

ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER PHOSPHOKETOLASE

II. UMSATZ VON "THIAMINPYROPHOSPHAT AKTIVIERTEM
GLYCOLALDEHYD"

W. SCHRÖTER UND H. HOLZER

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Freiburg,
Freiburg im Breisgau (Deutschland)*

(Eingegangen am 18. März, 1963)

SUMMARY

*On the mechanism of phosphoketolase**II. Conversion of "thiamine pyrophosphate activated glycolaldehyde"*

2-(1,2-Dihydroxyethyl)-thiamine pyrophosphate ("thiaminepyrophosphate-activated glycolic aldehyde"), isolated from an incubation mixture of hydroxypyruvate and thiamine pyrophosphate with a preparation of pyruvate oxidase from pig-heart muscle, is incubated with purified phosphoketolase (D-xylulose-5-phosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase (phosphate-acetylating), EC 4.1.2.9), from *Lactobacillus plantarum*. In the presence of orthophosphate acetyl phosphate is formed, whereas in the presence of ferricyanide the reaction product is glycolic acid.

The acetyl phosphate is identified by comparison with authentic acetyl phosphate in high voltage electrophoresis and, after cleavage with hydroxylamine, by comparison with authentic acetylhydroxamic acid in paper chromatography.

The reaction rate of "thiamine pyrophosphate-activated glycolic aldehyde" is about 100 times smaller than that of xylulose 5-phosphate, fructose 6-phosphate, or hydroxypyruvate.

The possible role of "thiamine pyrophosphate-activated glycolic aldehyde" and its reaction product acetylthiamine pyrophosphate as intermediates in the phosphoketolase-catalyzed reaction is discussed.

EINLEITUNG

In der ersten Arbeit dieser Reihe zeigten wir¹, dass alle bisher bekannten Substrate der Phosphoketolase (D-Xylulose-5-phosphat:D-Glyceraldehyd-3-phosphat-lyase (phosphat-acetylierend), EC 4.1.2.9) aus *Lactobacillus plantarum* (Xylulose-5-phosphat, Hydroxypyruvat, Fructose 6-phosphat) in einer streng TPP-abhängigen Reaktion mit Ferricyanid zu Glycolsäure oxydiert werden. Dieser Befund weist darauf hin, dass eine Verbindung von Glycolaldehyd mit TPP ("TPP-aktivierter

Abkürzungen: Acetyl-P = Acetylphosphat; DHETPP = 2-(1,2-Dihydroxyäthyl)-thiaminpyrophosphat; Pent-5-P = Pentose 5-phosphat; TMP = Thiaminmonophosphat; TPP = Thiaminpyrophosphat.

Glycolaldehyd² ein Zwischenprodukt der Phosphoketolasereaktion ist. Dieses Zwischenprodukt wird bei Anwesenheit von Orthophosphat zu Acetyl-P weiterverändert, während es mit Ferricyanid zu Glycolyl-TPP oxydiert und weiter mit Wasser zu Glycolsäure hydrolysiert wird. Die Struktur des aus Ansätzen mit Pyruvat-oxydase-System aus Schweineherzmuskel isolierten "TPP-aktivierten Glycolaldehyds" konnte als DHETPP aufgeklärt werden⁴. Eventuell ist die Substanz identisch mit dem in vorläufigen Mitteilungen von KRAMPITZ *et al.*⁵ erwähnten Syntheseprodukt aus TPP und 2 Molekülen Formaldehyd. Durch Umsatz von Hydroxypyruvat und TPP mit einem Enzympräparat aus Schweineherzmuskel kann "TPP-aktivierter Glycolaldehyd" in grösserer Menge gewonnen werden⁶. In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass der so erhaltene "TPP-aktivierte Glycolaldehyd" an Phosphoketolase bei Gegenwart von Orthophosphat in Acetylphosphat übergeht und bei Gegenwart von Ferricyanid zu Glycolsäure oxydiert wird. Er liefert daher die gleichen Endprodukte, wie die in unserer vorhergehenden Arbeit studierten Substrate der Phosphoketolasereaktion¹. Wir sehen in diesen Versuchen einen weiteren Hinweis darauf, dass "TPP-aktivierter Glycolaldehyd" ein Zwischenprodukt der Phosphoketolasereaktion ist.

