

223. Eugen Bamann und Walter Salzer: Über die Mg-Aktivierung bei Phosphatasen (VII. Abhandlung¹⁾ zur Kenntnis tierischer Phosphatasen).

[Aus der Pharmazeut. Abteil. d. Chem. Laborat. d. Universität Tübingen.]
(Eingegangen am 13. Mai 1937.)

In der Reihe der Eigenschaften, die im Laufe der Untersuchungen an Phospho-Esterasen festgestellt worden sind, gehört mit zum Wichtigsten die von H. Erdtman²⁾ erstmalig aufgefundene, wonach das Mg⁺⁺-Ion eine aktivierende Rolle für die Phosphatase der tierischen Organe spielt. E. Bamann und E. Riedel³⁾ konnten dann zusammen mit der Auffindung isodynamer Phospho-esterasen zeigen, daß das charakteristische Verhalten des Mg⁺⁺-Ions nur für eine, nämlich die im alkalischen Gebiete wirkende Phospho-esterase gilt, während die „saure“, die sich im Verlaufe weiterer Untersuchungen wieder als ein Gemisch⁴⁾ zweier isodynamer Enzyme herausgestellt hat (Wirkungsoptima: p_H 5.5 und p_H 4), von Mg⁺⁺-Ionen unbeeinflusst bleibt. Über das Wesen der Mg-Aktivierung sind im wesentlichen zwei Ansichten ausgesprochen worden:

1) Das Mg⁺⁺-Ion wirke als Antihemmstoff. H. Erdtman²⁾ glaubte die gesamte Mg-Wirkung damit erklären zu können, daß das Enzym mit dem Mg⁺⁺ einen Komplex bildet, der gegenüber der Hemmung durch Phosphat unempfindlich ist.

2) Eine andere Auffassung sieht im Mg⁺⁺-Ion einen spezifischen Aktivator, der durch seine Verbindung mit dem Enzym entweder die Affinität zum Substrat erhöht oder die Zerfallsgeschwindigkeit des Zwischenproduktes beschleunigt.

Zur Stützung dieser heute bevorzugten Annahme wurde bisher besonders die von H. D. Jenner und H. D. Kay⁵⁾ mitgeteilte Tatsache herangezogen, daß das Mg⁺⁺-Ion nach Überschreiten einer optimalen Konzentration eine Überschußhemmung hervorrufen kann.

Auf Grund von Erfahrungen an pflanzlichen Phospho-Esterasen⁶⁾ müssen wir jedoch darauf hinweisen, daß trotz einer begründeten Annahme einer Enzym-Aktivator-Verbindung unter gleichzeitiger Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit uns das Vorhandensein einer echten Aktivator-Wirkung im Gegensatz zu einer Antihemmstoffwirkung noch nicht gegeben zu sein scheint. Denn schon in Konzentrationen eines Antihemmstoffes, bei denen er die Vereinigung des Substrats mit dem Enzym in nicht zu beachtender Weise beeinflusst, kann er, wie wir im Falle der Taka-phospho-esterasen angenommen haben, die Vereinigung des Hemmstoffs mit dem Enzym verhindern und so eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit hervorrufen.

Den Schluß, daß die Mg⁺⁺-Wirkung aber dennoch eine „echte Aktivatorwirkung“ ist, ziehen wir aus anderen Beobachtungen. Zunächst einmal ist die hemmende Wirkung des Phosphats

¹⁾ I. — VI. Abhandl.: Ztschr. physiol. Chem. **229**, 125 [1934]; **230**, 175 [1934]; B. **67**, 2019 [1934]; **68**, 6 [1935]; Biochem. Ztschr. **286**, 143 [1936]; **286**, 147 [1936].

²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **177**, 211 [1928].

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **229**, 125 [1934].

⁴⁾ E. Bamann u. W. Salzer, Biochem. Ztschr. **286**, 147 [1936].

⁵⁾ Journ. biol. Chem. **93**, 733 [1932].

