

220. Eugen Bamann und Josef Riehl: Konstitutionelle Voraussetzung für die Spaltbarkeit von Phosphorsäureestern. II. Mitteil.¹⁾ zur Spezifität der Phosphatase

[Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München]
(Eingegangen am 15. Juni 1955)

Die konstitutionelle Voraussetzung für die Spaltbarkeit von Phosphorsäureestern durch die „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen ist das Vorhandensein einer sauren Funktion im Phosphorsäurerest des Esters.

Am Beispiel zahlreicher Tri-ester der Phosphorsäure und unter Heranziehung der „sauren“ und „alkalischen“ Phosphatasen tierischer und pflanzlicher Herkunft wird gezeigt, daß die Tri-ester unspaltbar sind, und zwar auf Grund mangelnder Affinität zu den Katalysatoren.

Unsere eingehenden Versuche über eine enzymatische Hydrolysierbarkeit von Tri-estern der Phosphorsäure erweisen die Unspaltbarkeit dieser Ester. Diese Aussage gilt für alle geprüften Phosphatasen, nämlich für die tierischen Phosphatasen der Schweineleber, Rinderleber, Schweineniere und Kaninchenknochen sowie die pflanzlichen Phosphatasen der Kartoffeln, Karotten, Spinatblätter und des *Aspergillus oryzae*. Als Substrate dienen Tri-methyl-, Tri-äthyl-, Tri-*n*-propyl-, Tri-isopropyl-, Tri-*n*-butyl-, Tri-isoamyl-, Tri-phenyl-, Tri-*o*-kresyl- und Tri- β -naphthyl-phosphorsäure-ester. Damit werden erste Angaben in den Arbeiten von C. Neuberg und K. P. Jacobsohn²⁾, C. Neuberg und J. Wagner³⁾ und F. v. Falkenhausen⁴⁾ auf eine breite und sichere Grundlage gestellt.

Vergleicht man die Wirksamkeit von Phosphatasen gegenüber Mono-, Di- und Tri-estern der Phosphorsäure miteinander, so ergibt sich: Mono-ester sind nach unseren Erfahrungen durch Phosphatasen leichter spaltbar als die Di-ester¹⁾. Die üblichen Tri-ester finden wir katalytisch unbeeinflussbar, d. h. unspaltbar. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten liegt in der abnehmenden Tendenz zur Bildung des Reaktionszwischenproduktes vom Mono-ester zum Di-ester bzw. in der Unmöglichkeit dazu bei den Tri-estern.

Die Ergebnisse mit unseren Phosphatase-Modellen (Cer-, Lanthan- und andere Metall-Ionen) gehen diesen Befunden genau parallel^{5, 6)}. Den Vorgang der Phosphorsäureester-Hydrolyse durch Phosphatase-Modelle erklären wir^{7, 5)} entsprechend dem Reaktionsmechanismus von S. C. Datta, J. N. E. Day und C. K. Ingold⁸⁾ oder demjenigen von Th. M. Lowry⁹⁾. Die Reaktionszwischenverbindung ist ein aus Metallhydroxyd und Substrat hauptvalenzmäßig sich bildendes undissoziiertes Salz, das dann in die Hydrolyseprodukte zerfällt.

¹⁾ I. Mitteil.: E. Bamann u. J. Riehl, Biochem. Z. **327**, 136 [1955].

²⁾ Biochem. Z. **199**, 498 [1928]. ³⁾ Biochem. Z. **171**, 485 [1926].

⁴⁾ Biochem. Z. **253**, 152 [1932]. ⁵⁾ E. Bamann, Dtsch. Apotheker-Ztg. **94**, 528 [1954].

⁶⁾ E. Bamann, J. Riehl u. R. Nicolai, noch unveröffentlicht.

⁷⁾ E. Bamann u. E. Nowotny, Chem. Ber. **81**, 463 [1948]; E. Bamann u. E. Ullmann, Chemiker-Ztg. **76**, 6, 44 [1952].

⁸⁾ J. chem. Soc. [London] **1939**, 838. ⁹⁾ J. chem. Soc. [London] **1925**, 1379.