PRÄPARATE UND METHODEN

Präparate

Thiamin, TMP und TPP wurden von der Firma E. Merck AG., Darmstadt, Barium Rib-5-*P* von der Firma C. F. Boehringer und Soehne, Mannheim, Lithium-acetyl-P von der Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. (U.S.A.), D,L-[3-¹⁴C]Serin, spezifische Aktivität $2,5 \cdot 10^6$ Imp./min pro μ Mol von The Radiochemical Centre, Amersham und D-Aminosäureoxydase (D-Aminosäure:O₂-oxidoreductase (deaminierend), EC 1.4.3.3), spezifische Aktivität 15 E pro mg Protein, von der Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N. J. (U.S.A.), bezogen. Pyruvatoxydase-System aus Schweineherz wurde nach SCRIBA UND HOLZER⁷ und Lithium Hydroxypyruvat nach DICKENS UND WILLIAMSON⁸ gewonnen. Acethydroxamsäure wurde aus äquimolaren Mengen von Essigsäure-anhydrid und Hydroxylamin hergestellt.

Präparation von 2-[¹⁴C]DHETPP und von DHETPP

[2-¹⁴C]DHETPP wurde nach der von DA FONSECA-WOLLHEIM *et al.*⁶ angegebenen Methode durch oxydative Desaminierung von D,L-[3-¹⁴C]Serin mit D-Aminosäureoxydase und Umsetzung des entstehenden [3-¹⁴C]Hydroxypyruvates mit Pyruvatoxydase-System aus Schweineherz gewonnen. In folgenden Punkten wurde von der angegebenen Methodik abgewichen: Es wurden 37 mg D-Aminosäureoxydase eingesetzt. Nach Äquilibrieren des Inkubationsansatzes mit dem Enzym wurde die Reaktion mit D,L-[3-¹⁴C]Serin gestartet. Nach 110 min wurde mit 0.1 N HCl gestoppt und auf ein pH von 5.9 eingestellt. Nach Ausfällen des Proteins mit 10 ml 96%igem

* In unseren bisherigen Arbeiten über TPP-aktivierte Aldehyde sprachen wir von "aktivem Acetaldehyd", "aktivem Glycolaldehyd" etc.. Vor kurzem ist nun ein an TPP-aktivierter Formaldehyd synthetisch² bzw. aus Enzymanisätzen³ zugänglich geworden. Es ist daher zweckmässig, um Verwechslungen mit "aktivem Formaldehyd" zu vermeiden, der an Tetrahydrofolsäure gebunden ist, von "TPP-aktivierten Aldehyden" bzw. "Tetrahydrofolsäure-aktivierten Aldehyden" zu sprechen.

Äthanol und zweimaligem Waschen des Niederschlages mit 2 ml Äthanol wurden die vereinigten Überstände auf 3.0 ml eingengt. Nach Bestimmung mit Lactatdehydrogenase (L-Lactat: NAD oxydoreductase, EC 1.1.1.27) im optischen Test wurde das gebildete Hydroxypyruvat weiter mit dem Pyruvatoxydase-System umgesetzt. $[2-^{14}\text{C}]$ DHETPP wurde durch Ionenaustauschchromatographie an einer Dowex-2X10 Säule (Höhe 40 cm, Durchmesser 2.1 cm, Chlorid-Form, 200 – 400 mesh) nach einem Vorlauf von 240 ml H_2O durch Elution mit 2 mM HCl gewonnen. $[2-^{14}\text{C}]$ DHETPP wurde papierchromatographisch und chromatographisch identifiziert. Das Präparat enthielt 80% $[2-^{14}\text{C}]$ DHETPP und 20% TPP, berechnet aus dem Thiamingehalt und der spezifischen Radioaktivität.

Nicht markiertes DHETPP wurde aus Lithiumhydroxypyruvat mit dem Pyruvatoxydase-System hergestellt⁶.