⁶⁾ E. Bamann u. W. Salzer, Biochem. Ztschr. **287**, 380 [1936].

quantitativ nicht imstande, solche Hemmungen zu verursachen⁷⁾, daß das Mg^{++} -Ion eine Aktivierung zum 50-fachen hervorrufen könnte. Zum anderen entbehrt die Annahme eines sonstigen begleitenden Hemmstoffs der experimentellen Stütze, insofern als in Mischversuchen⁷⁾ unterschiedlich aktivierbarer Phosphatase-Präparate angenähert eine Addition des Umsatzes zu beobachten ist, die bei einem unterschiedlichen Gehalt an einem Hemmstoff nicht eintreten sollte.

Damit haben wir an die Beobachtung erinnert, wonach Phosphatase-Auszüge desselben Organs ein ungleichmäßiges Verhalten zu Mg^{++} aufweisen, das mit dem Vorkommen von *lyo*- und *desmo*-Formen⁷⁾ Hand in Hand geht: *lyo*-Formen sind hoch aktivierbar, das *desmo*-Enzym zeigt einen wesentlich niedrigeren Grad der Aktivierbarkeit. Ausgehend von diesem Befund haben wir nunmehr die gleichzeitigen Beziehungen des Enzymzustandes, der Substratkonzentration und der Mg -Konzentration zur Reaktionsgeschwindigkeit untersucht, mit dem Ergebnis, eine nähere Charakterisierung sowohl der Mg -Wirkung als auch des *lyo*- und *desmo*-Zustandes damit ermöglicht zu haben.

I) Die Frage der Affinitätsbeeinflussung des Substrats zum Enzym.

Die Frage, ob die im alkalischen Gebiete wirksame Phosphoesterase überhaupt auf die Mitwirkung des Mg^{++} -Ions verzichten kann, ob also das Magnesium ein echtes Coenzym der „alkalischen“ Phosphoesterase darstellt, ist noch nicht entschieden. Die Entscheidung hierfür ist deshalb nicht leicht, weil das Enzym bei zu durchgreifender Dialyse (wie Elektrodialyse⁸⁾) eine irreversible Zerstörung erleidet. Aus demselben Grund kann dann auch die Frage, ob Mg^{++} -Ion die Affinität des Substrats⁹⁾ zu beeinflussen vermag, nach älteren und den aus neuerer Zeit vorliegenden Untersuchungen nur mit Vorbehalt beantwortet werden. Dieser Vorbehalt bezieht sich darauf, daß wirklich quantitativ Mg -freie Enzymlösungen auch nach sorgfältiger Dialyse unseren Untersuchungen nicht zur Verfügung stehen und deshalb im Zusammenhang mit noch zu besprechenden Besonderheiten bei kleinen Substrat- und kleinen Mg -Konzentrationen exakte Versuchsbedingungen nicht gegeben sind.

Zunächst steht fest, daß bei hohen Mg -Konzentrationen und niedrigen Substratkonzentrationen eine von der beiderseitigen Konzentration abhängige Überschußhemmung auftreten kann (s. die Versuche der Tabellen 2a und 2b). Bereits aus dieser gegenseitigen Konzentrationsabhängigkeit könnte sie als affinitätsbedingt angesprochen werden. Es liegen aber auch Ergebnisse vor, die noch berechtigter im Sinne einer Affinitätsbeeinflussung gedeutet werden könnten. In der ersten Abhandlung dieser Reihe fanden E. Bamann und E. Riedel die Umsatzgeschwindigkeit im Falle dialysierter Autolysate ohne Zusatz von Mg^{++} -Ionen höher bei der Substratkonzentration 0.1 g/50 ccm gegenüber 0.5 g/50 ccm, bei Mg -Zusatz umgekehrt bei der höheren Substratkonzentration größer als bei der kleineren. Bei näherer Durchforschung dieser Verhältnisse sind wir nunmehr darauf gestoßen, daß sich dieses Ergebnis nicht verallgemeinern läßt. In erster Linie ist der noch vorhandene Gehalt der dialysierten Lösungen an Mg^{++} -Ionen zu berücksichtigen. Wir fanden so bei

⁷⁾ E. Bamann, E. Riedel u. K. Diederichs, II. Abhandl. dieser Reihe, I. c. 1.

