

91. Der Einfluss der Nebennierenrinde auf die Glykogenphosphorylierung im Muskel.

III. Mitteilung¹⁾²⁾.

Über die Kinetik der Phosphorolyse mit Muskelbrei normaler und adrenaletomierter Tiere

von C. Montigel.

(27. III. 43.)

In einer Reihe von Untersuchungen wurde von *Verzár* und *Montigel*¹⁻⁶⁾ über die Phosphorolyse des Glykogens in vitro durch Muskelbrei berichtet. Dabei konnte bisher gezeigt werden, dass die Veresterung des Glykogens mit anorganischem Phosphat beim Ausfall der Nebennierenrinde im Sinne einer Verzögerung ihres Ablaufs gestört ist⁷⁾. Weiter fanden wir, dass Desoxy-corticosteron und in grösserer Konzentration Desoxy-corticosteron-acetat in vitro den Prozess reaktivieren. Die hierfür nötigen kleinsten Dosen entsprechen grössenordnungsmässig den im Lebenserhaltungstest ermittelten. Auf diese Tatsache glaubten wir die Vermutung stützen zu dürfen, dass die erwähnten Cortinsubstanzen bei der Phosphorylierung des Glykogens die Funktion von Co-Fermenten ausüben könnten.

1939 hat *Kiessling*⁸⁾ über die Isolierung der Fermentproteinfraktion C aus Hefe und Muskel berichtet, welche die Reaktion

Glykogen + anorganisches Phosphat \rightleftharpoons Hexose-monophosphorsäure (*Cori*-Ester)

reversibel katalysiert. Dasselbe Ferment wurde von *Cori*⁹⁾ auch aus der Leber isoliert und neuerdings krystallisiert erhalten¹⁰⁾. Im isolierten System wird bei dieser Reaktion ein Gleichgewicht zwischen *Cori*-Ester und anorganischem Phosphat eingestellt. Die Einstellung erfolgt als Reaktion erster Ordnung. Die Konzentration des Glykogens, welches sich in kolloidaler Lösung befindet, lässt dabei die Reaktionsgeschwindigkeit weitgehend unbeeinflusst⁹⁾¹⁰⁾.

¹⁾ I. Mitteilung: *Helv.* **25**, 9 (1942).

²⁾ II. Mitteilung: *Helv.* **25**, 22 (1942).

³⁾ *Schweiz. Med. Wschr.* **71**, 101 (1941).

⁴⁾ *Verh. Schweiz. Physiol.* Januar 1942.

⁵⁾ *Nature* **149**, 49 (1942).

⁶⁾ *Helv. physiol. pharmacol. acta* **1** (im Druck) (1943).

⁷⁾ Von *Schumann* war vorher die Verminderung der Phosphorylierung ohne Berücksichtigung des zeitlichen Ablaufs beschrieben worden, *Pflüger's Arch.* **243**, 686 (1940).

⁸⁾ *Kiessling, W.*, *Bioch. Z.* **302**, 50 (1939).

⁹⁾ *Cori, G. T., Cori, C. F.* und *Schmidt, J.* *Biol. Chem.* **129**, 629 (1939).

¹⁰⁾ *Green, A. A., Cori, G. T.* und *Cori, C. F.*, *J. Biol. Chem.* **142**, 447 (1942).

Wir haben die Reaktion mit Muskelbrei, also nicht mit dem isolierten Ferment untersucht. In diesem System kann das soeben erwähnte Gleichgewicht nicht beobachtet werden, da die irreversible Umwandlung des *Cori*-Esters in *Robison*-Ester nicht unterbunden ist. Es ist daher auch erst seit den Versuchen am isolierten System bekannt.

Wie im Folgenden gezeigt wird, ist der Ablauf des Prozesses als Reaktion erster Ordnung auch für das nicht isolierte System nachweisbar. Aus gewissen Störungen des Reaktionsmechanismus bei nebennierenlosen Tieren und ihrer experimentellen Behebung durch Zusatz von Nebennierenrindenhormon *in vitro*, kommt man in die Lage, Schlüsse auf die Wirkungsweise dieses Stoffes zu ziehen. Die vorliegende Arbeit bezweckt daher die reaktionskinetische Verarbeitung des teilweise schon früher publizierten Versuchsmaterials zur Feststellung des Mechanismus der Phosphorylierungsreaktion bei normalen und nebennierenlosen Tieren in einem System, bei dem der Glykogenabbau durch Fluoridzusatz erst auf der Stufe der Umwandlung der 2-Phospho-glycerinsäure in Phospho-brenztraubensäure¹⁾ gehemmt ist.

Versuche.

I. Kritische Untersuchungen zur Methodik.

Die experimentellen Daten, auf welche sich die vorliegende Arbeit stützt, wurden mit dem früher publizierten Versuchsansatz, der ursprünglich von *Lohmann* und *Schumann*²⁾ benützt wurde, bei Zimmertemperatur erhalten: 0,5 g Muskelbrei (aus der Extremitätenmuskulatur von frisch getöteten Tieren mit der *Latapie*-Mühle hergestellt), 0,5 cm³ 2-proz. Natriumhydrogencarbonat, 0,5 cm³ 3,5-proz. Natriumfluorid, 1 cm³ 0,5-proz. Glykogenlösung. Dieses System hat ein p_H von 8,2.

1. Reaktionsoptimum der Reaktion.

Der Abbau des Glykogens verläuft in dem oben erwähnten System bei p_H 8,2 optimal, was aus der Kurve Fig. 1 hervorgeht. Für die Messungen bei p_H 4 wurde Citrat-Salzsäure-Puffer, bei p_H 5, 6 und 7 Citrat-Natronlauge-Puffer, bei p_H 8, 9, 10, 11 und 12 Glykoll-Natronlauge-Puffer, nach den Angaben von *Michaelis*, verwendet.

2. Verhalten des Phosphats im Muskelbrei.

Die Konzentration des Glykogens hat auf die Reaktionsgeschwindigkeit direkt keinen Einfluss. Für die Geschwindigkeit der enzymatischen Phosphorylierung ist die Konzentration des anorganischen

¹⁾ *Parnas, J. K.*, in *Nord und Weidenhagen*, Handb. d. Enzymologie **11**, 933, Springer 1940.

²⁾ *Schumann, H.*, *Pflüger's Arch.* **243**, 686 (1940).

Phosphats bestimmend. Es ist deshalb wichtig, das Verhalten dieses Phosphats im Muskelbrei auch ohne Zusatz von Glykogen zu studieren.

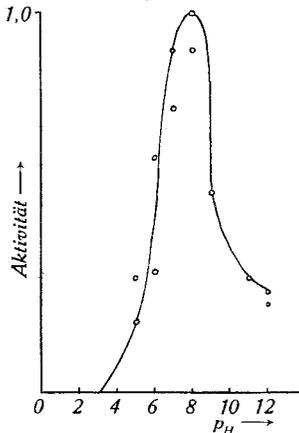


Fig. 1.

Aktivität 1,0 entspricht $v = 0,05$ c im Zeitraum von 0 bis 7 Minuten.
(c = Konzentration des anorg. Phosphats).

Der Muskel enthält, sofern er sehr rasch nach der Entnahme untersucht wird, noch eigenes Glykogen (0,5—1%), welches unter Verbrauch von anorganischem Phosphat abgebaut wird. Andererseits vergrößert sich die im Muskel vorhandene Menge des anorganischen Phosphats mit der Zeit, die verstreicht, bis der Muskel aufgearbeitet ist, da beim nicht durch Fluorid gehemmten glykolytischen Prozess stets noch anorganisches Phosphat freigesetzt wird.