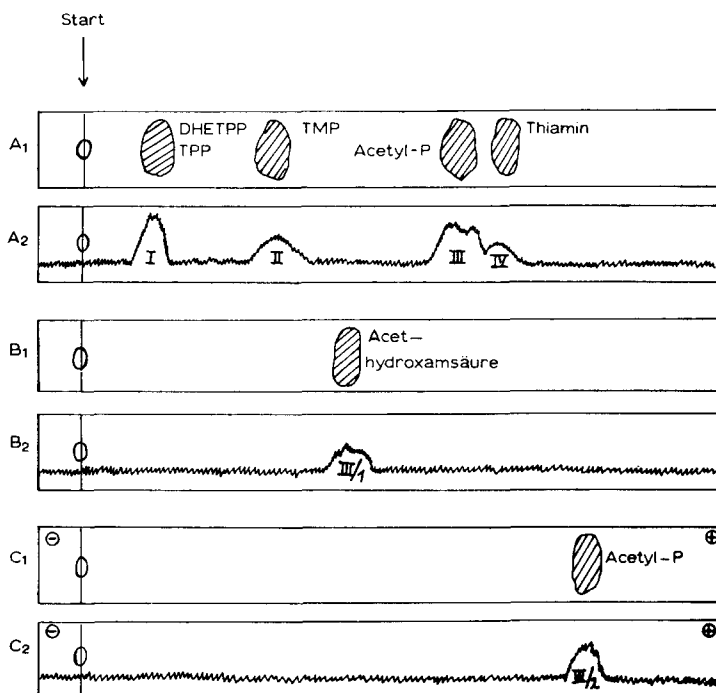


Fig. 1. Papierchromatogramme und Elektropherogramm von Ansätzen mit Phosphoketolase und $[^{14}\text{C}]$ DHETPP. A₁: Chromatographie von DHETPP, TPP, TMP, Thiamin und Acetyl-P in Äthanol-Acetat. A₂: Chromatographie eines Ansatzes von Phosphoketolase mit $[^{14}\text{C}]$ DHETPP in Äthanol-Acetat. Registrierung der Radioaktivität mit dem Radiopapierchromatographen. Der Versuchsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.6 ml: 40 μMole Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 6.0), 1 μMol MgCl_2 , 0.28 μMol $[^{14}\text{C}]$ DHETPP, 1.8 mg Phosphoketolase, spez. Aktivität 0.13. Nach 30 min Inkubation bei 37° wurde mit 7 ml abs. Äthanol abgestoppt. Nach zweistündigem Stehen bei 4° wurde das ausgefällte Protein abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 90% Äthanol gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden im Vakuum auf 0.2 ml eingengt und zur Chromatographie aufgetragen. B₁: Chromatographie von Acet-hydroxamsäure in wassergesättigtem *n*-Butanol. B₂: Chromatographie der Hälfte des Gipfels III des Chromatogramms A₂ nach Versetzen mit Hydroxylamin in wassergesättigtem *n*-Butanol. Registrierung der Radioaktivität. C₁: Elektropherogramm von Acetyl-P. C₂: Elektropherogramm der 2. Hälfte des Gipfels III des Chromatogramms A₂ nach Elution mit Wasser. Registrierung der Radioaktivität. Experimentelle Einzelheiten siehe PRÄPARATE UND METHODEN.

Bestimmung und Isolierung von Acetyl-P

Die Acetyl-P-Bestimmung erfolgte nach der früher¹ angegebenen Methode. Zur Isolierung von Acetyl-P wurden die enteinsetzten und eingengt Inkubationsansätze in dem von COHEN *et al.*⁹ angegebenen Fließmittel 14 Stunden, absteigend bei 25° auf Schleicher und Schüll Papier Nr. 2043b Mgl chromatographiert. Es traten 4 Gipfel auf (Fig. 1, Teil A): Thiamin, TMP und TPP wurden im Ultraviolettlicht lokalisiert; Acetyl-P wurde nach Besprühen mit 2 M Hydroxylamin (pH 5.8), Trocknen und Besprühen mit einer 5%igen Lösung von FeCl₃ in Methanol als Acet-hydroxamsäure nachgewiesen. Der [2-¹⁴C]Acetyl-P-Gipfel wurde mit H₂O eluiert, das Eluat zur Trockene eingengt und der Rückstand in 0.2 ml H₂O aufgenommen. Die Hälfte wurde mit 0.1 ml 2 M NH₂OH (pH 5.8) vermischt, nach 10 min Stehen