Der wesentliche Unterschied von Mono-, Di- und Tri-estern der Phosphorsäure liegt in ihrem verschiedenen Basenbindungsvermögen. Dementsprechend verhält sich die Affinität der Substrate zum Enzym und folglich die Reaktionsmöglichkeit. Daher findet bei den zweibasischen Mono-estern eine weitgehende Bindung des Substrates an das Enzym statt, während die einbasischen Di-ester eine geringere Affinität zum Enzym aufweisen und so bei dem in den Spaltungsversuchen üblichen Substratkonzentrations-Bereich auch einen geringeren Umsatz ergeben als die entsprechenden Mono-ester. Die neutralen Tri-ester haben keine Affinität mehr und werden infolgedessen auch nicht gespalten. Man darf deshalb auch bei der enzymatischen Verseifung von Phosphorsäureestern eine Hauptvalenzkatalyse annehmen, die nach ähnlichen Gesichtspunkten vor sich geht, wie sie an Phosphatase-Modellen aufgezeigt wurden^{7, 5)}.

Diese Aussage gilt für Tri-ester solcher Alkohole und Phenole, die keine polaren Gruppen tragen. In neueren Arbeiten konnten Di-phenyl-mono-*p*-nitrophenyl-phosphorsäure¹⁰⁾ und Di-methyl-mono-cholinyl-phosphorsäure-ester¹¹⁾ durch Enzyme hydrolysiert werden. Einige Autoren nehmen für diese Katalyse eigene Enzyme bzw. besondere Enzymsysteme¹²⁾ an. Ob dies notwendig ist oder ob das Vorhandensein bestimmter polarer Gruppen im Alkoholrest von Tri-estern gewissen Phosphatasen und Phosphatase-Modellen Anlage und Wirksamwerden gestattet, wäre noch zu entscheiden¹³⁾.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft verdanken wir apparative Hilfe.

Beschreibung der Versuche¹⁴⁾

I. Nachweis der Unspaltbarkeit

Unspaltbarkeit im Bereich p_{H} 3 bis 10 in Stunden und Tagen ergab sich nicht nur, wenn die in Wasser sehr schwer löslichen Tri-ester in den Ansätzen durch Schütteln im Thermostaten suspendiert waren, sondern auch dann, wenn man die Tri-ester in Toluol löste und den Versuchsansatz unter Schütteln im Thermostaten hielt. Hierbei hätte man eine etwaige Spaltung der Tri-ester auffinden müssen, da sich im inhomogenen Medium die enzymatische Hydrolyse an den Grenzflächen vollzieht.

II. Fehlende Affinität in Konkurrenzversuchen

Der Vergleich der Spaltung von Glycerin- β -phosphorsäure ohne und mit Tri-methyl-, Tri-äthyl-, Tri-*n*-butyl- und Tri-phenyl-phosphorsäure-ester, von Mono-äthyl-phosphorsäure- ohne und mit Tri-äthyl-phosphorsäure-ester, von Mono-phenyl- und Di-phenyl-phosphorsäure- ohne und mit Tri-phenyl-phosphorsäure-ester durch „saure“ und „alkalische“ Phosphatasen aus Schweine- und Rinderleber sowie Kartoffel- und Takaphosphatase bei

¹⁰⁾ L. Acker, W. Diemair u. R. Jäger, *Biochem. Z.* **322**, 471 [1952].

¹¹⁾ W. N. Aldridge, *Biochem. J.* **53**, 110, 117 [1953].

¹²⁾ Vergl. z. B.: J. J. O'Neill, T. Wagner-Jauregg, Y. Snider, C. Castle u. M. Stolberg, *Federation Proc.* **14**, Nr. 1 [1955]; T. Wagner-Jauregg u. B. E. Hackley, jr., *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 2125 [1953]; T. Wagner-Jauregg, B. E. Hackley, jr., T. A. Lies, O. O. Owens u. R. Proper, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 922 [1955]. — Nach einer privaten Mitteilung des Hrn. Prof. Dr. K. Myrbäck, Stockholm, wird dieses Problem gegenwärtig auch in seinem Institut bearbeitet.

¹³⁾ Diese Untersuchungen sind im Gange.

¹⁴⁾ Ausführliche Angaben zur Versuchsmethodik und zum Enzymmaterial sowie tabellarische Zusammenstellung der Versuchsergebnisse siehe bei: J. Riehl, *Dissertat. Univ. München* 1954.

wechselnder Tri-ester-Konzentration zeigt, daß Tri-ester keinen Einfluß auf die Mono-ester-Hydrolyse, folglich keine Affinität zu den Phosphatasen haben.

