C ₂₁ H ₃₄ O ₆ + 1 H ₂ O
nicht isoliert ¹¹⁾	—	1 Benzoos.			
nicht isoliert ¹¹⁾	—	1 Zimts.			
nicht isoliert ¹¹⁾	—	—	<i>Cynanchum caudatum</i> Max.	Cynanchogenin	C ₂₁ H ₃₂ O ₆ + 1 —OC—C ₆ H ₁₀

*) Dn = D-Diginose, Ol = D-Oleandrose, Dx = D-Digitoxose, Dig = D-Digitalose, Glu = D-Glucose

Tabelle 1. C₂₁-Steroide des Pflanzenreiches

(Fußnoten von Tabelle 1 s. S. 728)