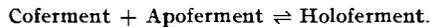


317. Henry Albers, Erhardt Beyer, Alex Bohnenkamp und Georg Müller: Über die zusammengesetzte Natur der Fermente, I. Mitteil. (zugleich VI. Mitteil.*) zur Kenntnis der Phosphatasen).

[Aus d. Organ.-chem. Instituten d. Techn. Hochschulen Hannover u. Danzig.]
(Eingegangen am 29. Juli 1938.)

In einer zusammenfassenden Arbeit hat H. Albers¹⁾ 1936 versucht, das Problem der Fermente unter einem einheitlichen Gesichtspunkt zu betrachten, der an Hand des vorliegenden Materials die zusammengesetzte Natur der Fermente im Sinne der Trägertheorie von A. P. Mathews und T. H. Glenn²⁾ annahm:

„Das vollständige Molekül eines Fermentes, das Holoferment, entsteht in einer Gleichgewichtsreaktion durch Vereinigung einer niedermolekularen Komponente, des die Wirkungsgruppe bzw. die Wirkungsgruppen enthaltenden Cofermentes mit einer spezifischen hochmolekularen Trägerkomponente, dem Apoferment:



Die Cofermente sind wirkliche Bestandteile des Fermentmoleküls.“

Zweifellos würde der generelle Nachweis, daß alle Fermente zusammengesetzter Natur seien, eine wesentliche Vereinfachung in der Fermentchemie bedeuten. Darüber hinaus sind es medizinische Belange, die die Kenntnis vor allem der Cofermente wertvoll erscheinen lassen mit Bezug auf die Vitamine und Hormone, denn nach unserer heutigen Kenntnis sind die Vitamine oft die chemischen Vorstufen der aus ihnen entstehenden Cofermente, und auch von den Hormonen darf man vermuten, daß sie sich cofermentartig mit spezifischen Eiweißen vergesellschaften. Die Eulerschen Begriffe „Vitazym“ und „Hormozym“ als Bezeichnung solcher fermentartigen Symplexe deuten dieses Geschehen an. — Wir wollen im folgenden am besonderen Beispiel der Phosphatasen untersuchen, wie weit man Hinweise auf das Wirken der Cofermente im Zellgeschehen und auf ihr Verhalten *in vitro* gewinnen kann. An dieser Stelle wollen wir es uns dabei ausdrücklich versagen, noch offene Fragen über die zusammengesetzte Natur bisher nicht aufgetretener Fermente, vor allem der krystallisierbaren Proteasen (Pepsin, Trypsin), im positiven oder im negativen Sinne zu berühren; auch halten wir es für verfrüht, ohne experimentelle Beweise neue Theorien über ihr Aufbauprinzip zu entwickeln³⁾. Wir werden auf die Frage der Proteasen in einer späteren Arbeit zurückkommen.

Auf Grund der umfangreichen, schon statistisch auswertbaren Arbeiten über den Bau und die Spezifität der Cozymase konnte der Schluß gezogen werden¹⁾, daß die Wirkungs-Spezifität eines Fermentsystems ausschließlich durch die im Coferment enthaltene Wirkungsgruppe (in diesem Falle Nicotinsäureamid⁴⁾) und die Substratspezifität allein durch das Apoferment bestimmt wird. Bei Übertragung dieses Satzes auf die Phosphatasen wird man erwarten dürfen, daß ihre gleiche Wirkungsspezifität, ihr Vermögen, Ester der Phosphorsäure zu spalten, zurückgeht auf in ihrem Molekül vorhandene gleiche oder zum mindesten nahe verwandte Cofermente mit gleicher

*) V. Mitteil.: B. 68, 1443 [1935].

¹⁾ Angew. Chem. 49, 448 [1936].

²⁾ Journ. biol. Chem. 9, 29 [1911].

³⁾ vergl. W. Langenbeck, Chem.-Ztg. 60, 953 [1936].

⁴⁾ H. v. Euler, H. Albers u. F. Schlenk, Ztschr. physiol. Chem. 237, I [1935]; 240, 140 [1936].

Wirkungsgruppe⁵⁾, und daß ihre Substrat- und ihre p_H -Spezifität zurückgeht auf chemisch verschiedene Apofermente. (Wir setzen dabei als wahrscheinlich voraus, daß die Spezifität der isodynamen Phosphatase, denselben Phosphorsäureester bei unterschiedlichen Wasserstoffionen-Konzentrationen spalten zu können, als eine Abart der Substratspezifität zurückgeht auf eine Auswirkung der verschiedenen Apofermente.)

Aus den bisher bekannten Beispielen über die Auftrennbarkeit von Fermenten in Coferment und Apoferment ist zu ersehen, daß die Bindung Coferment-Apoferment von sehr unterschiedlicher Festigkeit ist⁶⁾. Die Cozymase ist nicht umsonst wegen der leichten Dissoziation des Holozymase-Symplexes schon so frühzeitig von A. Harden und W. J. Young⁷⁾ entdeckt worden; die Esterase, das Flavinferment sind wesentlich schwieriger aufzutrennen. Man wird bei der Kompliziertheit des Aufbaus der Fermente nicht erwarten dürfen, allgemein gültige Gesetzmäßigkeiten für ihre Auftrennung aufstellen zu können — vor allem die Labilität des Eiweißanteils stellt einer solchen Aufgabe größte Schwierigkeiten entgegen —, und selbst wenn es jetzt gelingt, unter bestimmten Voraussetzungen der Reinheit der verwendeten Präparate und der Lösungseigenschaften im Falle der Phosphatasen bestimmte Gesetze für die Auftrennung zu erkennen, so können diese Erkenntnisse wohl als Richtlinien, noch nicht aber als etwas Endgültiges oder Allgemeingültiges behandelt werden.

1) Die Stabilitätsverhältnisse der Nierenphosphatase.

Wählt man für den Nachweis der Auftrennung eines Fermentensystems das klassische Experiment der Dialyse, so zeigt sich, daß unreine Phosphatase-Lösungen ohne Verlust ihrer Wirksamkeit dialysiert werden können⁸⁾, daß aber von einem bestimmten Reinheitsgrad an ein Wirksamkeitsverlust eintritt⁹⁾. Durch Zugabe der Außenflüssigkeit des Dialysators kann eine Aktivierung ohne weiteres nicht wieder erreicht werden; also hätte man nach dem üblichen Gebrauch schließen müssen, daß die Phosphatase zu den nicht auftrennbaren Fermenten gehöre, und daß der Wirksamkeitsverlust durch eine verringerte Haltbarkeit des dialysierten Fermentes bedingt sei. Wir haben nun die Bedingungen für die Haltbarkeit — ohne Dialyse — genauer untersucht und dabei zunächst festgestellt, daß der Sauerstoff der Luft darauf gar keinen oder nur einen geringen Einfluß hat. Das wesentliche zerstörende (besser störende) Element ist die Acidität der Lösung. Dieser Befund bietet nichts Unerwartetes, sind doch Einflüsse der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Haltbarkeit von Fermentlösungen genugsam bekannt. Allein die nähere Untersuchung zeigt, daß wir es hier nicht mit einer einfachen Fermentzerstörung zu tun haben, sondern daß der Wirksamkeitsverlust bedingt ist durch eine p_H -abhängige Dissoziation der Holophosphatase in Coferment und Apoferment.