Bei der Untersuchung des zeitlichen Ablaufs wird für jede Phosphatbestimmung eine eigene Probe angesetzt, aber aus technischen Gründen können nicht alle Proben zur gleichen Zeit abgewogen werden (für das Abwägen einer Probe ist eine Minimalzeit von 15—20 Sekunden kaum zu unterbieten). Dadurch wird sich der Zustand des Muskels der ersten Probe in bezug auf seinen Gehalt an anorganischem Phosphat um so mehr von dem der letzten Probe unterscheiden, je längere Zeit zwischen dem Abwägen der ersten und der letzten Probe verstrichen ist. Untersuchungen in dieser Richtung sind in der Tabelle I für normale und nebennierenlose Tiere zusammengestellt. Dabei handelt es sich nicht um denselben Muskel zu verschiedenen Zeiten, sondern um verschiedene zu den angegebenen Zeitmomenten untersuchte Versuche mit verschiedenen Muskelproben.

Die Tabelle I zeigt, dass bis zu 180 Minuten nach dem Tod der Gehalt an anorganischem Phosphat im Muskel von 2×10^{-2} Millimol P/g Muskel auf $5,67 \times 10^{-2}$ Millimol zunimmt. Bei den bis zu 60 Minuten nach dem Tod aufgestellten Proben ist in den nächsten 60 Mi-

nuten eine Abnahme des anorganischen Phosphats zu sehen, weil das vorhandene eigene Glykogen phosphoryliert wird. 120—180 Minuten nach dem Tode entnommene Proben zeigen dagegen diese Abnahme nicht mehr, weil zu diesem Zeitpunkt alles Glykogen des Muskels abgebaut ist.

Tabelle I.

(Der Versuchsansatz enthält kein zugesetztes Glykogen.)

Zeit, die verstreicht, bis die Muskelprobe dem Versuchsansatz zugesetzt ist. Tod des Tieres = Zeitpunkt 0'	Gehalt der Probe an anorganischem Phosphat in 10^{-2} Millimol P/1 g Muskelbrei			
	normale Ratten		nebenierenlose Ratten	
	sofort nach Zusatz	nach 60'	sofort nach Zusatz	nach 60'
5'	2,00	1,09		
	2,00	1,00		
10'	3,10	1,29	4,25	4,30
	2,90	1,42	4,31	4,37
	3,48	2,51	4,18	4,02
	2,52	1,54	4,21	4,26
	2,52	1,51	4,30	4,32
	2,70	2,19	2,84	2,76
20'	3,00	1,68		
	4,39	2,32		
	3,84	2,51		
30'	3,48	2,46		
	4,12	3,42	3,90	3,87
	4,12	2,77		
60'	4,08	3,97		
	4,96	3,74	5,75	5,81
	4,96	3,74	4,97	4,97
	5,21	4,93		
120'	4,69	4,52		
	5,04	4,96		
	5,35	5,35		
180'	5,61	5,59		
	5,67	5,67	5,75	5,75
	5,67	5,55	6,25	6,28

Bei nebenierenlosen Tieren (wenn sie stark adynam sind) liegen aber die Verhältnisse anders. Hier ist erstens keine Zunahme des anorganischen Phosphats des Muskels mit der Zeit zu sehen, sondern schon nach 10 Minuten ist so viel anorganisches Phosphat vorhanden, wie bei normalen Tieren nach 20—30 Minuten. Ferner ist nach Zusatz der Muskulatur zum Versuchsansatz nach 60 Minuten nirgends eine wesentliche Phosphatabnahme vorhanden. Wir haben gezeigt,

dass auch der Muskel der nebennierenlosen Tiere noch etwa 0,4 % Glykogen enthält¹⁾²⁾. Der Befund, dass während 60 Minuten keine Phosphatabnahme gefunden wird, kann also im wesentlichen nicht als Folge von Glykogenmangel, sondern hauptsächlich als Folge der verminderten Phosphorylierung erklärt werden. Dadurch wird dieser Befund ein neuer Beweis für die veränderte Phosphorylierung bei adrenalektomierten Tieren.

3. Änderung der Aktivität des Ferments.

Für unsere Versuche war es wichtig, dass die Anfangskonzentrationen des anorganischen Phosphats der einzelnen Proben nicht stark differierten. Das konnte durch rasches Arbeiten weitgehend realisiert werden; dabei ist es natürlich gleichgültig, ob vom Zeitpunkt des Todes des Tieres an, innerhalb vernünftiger Grenzen, mehr oder weniger Zeit verstreicht. Es ist allerdings zu beachten, dass mit der Zeit auch die Aktivität des Ferments geringer wird. Immerhin ist sie auch nach zwei Stunden noch nicht um einen wesentlichen Betrag gesunken, so dass bei 60 Minuten-Versuchen, auch wenn man erst 30 Minuten nach dem Tode des Tieres beginnen würde, noch mit der vollen Aktivität des Ferments gerechnet werden kann, bis der Versuch zu Ende ist. Man vergleiche hierzu die Fig. 2. Als Mass für die Aktivität wurde die Geschwindigkeit der Reaktion (v) im Mittel der ersten sieben Minuten verwendet.

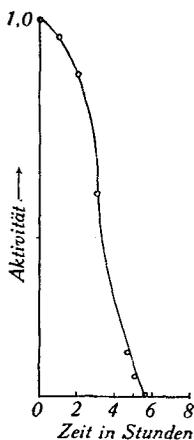


Fig. 2.

Aktivität 1,0 entspricht $v = 0,05$ c im Zeitraum von 0 bis 7 Minuten.

(c = Konzentration des anorg. Phosphats).

Nach dieser Kritik der Methode kann nun zur Auswertung der gewonnenen Resultate geschritten werden. Ich gehe hierbei so vor, dass auf Grund der experimentellen Befunde die Reaktionsgleichung abgeleitet und dann mit einer der bekannten kinetischen Gleichungen in Beziehung gesetzt wird.

II. Ableitung der Reaktionsgleichung für die Phosphorylierung mit normalen Muskeln.

Der Charakter einer chemischen Reaktion wird bekanntlich aus der Geschwindigkeit ihres Ablaufs, der Abhängigkeit dieser Geschwindigkeit von der Konzentration der verschiedenen im Spiele stehen-

¹⁾ Verzár, F., Bucher, R., Somogyi, J. C. und Wirz, H., Helv. Med. Acta 7, Suppl. VI, 67 (1941).

²⁾ Montigel, C. und Verzár, F., Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 1 (1943); im Druck.

den Reaktionspartner, sowie bei Fermentreaktionen, der Konzentration des Enzyms, sofern diese nicht konstant ist, bestimmt.

Wie eingangs auseinandergesetzt wurde¹⁾²⁾, spielt von den in Reaktion tretenden Substanzen das Glykogen kinetisch insofern keine Rolle, als die Reaktion von seiner Konzentration weitgehend unabhängig ist. Die Konzentration des Enzyms, der Phosphorylase, kann in dem von uns benutzten Versuchsansatz, wobei ja nicht mit dem isolierten Ferment gearbeitet wird, nicht absolut bestimmt werden. Ihre Menge kann aber in einer bestimmten Muskelquantität eines bestimmten Tiers als konstant angenommen werden. Es bleibt also für die Ableitung einer Gleichung nur noch die Konzentration des anorganischen Phosphats als variable Grösse übrig.

Die Grösse dieser Konzentration in 10^{-2} Millimol Phosphor/g Muskel ist in Tabelle II für 40 verschiedene Versuche an Ratten, Katzen und Hunden, zu verschiedenen Zeiten während der Dauer des Versuchs angegeben.

In Tabelle III sind die Geschwindigkeiten der Reaktion, d. h. die Geschwindigkeiten der Abnahme des anorganischen Phosphats für die in Tabelle II angeführten Versuche zusammengestellt. In der Tabelle sind alle bestimmten Werte angeführt. Aus diesen lassen sich nur mittlere Geschwindigkeiten von minimal 7 Minuten bestimmen.

In der Tabelle IV sind aus Tabelle II sämtliche Konzentrationen für jede Periode in aufsteigender Reihenfolge geordnet, wobei keine Rücksicht auf die zusammengehörigen Werte der einzelnen Versuche genommen wurde. Neben jede Konzentration (Spalte I) wurde in Spalte II die dazugehörige Geschwindigkeit aus Tabelle III eingetragen.

Durch Vergleich der Geschwindigkeiten mit den dazugehörigen Konzentrationen gewinnt man einen Einblick in die Art der Abhängigkeit dieser beiden Grössen voneinander.

