

Abweichungen des kryoskopischen vom viscosimetrischen Molekulargewicht bei gut fraktionierten Gemischen nicht sehr groß sind.

Tabelle 1.

Kryoskopisches ($M_k = 1500$) und viscosimetrisches Molekulargewicht (M_v) eines Gemisches von 2 Polymeren vom Molekulargewicht $M_1 = 1000$ und ansteigendem M_2 .

M_1	c_1	M_2	c_2	M_k	M_v
1000	0.33	2000	0.67	1500	1667
1000	0.50	3000	0.50	1500	2000
1000	0.62	10000	0.38	1500	4400
1000	0.65	20000	0.35	1500	7650
1000	0.66	100000	0.34	1500	34700
1000	0.67	1000000	0.33	1500	331000

Hrn. Prof. Dr. H. Staudinger, auf dessen Anregung diese Notiz verfaßt wurde, möchte ich auch an dieser Stelle bestens danken.

287. H. Albers: Über die Hemmbarkeit der Phosphatase durch Schwefelverbindungen (V. Mitteil. zur Kenntnis der Phosphatasen).

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 26. Juni 1935.)

Die Art der Regelung des Phosphat-Stoffwechsels in der Zelle ist bisher nur zum geringen Teil aufgeklärt. Sicher spielen dabei Phosphatasen eine wichtige Rolle. Es schien ein bestechender Gedanke, auch für die Regelung des durch die Phosphatasen bedingten Umsatzes das Sauerstoff-Potential innerhalb der Zelle verantwortlich zu machen, und in der Tat konnten Waldschmidt-Leitz und Schöffner¹⁾ eine Hemmung der Nieren-Phosphatase durch Sulfhydrylkörper wohl bei der spaltenden, nicht aber bei der synthetisierenden Wirkung feststellen. Cystin als S.S-Körper war ohne Einfluß. Edlbacher und Kutscher²⁾ fanden für die Phosphatase in Tumorgewebe ähnliche Einflüsse. Lohmann³⁾ hingegen konnte beim Neutralpunkt keine Hemmung der Nieren-Phosphatase durch Glutathion feststellen, Köster und Bersin⁴⁾ fanden darüber hinaus und im Gegensatz zu einer kurz vorher erschienenen Arbeit von Schöffner und Bauer⁵⁾ auch beim optimalen $p_H = 9$ keine Hemmung, solange sich die Zusätze in physiologisch annehmbaren Grenzen hielten.

Die vorliegenden, sich widersprechenden Untersuchungen sind sämtlich mit verhältnismäßig rohen Ferment-Präparaten durchgeführt; es war daher wünschenswert, die Widersprüche durch Verwendung möglichst weitgehend gereinigter und enzymatisch einheitlicher Phosphatase-Präparate aufzuklären.

¹⁾ Waldschmidt-Leitz u. Schöffner, Naturwiss. **20**, 122 [1932]; dies. u. Scharikova, Ztschr. physiol. Chem. **214**, 75 [1932].

²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **207**, 1 [1932].

³⁾ Biochem. Ztschr. **262**, 157 [1933].

⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. **231**, 153 [1935], s. das. **222**, 180 [1933].

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **225**, 245 [1934].

Ein Präparat von Nieren-Phosphatase, das nach der Vorschrift von H. und E. Albers⁶⁾ durch längere Autolyse von Nierenbrei bei Gegenwart von Alkohol hergestellt war und einen Ferment-Gehalt von 36 PE im Milligramm⁷⁾ aufwies, wurde auf seine Wirksamkeit bei der Aufspaltung von β -Glycerophosphat bei gleichzeitiger Gegenwart von S.H- bzw. S.S-Verbindungen untersucht. Die in der Tabelle 1 zusammengestellten Versuchs-Ergebnisse zeigen, daß Glutathion und Cystein schon in sehr kleinen Mengen eine beträchtliche Hemmung hervorrufen, daß aber weiterhin auch das Cystin, wenngleich in geringerem Maße, eine Hemmung bewirkt. Einen anschaulichen Begriff von dem Ausmaß und dem Wesen der Hemmungen geben die Anfangs-Geschwindigkeiten der Reaktionen, die im Kurvenbild (Fig. 1) gegen die jeweiligen Konzentrationen der zugesetzten Hemmkörper aufgetragen sind.