⁵⁾ Wie etwa im Falle der Cozymase und der Codehydrase II, die beide die Wirkungsgruppe des Pyridinkerns enthalten.

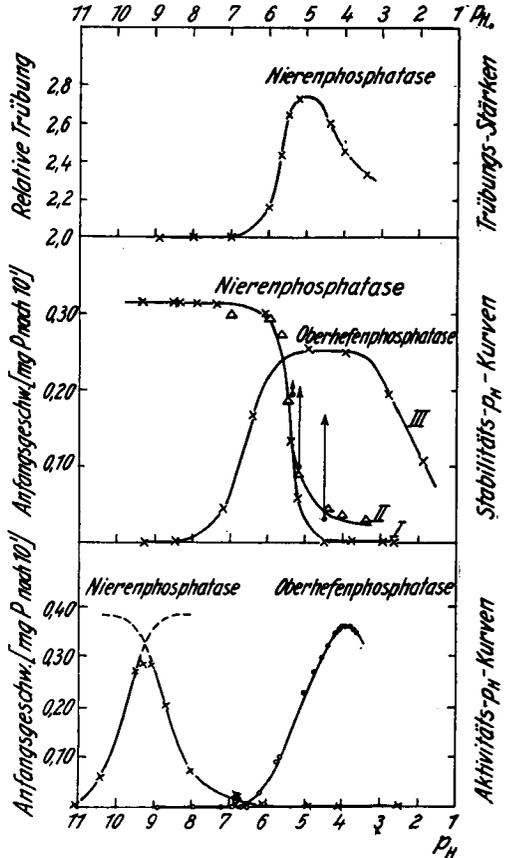
⁶⁾ Keinesfalls darf allgemein von einer „lockeren Bindung“^(*) als kennzeichnend für die Bindung zwischen Coferment und Apoferment gesprochen werden.

⁷⁾ Journ. Physiol. (Proceed.) **32**, I [1905]; Proceed. chem. Soc. London **21**, 189 [1905].

⁸⁾ vergl. H. D. Jenner u. H. D. Kay, Journ. biol. Chem. **93**, 733 [1931]; S. Uza-wa, Journ. Biochemistry **15**, 1 [1932].

⁹⁾ H. u. E. Albers, Ztschr. physiol. Chem. **232**, 165 [1935].

Setzt man Lösungen hochgereinigter Nierenphosphatase¹⁰⁾ längere Zeit bei Zimmertemperatur der Einwirkung bestimmter Wasserstoffionen - Konzentrationen aus, und bestimmt man nach gegebenen gleichen Zeiten die noch vorhandene Aktivität, so erhält man Kurvenbilder nach Art der Kurven I und II der Abbild. 1. Sie zeigen, daß die Nierenphosphatase, die bei einem p_H von 9.25 optimal wirksam ist, im alkalischen Gebiet vollkommen stabil ist, daß aber ein steiler Abfall der Stabilität einsetzt bei einem p_H von 6, und daß schon bei einem p_H von 4.5 kaum noch Phosphatase nachweisbar ist. Die so gewonnene Stabilitäts- p_H -Kurve steht in keinerlei Beziehung zur bekannten Aktivitäts- p_H -Kurve (Abbild. 1). Sollte die Stabilitäts- p_H -Kurve lediglich eine Fermentzerstörung beschreiben, so müßte ihre Lage, insbesondere ihre Steilheit, abhängig sein von der Inaktivierungszeit und von der Art des verwendeten Ferments. Das ist nicht der Fall, die mit verschiedenen Fermenten aufgenommenen Kurven I und II haben sehr angenähert die gleiche Lage. Verfolgt man zudem den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung in dem kritischen p_H -Intervall, so stößt man auf die sehr merkwürdige Tatsache, daß sich offenbar Gleichgewichte einstellen: die Inaktivierung schreitet nur bis zu einer gewissen Grenze fort (Abbild. 2). Weiter zeigt sich, daß die Inaktivierung im kritischen p_H -Intervall reversibel



Abbild. 1. Kurve der Trübungsstärken in Abhängigkeit vom p_H :

Ordinate: relative Trübungsstärke in Photometergraden,

Abzisse: p_H der Fermentlösung (Nierenphosphatase).

Stabilitäts- p_H -Kurven:

Ordinate: relative Aktivitäten der Fermentlösungen nach 45- (I, II) bzw. 24- (III)-stdg. Aufbewahren (Zimmertemperatur) bei den jeweiligen p_H -Werten, ausgedrückt in den durch die Lösungen bei ihrem Reaktionsoptimum (p_H 9.25 u. 4.0) erzeugten Anfangsgeschwindigkeiten (in 10 Min. freigelegte mg P),
 Abzisse: Aufbewahrungs- p_H der Fermentlösungen.

Aktivitäts- p_H -Kurven:

Ordinate: relative Aktivitäten bei dem jeweiligen Reaktions- p_H , ausgedrückt durch die Anfangsgeschwindigkeiten (in 10 Min. freigelegte mg P),
 Abzisse: p_H der Reaktionsansätze.

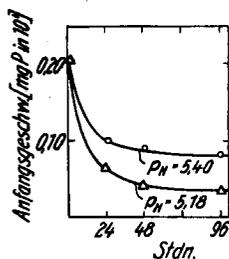
¹⁰⁾ H. u. E. Albers, Ztschr. physiol. Chem. 232, 189 [1935].

Tafel 1.

Zeitlicher Gang der Inaktivierung und der Reaktivierung von Lösungen der Nierenphosphatase.

p _H -Wert der bei 18° aufbewahrten Lösung	5.40	5.18	4.50	2.95
Aktivität (in PE/cc) nach 0 Min.	18.0	18.0	18.0	18.0
75 „	13.9	14.5	11.7	0
185 „	14.6	12.4	9.3	0
25 Stdn.	12.4	6.4	(0 → 2) ¹¹⁾	
Aktivität der Lösung nach Aufbewahrung bei p _H 9.0 und 18° über 3 1/2 Stdn.	16.6	15.9	12.3	
23 „	15.7	15.7	15.8	0
23 „	13.5	13.2	10.8	

Die Pfeile geben die Art der Reaktivierung an: z. B. hat die 185 Min. bei p_H 4.50 gestandene Lösung noch eine Aktivität von 9.3 PE/ccm, die nach 3 1/2-stdg. Aufbewahren bei p_H 9.0 auf 12.3 und schließlich nach 23-stdg. Aufbewahren auf 15.8 PE/ccm wieder ansteigt.



Abbild. 2.

Ordinate: relative Aktivitäten der Fermentlösungen nach den jeweiligen Aufbewahrungszeiten,

Abszisse: Aufbewahrungszeiten in Stunden.

ist: die wieder auf das Stabilitätsoptimum, auf p_H 8—9, gebrachten Inaktivierungsgemische gewinnen im Laufe der Zeit in um so höherem Maße ihre alte Aktivität zurück (in der Abbild. 1 durch die Höhe der Pfeile gekennzeichnet), je geringere Zeiten sie dem Inaktivierungs-p_H ausgesetzt waren, und je weniger sauer die Lösungen waren (Tafel 1). Die Reaktivierung ist wie die Inaktivierung eine langsam verlaufende Reaktion, die nach gleichen Zeiten gleiche Aktivitäten erreichen läßt. Im stärker sauren Gebiet wird das Ferment irreversibel zerstört (vergl. Abschn. V).