Hieraus lässt sich der Ansatz gewinnen:

$$v = k c \quad (1)$$

wobei v = Geschwindigkeit der Reaktion, c = Konzentration des Substrats, k = Konstante.

Aus dieser Beziehung erhält man, wenn man v durch das Differential $-dc/dt$ ersetzt, durch Integration den Ausdruck:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c_t} \quad (2)$$

wo c_0 die Anfangskonzentration, c_t die Konzentration des Substrats zum Zeitpunkt t bezeichnet. Er stellt die bekannte Gleichung für Reaktionen erster Ordnung dar. Für enzymatische Reaktionen wurde dieses Gesetz erstmals von *Wilhelmy* (1850)³⁾ für die Rohrzuckerinversion erfüllt gefunden, wobei er die folgende Form anwandte:

$$k_1 n_e = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c_t} \quad (3)$$

Hier erscheint die Enzymkonzentration n_e als Komponente der Konstanten der Gleichung (2). Für Reaktionen, bei denen man nicht mit dem isolierten Ferment arbeitet und seine Konzentration nicht direkt angeben kann, ist es nicht möglich, die Konstante der Gleichung (2) in den Ausdruck der Gleichung (3) aufzulösen.

¹⁾ *Cori G. T., Cori C. F. und Schmidt, J. Biol. Chem.* **129**, 629 (1939).

²⁾ *Kiessling, W., Bioch. Z.* **302**, 50 (1939).

³⁾ *Wilhelmy* (vgl. *Nord und Weidenhagen, Handb. d. Enzymol.* **1**, 225ff., Springer (1940)).

Tabelle II.
Normale Tiere.

Tier Nr.	Gewicht g	Muskel- art	Tem- pera- tur °C.	Konzentration des anorganischen Phosphats in 10 ⁻² Millimol Phos- phor im Ansatz von 1 g Muskel im Zeitpunkt von:				
				0'	7'	15'	30'	60'
K 1054 ♂	3 100	H	20	1,29	0,84	—	0,78	0,58
H 13 ♀	5 650	E	18	1,74	1,48	1,32	0,90	0,84
R 58 ♀	207	E	20	1,77	1,29	0,97	0,90	0,81
R 59 ♀	260	E	20	1,77	1,48	1,29	0,97	0,97
R 56 ♀	210	E	20	1,94	1,35	1,23	0,91	0,91
R 57 ♀	200	E	20	2,00	1,35	1,10	0,84	0,84
H 13 ♀	5 650	E	18	2,19	1,81	1,16	0,97	0,97
R 60 ♂	130	E	20	2,22	1,68	1,48	1,13	1,13
R 55 ♀	100	E	20	2,39	2,22	1,45	1,10	
K 1054 ♂	3 100	Osch	20	2,52	1,61	1,29	1,03	0,78
		Bm	20	2,52	1,61	1,35	1,03	0,78
H 8 ♂	9 900	E	16	2,55	1,74	1,29	1,10	0,97
				2,58	1,74	1,29	1,10	0,97
R 91 ♀	114	E	20	2,64	2,52	1,68	1,36	1,10
K 1054 ♂	3 100	Usch	20	2,64	1,61	1,29	1,26	0,84
K 1079 ♂	3 700	E	25	2,71	1,81		1,29	1,16
H M ♀	15 500	E	23	2,74	2,39	1,94	1,55	1,29
R 90 ♀	210	E	20	2,77	1,87	1,29	0,97	0,97
K 1079 ♂	3 700	E	20	2,77	1,94	1,61	1,29	1,10
				2,77	1,68	1,42	1,23	1,16
R 165 ♂	200	E	20	2,78	1,81	1,55	1,42	0,84
K 1079 ♂	3 700	E	20	2,84	1,68	1,35	1,26	1,23
R 92 ♀	234	E	20	2,96	2,71	1,68	1,36	1,03
R 93 ♂	200	E	20	2,96	1,93	1,48	1,36	1,36
R 157 ♂	112	E	24	2,97	2,45	1,87	1,62	1,19
R 158 ♀	120	E	24	3,00	2,45	2,13	1,29	1,10
R 166 ♀	230	E	20	3,03	2,52	2,13	1,42	1,03
R 39 ♂	110	E	20	3,19	2,52	1,90	1,48	1,48
R 165 ♂	200	E	20	3,42	2,58	2,06	1,42	0,90
R 195 ♀	170	E	20	3,42	2,45	1,42	0,84	0,65
R 61 ♂	130	E	20	3,62	2,52	2,19	1,93	1,93
R 48 ♂	90	E	19	3,65	2,54	2,38	2,00	
R 62 ♂	130	E	20	3,80	3,29	2,90	2,13	2,06
R 167 ♀	190	E	20	3,81	3,03	2,32	1,55	1,16
R 188 ♀	160	E	20	3,87	2,51	1,94	1,87	1,16
R 193 ♀	160	E	21	3,87	2,64	1,42	0,84	0,45
R 192 ♀	165	E	20	4,00	2,39	1,29	0,97	0,39
R 194 ♂	178	E	20	4,20	2,71	1,35	1,03	0,58
R 189 ♀	165	E	20	4,25	2,90	2,13	1,29	0,45
R 185 ♂	160	E	21	4,33	2,13	2,00	1,42	0,84
R 186 ♀	178	E	21	4,51	2,71	2,20	1,48	0,84
R 187 ♂	174	E	21	4,51	3,10	3,10	2,52	1,62

Anmerkung. In der Tabelle bedeuten:

Spalte 1 K = Katze
H = Hund
R = Ratte

Spalte 3 H = Herzmuskel
E = Extremitäten
Osch = Oberschenkel

Usch = Unterschenkel
Bm = Bauchmuskel

Tabelle III.

Tier Nr.	Mittlere Geschwindigkeit der Reaktion in 10 ⁻² Millimol P/Min. im Zeitraum von:			
	0—7'	7—15'	15—30'	30—60'
K 1054 ♂	0,065	—	—	0,006
H 13 ♀	0,037	0,020	0,028	0,004
R 58 ♀	0,069	0,046	0,004	0,003
R 59 ♀	0,041	0,024	0,021	0,0
R 56 ♀	0,084	0,015	0,021	0,0
R 57 ♀	0,093	0,031	0,016	0,0
H 13 ♀	0,054	0,081	0,012	0,0
R 60 ♂	0,077	0,025	0,023	0,0
R 55 ♀	0,017	0,077	0,035	—
K 1054 ♂	0,130	0,040	0,016	0,008
	0,130	0,032	0,021	0,008
H 8 ♂	0,115	0,056	0,012	0,004
	0,120	0,056	0,012	0,004
R 91 ♀	0,017	0,105	0,021	0,008
K 1054 ♂	0,147	0,040	0,002	0,014
K 1079 ♂	0,130	—	—	0,004
H M ♀	0,050	0,056	0,026	0,008
R 90 ♀	0,130	0,072	0,021	0,0
K 1079 ♂	0,120	0,040	0,021	0,006
	0,155	0,032	0,012	0,002
R 165 ♂	0,140	0,032	0,008	0,019
K 1079 ♂	0,123	0,040	0,006	0,001
R 92 ♀	0,036	0,130	0,021	0,001
R 93 ♂	0,147	0,056	0,008	0,0
R 157 ♂	0,074	0,072	0,017	0,011
R 158 ♀	0,078	0,040	0,056	0,006
R 166 ♀	0,073	0,048	0,047	0,013
R 39 ♂	0,095	0,077	0,028	0,0
R 165 ♂	0,120	0,065	0,042	0,017
R 195 ♀	0,140	0,130	0,038	0,006
R 61 ♂	0,157	0,041	0,016	0,0
R 48 ♂	0,222	0,016	0,012	—
R 62 ♂	0,073	0,048	0,051	0,002
R 167 ♀	0,110	0,090	0,051	0,013
R 188 ♀	0,194	0,071	0,004	0,023
R 193 ♀	0,175	0,152	0,038	0,013
R 192 ♀	0,230	0,137	0,021	0,019
R 194 ♂	0,213	0,170	0,021	0,015
R 189 ♀	0,193	0,096	0,056	0,028
R 185 ♂	0,314	0,016	0,038	0,019
R 186 ♀	0,257	0,063	0,048	0,021
R 187 ♂	0,201	0,0	0,038	0,030

H = Hund, K = Katze, R = Ratte.