Tabelle 1.

mol. Konzentrat. d. Cysteins nach den angegeben. Min. freigelegt. Phosphat in mg P	Zusatz von Cystein:							
	1) 0	2) 5×10^{-4}	3) 1×10^{-3}	4) 2.5×10^{-3}	4a) 2.5×10^{-3}	5) 5×10^{-3}	6) 1×10^{-2}	6a) 1×10^{-2}
	19.5':0.184	19': 0.076	19' : 0.041	19.5':0.019	21.5':0.010	21.5':0.016	17.5':0.022	18' : 0.010
	48.5 450	49.5 149	52.5 092	57 067	59.5 024	65.5 048	51 051	53 028
	131 1.058	132 355	133 215	133 146	131 069	132 108	138 127	137 066

Zusatz von Glutathion (Vers. 7), Einwirkung von H_2S (Vers. 8—10)

mol. Konzentrat. d. Glutathions bzw. Einwirkungs- dauer des H_2S	Zusatz von Glutathion (Vers. 7), Einwirkung von H_2S (Vers. 8—10)			
	0	7) 1×10^{-2}	8) 10 Min.	9) 26 Min.
nach den angegeben. Min.	17.5':0.149	21' : 0.003	17.5':0.149	19.5':0.120
freigelegt. Phosphat in	52 469	58.5 016	52.5 437	51 317
mg P	139 1.083	104 057	136 981	133 744
				10) 62 Min.
				22.5':0.086
				52 215
				131 516

Zusatz von Cystin (Vers. 11—12a), Brom-essigsäure (Vers. 13) und KCN (Vers. 14 u. 14a):

mol. Konzentrat. d. Zusätze nach den angegeben. Min. freigelegt. Phosphat in mg P	Zusatz von Cystin (Vers. 11—12a), Brom-essigsäure (Vers. 13) und KCN (Vers. 14 u. 14a):							
	0	11) 0.8×10^{-3}	12) 1.25×10^{-3}	12a) 1.25×10^{-3}	13) 2×10^{-2}	14) 1×10^{-2}	14a) 1×10^{-2}	
	19' : 0.216	20.5':0.149	20' : 0.098	20' : 0.101	19.5':0.231	20' : 0.168	20' : 0.142	
	53.5 560	52.5 393	53.5 279	51.5 288	38.5 433	49 380	42 294	
	98 915	97.5 710	98.5 530	95 530	97 943	97 697	94 592	

⁶⁾ H. u. E. Albers, *Ztschr. physiol. Chem.* **232**, 189 [1935].

⁷⁾ Über die Reinheits-Bezeichnung in Phosphatase-Einheiten PE und über die Eigenschaften der reineren Phosphatase-Präparate vergl. H. u. E. Albers, *Ztschr. physiol. Chem.* **232**, 165 [1935].

In den Versuchen 4a und 6a wirkte das Cystein vor der Zugabe des Glycerophosphats 75 Min. auf das Ferment ein. In den Versuchen 12a und 14a wirkte das Cystin bzw. das KCN vor der Zugabe des Glycerophosphats 42 bzw. 47 Min. auf das Ferment ein. Ebenso hatte im Vers. 13 die Brom-essigsäure 45 Min. eingewirkt.

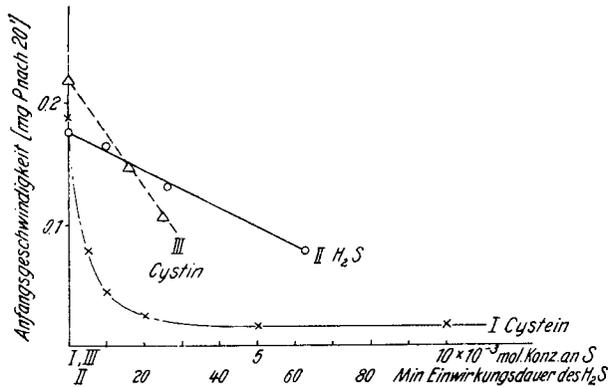


Fig. 1.

Offenbar unterscheiden sich die Mechanismen der Hemmungs-Reaktionen, die der Einwirkung von Sulfhydryl- und von Disulfid-Verbindungen auf die Phosphatase zu Grunde liegen, in typischer Weise: Einmal steht das Ausmaß der Hemmung durch Cystin in einer einfachen linearen Abhängigkeit von dessen Menge⁸⁾, während beim Cystein die Abhängigkeit nicht-linear ist; zum anderen ist die Hemmung durch Sulfhydrylkörper — im Gegensatz zur Hemmung durch Cystin — von der Dauer ihrer Einwirkung auf die Phosphatase abhängig (Versuche 4a, 6a, 12a). Daraus ist zu schließen, daß Cystein und Schwefelwasserstoff in einer meßbar langsam ablaufenden Reaktion⁹⁾ mit dem Phosphatase-Molekül — möglicherweise unter Reduktion desselben — reagieren. Bei dieser Reaktion wird offenbar die wirksame Gruppe der Phosphatase nicht angegriffen, denn, wie die Kurve zeigt, wird bei steigender Cystein-Zugabe schließlich eine konstante Geschwindigkeit der Glycerophosphat-Aufspaltung erreicht; d. h., das chemisch veränderte Ferment-Molekül besitzt noch eine restliche Wirksamkeit¹⁰⁾. Das Cystin entfaltet seine volle Hemmungswirkung augenblicklich und proportional seiner Menge im Versuchs-Ansatz; wahrscheinlich konkurriert es also einfach mit dem Substrat um die Ferment-Moleküle, die es nach dem Verteilungssatz zu einem gewissen Teil bindet.