Es wäre denkbar, daß das beschriebene p_H-abhängige Gleichgewicht einer reversiblen Umwandlung des Fermentproteins in ein denaturiertes, fermentativ inaktives *meta*-Protein¹²⁾ entspräche. Solche reversiblen Denaturierungen sind in der Eiweißchemie zwar bekannt, aber der Gang unserer Untersuchungen legte eine andere Erklärung nahe, die auch nach dem Aussehen der Stabilitäts-p_H-Kurve als einer typischen Dissoziationsrest-Kurve wahrscheinlich war. Die Inaktivierung könnte nämlich bedingt sein durch ein p_H-abhängiges Dissoziationsgleichgewicht:

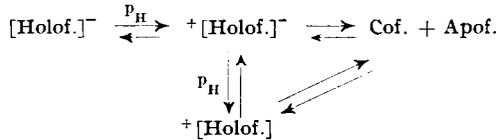


Der Ladungssinn des Holofermentes würde mithin verantwortlich gemacht für seine Dissoziationsneigung: das in der alkalischen Lösung als Anion vorliegende Fermenteiweiß wäre stabil, beim Ansäuern der Lösung würde es isoelektrisch und schließlich kationisch aufgeladen; mit dieser Umladung ginge eine Dissoziation einher.

¹¹⁾ Das Ferment reaktiviert sich während der bei p_H 9.10 ablaufenden Reaktion: nach 10 Min. ist die Aktivität 0, nach 50 Min. Reaktionsdauer werden 2 PE/cc gemessen.

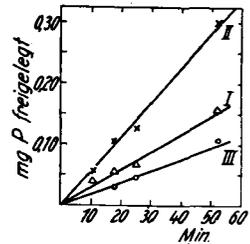
¹²⁾ vergl. H. Theorell, Biochem. Ztschr. **290**, 293 [1937].

Daß bei stufenweiser p_H -Änderung eine Umladung statthat, kann für das Eiweißmolekül der Phosphatase als sicher angenommen werden; nachweisen läßt diese sich in konzentrierteren Lösungen durch das Entstehen und Wiederverschwinden einer Trübung im Gefolge der p_H -Änderung. Offenbar ist das anionisch geladene Fermenteiweiß (p_H 10—6) in Wasser leicht löslich; im isoelektrischen Gebiet (p_H 6—5) tritt — wie bei sehr vielen Eiweißen — Schwerlöslichkeit auf; das schließlich entstehende Kation (p_H 5—3) ist wieder löslich. Mißt man die Trübungsstärken einer solchen Lösung in Abhängigkeit vom p_H , so erhält man die obere Kurve der Abbild. 1; sie stellt in ihrem ansteigenden Ast nach Veränderung des Ordinatenmaßstabes annähernd ein Spiegelbild der Stabilitäts- p_H -Kurve dar. Das bedeutet im Sinne unserer Annahme, daß das durch die zunehmenden Trübungsstärken angezeigte isoelektrische Zwitterion und wahrscheinlich auch das Kation in seine Komponenten Coferment und Apoferment dissoziiert. Es besteht also ein Gleichgewicht¹³⁾



Wenn die Erklärung richtig ist, muß es möglich sein, im Gültigkeitsbereich dieses Gleichgewichtes, d. h. etwa vom p_H 6—5 im Bereich des abfallenden Astes der Stabilitäts- p_H -Kurve und darüber hinaus, das niedermolekulare Coferment durch Dialyse abzutrennen und das gewonnene Apoferment wiederum durch Cofermentzugabe zum Holoferment zu ergänzen. Im Existenzbereich des Ferment-Anions hingegen, im alkalischen Gebiet, sollte eine Abtrennung nicht möglich sein. Das Experiment bestätigt beide Voraussagen (vergl. Tafel 2); man gelangt in der Tat bei vorsichtig geleiteter saurer Dialyse der Nierenphosphatase zu apofermenthaltigen Präparaten, die recht gut durch Cofermentpräparate verschiedener Herstellung aktivierbar sind (Abbild. 3). Damit ist die zusammengesetzte Natur der Nierenphosphatase erwiesen und die wichtige Tatsache festgestellt, daß der Ladungssinn eines Fermentes von entscheidender Bedeutung sein kann für seine Dissoziationsneigung¹⁴⁾.

Inaktivierung und Reaktivierung bei p_H -Änderung sind somit im Sinne der gemachten Annahme als Disso-



Abbild. 3.

- Kurve I: Apofermenthaltige Nierenphosphatase.
- Kurve II: Aktivierung durch gereinigte Cophosphatase.
- Kurve III: Hemmung durch den von der Cophosphatase abgetrennten Hemmstoff (vergl. Abschn. V).

¹³⁾ Über den Ladungssinn von Coferment und Apoferment soll vorerst nichts ausgesagt werden.

¹⁴⁾ In der manchmal mit Erfolg verwendeten Dialyse von Fermentlösungen gegen verd. Salzsäure zum Zwecke der Auftrennung ist danach offenbar ebenfalls der Zusammenhang zwischen Ladungssinn und Dissoziationsneigung zu sehen (Flavinferment: Theorell, *Biochem. Ztschr.* **272**, 155 [1934]; **278**, 263 [1935]; Katalase: K. Agner, *Ztschr. physiol. Chem.* **235**, II [1935]; Esterasen: W. v. Pantschenko-Jurewicz u. H. Kraut, *Biochem. Ztschr.* **285**, 407 [1936]).

ziation des Fermentmoleküls und als Assoziation seiner Komponenten erklärt. — Der langsame Verlauf¹⁵⁾ beider Reaktionen (Abbild. 2, Tafel 1) sollte offenbar eine salzartige Bindung zwischen Coferment und Apoferment ausschließen, für die eine augenblicklich verlaufende Ionenreaktion zu erwarten wäre. Aber wir wissen vorerst nicht, ob nicht die langsame Reaktion durch einen reversiblen Übergang des Apofermentproteins in ein nicht mehr mit dem Coferment kuppelungsfähiges meta-Protein bedingt wird, so wie es in ähnlicher Weise auftritt beim Flavīn-Apoferment¹²⁾. In dem Fall würde die salzartige Verknüpfung nur nach Maßgabe jenes langsamen Übergangs voranschreiten können. Im anderen Fall nicht-salzartiger Bindung könnte man leicht hydrolysierbare Hauptvalenzbindungen, etwa Ester- oder Säureamid(Peptid)-Verkettungen, diskutieren, man hätte allerdings dabei deren z. Tl. geringe Stabilität im alkalischen Gebiet zu berücksichtigen. —

II) Die Stabilitätsverhältnisse der Oberhefenphosphatase.