Tabelle IV.

Spalten I: Konzentration des anorg. P in 10^{-2} Millimol P/g Muskel
 Spalten II: Geschwindigkeit der Reaktion in 10^{-2} Millimol P/Min. im Mittel des genannten Zeitraums.

I 0'	II 0—7'	I 7'	II 7—15'	I 15'	II 15—30'	I 30'	II 30—60'
1,29	0,065	0,84	—	0,97	0,004	0,78	0,006
				1,10	0,016	0,84	0,0
1,74	0,037	1,29	0,046	1,16	0,012	0,84	0,006
1,77	0,069	1,35	0,015	1,23	0,021	0,84	0,013
1,77	0,041	1,35	0,031			0,90	0,004
1,94	0,084	1,48	0,020	1,29	0,021	0,90	0,003
		1,48	0,024				
2,00	0,093	1,61	0,040	1,29	0,016	0,91	0,0
2,19	0,054	1,61	0,032	1,29	0,012	0,97	0,0
2,22	0,077	1,61	0,040	1,29	0,012	0,97	0,0
		1,68	0,032	1,29	0,002	0,97	0,0
2,39	0,017	1,68	0,040	1,29	0,021	0,97	0,019
2,52	0,130	1,68	0,025	1,29	0,021		
2,52	0,130	1,74	0,056	1,32	0,028	1,03	0,008
2,55	0,115	1,74	0,056	1,35	0,021	1,03	0,004
2,58	0,120	1,81	0,081	1,35	0,006	1,03	0,015
2,64	0,017	1,81	—	1,35	0,021		
2,64	0,147	1,81	0,032			1,10	—
		1,87	0,072	1,42	0,012	1,10	0,004
2,71	0,130			1,42	0,038	1,10	0,008
2,74	0,050	1,93	0,056	1,42	0,038	1,13	0,0
2,77	0,130	1,94	0,040	1,45	0,035		
2,77	0,120			1,48	0,023	1,23	0,002
2,77	0,155	2,13	0,016	1,48	0,008	1,26	0,014
2,78	0,140	2,22	0,077	1,55	0,008	1,26	0,001
		2,39	0,056			1,29	0,004
2,84	0,123	2,39	0,137	1,61	0,021	1,29	0,006
2,96	0,036	2,45	0,072	1,68	0,021	1,29	0,006
2,96	0,147	2,45	0,040	1,68	0,021	1,29	0,028
2,97	0,074	2,45	0,130				
3,00	0,078	2,51	0,071	1,87	0,017	1,36	0,001
3,03	0,073	2,52	0,105	1,90	0,028	1,36	0,0
		2,52	0,048	1,94	0,026	1,36	0,008
3,19	0,095	2,52	0,077	1,94	0,004		
3,42	0,120	2,52	0,041	2,00	0,038	1,42	0,019
3,42	0,140	2,54	0,016			1,42	0,006
		2,58	0,032	2,06	0,042	1,42	0,017
3,62	0,157			2,13	0,056	1,42	0,019
3,65	0,222	2,64	0,152	2,13	0,047	1,48	0,0
3,80	0,073	2,71	0,130	2,13	0,056	1,48	0,021
3,81	0,110	2,71	0,170	2,19	0,016		
		2,71	0,063	2,20	0,048	1,55	0,008
3,87	0,194					1,55	0,013
3,87	0,175	2,90	0,096	2,32	0,051		
4,00	0,230	3,03	0,090	2,38	0,012	1,62	0,011
4,20	0,213	3,10	0,0			1,87	0,023
4,25	0,193	3,29	0,048	2,90	0,051	1,93	0,0
4,33	0,314			3,10	0,038	2,00	—
						2,13	0,002
4,51	0,257						
4,51	0,201					2,52	0,030

Aus Tabelle IV folgt, dass im allgemeinen die Geschwindigkeiten im Zeitraum von 0—7 Minuten, längstens bis 15 Minuten, der zugehörigen Konzentration des anorganischen Phosphats direkt proportional sind und dass diese Proportionalität später verloren geht. Die Geschwindigkeit beträgt ca. 1/20 der Konzentration des anorganischen Phosphats.

Tabelle V.

Tier Nr.	Konstanten k im Zeitraum von		Tier Nr.	Konstanten k im Zeitraum von	
	0—7'	7—15'		0—7'	7—15'
K 1054 ♂	0,0595	—	R 92 ♀	0,0126	0,0597
H 13 ♀	0,0230	0,0142	R 93 ♂	0,0610	0,0331
R 58 ♀	0,0451	0,0356	R 157 ♂	0,0274	0,0337
R 59 ♀	0,0255	0,0171	R 158 ♀	0,0286	0,0174
R 56 ♀	0,0517	0,0116	R 166 ♀	0,0263	0,0209
R 57 ♀	0,0528	0,0256	R 39 ♂	0,0336	0,0352
H 13 ♀	0,0272	0,0555	R 165 ♂	0,0402	0,0281
R 60 ♂	0,0397	0,0158	R 195 ♀	0,0476	0,0681
R 55 ♀	0,0105	0,0531	R 61 ♂	0,0517	0,0175
K 1054 ♂	0,0639	0,0276	R 48 ♂	0,0517	0,0081
	0,0639	0,0219	R 62 ♂	0,0250	0,0157
H 8 ♂	0,0545	0,0373	R 167 ♀	0,0327	0,0333
	0,0562	0,0373	R 188 ♀	0,0617	0,0321
R 91 ♀	0,0066	0,0506	R 193 ♀	0,0545	0,0774
K 1054 ♂	0,0705	0,0276	R 192 ♀	0,0736	0,0757
K 1079 ♂	0,0576	—	R 194 ♂	0,0625	0,0870
H M ♀	0,0194	0,0260	R 189 ♀	0,0545	0,0385
R 90 ♀	0,0560	0,0463	R 185 ♂	0,0913	0,0078
K 1079 ♂	0,0508	0,0232	R 186 ♀	0,0726	0,0260
	0,0713	0,0209	R 187 ♂	0,0535	0,0
R 165 ♂	0,0612	0,0193			
K 1079 ♂	0,0749	0,0273	Mittel	0,0500	0,0322

Die Tabelle V zeigt die nach Formel (2) aus den Grössen der Konzentration des anorganischen Phosphats der Tabelle II berechneten Geschwindigkeitskonstanten für die 1. und 2. Periode der Reaktion von 0—7 und 7—15 Minuten.

Es ergibt sich, dass wenigstens im Zeitraum von 0—7 Minuten die Gleichung (2) erfüllt ist. Die Konstante zeigt durchschnittlich den Wert 0,05. Die Schwankungsbreite der Werte ist allerdings ziemlich gross, was aber durch die Tatsache erklärt ist, dass nicht mit dem isolierten Fermentsystem gearbeitet wird. Es liegen immerhin über 50 % der Werte innerhalb $k = 0,05 \pm 0,01$ und 75 % innerhalb $k = 0,05 \pm 0,02$. Im Zeitraum von 7—15 Minuten wird, von wenigen Fällen abgesehen, der Wert $k = 0,05$ nicht mehr erreicht. Im Mittel

von 40 Werten erhält man nur noch $k = 0,03$. Die Reaktion ist demnach schon verzögert.