Nach diesen Ergebnissen wird man eine Regelung des Phosphat-Umsatzes in der Zelle durch ein SH-S-S-System wohl in Betracht ziehen können. Die

⁸⁾ Die Prüfung einer größeren Menge war wegen der Unlöslichkeit des Cystins nicht möglich.

⁹⁾ Es ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, daß Waldschmidt-Leitz, Scharikova u. Schöffner¹⁾ auch bei der Katalase feststellten, daß die Hemmung durch Cystein eine Zeitreaktion ist.

¹⁰⁾ Es ist bemerkenswert, daß bei längerer Einwirkung von verschiedenen Mengen Cystein auf das Ferment sich identische Reaktionsverläufe ergeben (Versuch Nr. 4a und 6a).

Hemmung der Phosphatase durch S.S-Körper¹¹⁾ braucht nicht dagegen zu sprechen, denn sie ist vergleichsweise gering, und das Ferment-Molekül bleibt dabei — wie ausgeführt — wahrscheinlich in seinem Aufbau erhalten. Außerdem wäre es ein Zufall, wenn der natürliche Hemmungskörper (in der S.S-Form) sich ähnlich wie das zweifellos physiologisch bedeutsame Cystin¹²⁾ verhielte, oder wenn er gar mit ihm identisch wäre. Daß die Niere⁷⁾ und andere Körpergewebe¹³⁾, sowie die Hefe¹⁴⁾ natürliche Hemmungskörper enthalten, konnte früher nachgewiesen werden; bemerkenswert ist es, daß die Darm-Schleimhaut, in der die abbauenden Prozesse im Vordergrund stehen, keinen natürlichen Hemmungskörper enthält⁶⁾. — Voraussetzung für die Annahme eines regulierenden SH-S.S-Systems wäre natürlich die Möglichkeit einer Regenerierung des chemisch veränderten Ferment-Moleküls zu seiner voll aktiven Form; in vitro scheint allerdings eine solche Regenerierung schwierig zu sein¹⁵⁾.

Kaliumcyanid, ein typisches Reduktionsmittel für Disulfide, reagiert ebenfalls mit der Phosphatase in einer langsam verlaufenden Reaktion, bei längerer Einwirkungsdauer tritt eine stärkere Hemmung auf (Vers. 14a). Brom-essigsäure, die leicht mit Sulfhydrylgruppen reagieren würde¹⁶⁾, hat selbst bei längerer Einwirkung keinen Einfluß auf die Wirksamkeit der Phosphatase (Vers. 13).

Es war somit nicht ausgeschlossen, daß die Phosphatase selber eine die Wirksamkeit mitbedingende Disulfidgruppe in ihrem Molekül enthielte. Die colorimetrische Bestimmung des Disulfid-Schwefels in Präparaten verschiedenen Reinheitsgrades ergab jedoch, daß nur in den weniger reinen Phosphatase-Präparaten Disulfid-Schwefel nachweisbar war (Tabelle 2).

Tabelle 2.

Präp.	Reinheitsgrad in PE/mg	Einwaage in		Relat. Gehalt an Disulfid-Schwefel
		mg	PE	
1	3.65	404.6	1475	0.08
2	8.54	219.6	1870	0.04
3	16.9	102.3	1733	—
4	29.2	105.2	3038	0.01
5	36.0	42.8	1540	—
6	46.8	41.6	1945	—

Möglicherweise ist jener erwähnte natürliche Hemmungskörper mit dem hier nachgewiesenen Disulfid in Beziehung zu bringen — Die Nicht-hemmbarkeit unreinerer Phosphatase-Präparate durch Sulfhydrylverbindungen und weiterhin auch durch Cystin kann entweder damit erklärt werden, daß die verwendeten Fermente bereits durch ihre natürlichen Begleitstoffe maximal

¹¹⁾ Die für die physiologische Wirkung des Insulins wichtige Frage der Hemmbarkeit von Phosphatasen durch Insulin wird noch geprüft.

¹²⁾ vergl. Bierich u. Rosenbohm, Ztschr. physiol. Chem. **215**, 151 [1933], **233**, 136 [1934].