Die Untersuchung der Stabilitätsbedingungen der Oberhefenphosphatase¹⁶⁾ gehen in grundsätzlich gleicher Weise vor sich wie bei der Nierenphosphatase. Sie hat ein Reaktionsoptimum (für die Spaltung von β -Glycerophosphat) bei einem p_H von 4 (Abbild. 1). Nach eintägigem Stehenlassen bei verschiedenen Wasserstoffionen-Konzentrationen zeigt sie Inaktivierungseffekte, die die Stabilitäts- p_H -Kurve III der Abbild. 1 beschreibt: die Oberhefenphosphatase ist stabil zwischen den p_H -Werten von etwa 3.5—5.5, im alkalischen sowie im sauren Gebiet zeigt sie einen Abfall der Aktivität. Wir betrachten zunächst nur den Abfall zum alkalischen: wir schließen daraus, daß offenbar das isoelektrische oder das anionisch aufgeladene Molekül der Oberhefenphosphatase unter scheinbarer Inaktivierung in seine Komponenten dissoziiert. Dann dürfte eine Dialyse der Oberhefenphosphatase nur im Dissoziationsgebiet zwischen p_H 5.5 und 7.5 zu einem reaktivierbaren Apoferment führen, während eine Dialyse bei den p_H -Werten zwischen 3.5 und 6 keine Wirksamkeitseinbuße des Ferments zeigen dürfte. Unter Voraussetzung eines Ergebnisses des nächsten Abschnittes finden wir, daß wieder das Experiment beide Voraussagen bestätigt; das gewonnene Apoferment ist durch Cophosphatase zum Holoferment zu ergänzen. Damit ist die zusammengesetzte Natur auch der Oberhefenphosphatase bewiesen.

III) Coferment-Wanderungen.

Einleitend hoben wir hervor, daß die Phosphatasen wegen ihrer Wirkungsgleichheit das gleiche Coferment besitzen müßten. Es sollte also möglich sein, mit Hilfe des Coferments der Oberhefen-Phosphatase ein Nieren-Apoferment zur vollständigen Holoferment zu ergänzen und umgekehrt auch die Oberhefen-Holoferment aufzubauen aus ihrem Apoferment und der Nieren-Cophosphatase. Beide Vorgänge sind realisierbar unter Berücksichtigung der in den vorhergehenden Abschnitten erkannten Dissoziationsverhältnisse: Nieren-Apophosphatase wird bei p_H 9 mit Oberhefenphosphatase versetzt,

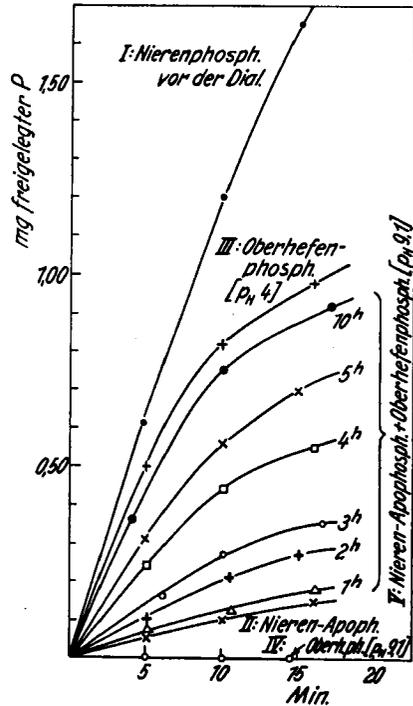
¹⁵⁾ Bei den Apoesterasen wurde eine ähnlich langsame Vereinigung mit der Coesterase beobachtet (v. Pantschenko-Jurewicz u. Kraut, l. c.).

¹⁶⁾ H. u. E. Albers, Ztschr. physiol. Chem. **235**, 47 [1935]; Ark. Kemi, Mineral., Geol. **12** B, Nr. 3 [1935].

die bei dieser Alkalität vollkommen inaktiv ist (Abbild. 1 u. 4). Die nach gegebenen Zeiten entnommenen Proben ergeben bei der Aktivitätsbestimmung mehr und mehr ansteigende Reaktionskurven (Abbild. 4). Sie zeigen, daß in meßbar langsamer Reaktion Nierenphosphatase gebildet wird, daß also die bei p_H 9 freigelegte Oberhefen-Cophosphatase zusammengetreten ist mit dem Nieren-Apoferment. — Dabei wird die ursprüngliche Aktivität nicht wieder erreicht, und zwar auch dann nicht, wenn dem Nieren-Apoferment die doppelte Menge Oberhefenphosphatase zugesetzt wird: nach 10-stdg. Einwirkung wird eine mit der 10-Stdn.-Kurve der Abbild. 4 identische Reaktionskurve erhalten. Daraus ist zu schließen, daß das Apoferment durch die Dialyse zum Teil geschädigt wurde; nur seine noch ungeschädigt vorliegende Menge begrenzt die Höhe der erreichbaren Aktivierung.

Den Typ der Wiedervereinigungsreaktion von Apophosphatase und Cophosphatase erkennt man aus der nächsten Kurve der Abbild. 5, die durch Auftragen der aus den Reaktionskurven entnommenen Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Vereinigungszeiten gewonnen wird: sie zeigt das typische Bild einer autokatalytisch sich beschleunigenden Reaktion. [Es bedarf aber noch der Aufklärung, ob es sich dabei um eine echte Autokatalyse handelt, oder ob nicht vielmehr zwei bzw. drei sich ergänzende Reaktionen verschiedener Geschwindigkeit gleichzeitig ablaufen: eine langsame Dissoziation der Oberhefenphosphatase, eine Umwandlung von meta-Protein in kuppelungsfähiges Apoferment-Protein¹⁷⁾ (größere Geschwindigkeit) und die mit diesem erfolgende Vereinigung der Cophosphatase zum Holoferment.] —

Den umgekehrten Vorgang zur Synthese der Nierenphosphatase bildet

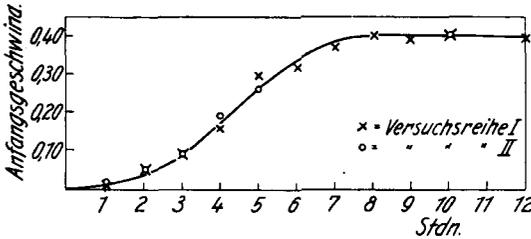


Abbild. 4.

- Kurve I: Reaktionskurve der Nierenphosphatase vor der Dialyse,
 - Kurve II: Reaktionskurve der aus der Nierenphosphatase I gewonnenen Apo-phosphatase,
 - Kurve III: Reaktionskurve der zur Coferment-Übertragung verwendeten Oberhefenphosphatase (p_H 4.0; ohne Mg),
 - Kurve IV: Reaktionskurve der gleichen Oberhefenphosphatase bei p_H 9.1,
 - Kurvenschar V: Reaktionskurven von Nieren-Apo-phosphatase II, die über wechselnde Zeiten mit einer jeweils gleichen Menge von Oberhefenphosphatase III bei p_H 9.1 reagierte (Prüfsätze mit Mg, p_H 9.1).
- Die für die Versuche verwendeten Fermentmengen sind gleich.