Für Reaktionen, die der Gleichung (2) gehorchen, ist es charakteristisch, dass nach einer bestimmten, von der Anfangsgeschwindigkeit unabhängigen Zeitspanne jeweils die Hälfte der vorhandenen Substratmenge umgesetzt ist. Diese Halbwertszeit ergibt sich zu:

$$\tau = \frac{1}{k} \ln 2 \quad (4)$$

aus Gleichung (2), wenn $c_t = c_0/2$ gesetzt wird. Für die Glykogenphosphorolyse ergibt sich ein τ -Wert von 14 Minuten. Die experimentellen Befunde bestätigen diesen Wert im allgemeinen, obschon die 15 Minuten-Werte vielfach etwas höher liegen als $c_0/2$, was durch die beginnende Hemmung verursacht ist. Immerhin kann gesagt werden, dass die Reaktion während etwa dem halben Umsatz als Reaktion erster Ordnung verläuft, was den für Enzymreaktionen bekannten Tatsachen entspricht¹⁾.

Mit Hilfe des τ -Wertes kann bei bekannter Anfangskonzentration die theoretisch für den Ablauf der Reaktion zu fordernde Kurve gezeichnet werden. Die Figur 3 zeigt für einige der für die Ableitung der Formel benutzten Versuche die theoretischen und experimentellen Kurven des Reaktionsablaufs.

Es ist hieraus nochmals besonders deutlich zu sehen, dass die Phosphorolyse des Glykogens in dem von uns benutzten Versuchsansatz als Reaktion erster Ordnung verläuft. Dieser Befund steht im Einklang mit den Angaben von *Cori*²⁾ und *Kiessling*³⁾ über die monomolekulare Einstellung des *Cori*-Ester-Gleichgewichts mit dem isolierten Ferment.

III. Ableitung der Reaktionsgleichung für die Phosphorolyse mit Muskeln von nebennierenlosen Tieren.

Die an nebennierenlosen Tieren gefundenen Werte werden in genau derselben Weise, wie es mit den normalen geschehen ist, ausgewertet. In Tabelle VI und VII sind die Konzentrationen von anorganischem Phosphat und die mittleren Geschwindigkeiten in der Reihenfolge der zunehmenden, seit der Nebennierenexstirpation verstrichenen Zeit zusammengestellt. Diese Tabellen sind also zu vergleichen mit den Tabellen II, III und IV der normalen Tiere.

Aus den Tabellen VI und VII treten im Vergleich mit den Werten der Normaltiere in den Tabellen II, III und IV besonders zwei charakteristische Merkmale hervor. Erstens ist die Geschwindigkeit des

¹⁾ Vgl. *Nord* und *Weidenhagen*, Handb. d. Enzymol. **1**, 225, Springer 1940.

²⁾ *Cori G. T.*, *Cori C. F.* und *Schmidt*, J. Biol. Chem. **129**, 629 (1939).

³⁾ *Kiessling*, W., Bioch. Z. **302**, 50 (1939).

Reaktionsablaufs bedeutend kleiner und zweitens, was wichtiger ist, unabhängig von der Anfangskonzentration des anorganischen Phosphats.

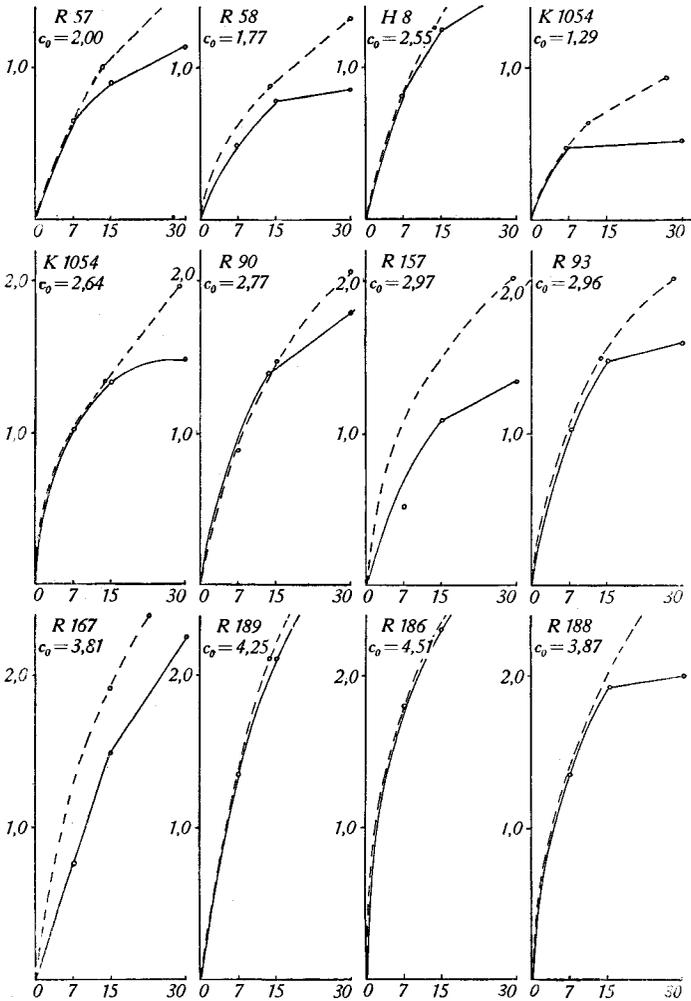


Fig. 3.

Ordinate: Konzentration des anorganischen Phosphats in 10^{-2} Millimol P/g Muskel

Abszisse: Zeit in Minuten

— experimentelle Kurven

- - - theoretische Kurven

c_0 : Anfangskonzentration des anorganischen Phosphats in 10^{-2} Millimol P/g Muskel.

Bei den Ratten lässt sich parallel mit der seit der Adrenalektomie verstrichenen Zeit eine Abnahme der Geschwindigkeit feststellen, wie das besonders aus den Mittelwerten zwischen 0 und 30 Minuten,

Tabelle VI.