⁸⁾ H. u. E. Albers, Ztschr. physiol. Chem. **232**, 156 [1935].

⁹⁾ Es soll im folgenden, wenn nicht ausdrücklich vermerkt, stets β -Glycerin-phosphorsäure gemeint sein.

einer Lösung, die weitgehend dialysiert war, daß die Umsetzungsgeschwindigkeit bei den erwähnten Konzentrationen nicht bei der niedrigeren Konzentration größer ist, daß dagegen nach Zusatz sehr kleiner Mengen Mg⁺⁺ tatsächlich bei der geringeren Substratkonzentration der größere Umsatz auftritt (Tab. 1). Die Kinetik wird also in diesem Fall durch das günstigere Verhältnis Substrat:Mg-Konzentrationen bedingt. Die scheinbare Affinitätsbeeinflussung, die aus den Versuchen von Bamann und Riedel sprach, wird also wohl aus den schwer dialysierbaren Resten von Mg⁺⁺-Ion vorgetäuscht, die in den Ansätzen ohne künstlichen Mg-Zusatz noch zur Wirkung kommen. Die Vorgänge, die diese Erscheinungen hervorrufen, sind zusammengesetzter Natur, und die experimentellen Befunde berechtigen uns vorerst nicht, Änderungen der Affinität des Substrates durch das Mg⁺⁺-Ion anzunehmen.

Tabelle 1.

Einfluß von Mg⁺⁺ auf die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Enzym: Ausz. mit $n/_{40}$ -NH₃ aus Aceton-Trockenleber vom Schwein (1:20); 4 Tge. dialysiert.
Ansatz: 10 ccm enth. β -glycerinphosphors. Na, 1 ccm 2.5-n. NH₃-NH₄Cl Puffer
pH = 9, 5 ccm Enzym-Lösg.

(Die Zahlen bed. mg P₂O₅, die in der analysierten Probe von 5 ccm in 15 Stdn. abgespalten wurden; t = 30⁰).

Substr. Konz.: 0.1 g/10 ccm		0.02 g/10 ccm	
ohne Mg-Zusatz	1 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O	ohne Mg-Zusatz	1 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O
0.089	0.106	0.082	0.130

Tabelle 2a.

Die Umsatzgeschwindigkeit, verursacht durch die gegenseitigen Beziehungen des Enzymzustandes, der Substratkonzentration und der Mg-Konzentration.

Enzym: Aceton-Trockennierye vom Schwein. Frakt. I = Ausz. (1/2 Stde.) mit $n/_{40}$ -NH₃ (1:30); 2 Tge. dialysiert. Frakt. III = Ausz. (12 Stdn.) mit $n/_{40}$ -NH₃ aus dem Rückstand des II. Ausz. (2 Stdn.).

Ausatz: 10 ccm enth. β -glycerinphosphors. Na, 0.5 ccm 2.5-n. NH₃-NH₄Cl Puffer
pH = 9, 0.4 ccm Enzym-Lösg.

(Die Zahlen bed. mg P₂O₅, die in der analysierten Probe von 5 ccm in 2 Stdn. abgespalten wurden; t = 30⁰).

Substratkonzentr.:	Enzymfraktion I			Enzymfraktion III		
	0.1 g	0.02 g	0.004 g	0.1 g	0.02 g	0.004 g
	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm
ohne Zusatz	0.038	0.049	0.060	0.118	0.113	0.092
1 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O..	0.049	0.073	0.065	0.121	0.137	0.105
10 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O..	0.055	0.073	0.061	0.125	0.136	0.105
100 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O..	0.074	0.064	0.052	0.139	0.136	0.087
250 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O..	0.074	0.061	0.036	0.141	0.119	0.066
500 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O..	0.070	0.044	0.026	0.143	0.113	0.039

Tabelle 2b.

Die Umsatzgeschwindigkeit, verursacht durch die gegenseitigen Beziehungen des Enzymzustandes, der Substratkonzentration und der Mg-Konzentration.