¹⁷⁾ Auf eine Umwandlung Apoferment-Protein → meta-Protein würde die Art der p_H -Abhängigkeit der Trübungsstärken von Nierenphosphataselösungen hindeuten. (Abbild. 1.)

die Synthese der Oberhefenphosphatase aus Oberhefen-Apophosphatase und Nieren-Cophosphatase: Nierenphosphatase wird bei einem p_H von 4.8



Abbild. 5. Kurve der Reaktion: Oberhefen-Cophosphatase + Nieren-Apophosphatase \rightarrow Nieren-Holo-phosphatase.

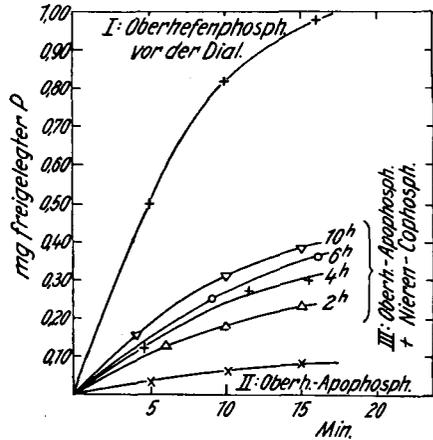
Ordinate: Anfangsgeschwindigkeiten in mg P nach 5 Min., z. Tl. entnommen aus der Kurvenschar V der Abbild. 4 (Versuchsreihe II),
Abszisse: Reaktionsdauer in Stunden.

dissoziieren gelassen. Diese Lösung, die nunmehr freies Coferment enthält, wird mit Oberhefen-Apoferment zusammengebracht, und nach bestimmten Zeiten wird jeweils ihre Aktivität bestimmt. So ergeben sich die Reaktionskurven der Abbild. 6. Sie zeigen, daß Oberhefenphosphatase neu entsteht, und zwar wiederum in meßbar langsamer Reaktion, obgleich das notwendige Coferment in diesem Fall von vornherein als bereits freigelegt zur Verfügung stand.

Die Nierenphosphatase und die Oberhefenphosphatase besitzen somit das gleiche, gegeneinander austauschbare Coferment.

Damit ist die früher¹⁸⁾ ausgesprochene Annahme, daß die wirkungsgleichen Phosphatasen die gleiche Cophosphatase enthalten, für jene beiden Fermente bewiesen und, da die Coferment-Gleichheit hier trotz der sehr verschiedenen Herkunft und trotz des verschiedenen Verhaltens vorliegt, auch für die übrigen wirkungsgleichen Phosphatasen sehr wahrscheinlich gemacht.

Interessant ist dazu die Frage der Aktivierbarkeit der Phosphatasen durch Magnesium-Ionen. Bekanntlich wird Nierenphosphatase durch Magnesium-Ionen aktiviert¹⁹⁾, Oberhefenphosphatase hingegen wird gehemmt¹⁶⁾. Die Wirkung des Magnesiums ist trotz des gleichen Cofermentanteils also entgegengesetzt; offenbar ist es die Verschiedenheit der Apofermente, die in die Art der Magnesiumwirkung eingreift. Im Hinblick auf die Substratspezifität der Apofermente kann man darin eine Stütze für die Ansicht von E. Bauer²⁰⁾ erblicken, daß das Magnesium das Substrat durch „Auflockerung“ aktiviere.



Abbild. 6.

Kurve I: Reaktionskurve der Oberhefenphosphatase vor der Dialyse,

Kurve II: Reaktionskurve der aus der gleichen Oberhefenphosphatase I gewonnenen Apophosphatase.

Kurvenschar III: Reaktionskurven von Oberhefen-Apophosphatase II, die über wechselnde Zeiten mit einer jeweils gleichen Menge Nierenphosphatase reagierte.

Die verwendeten Fermentmengen sind gleich, Prüfansätze ohne Mg, p_H 4.0.

¹⁸⁾ Vorträge auf dem Reichstreffen d. Dtsch. Chemiker, Frankfurt 1937, und auf der Chemiedozententagung, Braunschweig 1936.

¹⁹⁾ H. Erdtman, Ztschr. physiol. Chem. **172**, 182 [1927]; **177**, 211 [1928].

²⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. **248**, 213 [1937].

IV) Dissoziation der Phosphatasen und Massenwirkungsgesetz.

Das Dissoziationsgleichgewicht: Holophosphatase \rightleftharpoons Cophosphatase + Apophosphatase muß nach dem Massenwirkungsgesetz durch Verdünnen des Systems nach rechts verschoben werden können. Ein Hinweis, daß Phosphatasen in verdünnten Lösungen zum Teil dissoziieren, liegt schon in der geringeren Haltbarkeit solcher Lösungen gegenüber ihren gleichartig behandelten konzentrierteren Ursprungslösungen. Man pflegt solche Effekte im Laboratorium mit der „geringeren Stabilität“ verdünnter Fermentlösungen abzutun; daß hier aber häufig nur Dissoziationen vorliegen, die einesteils den Gehalt an aktivem Holoferment verringern, und in deren Folge anderenteils das meist sehr labile freie Apoferment und oft auch das Coferment zerstört wird, läßt sich durch Dialysen leicht erweisen. Immer dialysieren verdünnte Phosphatase-Lösungen viel weitergehend (Tafel 2), immer liefern sie auch schneller gute Apofermentpräparate als konzentrierte Lösungen, in denen von vornherein weniger freies Coferment der Dialyse zur Verfügung steht.

Tafel 2.
Dialyse verschieden konzentrierter Nierenphosphatase-Lösungen.

Dauer der Dialyse in Stdn.	Aktivitäten in PE/cc						
	Dialyse bei p _H 5.6; 18°				dass.; 0°		Dialyse bei p _H 8.0; 0°
	Lg. I	Lg. II	Lg. III	Lg. IV	Lg. V	Lg. VI	
0	80	16.4	12.3	2.95	14.5	14.5	14.5
2	76.5						
16				0.19			
20		7.5					
21			4.1				
22	49.5	6.6	3.6	0.17	3.6		13.3
25			2.1			2.0	
37				0.13			

V) Umwandlung der Cophosphatase in einen Hemmstoff.

Schon in früheren Arbeiten⁹⁾¹⁰⁾¹⁶⁾ fanden wir, daß in der Natur ein niedermolekularer Hemmstoff als Begleiter einiger Phosphatasen vorkommt. Dieser Hemmstoff entsteht offenbar aus der Cophosphatase selber. Er bildet sich leicht schon unter physiologischen Bedingungen in verdünnten, schwach sauren Lösungen hochgereinigter Nierenphosphatase: Hält man Fermentlösungen bei verschiedenen Aciditäten (p_H 2—8) über 10 Min. bei 35° und bestimmt sodann die jeweiligen Aktivitäten²¹⁾, so ergibt sich eine Stabilitäts-p_H-Kurve (Abbild. 7, Kurve I), die gegenüber der bei Zimmertemperatur gewonnenen (Abbild. 1) ein gänzlich anderes Aussehen zeigt: nach anfänglichem leichten Abfall sinkt die Aktivität zwischen p_H 3 und 4 (statt vorher zwischen 5 und 6) plötzlich auf Null. Selbst wenn man nach dem Ergebnis des vorhergehenden Abschnittes berücksichtigt, daß in der verwendeten verdünnteren Ferment-Lösung eine weitergehende Dissoziation statthatte, muß man annehmen, daß dem Abfall der Aktivität eine Zerstörung oder eine Umwandlung entweder des Apoferment- oder des Coferment-Anteils oder beider zugrunde liegt. —

²¹⁾ Die Aktivitäten sind graphisch aus Bestimmungen, z. B. nach 5, 10, 20, 40, 100 Min., also aus den Inaktivierungs-Zeit-Kurven der einzelnen p_H-Werte, ermittelt.