Tier Nr.	Gewicht	Muskel	Temperatur °C	Tag nach NN- exst.	Konzentration des anorgan. P in 10-2 Millimol im Ansatz 1 g Muskel zum Zeitpunkt von					Bemerkungen zur Adynamie der Tiere
					0'	7'	15'	30'	60'	
					R 129 ♂	160	E	20	3	
R 201 ♂	82	E	16	3	2,84	2,45	2,00	—	1,29	zieml. adynam
R 49 ♂	94	E	20	4	2,54	2,38	2,26	2,26	1,87	deutl. adynam
R 33 ♂	85	E	19	4	2,20	1,97	1,64	1,48	1,36	adynam
R 82 ♂	94	E	20	4	3,10	3,03	2,71	2,26	1,55	nicht bes. adynam
R 117 ♂	160	E	20	4	3,94	—	3,94	3,23	2,58	deutl. adynam
R 180 ♂	70	E	18	4	5,55	4,32	3,81	—	3,10	adynam
R 197 ♂	102	E	17	4	3,29	3,10	2,97	—	1,48	nicht sehr adynam
R 84 ♂	134	E	20	5	3,68	3,65	3,23	2,52	2,52	nicht bes. adynam
R 95 ♂	118	E	20	5	2,84	2,84	2,71	2,00	1,29	deutlich adynam
R 96 ♂	102	E	20	5	3,55	3,55	3,36	1,94	1,94	nicht bes. adynam
R 101 ♂	110	E	20	5	4,00	3,68	3,03	2,84	2,84	adynam
R 130 ♂	140	E	20	5	2,58	2,26	1,81	1,55	1,55	ziemlich adynam
R 131 ♂	140	E	20	5	3,36	2,52	2,06	1,97	1,94	ziemlich adynam
R 132 ♂	165	E	20	5	2,90	2,90	2,52	1,68	1,42	nicht bes. adynam
R 160 ♂	110	E	24	5	5,10	4,19	3,87	3,29	2,90	adynam
R 198 ♂	89	E	17	5	3,61	2,90	2,06	—	1,22	nicht adynam
R 97 ♂	110	E	20	6	4,33	4,35	3,29	3,03	1,48	nicht bes. adynam
R 98 ♂	104	E	20	6	3,35	3,29	2,84	2,84	2,45	deutlich adynam
R 103 ♂	100	E	20	6	3,36	3,23	2,90	2,71	2,51	deutlich adynam
R 161 ♂	105	E	24	6	4,76	4,00	3,36	2,58	2,26	adynam
R 164 ♂	100	E	24	6	4,71	4,39	3,48	3,36	3,10	adynam
R 51 ♂	81	E	20	7	2,42	2,35	2,26	2,26	2,13	deutlich adynam
R 99 ♂	104	E	20	7	5,49	5,03	5,03	4,65	3,76	deutlich adynam
R 100 ♂	115	E	20	7	3,84	3,84	3,81	3,29	2,58	deutlich adynam
R 119 ♂	160	E	20	7	4,00	—	4,00	3,97	2,58	adynam
R 120 ♂	140	E	20	7	3,87	—	3,87	3,06	2,84	adynam
R 121 ♂	146	E	20	7	4,39	—	4,35	4,32	3,16	adynam
R 143 ♂	130	E	18	7	3,61	3,10	3,63	3,10	2,13	adynam
R 162 ♂	102	E	24	7	3,42	3,42	2,58	2,45	1,62	adynam
R 199 ♂	105	E	17	7	3,36	2,90	2,19	—	1,29	sehr adynam
R 200 ♂	92	E	18	7	3,42	2,52	2,00	—	0,65	ziemlich adynam
R 54 ♂	100	E	20	8	2,93	2,93	2,93	2,74	—	deutlich adynam
R 107 ♂	100	E	20	8	2,84	2,77	2,71	2,64	2,51	nicht bes. adynam
R 151 ♂	140	E	18	8	4,32	4,00	3,94	3,87	3,16	nicht bes. adynam
R 153 ♂	140	E	18	8	5,02	4,13	4,19	4,06	3,76	nicht bes. adynam
K 1077 ♂	1970	E	20	Krise	3,29	2,90	2,58	1,68	1,61	nicht bes. adynam
K 1075 ♂	2000	E	20	„	3,16	3,16	2,51	1,68	1,68	nicht bes. adynam
K 1059 ♂	3170	H	20	„	1,42	1,29	1,10	0,97	0,97	deutlich adynam
		Osch			2,13	1,94	1,77	1,68	1,55	
		Üsch			3,03	3,03	2,84	2,52	2,13	
		Bm			3,03	2,52	2,13	1,68	1,55	
K 1048 ♂	2830	Osch	20	„	2,13	2,13	2,00	1,29	1,23	nicht bes. adynam
		Üsch	20	„	2,26	2,26	2,00	1,42	1,36	
K 30 ♂		E	16	„	2,58	2,52	2,48	—	1,74	sehr adynam
		E		„	2,58	2,58	2,52	—	1,68	
K 14 ♂	2410	E	19	„	1,06	1,06	0,87	0,71	0,58	deutlich adynam
		E		„	1,06	0,94	0,87	0,65	0,55	
H 7 ♂	8920	E	20	„	2,52	2,39	2,19	1,81	1,81	ziemlich adynam
		E		„	2,77	2,64	2,39	2,06	1,81	
H 10 ♂	8660	E	18	„	3,16	3,10	2,84	2,58	2,48	deutlich adynam

Anmerkung: Bedeutung der Zeichen siehe Tabelle II.

Tabelle VII.

Tier Nr.	Tag nach N.N.Exst.	Mittlere Geschwindigkeit der Reaktion in 10 ⁻² Millimol P/Min. im Zeitraum von				Mittlere Ge- schwindigkeit 0—30'
		0—7'	7—15'	15—30'	30—60'	
R 129 ♂	3	0,111	0,081	0,030	0,015	0,074
R 201 ♂	3	0,056	0,056	—	—	—
R 49 ♂	4	0,023	0,015	0,0	0,013	0,013
R 33 ♂	4	0,033	0,041	0,011	0,004	0,028
R 82 ♂	4	0,010	0,040	0,030	0,038	0,026
R 117 ♂	4	0,0	0,0	0,047	0,021	0,023
R 180 ♂	4	0,176	0,064	—	—	—
R 197 ♂	4	0,027	0,016	—	—	—
R 84 ♂	5	0,004	0,053	0,045	0,0	0,034
R 95 ♂	5	0,0	0,017	0,047	0,023	0,021
R 96 ♂	5	0,0	0,032	0,090	0,0	0,040
R 101 ♂	5	0,046	0,081	0,012	0,0	0,046
R 130 ♂	5	0,045	0,057	0,017	0,0	0,039
R 131 ♂	5	0,110	0,057	0,006	0,001	0,057
R 132 ♂	5	0,0	0,060	0,056	0,008	0,038
R 160 ♂	5	0,130	0,040	0,013	0,013	0,067
R 198 ♂	5	0,114	0,105	—	—	—
R 97 ♂	6	0,0	0,128	0,017	0,004	0,048
R 98 ♂	6	0,008	0,064	0,0	0,013	0,008
R 103 ♂	6	0,009	0,040	0,013	0,017	0,021
R 161 ♂	6	0,108	0,080	0,052	0,010	0,080
R 164 ♂	6	0,045	0,113	0,0	0,022	0,079
R 51 ♂	7	0,010	0,010	0,0	0,004	0,010
R 99 ♂	7	0,065	0,0	0,025	0,030	0,030
R 100 ♂	7	0,0	0,004	0,034	0,013	0,012
R 119 ♂	7	0,0	0,0	0,002	0,013	0,001
R 120 ♂	7	0,0	0,0	0,054	0,014	0,027
R 121 ♂	7	0,0	0,0	0,002	0,039	0,001
R 143 ♂	7	0,072	0,004	0,0	0,032	0,025
R 162 ♂	7	0,0	0,056	0,008	0,027	0,032
R 199 ♂	7	0,065	0,009	—	—	—
R 200 ♂	7	0,130	0,065	—	—	—
R 54 ♂	8	0,0	0,0	0,012	—	0,006
R 107 ♂	8	0,010	0,008	0,002	0,004	0,006
R 151 ♂	8	0,045	0,007	0,004	0,023	0,018
R 153 ♂	8	0,127	0,0	0,008	0,010	0,045
K 1077 ♂	Krise	0,055	0,040	0,060	0,002	0,051
K 1075 ♂	„	0,0	0,081	0,055	0,0	0,068
K 1059 ♂	„	0,033	0,024	0,008	0,0	0,021
		0,028	0,020	0,006	0,004	0,018
		0,0	0,012	0,021	0,013	0,016
		0,073	0,049	0,031	0,010	0,051
K 1048 ♂	„	0,0	0,016	0,047	0,002	0,031
		0,0	0,032	0,038	0,002	0,035
K 30	„	0,008	0,005	0,0	—	0,004
		0,0	0,007	0,0	—	0,003
K 14	„	0,0	0,023	0,010	0,008	0,016
		0,017	0,009	0,014	0,007	0,014
H 7 ♂	„	0,033	0,023	0,026	0,0	0,027
		0,021	0,032	0,021	0,008	0,025
H 10 ♂	„	0,008	0,032	0,017	0,003	0,019

welche aus den Werten zwischen 0—7, 7—15 und 15—30 Minuten berechnet sind (Tabelle VII), hervorgeht. Die Reaktion beginnt manchmal im Zeitpunkt 0, manchmal erst später, geht dann eine gewisse Zeit lang mit einer gewissen durchschnittlichen Geschwindigkeit vor sich und bricht dann entweder ganz plötzlich ab, oder geht mit stark herabgesetzter Geschwindigkeit weiter.

Reaktionen, bei denen die Geschwindigkeit von der Substratkonzentration unabhängig ist, sind nullter Ordnung. Für solche ist charakteristisch, dass sie mit konstanter Geschwindigkeit vor sich gehen. Die Gleichung (2) geht in diesem Falle über in:

$$-\frac{dc}{dt} = k \quad (5)$$

Graphisch kommt dieses Verhalten darin zum Ausdruck, dass die Abnahme des anorganischen Phosphats linear verläuft. Dass das tatsächlich der Fall ist, sieht man sehr deutlich aus den graphischen Darstellungen der Fig. 4, wo für die betreffenden Anfangskonzentrationen die zu fordernden Kurven erster Ordnung und die experimentellen Kurven einander gegenübergestellt sind. Fig. 4 (S. 898) ist mit Fig. 3 der normalen Tiere zu vergleichen.