Enzym: Aceton-Trockenleber vom Schwein. Frakt. I = Ausz. (10 Min.) mit $n/_{40}$ -NH₃ (1:20), sofort neutralis. u. 2 Tge. dialysiert. Frakt. II = Ausz. (2 Stdn.) mit $n/_{40}$ -NH₃ aus dem Rückstand von I. *desmo*-Enzym = Rückstand von II mit H₂O gewaschen u. in der 20-fachen Menge H₂O (bez. auf die angew. Trockenmenge) suspendiert. Ansatz: Wie in Tab. 2a, jedoch 2 ccm Enzym-Lösg. (Die Zahlen bed. mg P₂O₅, die in der analysierten Probe von 5 ccm in 2 Stdn. (Vers. der Frakt. I) bzw. 12 Stdn. (Vers. der Frakt. II) bzw. 4 Stdn. (Vers. mit *desmo*-Enzym) abgespalten wurden; t = 30°).

Substr. Konzentr.:	Enzymfraktion I			Enzymfraktion II			<i>desmo</i> -Enzym		
	0.1 g	0.02 g	0.004 g	0.1 g	0.02 g	0.004 g	0.1 g	0.02 g	0.004 g
	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm
ohne Zusatz	0.028	0.026	0.025	0.031	0.034	0.036	0.286	0.284	0.186
1 mg MgCl ₂ .6H ₂ O	0.084	0.073	0.045	0.082	0.069	0.058	0.318	0.291	0.195
10 mg MgCl ₂ .6H ₂ O	0.430	0.315	0.082	0.121	0.097	0.065	0.333	0.309	0.146
100 mg MgCl ₂ .6H ₂ O	0.792	0.420	0.117	0.138	0.096	0.056	0.340	0.286	0.135
250 mg MgCl ₂ .6H ₂ O	0.867	0.460	0.125	0.145	0.083	0.048	0.309	0.215	0.116
500 mg MgCl ₂ .6H ₂ O	0.850	0.440	0.121	0.131	0.080	0.045	0.270	0.149	0.069

II) Der Einfluß der gegenseitigen Konzentrationsabhängigkeit von Substrat und Mg⁺⁺-Ion auf die Aktivierung.

Im Falle der Leber-Phosphoesterase haben wir früher gefunden¹⁰⁾, daß die Aktivierung durch Mg⁺⁺-Ion mit steigendem Mg-Gehalt zunimmt und erst bei sehr hohen Konzentrationen zum Stillstand kommt. Diese Beobachtung stand im Widerspruch zu den Angaben von H. D. Jenner und H. D. Kay⁵⁾, die, wie schon erwähnt, eine optimale Mg-Konzentration mit Abfall nach beiden Seiten fanden. Diesen Widerspruch können wir heute nach unseren jetzigen Untersuchungen erklären:

1) Die Erreichung der optimalen Konzentration ist abhängig von der Konzentration des Substrats. Bei der von Bamann und Riedel angewandten Substratkonzentration wird eine Überschußhemmung durch Mg⁺⁺-Ion tatsächlich kaum zu beobachten sein. Bei niedrigeren Substratkonzentrationen dagegen, wie sie in den Untersuchungen von Jenner und Kay zur Anwendung kamen, kann diese Überschußhemmung beobachtet werden (Versuche der Tabellen 2a und 2b).

2) Besonders aufschlußreich ist aber unsere zweite Beobachtung, wonach der Enzymzustand (*lyo*-, *desmo*-) und damit der Aktivierungsgrad das gegenseitige Verhältnis in starkem Maße festlegt. Bei ausgesprochenem *lyo*-Enzym kann selbst bei niedrigster Substratkonzentration und höchster Mg-Konzentration eine Hemmung nicht beobachtet werden (vergl. die Versuche der Tab. 2b: Enzymfraktion I). Bei ausgesprochenem *desmo*-Enzym können bei derselben niedrigen Substratkonzentration schon wenige mg Mg⁺⁺ einen deutlichen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit verursachen (s. die Versuche d. Tab. 2b: *desmo*-Enzym). Ein an sich aktivierbares Enzym kann unter diesen Bedingungen schon durch geringe Mg-Mengen eine Umkehrung