TABELLE I

BILDUNG VON [¹⁴C]ACETYL-P AUS [¹⁴C]DHETPP AN PHOSPHOKETOLASE

Die Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 0.61 ml: 40 μ Mole Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 6.0), 1 μ Mol MgCl₂, 0.14 bzw. 0.28 μ Mol [¹⁴C]DHETPP, 1.8 mg Phosphoketolase (Ribosephosphat-isomerase und Ribulosephosphat-epimerase enthaltend), spez. Aktivität 0.13. Es wurde bei 37° inkubiert und nach der jeweils angegebenen Zeit mit 7.0 ml abs. Äthanol abgestoppt.

Weitere Aufarbeitung siehe PRÄPARATE UND METHODEN.

[¹⁴ C]DHETPP eingesetzt (Imp./min $\times 10^3$)	Dauer der Inkubation (min)	Acetyl-P gefunden (Imp./min $\times 10^3$)		
		Elektro- phorese	Als Acet- hydroxam- säure	Ins- gesamt
28	30	0.8	0.7	1.5
28	60	1.4	1.0	2.4
56	30	1.5	1.2	2.7

bei Zimmertemperatur zur Trockene eingengt und dreimal mit 2 ml absolutem Äthanol gewaschen. Es wurde vom Unlöslichen abzentrifugiert, die Überstände wurden vereinigt, auf 0.1 ml eingengt und zur Chromatographie in wassergesättigtem *n*-Butanol auf Whatman-Papier Nr. 1, gewaschen mit Ameisensäure und Versen, absteigend 16 h chromatographiert. (Fig. 1, Teil B). Die Acet-hydroxamsäure wurde durch Besprühen mit FeCl₃-Lösung lokalisiert und nach Elution mit H₂O auf Aluminiumplättchen in unendlich dünner Schicht ausgezählt (siehe Tabelle I). Die 2. Hälfte des in H₂O aufgenommenen [2-¹⁴C]Acetyl-P-Gipfels wurde auf 0.02 ml eingengt und zur Hochspannungselektrophorese (38.5 V/cm, Laufzeit 90 min bei 4°) auf Schleicher und Schüll Papier Nr. 2043b Mgl aufgetragen (Fig. 1, Teil C). Der Gipfel an der Acetyl-P-Stelle wurde eluiert, eingengt und die Radioaktivität auf Aluminiumschälchen in unendlich dünner Schicht ausgezählt (siehe Tabelle I). Zur Zählung und Registrierung der Radioaktivität dienten die früher¹ angegebenen Geräte.

Gewinnung des Bakterienextraktes

Die Züchtung der Bakterien erfolgte wie früher angegeben¹. 3 g Bakterienpaste wurden mit 7.5 g Alcoa, Typ A-301 (Alumina Corporation, Philadelphia, Pa.) 10 min

bei 4° im Mörser zerrieben. Die zähflüssige Suspension wurde in Wasser aufgenommen und zweimal mit Wasser auf der Zentrifuge gewaschen. Das Volumen der vereinigten Überstände (Rohsaft) aus 3 g Bakterienpaste betrug ca. 30 ml. Die Anreicherung der Phosphoketolase erfolgte wie früher angegeben¹.

ERGEBNISSE

Aus [3-¹⁴C]Hydroxypyruvat mit dem Pyruvatoxydase-System gewonnener "TPP-aktivierter Glycolaldehyd" wurde mit gereinigter Phosphoketolase aus *Lactobacillus plantarum* und Orthophosphat inkubiert. Es wurde mit Alkohol enteiweiss und der Überstand chromatographiert. Teil A₂ von Fig. 1 gibt die Verteilung von Radioaktivität auf dem Papierchromatogramm wieder. Durch Vergleich mit den in Teil A₁ aufgezeichneten Positionen von authentischen Vergleichssubstanzen sieht man, dass neben nicht umgesetztem [¹⁴C]-markiertem "TPP-aktiviertem Glycolaldehyd" (Gipfel I) radioaktiver "TMP-aktivierter Glycolaldehyd" (Gipfel II), [¹⁴C]Acetyl-P (Gipfel III) und eventuell [¹⁴C]-markierter "Thiamin-aktivierter Glycolaldehyd" (Gipfel IV) auftreten. Um Gipfel III weiter als Acetyl-P zu identifizieren, wurde dieser Bereich aus dem Chromatogramm A₂ eluiert. Die Hälfte des Eluates wurde mit Hydroxylamin behandelt und im Vergleich mit authentischer Acethydroxamsäure chromatographiert (vgl. B₁ und B₂ in Fig. 1). Die andere Hälfte wurde im Vergleich mit authentischem Acetyl-P der Elektrophorese unterworfen (vgl. C₁ und C₂ in Fig. 1). Man sieht aus der gleichen Lage von Radioaktivität und authentischer Vergleichssubstanz, dass Gipfel III in Chromatogramm A₁ [¹⁴C]Acetyl-P zugrunde liegt.