IV. Der Einfluss von Desoxy-corticosteron auf den Reaktionstypus der nebennierenlosen Tiere.

1. Reaktionstypus bei in vitro-Versuchen.

Nachdem nun feststeht, dass der Reaktionsablauf der Phosphorolyse des Glykogens normalerweise durch Muskelbrei, also auch mit dem nicht isolierten Ferment, als Reaktion erster Ordnung verläuft, nach Nebennierenexstirpation jedoch nullter Ordnung wird und nachdem, wie früher mitgeteilt wurde¹⁻⁴), Zusatz von Cortinsubstanzen den gehemmten Prozess zu reaktivieren vermag, war zu untersuchen, ob man den Einfluss dieser Cortinsubstanzen auch am Reaktionsverlauf erkennen kann. In Tabelle VIII sind für eine Anzahl Versuche die Geschwindigkeiten mit und ohne Zusätze von Desoxy-corticosteron in vitro zusammengestellt.

Es ergibt sich, dass Zugabe von 2 mg und 0,2 mg Desoxy-corticosteron zu 1 g Muskelbrei die Reaktionsgeschwindigkeit vergrössert. In Versuch 101 beträgt die Steigerung der Geschwindigkeit in der Zeit von 0—7 Minuten das 4fache wie ohne Zusatz und nähert sich dem theoretischen Wert ausserordentlich stark. Ebenso stark ist diese Annäherung in Versuch 200, aber hier beträgt die Steigerung nur wenig. Dasselbe gilt von Versuch 108, wo 0,2 mg Desoxy-corticosteron eine Steigerung bis nahe an den theoretischen Wert hervorrufen. Mit Ausnahme von 4 Fällen ist die Wirkung im Zeitraum von 0—7

¹) Schweiz. Med. Wschr. **71**, 101 (1941).

²) Verh. Schweiz. Physiol., Januar 1942.

³) Nature **149**, 49 (1942).

⁴) Helv. physiol. pharmacol. acta **1** (1943) (im Druck).

Minuten sehr deutlich zu sehen. Diese Ausnahmen betreffen äusserst schwer adyname Tiere. In den spätern Zeiträumen, hauptsächlich von 15—30 Minuten, ist die Geschwindigkeit mit Hormonzusatz oft deutlich gegen die ohne Zusatz herabgesetzt. Das zeigt ebenfalls den Einfluss des Hormons, das im Anfang einen rascheren, später entsprechend der Abnahme des Substrats immer langsameren Ablauf gemäss einer Reaktion erster Ordnung verursacht.

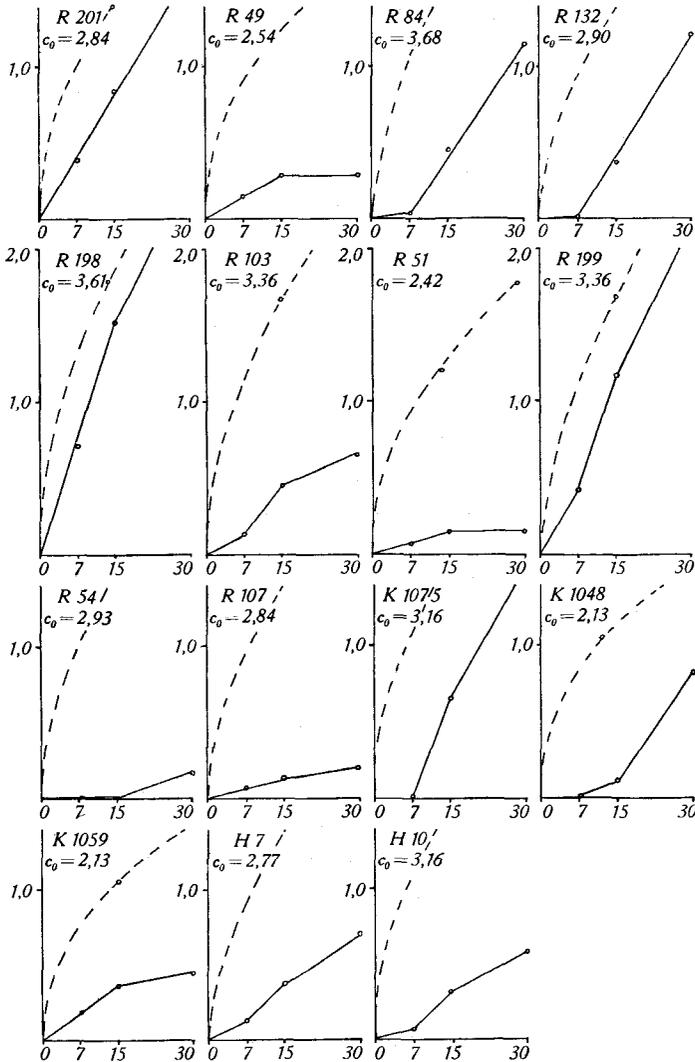


Fig. 4.

Ordinate: Konzentration des anorganischen Phosphats in 10^{-2} Millimol P/g Muskel
 Abszisse: Zeit in Minuten
 ——— experimentelle Kurven
 - - - - - theoretische Kurven für normalen Ablauf der Reaktion.

Tabelle VIII.

Tier Nr.	Tag nach N. N.-Exst.	Anfangs-Konzentration in 10 ⁻² Millimol P/1 g Muskel	Geschwindigkeit der Reaktion in 10 ⁻² Millimol P/Min. im Zeitraum von								
			0—7'			7—15'			15—30'		
			ohne Zusatz	Desoxy-cortico-steron		ohne Zusatz	Desoxy-cortico-steron		ohne Zusatz	Desoxy-cortico-steron	
	2,0 mg	0,2 mg		2,0 mg	0,2 mg		2,0 mg	0,2 mg			
R 95 ♂	5	2,84 3,55	0,0			0,017			0,047		
				0,064		0,033			0,047		
R 96 ♂	5	3,55 3,74	0,0			0,032			0,090		
				0,045		0,024			0,070		
R 97 ♂	6	4,33	0,0	0,074		0,128	0,064		0,017	0,018	
R 98 ♂	6	3,35	0,008	0,0		0,064	0,047		0,0	0,034	
R 99 ♂	7	5,49 5,74	0,065						0,025		
				0,175			0,016			0,055	
R 100 ♂	7	3,84 3,87	0,0			0,004			0,034		
				0,0			0,112			0,052	
R 101 ♂	5	4,00	0,046	0,184		0,081	0,040		0,012	—	
R 103 ♂	6	3,36 3,10	0,009			0,040			0,013	—	
				0,047			0,063			—	
R 107 ♂	8	2,84 2,87	0,010			0,008			0,002		
				0,023			0,025			0,002	
R 182 ♂	5	5,36	0,018	0,147		0,0	0,0		—	—	
R 197 ♂	4	3,29	0,027		0,055	0,016		0,120	—	—	
R 198 ♂	5	3,61 3,16	0,114			0,105			—	—	
				0,054			0,097				
R 199 ♂	7	3,36	0,065		0,102	0,009		0,096			
R 200 ♂	7	3,42 3,35	0,130			0,065					
				0,165			0,063				
R 201	3	2,84	0,056		0,111	0,056		0,015	—	—	
R 180	4	5,55 5,67	0,176			0,064			—	—	
				0,220			0,130				
R 142 ♂	7	2,26	0,0		0,0	0,0		0,097	0,0	0,090	
K 1048 ♂	Krise	2,13 2,19 2,26	0,0	0,064		0,016	0,017		0,047	0,017	
					0,009			0,097		0,034	
			0,0		0,093	0,032		0,016	0,038	0,034	
K 1059 ♂	„	3,03 2,97	0,0			0,012			0,021		
			0,0	0,0			0,072	0,105		0,052	
K 30 ♂	„	2,58	0,0		0,045	0,007		0,025		0,032	
K 14 ♂	„	1,06 1,13	0,0			0,023			0,010		
				0,045			0,005			0,080	

Die Kurven der Fig. 5 zeigen für einige Beispiele diese Verhältnisse deutlich.