¹⁰⁾ I. Abhandl. dieser Reihe, I. c. 1.

der Aktivierung zur Hemmung gegenüber Mg-freiem Ansatz aufweisen. Zur näheren Kennzeichnung dieses Unterschiedes von *lyo*- und *desmo*-Phospho-Esterase ist auch hier wieder die Annahme zur Erklärung ungeeignet, daß das *lyo*-Enzym zum Substrat eine wesentlich andere (nämlich bedeutend höhere) Affinität als das *desmo*-Enzym besitzt und dadurch die Verdrängung vom Substrat durch größere Mg-Mengen nicht erleidet; denn damit steht der experimentelle Befund im Widerspruch, daß selbst bei der niedrigen Substratkonzentration die Aktivierung mit steigendem Mg-Gehalt anhaltend ansteigt (s. die Versuche d. Tab. 2b; Enzymfraktion I), während — falls man das Ausbleiben einer Überschußhemmung durch die starke Affinität zum Substrat erklären wollte —, bestenfalls ein Stillstand der Aktivierung an dem Punkte erfolgen sollte, bei dem beim *desmo*-Enzym der Rückgang eintritt. Man muß also vielmehr einen anderen Schluß ziehen, nämlich, daß bei einem *lyo*-Enzym andersartige, zusammengesetztere Zwischenprodukte Zerfallbarkeit besitzen, und zwar mit steigendem Mg-Gehalt mit steigender Geschwindigkeit. In den *lyo*-Enzymen sind also darnach andersgelagerte oder andersbeeinflusste aktive Stellen anzunehmen, von anderer Wirkung wohl in Folge einer besonderen Lage an einem besonderen kolloiden Träger.

Man könnte sich diese Abstufung der aktiven Stellen als Hilfsvorstellung ähnlich veranschaulichen, wie H. S. Taylor¹¹⁾ bei der makroheterogenen Katalyse für seine aktiven Zentren Atome annimmt, die nicht nur in einer Richtung an die andere Phase grenzen (Atome in Gitterebenen), sondern in zwei (Kantenatome), drei (Eckatome) oder vier und fünf (Spitzenatome). Dieses Bild ließe sich noch weiter verfolgen, insofern als der steigenden Labilität solcher mit steigender Anzahl von Valenzen in den Raum ragenden Atome, die steigende Labilität der spezifischen *lyo*-Eigenschaften der „alkalischen“ Phospho-Esterasen entspricht. Wir meinen damit das beobachtete⁷⁾ starke Nachlassen der Aktivierungsmöglichkeit, das eine Enzymlösung mit *lyo*-Fraktion beim Aufbewahren erleidet und besonders erleidet, wenn die Aufbewahrung bei alkalischer oder saurer Reaktion erfolgt.

Erwähnenswert ist noch, daß wir mit dieser Annahme der Ungleichheit der aktiven Gruppe auf scharf definierte Affinitäts- und Zerfallskonstanten verzichten müssen, ein Vorgang, der in der Erklärung des stereochemischen Verhaltens der Leberesterase des Menschen¹²⁾ schon seinen Vorläufer hat.

Die Frage nach der optimalen Mg-Konzentration ist also hauptsächlich eine Frage nach dem Enzymzustand. Der in Kapitel I mitgeteilte Fall, wonach bei kleinen Mg-Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit bei der niedrigeren Substratkonzentration oft größer ist, wurde von uns bisher bei Enzymfraktionen mittleren Aktivierungsgrades angetroffen. (Bei ausgesprochenem *lyo*- und ausgesprochenem *desmo*-Enzym¹³⁾ konnten wir diese Beziehungen nicht auffinden.)

¹¹⁾ vergl. G. M. Schwab, Katalyse vom Standpunkt der chemischen Kinetik, Berlin [1931]; S. 193ff.

¹²⁾ G. M. Schwab, E. Bamann u. P. Laeverenz, Ztschr. physiol. Chem. **215**, 121 [1933].