In Tabelle I sind die Radioaktivitätsausbeuten mehrerer Ansätze von [¹⁴C]-markiertem, "TPP-aktiviertem Glycolaldehyd" mit Phosphoketolase und Orthophosphat nach Auftrennung der Acetyl-P-Fraktion durch Chromatographie bzw. Elektrophorese entsprechend Fig. 1 wiedergegeben. Wie zu erwarten, nimmt die Ausbeute bei Verlängerung der Inkubationszeit zu und Verdopplung des Einsatzes an "TPP-aktiviertem Glycolaldehyd" führt zu annähernder Verdopplung der Radioaktivität im Acetyl-P. Ein Kontrollversuch unter sonst gleichen Bedingungen, jedoch ohne Enzym, ergab keine Radioaktivität im Bereich von Gipfel III bei Chromatographie entsprechend Teil A₂ in Fig. 1. Wie zu erwarten, ist die Radioaktivitätsausbeute in der [¹⁴C]Acethydroxamsäure etwa gleich wie im [¹⁴C]Acetyl-P, wenn man die Acetyl-P-Fraktion des ersten Chromatogramms (Gipfel III in Teil A von Fig. 1) je

TABELLE II

VERGLEICH DER ACETYL-P-BILDUNG AUS PENT-5-P UND DHETPP

Die Versuchsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 0.6 ml: 40 μ Mole Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 6.0), 4 μ Mole Rib-5-P bzw. DHETPP, 1 μ Mol MgCl₂, 240 μ g Phosphoketolase (Ribosephosphat-isomerase und Ribulosephosphat-epimerase enthaltend) sowie in den Versuchen mit Pent-5-P 0.2 μ Mol TPP. Es wurde 30 min bei 37° inkubiert.

Substrat	Enzymmenge (μ g)	Acetyl-P gebildet (μ Mol)
Pent-5-P	240	0.95
DHETPP	240	<0.03

zur Hälfte zur Rechromatographie entsprechend Teil B von Fig. 1 bzw. zur Elektrophorese entsprechend Teil C in Fig. 1 aufteilt.

Bei den in Tabelle I beschriebenen Versuchen beträgt die Radioaktivitätsausbeute im Acetyl-P etwa 5–10% des eingesetzten "TPP-aktivierten Glycolaldehyds". Da für die Versuche sehr hohe Konzentrationen an Phosphoketolase benutzt wurden (1.8 mg Protein pro 0.61 ml Ansatz) war schon hieraus zu ersehen, dass die Umsatzgeschwindigkeit des "TPP-aktivierten Glycolaldehyds" relativ klein ist. Tabelle II zeigt, dass die Geschwindigkeit der Acetyl-P-Bildung aus "TPP-aktiviertem Glycolaldehyd" weniger als 3% derjenigen aus Pent-5-P (Ribosephosphat-isomerase (D-Ribose-5-phosphat Ketol-isomerase, EC 5.3.1.6) und Ribulosephosphat-epimerase (D-Ribulose-5-phosphat 3-epimerase, EC 5.1.3.1) Gleichgewichtsgemisch) beträgt. Auch die Reduktion von Ferricyanid (vgl. Tabelle III) erfolgt mit "TPP-aktiviertem