Die Beständigkeit des Coferment-Anteils kann man leicht durch Kochproben der betreffenden Fermentlösungen bei verschiedenem p_H untersuchen; beim Kochen wird das hochmolekulare Apoferment zerstört, und nur das Coferment bleibt unter den verschiedenen Bedingungen verschieden gut erhalten. Mit solchen Kochsäften werden Nieren-Apoferment-Präparate versetzt und nach mehrstündigem Stehenlassen bei p_H 9 auf ihre Aktivität geprüft (Reaktionskurven der Abbild. 8). Es zeigt sich, daß die alkalisch und die neutral hergestellten Kochsäfte zu aktivieren vermögen, sie enthalten also wirksame Cophosphatase; der bei p_H 3 hergestellte Kochsaft übt hingegen eine hemmende Wirkung aus. Setzt man solche Kochsäfte inaktiver Nieren-Holophosphatase zu, so wird die hemmende Wirkung noch wesentlich deutlicher: der bei einem p_H von 2.8 und 3.1 hergestellte Kochsaft bringt die Aktivität eines stark wirksamen Präparates fast völlig zum Verschwinden. (Reaktionskurven der Abbild. 9.) Trägt man die Anfangsgeschwindigkeiten dieser Versuche gegen das p_H des zugegebenen Kochsaftes in einem Koordinatensystem auf, so ergibt sich eine Hemmungskurve (Ab-

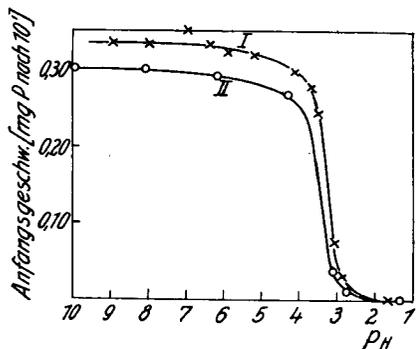


Abbildung 7.

I: Stabilitäts- p_H -Kurve bei 35°.

Ordinate: Aktivität der bei 35° und verschiedenem p_H aufbewahrten Fermentlösungen, ausgedrückt durch die Anfangsgeschwindigkeiten (nach 10 Min. freigelegte mg P),

Abszisse: Aufbewahrungs- p_H der Fermentlösungen.

II: Hemmungskurve.

Ordinate: Aktivität (in mg P nach 10 Min.) von Nierenphosphatase, die 5 Stdn. mit bei wechselndem p_H hergestelltem Kochsaft stand (p_H 9.1),

Abszisse: Herstellungs- p_H des Kochsaftes.

Abbildung 7, Kurve II), die der 35°-Stabilitäts- p_H -Kurve nach einer entsprechenden Ordinatenüberhöhung praktisch gleich ist. Beim Erhitzen einer sauren Phosphatase-Lösung auf 100° entsteht demnach ein spezifisch wirkender Hemmstoff; aus der Gleichheit seiner Hemmungskurve mit der 35°-Stabilitäts- p_H -Kurve ist abzuleiten, daß dieser selbe Hemmstoff schon bei 35° mit großer Leichtigkeit gebildet wird. Wir nehmen als wahrscheinlich an, daß er durch Umwandlung aus der Cophosphatase entsteht, denn wir können ihn aus Phosphatasepräparaten auch höchster Reinheitsgrade erzeugen. Auch ist sein Entstehen nicht auf Nierenphosphatase beschränkt²²⁾; er entsteht — angezeigt

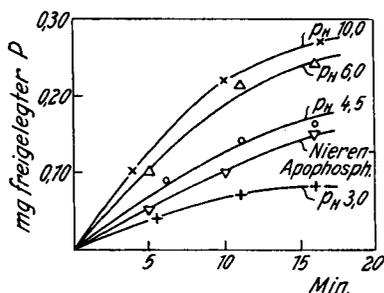
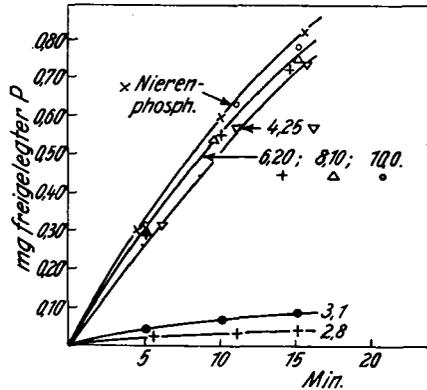


Abbildung 8. Reaktionskurven von Nieren-Apofermenten nach 5-stündiger Einwirkung von bei verschiedenem p_H hergestellten Kochsäften (Einwirkungs- p_H : 9.1).

²²⁾ Über das Vorkommen eines natürlichen Hemmstoffes, der wahrscheinlich mit dem hier beschriebenen identisch ist, vergl. den Abschnitt VII.

durch den im sauren Gebiet abfallenden Ast der Stabilitäts- p_H -Kurve (Abbild. 1) — auch aus der Oberhefenphosphatase sowie aus der Prostataphosphatase²³⁾ und aus der Knochenphosphatase²⁴⁾.

Naturgemäß erschwert der angenommene leichte Übergang der Cophosphatase in diesen hochwirksamen Hemmstoff ihre Isolierung in starkem Maße; von der Abtrennung (vergl. Abbild. 3) und der näheren Charakterisierung soll im Zusammenhang mit den Cophosphatase-Reinigungsarbeiten berichtet werden. Der Hemmstoff ist wie die Cophosphatase dialysierbar¹⁶⁾; Aktivitäts-Steigerungen, die man bei Dialysen und Elektrodialysen von Phosphatasepräparaten oft findet, sind auf seine Entfernung zurückzuführen.



Abbild. 9. Reaktionskurven von Nieren-Holophosphatasen nach 5-stdg. Einwirkung von bei verschiedenem p_H hergestellten Kochsäften (Einwirkungs- p_H : 9.1).

VI) Allgemeine Schlußfolgerungen.

Wir haben die Befunde, die sich aus der zusammengesetzten Natur der Phosphatasen ergeben, genauer untersucht, weil sie einerseits versprechen, für andere bisher ungeklärte Erscheinungen der Fermentchemie brauchbare Arbeitshypothesen abzugeben, und weil sie andererseits für die Erkenntnis der Zellvorgänge von wesentlichem Nutzen sein können.