¹³⁾ Die Ausdrücke *lyo*- und *desmo*-Enzym stellen in diesem Zusammenhang Grenzfälle dar, zwischen denen sich ein kontinuierlicher Übergang befindet. Zur Charakterisierung einer Fraktion wird an Stelle der definitionsmäßigen Löslichkeit dann zweckmäßigerweise hier die damit parallel befundene Aktivierbarkeit verwendet. Die Zweckmäßigkeit dieses Verfahrens liegt darin, daß ein *lyo*-Enzym (vergl. I. Abh. dieser Reihe I. c. 1) seine Aktivierbarkeit in mehr oder weniger starkem Maße verlieren kann und

Die leichte Hemmbarkeit von *desmo*-Phospho-Esterase bei niedriger Substratkonzentration schon durch geringe Mengen Mg^{++} kann uns auch erklären, warum gelegentlich Phospho-Esterasen einmal als nicht aktivierbar, in einer anderen Untersuchung dagegen als aktivierbar geschildert werden. Dieser Punkt trägt auch mit bei, warum die Beantwortung der Frage nach der unbedingten Notwendigkeit, also der Coenzym-Natur, des Magnesiums für die „alkalische“ Phospho-Esterase so schwer zu beantworten ist, da ja ein Auffinden eines nicht aktivierbaren Enzyms kein Beweis dagegen ist, sondern nur sagt, daß dieses Enzym *desmo*-Charakter besitzt und daß die vorhandene, wenn vielleicht auch geringe Menge an Magnesium zur maximalen Aktivierung bereits ausreicht. Nach diesen Erfahrungen können wir uns auch eine Stellungnahme erlauben zu der von S. Belfanti, A. Contardi und A. Ercoli¹⁴⁾ geäußerten Meinung, unter den tierischen „alkalischen“ Phospho-Esterasen organmäßig zwei Gruppen unterscheiden zu müssen, auf Grund anderslaufender Hemmungserscheinungen. Solche anderslaufende Hemmungs- und Aktivierungserscheinungen können aber nach dem Vorhergesagten bereits bei verschiedenen Fraktionen des Enzyms eines und desselben Organs auftreten und es ist wohl nicht so, daß diese Diskontinuität des Verhaltens auf das Mg^{++} -Ion beschränkt sein muß. Bei 0.004 g Substrat im 10 ccm-Ansatz bewirkt z. B. beim *lyo*-Enzym ein Zusatz von 250 mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ eine Erhöhung der Phosphorsäure-Abspaltung von 0.026 auf 0.125; beim *desmo*-Enzym unter gleichen Bedingungen eine Herabsetzung von 0.186 auf 0.116. (Die Zahlen bedeuten mg P_2O_5 in 5 ccm Analysenprobe.) Es besteht also die Möglichkeit, daß die Beziehungen, die S. Belfanti und seine Mitarbeiter zwischen den Phospho-Esterasen verschiedener Organe aufgestellt haben, qualitativ auch zutreffen für verschiedene Enzymfraktionen ein und desselben Organs. Damit soll aber nicht bestritten werden, daß die Organe einen unterschiedlichen Gehalt an leichter und schwerer aktivierbarem Enzym aufweisen (s. die verschiedenen Verhältnisse bei den gleichartigen Auszügen aus Leber und Niere: Versuche der Tabellen 2a und 2b), und daß ein Organ auf diese Weise im Gesamtbild ein anderes Ergebnis zeigt als das andere.

III) Einfluß des Enzym-Zustandes in An- und Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen auf die Spezifität.

Die Annahme anders gearteter oder gelagerter aktiver Gruppen in *lyo*-Anteilen gegenüber dem *desmo*-Enzym läßt auch nicht verwunderlich erscheinen, daß die Spezifität, gemessen am Beispiel der α - und β -Glycerinphosphorsäure, bei den verschiedenen Enzymfraktionen in ihrem quantitativen Ausmaß Änderungen zeigen kann. So fanden wir, daß sich die β -Glycerinphosphorsäure-Spaltung durch Mg^{++} -Ion höher aktivieren läßt als die Spaltung des α -Isomeren (Versuche d. Tab. 3). Wir beobachteten auch, daß bei maximal dialysierten Prä-

damit zu einem Enzym mehr vom Typus eines *desmo*-Enzyms wird, ohne daß sich in diesem Zeitraum seine Löslichkeit geändert hätte. Es ist also ein Unterschied in analytischer, nicht in genetischer Beziehung. Es scheint uns nun im Rahmen dieser Arbeit wichtiger, das analytische als das genetische Verhalten zu kennzeichnen mit dem Bewußtsein, daß im unveränderten Organ die beiden Begriffe an und für sich zusammenfallen.