TABELLE III

VERGLEICH DER FERRICYANID-REDUKTION DURCH PENT-5-P UND DHETPP
AN PHOSPHOKETOLASE

Die Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 0.6 ml: 40 μ Mole Citratpuffer (pH 6.0), 1 μ Mol $MgCl_2$, 0.03 μ Mol Ferricyanid, 4 μ Mole Rib-5-P bzw. 4 μ Mole DHETPP, in den Versuchen mit Pent-5-P 0.2 μ Mol TPP sowie die jeweils angegebene Enzymmenge (Ribosephosphat-isomerase und Ribulosephosphat-epimerase enthaltend). Es wurde 10 min bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0.06 ml 50-%iger Trichloressigsäure abgestoppt. Nach Abzentrifugieren des ausgefällten Proteins wurde die Absorption im Überstand bei 405 m μ gemessen.

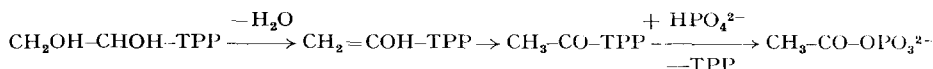
Substrat	Enzymmenge (μ g)	ΔA_{405} m μ /10 min
Pent-5-P	122	0.290
DHETPP	122	< 0.001
DHETPP	1980	0.018

Glycolaldehyd" überaus langsam im Vergleich zu Pent-5-P als Substrat. Erst mit sehr hohen Konzentrationen an "TPP-aktiviertem Glycolaldehyd" war eine exakt messbare Ferricyanidreduktion nachzuweisen.

DISKUSSION

Einen relativ zu den eigentlichen Substraten sehr langsamen Umsatz des intermediär entstehenden TPP-Derivates haben wir bereits beim Studium des Umsatzes von "TPP-aktiviertem Acetaldehyd" an verschiedenen Enzymen beobachtet. In früheren Arbeiten diskutierten wir^{10,11} verschiedene Erklärungsmöglichkeiten hierfür. Eine Möglichkeit besteht darin, dass das mit dem Aldehyd beladene TPP in einer langsamen, geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion mit dem Apoenzym rekombiniert. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass die Abdissoziation des TPP vom Enzymprotein nach Abgabe des Aldehyds geschwindigkeitsbestimmend langsam erfolgt. Die letztgenannte Möglichkeit wird von RACKER¹² für die wahrscheinlichste gehalten.

Für den Übergang des "TPP-aktivierten Glycolaldehyds" in Acetyl-P ist der folgende Mechanismus in Betracht zu ziehen (vgl. Ref. 1):