In der präparativen Fermentchemie wird man bei Isolierungen von Fermenten oft mit einer Wanderung des Coferments von einem Apoferment zum andern rechnen müssen. Gesetzt den Fall, es seien aus einem natürlichen Vorkommen zwei Phosphatasen von den Typen der Nierenphosphatase und der Oberhefenphosphatase zu isolieren. Neben ihnen wird wahrscheinlich meistens ein Überschuß der diesbezüglichen Apofermente vorliegen²⁵⁾. Nehmen wir nun die Isolierung durch alkalische Extraktion (p_H etwa 8) vor, so werden wir ausschließlich Nierenphosphatase in die Hand bekommen; bei schwach saurer Extraktion (p_H etwa 4.5), erhalten wir ausschließlich Oberhefenphosphatase. Bringen wir die beiden Extrakte nun wechselseitig auf die jeweils entgegengesetzte Reaktion (4.5 \rightarrow 8 bzw. 8 \rightarrow 4.5), so werden wir in beiden Fällen nach einer gewissen Zeit eine „Neubildung“ des vorher fehlenden und ein Verschwinden des zunächst isolierten Ferments beobachten²⁶⁾. Immer werden wir solche Neubildungen erwarten können, wenn in einem Gemisch wirkungsgleiche Fermentsysteme vorliegen, deren gleiches Coferment bei günstigen p_H -Bedingungen wandert. —

²³⁾ W. Kutscher u. A. Wörner, Ztschr. physiol. Chem. **239**, 109 [1936].

²⁴⁾ S. Belfanti, A. Contardi u. A. Ercoli, Biochem. Journ. **29**, 517, 842 [1935]. (Bemerkt sei, daß Knochenphosphatase mit Nierenphosphatase identisch ist.)

²⁵⁾ Dieser läßt sich nach unseren Befunden in vorsichtig bereiteten Rohpräparaten z. B. der Nierenphosphatase durch die Aktivierbarkeit mit Cophosphatasepräparaten leicht nachweisen.

²⁶⁾ vergl. dazu das Dissoziationsschema im Abschn. VII.

Beobachtungen über Neubildungen von Fermenten liegen vielfach und bisher unerklärt in der Literatur vor. So findet W. Schuchardt²⁷⁾ bei der Untersuchung der Hefe Hansenula zwei Phosphatasen gerade jenes erwähnten Typs: nach Behandlung der Hefe mit 0.3-n. Ammoniaklösung ist die im sauren Gebiet wirksame Phosphatase nicht mehr nachzuweisen, wohl aber ist die im alkalischen Gebiet wirksame stark vermehrt. Die Cophosphatase des „sauren“ Ferments ist in der alkalischen Lösung freigelegt und von überschüssigem „alkalischem“ Apoferment aufgenommen worden. E. Bamann und W. Salzer²⁸⁾ finden ähnliche Verhältnisse bei der Taka-Phosphatase (p_H -Optimum bei 4): in alkalischer Lösung tritt ein zweites neues Optimum bei p_H 6.2 auf²⁹⁾. Eine Abhängigkeit der Substratspezifität von der Darstellungsart der Phosphomonoesterase finden J. Roche und M. Latreille³⁰⁾. Solche Beispiele ließen sich vielfach vermehren, und auch bei der Durchsicht anderer Fermentklassen treffen wir auf ähnlich gelagerte und ähnlich zu erklärende Fälle. So sind Darstellungsmethoden mit Hilfe der „selektiven Extraktion“ bei alkalischer oder bei saurer Reaktion oder mit Hilfe der dieser sinngemäß entsprechenden selektiven „Inaktivierung“ vorliegender Gemische bei verschiedenem p_H häufig angewendet: u. a. bei den Hefephosphatasen von C. Kobayashi³¹⁾, der, selektiv extrahierend, unbewußt den oben beschriebenen Modellfall der Cophosphatasewanderung verwirklichte (vergl. ²⁷⁾), bei den Leberphosphatasen und der Leberesterase von E. Bamann und K. Diederichs³²⁾, bei Pyrophosphatasen von E. Bamann und H. Gall³³⁾ und von E. Bauer³⁴⁾. —

VII) Physiologische Bedeutung der Cofermentwanderungen und der Cofermentbindung.

Das veranlassende Moment für Cofermentwanderungen kann, wie die Steilheit der Stabilitäts- p_H -Kurven im kritischen p_H -Bereich der Dissoziation zeigt, eine schon verhältnismäßig geringe p_H -Verschiebung sein, eine Verschiebung, wie sie auch im Zellenleben unter normalen Verhältnissen auftreten kann. Wir dürfen daher annehmen, daß auch hier ähnliche Cofermentwanderungen vorkommen, wie wir sie in vitro beobachten können. Bei der Erwägung, ob diese Wanderungen vielleicht sogar einer physiologischen Zweckmäßigkeit entsprechen, stoßen wir auf eine Antwort, die für die Physiologie des Zusammenwirkens der Fermente in der Zelle von Bedeutung ist.

Es ist eine noch offene und bisher auch wenig diskutierte Frage, welchen Sinn in der Zelle Fermente mit einem ausgesprochen unphysiologischen Wirkungsoptimum im stark alkalischen oder im stark sauren Gebiet haben, wenn sie durch das Eigen- p_H ihrer Umgebung meistens gar nicht oder nur zum geringen Teil in der Lage sind, überhaupt zu wirken. Nun kann aller-

²⁷⁾ Biochem. Ztschr. **285**, 448 [1936].

²⁸⁾ Biochem. Ztschr. **287**, 381 [1936].

²⁹⁾ Die unklaren Verhältnisse bei den Takafermenten können sicher zum Teil bei zufällig günstigem p_H , bei zufällig längerer Adsorptions- oder Elutionsdauer während der Reinigung auf ähnliche Cofermentwanderungen zurückgeführt werden, die zum Entstehen isodynamer oder ihre Substrate verschieden angreifender Fermente führen. Die Ergebnisse K. Kuratas bei der Diphenyl-pyrophosphatase (Journ. Biochemistry **14**, 25 [1931]) lassen sich analog erklären.

³¹⁾ Journ. Biochemistry **24**, 369 [1936].

³⁰⁾ Enzymologia **3**, 75 [1937].

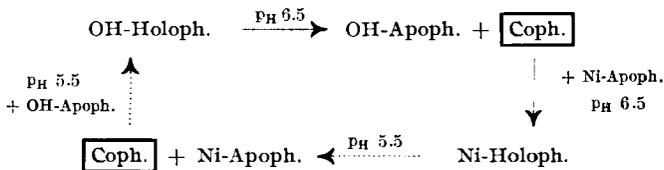
³²⁾ B. **67**, 2019 [1934]; **68**, 6 [1935].

³³⁾ Biochem. Ztschr. **298**, 1 [1937].