¹⁴⁾ Biochem. Journ. **29**, 1491 [1935].

paraten der Unterschied zwischen α - und β -Substrat-Spaltung bis auf wenige Prozente zurückgeht, während andererseits bei demselben Enzympräparat, einer *lyo*-Fraktion, nach Mg-Zusatz eine etwa 4-fache Bevorzugung der β -Substratspaltung gegenüber der α -Substratspaltung festzustellen ist. Der Angriff des Mg^{++} -Ions führt also wohl für die α -Spaltung zu anderen Verhältnissen als bei der β -Spaltung. Es ist demnach eine neue Erkenntnis, daß das Verhältnis der α : β -Hydrolysegeschwindigkeit bei einem Enzym derselben Herkunft mehr oder weniger großen Schwankungen unterworfen ist, je nach dem Enzymzustand und dem zufälligen Mg-Gehalt der Lösungen. Die Bedeutung der Substratspezifität zur Charakterisierung darf also in diesem Falle nicht zu hoch eingeschätzt werden, da mehrere Faktoren hierfür maßgebend sind.

Tabelle 3.

Die α -, β -Substrat-Spezifität in Abhängigkeit vom Enzymzustand und der Anwesenheit von Mg^{++} -Ion.

Enzym: Aceton-Trockenleber vom Schwein; Fraktion I u. *desmo*-Enzym wie in den Vers. der Tab. 2b.

Ansatz: Wie in den Vers. der Tab. 2b; Substr. Konz. 0.1 g/10 ccm.

Enzymfraktion I				<i>desmo</i> -Enzym			
mg P_2O_5 in 1 ccm anal. Probe nach 20 Stdn.		mg P_2O_5 in 1 ccm nach 2 Stdn.		mg P_2O_5 in 5 ccm nach 4 Stdn.			
ohne Mg-Zusatz		100 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$		ohne Mg-Zusatz		100 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	
α -Ester	β -Ester	α -Ester	β -Ester	α -Ester	β -Ester	α -Ester	β -Ester
0.056	0.058	0.023	0.087	0.263	0.286	0.288	0.340

IV) Über das Wesen des Ca^{++} -Einflusses auf die phosphatatische Hydrolyse.

Die Angaben, die über die Wirkung des Ca^{++} -Ions auf die Wirksamkeit der im alkalischen Gebiete wirkenden tierischen Phospho-Esterasen in die Literatur eingegangen sind, sind sehr unterschiedlich¹⁵⁾. Teils wurde Hemmung beobachtet, teils wurde keine Beeinflussung und teils sogar Aktivierung gesehen. Wir heben in diesem Zusammenhang hervor, daß ein Stoff zum Enzym in Beziehung stehen kann, ohne daß sich diese Beziehung zunächst in der Reaktionsgeschwindigkeit äußern muß (als Verdrängungsreaktion gegenüber dem Substrat), daß diese Äußerung aber eintreten kann, sowie ein zweiter Stoff dazu kommt, der eine spezifische Wirkung auf das Enzym ausübt (sei es Hemmung oder Aktivierung). Bei Gegenwart eines Hemmstoffs kann dann dieser Stoff als Aktivator oder richtiger ausgedrückt: enthemmend wirken, bei Gegenwart eines Aktivators als Hemmstoff¹⁶⁾. In solcher Weise wirkt nun, wie wir erkannt haben, auch das Ca^{++} -Ion. Ca^{++} an sich ist in Ansätzen

¹⁵⁾ s. dazu: C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Supplement, Den Haag (1936), u. zw. S. 150.