Die wasserlöslichen Phosphorsäure-tri-ester des Methanols und Äthanols fallen in höherer Konzentration Erweiß, wodurch das Enzym teilweise inaktiviert und so eine Hemmung der Mono-ester-Hydrolyse vorgetäuscht wird.

III. Substrate und Enzymmaterial

1. Substrate: Tri-methyl-phosphorsäure-ester als $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$ (140.0) und Tri-äthyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$ (182.2), dargestellt nach einem Patent¹⁵. – Tri-*n*-propyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3\text{PO}$ (224.3) und Tri-iso-propyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_3\text{H}_7\text{O})_3\text{PO}$ (224.3) und Tri-*n*-butyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_4\text{H}_9\text{O})_3\text{PO}$ (266.3) und Tri-isoamyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O})_3\text{PO}$ (308.4), dargestellt nach einem Patent¹⁶. – Tri-phenyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$ (326.3) und Tri-*o*-kresyl-phosphorsäure-ester als $(\text{CH}_3\cdot\text{C}_6\text{H}_4\text{O})_3\text{PO}$ (368.2) und Tri- β -naphthyl-phosphorsäure-ester als $(\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O})_3\text{PO}$ (482.2), dargestellt nach einem Patent¹⁷.

Die verwendeten Substrate waren praktisch frei von anorganischem Phosphat.

2. Enzymmaterial: Als Enzymlösungen, enthaltend „saure“ bzw. „alkalische“ Phosphatase, dienten Autolysate aus Schweineleber, Rinderleber und Schweineiere nach E. Bamann und E. Riedel¹⁸), Zubereitungen aus Kaninchenknochen nach M. Martland und R. Robison¹⁹), Preßsäfte aus Kartoffeln, Karotten, Spinatblättern und Auszüge aus „Luizym“, Luitpold-Werk, München. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach den Angaben unserer I. Mitteilung¹).

221. Rudolf Tschesche und Günther Snatzke: Über pflanzliche Herzgifte, XXIX. Mittel.: Zur Konstitution des Ouabagenins¹)

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 15. Juni 1955)

Ouabagenin bildet leicht ein 1.5.19-Orthoformiat, in dem 2 freie Oxygruppen noch acetyliert und zum Keton oxydiert werden können. Die Reduktion des Diketons mit Natriumborhydrid liefert ein neues Diol, das nur ein Monoacetat ergibt. Es wird dargelegt, daß Ouabagenin sehr wahrscheinlich eine 11-Oxy-Verbindung ist und daß alle seine Hydroxyle außer dem an C¹¹ β -Konfiguration haben müssen. Für die Bildung des β -Ouabagenin-diacetates aus Aceton-ouabagenin über Diacetyl-aceton-ouabagenin wird angenommen, daß eine Umlagerung auf der Stufe vom Aceton-ouabagenin zu seinem Diacetyl-Derivat erfolgt.

Ouabagenin, mit seinen 6 Oxygruppen das sauerstoffreichste der bisher bekannten Cardenolide, ist zuerst durch das bequeme Hydrolysenverfahren von C. Mannich und G. Siewert²) zugänglich geworden. Diese Autoren

¹⁵) Dtsch. Reichs-Pat. Nr. 517 538 Kl. 120 v. 1. 7. 1927; I.G. Farbenindustrie A.-G., Frankfurt a. M.; C. 1931 I, 3057. – Dieser Ester wurde uns außerdem liebenswürdigweise vom Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren herzlichen Dank aussprechen.

¹⁶) Dtsch. Reichs-Pat. Nr. 564 321 Kl. 120 v. 17. 11. 1932; I.G. Farbenindustrie A.-G., Frankfurt a. M.; C. 1933 I, 2172.

¹⁷) Amer. Pat. 1856 862 Serie 396 015 v. 3. 5. 1932, Dow Chemical Company; C. 1932 II, 924. ¹⁸) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 229, 125 [1934].

¹⁹) Biochem. J. 23, 237 [1929].

¹) XXVIII. Mittel.: R. Tschesche, M.-E. Rühnen u. G. Snatzke, Chem. Ber. 88, 686 [1955]. ²) Ber. dtsh. chem. Ges. 75, 737 [1942].