³⁴⁾ Naturwiss. **23**, 866 [1935].

dings nach den neueren histologischen Untersuchungen nicht mehr von einem allgemeinen „Zell-p_H“ gesprochen werden, vielmehr gibt es in der Zelle begrenzte Bezirke recht verschiedener Wasserstoffionen-Konzentration, die nach den Ergebnissen an einzelligen Gebilden zwischen den Grenzen etwa von p_H 5 bis 8 anzugeben ist³⁵). Auch die Fermentwirkungen hat man als innerhalb der Zelle lokalisiert anzunehmen, man darf daher wohl mit Recht an lokale Übersäuerungen innerhalb der Zelle denken, die etwa durch die bei übermäßigem Phosphatstoffwechsel freigelegte Phosphorsäure hervorgerufen werden. Bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Phosphatase vom Typ der Nierenphosphatase (p_H-Optimum 9.25) und einer im physiologischen p_H-Bereich wirksamen Phosphatase in einer Zelle (z. B. in der Hefezelle, s. oben) kommt nun diese Übersäuerung dem Bedürfnis nach vermehrter Bereitstellung von spaltungsfähiger Phosphatase für den vermehrten Stoffwechsel entgegen: die Nierenphosphatase dissoziiert unter dem Einfluß der Übersäuerung, und die aus ihr freigelegte Cophosphatase kann sich mit noch freiem Apoferment der anderen Phosphatase verbinden. So ist eine Neubildung wirksamer Phosphatase eingetreten, dem Überangebot an Phosphorsäureestern ist durch Bereitstellung spaltenden Ferments Genüge geschehen. Nach Wiederherstellung normaler p_H-Bedingungen kann die Cofermentwanderung den rückläufigen Weg gehen, indem das natürliche Verteilungsgleichgewicht des Coferments zwischen seinen spezifischen Apofermenten nach Maßgabe von deren Menge und ihrer Affinitätsbetätigung wiederhergestellt wird. Der Zelle steht in der „unphysiologischen“ Nierenphosphatase eine Cophosphatase-Reserve zur Verfügung, die bei Bedarf durch eine geringfügige p_H-Verschiebung mobilisiert werden kann. —

Betrachten wir so die beiden vorher besprochenen Phosphatasen als Modellfall eines Zellvorkommens, so können wir in einem Gemisch von Oberhefen (OH-)- und Nieren (Ni-)-Phosphatase, welches einen Überschuß beider Apofermente enthält, die Cophosphatase zwischen den Apofermenten pendeln lassen gemäß dem folgenden Dissoziations-Schema:



Daß im besonderen Fall der Betätigung der Phosphatasen keine schädigende pathologische Übersäuerung des Zellinhalts eintritt, verhindert das leichte Entstehen jenes beschriebenen Hemmstoffes aus der Cophosphatase, welcher schon in geringer Menge jede phosphatatische Tätigkeit unterbindet und der, dialysabel und niedermolekular, nach Wiedereinstellung normaler Verhältnisse mit dem Säftekreislauf des Körpers weggeschafft werden kann. In verschiedenen Zellen ist ein solcher Phosphatase-Hemmstoff³⁶) gefunden worden: in der Niere⁹)¹⁰), im Grauhirn³⁷), in den Hefezellen¹⁶). Es wurde

³⁵) vergl. J. Spek, *Ergebn. Enzymforsch.* **6**, 1 [1937].

³⁶) Noch unklar ist sein Zusammenhang mit einem von Bamann u. Salzer beschriebenen Antihemmstoff (*Biochem. Ztschr.* **287**, 380 [1936]).

³⁷) H. Kraut u. F. Borkowsky, *Ztschr. physiol. Chem.* **220**, 192 [1933].

auch bereits erwähnt, daß er aus den verschiedensten Phosphatasen in gleicher Weise bei Übersäuerung ihrer Lösungen entsteht. Bemerkenswert ist, daß im Dünndarm, dessen alkalisches Milieu eine Übersäuerung nicht zuläßt, und in dessen verdauender Tätigkeit auch keine Notwendigkeit zur Sistierung des Phosphatstoffwechsels aufzutreten braucht, kein Hemmstoff vorhanden ist¹⁰⁾.

Wenn man nach dem Vorgebrachten eine besondere Aufgabe der „unphysiologischen“ Phosphatasen darin sieht, daß sie eine Cofermentreserve für wirkungsgleiche, im physiologischen p_H -Bereich arbeitende Fermente darstellen, darf man noch nicht annehmen, daß alle wirkungsgleichen Fermentsysteme einer Zelle durch eine Verschiebung der Wasserstoffionen-Konzentration „abgestimmt“ werden in der Wirkungsregulierung ihrer Komponenten. Hier sollte nur ein neuartiger Regulierungsmechanismus aufgezeigt werden, der für viele Fermentsysteme gelten mag, dessen weitere Möglichkeiten aber noch zu prüfen sind, und der andere, auch gleichzeitige Regulierungsmechanismen nicht ausschließt.

VIII) Methodik.

Herstellung der Fermente: Die Nierenphosphatase wird nach H. u. E. Albers¹⁰⁾ hergestellt, die verwendeten Präparate enthalten 30—50 PE/mg.

Die Oberhefenphosphatase wird aus Preßhefe durch Freilegung mit Amylase (aus Trockengrünmalz) hergestellt¹⁴⁾. Sie enthält etwa 1 PE pro mg Trockengewicht.

Die Bestimmung der Fermentaktivität erfolgt nach der für die Bestimmung der Phosphatase-Einheit (PE) gegebenen Normalvorschrift von H. u. E. Albers⁹⁾. Die p_H -Werte werden elektrometrisch gemessen, Genauigkeit ± 0.015 .

Die Trübungsstärken werden mit Hilfe des Pulfrichschen Stufenphotometers (C. Zeiss-Jena) gemessen, sie werden in relativen Einheiten als Grade der Skaleneinteilung des Photometers angegeben.

Die Stabilitätsversuche sind in ihrer Ausführung aus den bei den Kurven angegebenen Erläuterungen ersichtlich. Die Einzelwerte der jeweiligen Inaktivierungen sind stets vollständigen Versuchskurven entnommen, aus denen die 5- bzw. die 10-Minutenwerte graphisch ermittelt werden. Die Fermentkonzentration der für die 35°-Stabilitäts- p_H -Kurve verwendeten Lösungen beträgt etwa 50 PE im ccm. Das p_H wird mit n_{100} -Salzsäure eingestellt und vor und nach der Inkubation gemessen; der Mittelwert ist in die Kurven eingezeichnet. (Meist bleibt der p_H -Wert konstant.) — Die Fermentkonzentration der bei Zimmertemperatur auf ihre Stabilität geprüften Lösungen beträgt 100 PE/ccm (Kurve I) und 200 PE/ccm (Kurve II). Die p_H -Werte werden mit Veronal-Acetat-Puffer nach Michaelis (Kurve I) oder mit Acetat-Puffer und Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer (Kurve II) eingestellt und elektrometrisch bestimmt.

Die Aktivierungsversuche werden mit durch vorsichtige Dialyse aus hochgereinigten Fermenten gewonnenen Apofermentpräparaten und mit Kochsäften durchgeführt, die aus denselben hochgereinigten Fermentpräparaten durch 5 Min. langes Erhitzen ihrer gepufferten Lösungen im siedenden Wasserbad gewonnen werden. Die Kochsäfte allein sind in allen Fällen völlig inaktiv. Die Darstellung der für die Kurven der Abbild. 3 verwendeten gereinigten Cofermentpräparate sowie die Abtrennung des Hemmstoffes wird später beschrieben.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die Untersuchungen durch Beihilfen unterstützt. Wir sind ihr dafür zu besonderem Dank verpflichtet.