¹³⁾ Grauhirn: Kraut u. Borkowsky, Ztschr. physiol. Chem. **220**, 192 [1933]; Tumorgewebe: Edlbacher u. Kutscher²⁾.

¹⁴⁾ H. u. E. Albers, Ztschr. physiol. Chem. [1935] (im Druck); vergl. Arkiv Kemi, Mineral., Geol. **12** B, Nr. 3 [1935].

¹⁵⁾ Eine Regenerierung der durch H₂S geschädigten Phosphatase durch Oxydationsmittel wie H₂O₂ ist bis jetzt nicht gelungen.

¹⁶⁾ vergl. v. Euler u. Hagen, Ztschr. physikal. Chem. (A) **171**, 379 [1934].

gehemmt waren, oder daß die natürlichen Begleitstoffe die zugesetzten Hemmstoffe abfingen. So scheint auch die jüngst hergestellte Oberhefen-Phosphatase¹⁴⁾ noch beträchtliche Mengen dieser Begleitstoffe zu enthalten, denn sie wird durch Cystein und durch Kaliumcyanid unter den oben beschriebenen Bedingungen nicht merklich gehemmt. Schwefelwasserstoff hemmt erst nach 1 $\frac{1}{2}$ -stdg. Einwirkung um ungefähr 30%; man darf daraus schließen, daß grundsätzlich auch die Oberhefen-Phosphatase durch Sulfhydrylverbindungen hemmbar ist¹⁷⁾. Sehr wahrscheinlich wirken auch Disulfidverbindungen hemmend, denn Cozymase-Präparate mittleren Reinheitsgrades (ACo 50000), die als hartnäckig anhaftenden Begleitstoff ein Disulfid enthalten¹⁸⁾, wirken deutlich hemmend, während ein Zusatz der reinsten zugänglichen Cozymase-Präparate¹⁹⁾ (ACo 380000) kaum einen Einfluß ausübt.

Die Versuche wurden nach der von H. und E. Albers angegebenen Vorschrift⁷⁾ (Ferment-Menge: 0.25 mg, maximale Aktivierung durch Magnesium, $p_H = 8.9$, $t = 33^0$, Vol. 20 ccm) ausgeführt. Die p_H -Werte wurden colorimetrisch (Stufen-Photometer) kontrolliert, die jeweiligen Zusätze wurden stets vorher auf das Versuchs- p_H gebracht. Eine maßgebliche p_H -Verschiebung trat während der Versuchsdauer nie ein. — Über die colorimetrische Bestimmung von Disulfid-Schwefel mittels Nitroprussidnatriums im Stufen-Photometer wird demnächst gesondert berichtet. Die angegebenen Zahlen bedeuten die Absorptionskoeffizienten der Meßlösungen bei 1 cm Schichtlänge nach Abzug der Eigenfarben von Phosphatase- und Reagenzlösung.

Der in die Ferment-Lösungen eingeleitete H_2S wurde nach den angegebenen Zeiten durch intensives Belüften schnell entfernt. Schon nach $\frac{1}{4}$ -stdg. Belüftung war er nicht mehr nachweisbar, sicherheitshalber wurde stets mindestens $\frac{1}{2}$ Stde. belüftet.

288. Paresh Chandra Dutta: Untersuchungen über indigoide Farbstoffe (VIII. Mitteil.).

[Aus d. Laborat. d. G. B. B. College, Muzaffarpur, Bihar und Orissa, Indien.]
(Eingegangen am 29. April 1935.)

Auf Grund einer Untersuchung über thioindigoide Farbstoffe wurde in der VI. Mitteil.¹⁾ der Schluß gezogen, daß die Farbvertiefung bei den isomeren Farbstoffen dieser Reihe von den Stellen abhängt, an welchen ein neuer symmetrischer Ring an den Thionaphthenring angegliedert wird, und daß der bathochrome Effekt am größten ist, wenn der neue symmetrische Ring so an den Thionaphthenring angeschlossen wird, daß er gleich weit von den beiden Chromophoren des Indigos, dem CO und dem auxochromen S, oder mit anderen Worten von der Gruppierung $\begin{array}{c} \text{—CO} \\ \text{—S} \end{array} > \text{C=}$, entfernt ist.

¹⁷⁾ vergl. dazu Schöffner u. Bauer⁵⁾.

¹⁸⁾ v. Euler, H. u. E. Albers, Schlenk u. Günther, Arkiv Kemi, Mineral., Geol. 12 B, Nr. 4 [1935].

¹⁹⁾ Hergestellt nach einer neuerdings ausgearbeiteten Methode.

¹⁾ B. 67, 1319 [1934].