Zwar ist es bisher nicht gelungen, mit Hydroxylamin eine energiereich an TPP gebundene Acetylgruppe abzufangen^{13,14}, jedoch haben sich bisher keine experimentellen Hinweise für einen anderen Reaktionsweg ergeben. Der Befund von GOLDBERG UND RACKER¹⁵, wonach beim Umsatz von Pent-5-P in [³H]H₂O nur ein ³H-Atom im Acetyl-P auftritt, scheint dem oben formulierten Reaktionsablauf zu widersprechen. Man sollte nämlich bei Gleichgewichtseinstellung zwischen 1-Hydroxyvinyl-TPP und Acetyl-TPP einen vollständigen Austausch aller drei H-Atome an der CH₃-Gruppe mit ³H erwarten. Man kann jedoch verstehen, dass nur ein ³H in der CH₃-Gruppe auftritt, wenn man annimmt, dass das aus 1-Hydroxyvinyl-TPP entstehende Acetyl-TPP sehr rasch weiterverändert wird, so dass sich das Gleichgewicht dieser Tautomerisierung nicht einstellt. Eine sehr rasche Weiterveränderung des Acetyl-TPP zu Acetyl-P wird auch durch die vergeblichen Bemühungen nach Zusatz von NH₂OH, Acetylhydroxamsäure zu fassen^{13,14}, nahegelegt. Zudem ist eine sehr rasche Weiterveränderung und damit eine überaus geringe stationäre Konzentration des Acetyl-TPP deshalb zu erwarten, weil, den Versuchen von BRESLOW UND MCNELIS¹⁶ sowie WHITE UND INGRAHAM¹⁷ mit 2-Acyl Thiazolen zufolge, Acetyl-TPP überaus hydrolyseempfindlich sein dürfte. Eine quantitative Überführung der Substrate der Phosphoketolase mit Orthophosphat in Acetyl-P ohne Verluste durch Hydrolyse, d.h. ohne Auftreten von Acetat, kann daher nur erfolgen, wenn das intermediär entstehende Acetyl-TPP sehr rasch weiterverändert wird. Wahrscheinlich ist es die Aufgabe des Proteinanteils in der Phosphoketolase, ausser der Steigerung der Reaktivität des C-2 im Thiazolring von TPP die Hydrolyse von Acetyl-TPP durch rasche Reaktion mit Orthophosphat zu dem relativ stabilen Acetyl-P zu verhindern.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Forschung danken wir für Beihilfen, die die vorliegende Arbeit ermöglicht haben. W. SCHRÖTER dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Stipendium.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Umsatz von Hydroxypyruvat mit Thiaminpyrophosphat an einem Pyruvat-oxydase-Präparat aus Schweineherzmuskel gewonnenes 2-(1,2-Dihydroxyäthyl)-thiaminpyrophosphat ("Thiaminpyrophosphat-aktivierter Glycolaldehyd") wird an gereinigter Phosphoketolase aus *Lactobacillus plantarum* bei Gegenwart von Orthophosphat zu Acetylphosphat und bei Gegenwart von Ferricyanid zu Glycolsäure umgesetzt. Das mit Orthophosphat gebildete Acetylphosphat wurde durch Hochspannungselektrophorese im Vergleich mit authentischem Acetylphosphat sowie nach Zerlegung mit Hydroxylamin durch Papierchromatographie im Vergleich mit authentischer Acetylhydroxamsäure identifiziert. Die Reaktionsgeschwindigkeit des "Thiaminpyrophosphat-aktivierten Glycolaldehyds" ist um etwa 2 Zehnerpotenzen kleiner als diejenige von Xylulose 5-phosphat, Fructose 6-phosphat und Hydroxypyruvat. Es wird diskutiert, ob "Thiaminpyrophosphat-aktivierter Glycolaldehyd"

und daraus entstehendes Acetyl-thiaminpyrophosphat Zwischenprodukte der Phosphoketolase-Reaktion sind.

LITERATUR

- ¹ H. HOLZER UND W. SCHRÖTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 65 (1962) 271.
- ² L. JAENICKE UND J. KOCH, *Biochem. Z.*, 336 (1962) 432.
- ³ H. HOLZER UND G. KOHLHAW, 15. *Kolloquium d. Gesellschaft f. physiol. Chemie, Mosbach*, 1963 Springer, Berlin.
- ⁴ K. W. BOCK, L. JAENICKE UND H. HOLZER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9 (1962) 472.
- ⁵ L. O. KRAMPITZ, I. SUZUKI UND G. GREULL, *Proc. 5th Intern. Congr. Biochem., Moscow, 1961*, Pergamon Press, Oxford, (1961); *Federation. Proc.*, 20 (1961) 971.
- ⁶ F. DA FONSECA-WOLLHEIM, K. W. BOCK UND H. HOLZER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9 (1962) 466.
- ⁷ P. SCRIBA UND H. HOLZER, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 473.
- ⁸ F. DICKENS UND D. H. WILLIAMSON, *Biochem. J.*, 68 (1958) 74.
- ⁹ S. S. COHEN UND D. B. MCNAIR SCOTT, *Science*, 111 (1950) 543.
- ¹⁰ H. HOLZER, *Angew. Chem.*, 73 (1961) 721.
- ¹¹ H. HOLZER, F. DA FONSECA-WOLLHEIM, L. KOHLH UND CH. W. WOENCKHAUS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 98 (1962) 453.
- ¹² E. RACKER, persönliche Mitteilung.
- ¹³ M. SCHRAMM, V. KLYBAS UND E. RACKER, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1283.
- ¹⁴ H. HOLZER UND W. SCHRÖTER, 14. *Kolloquium d. Gesellschaft f. physiol. Chemie, Mosbach*, 1963 Springer, Berlin.
- ¹⁵ M. L. GOLDBERG UND E. RACKER, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 3841.
- ¹⁶ R. BRESLOW UND E. MCNELIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 2394.
- ¹⁷ F. G. WHITE UND L. L. INGRAHAM, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 4114.

Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 474-481