¹⁶⁾ R. Willstätter u. M. Rohdewald (Enzymologia I, 213 [1936]) unterscheiden in diesem Zusammenhang folgerichtig Hemmung und Desaktivierung: Desaktivierung also, wenn durch einen dritten Stoff die aktivierende Wirkung eines zweiten Stoffs ausgeschaltet wird. Vergleiche dazu ebendort die Wirkung von Insulin und Adrenalin auf aktivierte, gehemmte und enthemmte Amylase der Leber.

ohne Mg⁺⁺ ohne deutliche Wirkung auf die Wirksamkeit der „alkalischen“ Phospho-Esterase. Dagegen ist Ca⁺⁺ in derselben Konzentration in mit Mg⁺⁺ aktivierten Lösungen imstande, erhebliche Hemmungen zu verursachen (s. die Versuche d. Tab. 4). Die vereinzelt Angaben über eine Aktivierung durch Ca⁺⁺-Ion könnten wir uns dementsprechend erklären durch die Ausschließung eines hemmenden Körpers vom Enzym.

Tabelle 4.

Einfluß des Ca⁺⁺-Ions auf die phosphatatische Hydrolyse bei An- und Abwesenheit von Mg⁺⁺-Ion.

Enzym: Aceton-Trockenleber vom Schwein; Frakt. I und *desmo*-Enzym wie in den Vers. d. Tab. 2b.

Ansatz: 10 ccm enth. 0.1 g β -Substrat, 2 ccm Enzymfraktion I bzw. 2 ccm *desmo*-Suspension, 0.5 ccm 2.5-n. NH₃-NH₄Cl Puffer p_H = 9. (Die Zahlen bed. mg P₂O₅, die in der anal. Probe von 1 ccm in 4 Stdn. (Vers. der Frakt. I) bzw. von 5 ccm in 4 Stdn. (Vers. mit *desmo*-Enzym) abgespalten wurden; t = 30°).

Zusatz (mg)	Enzymfraktion I				<i>desmo</i> -Enzym			
	—	0.1	1	10	—	10	—	10
CaCl ₂ ·6H ₂ O	—	0.1	1	10	—	10	—	10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100	100	100	100	—	—	100	100
	0.158	0.158	0.156	0.096	0.286	0.286	0.340	0.332

224. M. Henze: Über das Jodmethylat des Chinolin-*N*-Oxyds.

[Aus d. Medizin.-chem. Institut d. Universität Innsbruck.]

(Eingegangen am 19. Mai 1937.)

Bekanntlich sind die Wasserstoffatome der in 2- oder 4-Stellung befindlichen Methylgruppe des Methyl-pyridins und Methyl-chinolins kondensationsfähig und reagieren z. B. mit Aldehyden. Anderen Substanzen gegenüber, wie etwa gegenüber dem Nitroso-dimethylanilin, versagt aber ihre Reaktionsfähigkeit. Sie tritt jedoch, wie Kaufmann¹⁾ berichtet hat, wieder ein, wenn man die genannten Ringbasen in ihre Jodalkylate verwandelt. Ein Nachteil der Methode liegt nur in der Schwierigkeit, das Jodalkyl nach erfolgter Kondensation wieder abzuspalten.

Wir hatten erwartet, daß eine gleiche Steigerung der Reaktionsfähigkeit der genannten Methylgruppe eintreten würde, wenn der Ringstickstoff durch Umwandlung in das *N*-Oxyd ebenfalls in den fünfwertigen Zustand gebracht wird. Nach eingetretener Kondensation mußte auch die Rückverwandlung in die sauerstoff-freie Ringbase ohne Schwierigkeit durch Reduktion zu erreichen sein. Unsere Erwartung hat sich leider nicht erfüllt. Daß diese *N*-Oxyde der Ringbasen tatsächlich in anderer Hinsicht Analogien mit den Jodalkylaten der Ringbasen selbst zeigen, äußert sich in Erscheinungen, die den bekanntesten Deckerschen Umlagerungen entsprechen, worüber wir kürzlich Mitteilung gemacht haben²⁾.

¹⁾ B. 45, 1736 [1912].

²⁾ B. 69, 534 u. 1566 [1936].