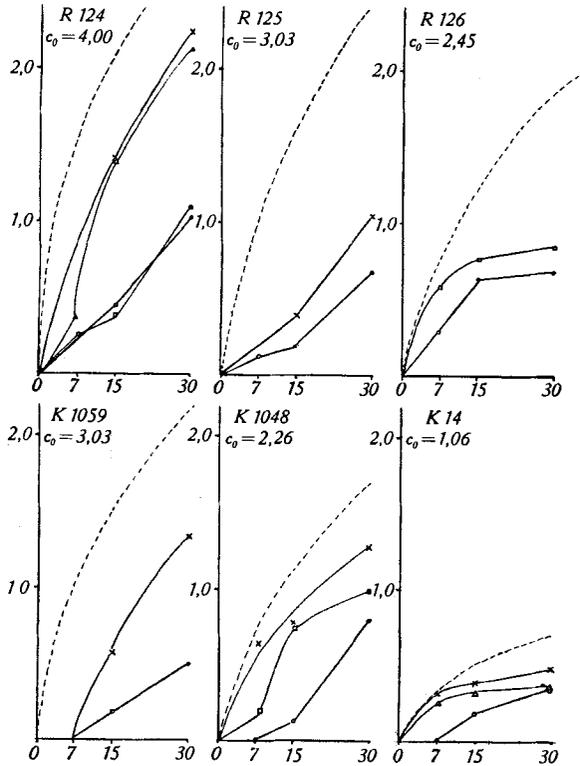


Fig. 5.

Ordinate: Konzentration des anorganischen Phosphats in 10^{-2} Millimol P/g Muskel
 Abszisse: Zeit in Minuten

----- theoretische Kurven für normalen Ablauf der Reaktion
 ——— experimentelle Kurven:

- o-o- ohne Zusätze
- *-* mit Zusatz von 2,0 mg Desoxy-corticosteron/g Muskel
- Δ-Δ- " " " 0,2 " " " "
- " " " 0,02 " " " "

Man sieht zunächst den zunehmenden Einfluss der verschiedenen starken Dosen. Kleine Dosen verursachen im allgemeinen nur eine Vergrößerung der Steilheit der Kurven, während grössere Dosen den Prozess wieder stärker gegen den Charakter von Reaktionen erster Ordnung zu verschieben vermögen. Es ist ferner eine Abhängigkeit des Wirkungsgrades der einzelnen Dosen von der Grösse der Adynamie der Tiere deutlich ersichtlich, indem stark adynamie Tiere grössere Dosen zur Restitution ihrer Phosphorolyse brauchen als weniger adynamie. Das steht sehr gut im Einklang mit den Erfahrungen am lebenden Tier, das zur Heilung aus einer schweren Krise grössere Dosen braucht, als zur Lebenserhaltung nötig sind.

2. Reaktionstypus bei kompensierten Tieren.

Einige adrenaletomierte Katzen wurden mit Desoxy-cortico-steron-acetat am Leben erhalten¹⁾ und nachher in voll kompensiertem Zustand getötet und ihre Glykogenphosphorylierung untersucht²⁾. Das Resultat ist in Tabelle IX zusammengestellt.

Tabelle IX.

Tier Nr.	Anfangs-Konzentration des anorg. P in 10 ⁻² pro 2 g Muskel	Geschwindigkeit der Reaktion in 10 ⁻² Millimol P/Min. im Zeitraum von					
		0—7'		7—15'		15—30'	
		ohne Zusatz	Mit Desoxy-corticosteron	ohne Zusatz	Mit Desoxy-corticosteron	ohne Zusatz	Mit Desoxy-corticosteron
K 1047 ♀	3,68	0,130	—	0,047	—	0,047	—
	3,68	0,140	—	0,065	—	0,038	—
	3,55	0,111	—	0,052	—	0,044	—
K 1060 ♂	2,39	0,093	—	0,007	—	0,004	—
	2,26	0,074	—	0,015	—	0,004	—
K 16 ♂	2,84	0,056	—	0,025	—	—	—
	2,84	0,064	—	0,025	—	—	—
	2,77	—	0,035	—	0,034	—	—
	2,94	—	0,060	—	0,016	—	—
K 1 ♀	2,58	0,064	—	0,056	—	0,021	—
	2,71	0,074	—	0,040	—	0,021	—
	3,03	—	0,070	—	0,044	—	0,042
	3,36	—	0,070	—	0,036	—	0,047

Anmerkung: Bei Versuch K 16 wurden 2 mg, bei Versuch K 1 0,2 mg Desoxy-corticosteron pro 1 g Muskel zugesetzt.

Wie die Tabelle IX zeigt, liegen die Geschwindigkeiten ohne Zusatz von Desoxy-corticosteron im allgemeinen innerhalb der bei normalen Tieren beobachteten Grenzen und sind deutlich von der Phosphatkonzentration abhängig. Der Reaktionstypus ist also wieder, wenigstens angenähert, erster Ordnung. Immerhin ist auch die Phosphorylierung der in vivo kompensierten Tiere keine vollkommen normale. Die Grösse der Geschwindigkeiten erreicht in keinem Fall ganz die theoretisch für eine Reaktion erster Ordnung zu fordernde Höhe.

Zusatz von Desoxy-corticosteron in vitro zu Muskeln von vollkommen kompensierten Tieren bringt, wie die Versuche K 16 und K 1 zeigen, keine Erhöhung der Geschwindigkeit zustande. Die Kompensation in vitro und in vivo sind sich demnach gleich.

¹⁾ Verwendet wurde „Percorten Ciba“. Auch an dieser Stelle sei der *Gesellschaft für chemische Industrie* in Basel für die grossen überlassenen Versuchsmengen gedankt.

²⁾ *Montigel, C. und Verzár, F.*, *Helv. physiol. pharm. acta* 1 (1943), im Druck.

V. Wirkung erhöhter Substratkonzentrationen.

Es ist bekannt, dass bei manchen Fermentreaktionen steigende Substratkonzentrationen zunächst eine Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge haben, dass aber bei einer gewissen Grösse dieser Konzentration die Geschwindigkeit nicht mehr weiter zunimmt, sondern die Reaktionsordnung reduziert wird¹⁾.

Es war nun zu untersuchen, ob für die Glykogenphosphorolyse dieses Verhalten auch nachgewiesen werden kann. In der Tat lässt sich zeigen, dass in unserem Versuchsansatz mit Muskeln von normalen Tieren bei einer Erhöhung der Phosphatkonzentration auf über 6×10^{-2} Millimol Phosphor/g Muskel, der Ablauf der Phosphorylierung einen ganz dem bei nebennierenlosen Tieren analogen Charakter annimmt.

Die Erhöhung der Phosphatkonzentration wurde dadurch erzielt, dass zu den Versuchsansätzen je $0,1 \text{ cm}^3$ sekundäre Kalium- oder Natriumphosphatlösung in entsprechender Konzentration zugesetzt wurde. Ein Unterschied zwischen dem Zusatz von Natrium- oder Kaliumphosphat wurde nicht gefunden. Durch den Zusatz wurde das p_H des Ansatzes nicht verändert.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ist in Fig. 6 dargestellt.

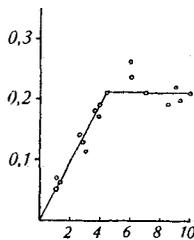


Fig. 6.

Ordinate: Geschwindigkeit in 10^{-2} Millimol P/Min zu Beginn der Reaktion.

Abzisse: Konzentration in 10^{-2} Millimol P/g Muskel.

Diese Kurve bezieht sich auf eine als konstant anzusehende Fermentmenge, die normalerweise in 1 g Muskelbrei enthalten ist. Natürlich sind dabei ziemliche Schwankungen zu erwarten. Von einer Konzentration von über 4×10^{-2} Millimol Phosphor/g Muskel bis über 5×10^{-2} Millimol Phosphor/g Muskel sind je nach dem Tier beide Reaktionstypen beobachtet worden. Unter 4×10^{-2} Millimol Phosphor war die Reaktion meist erster und über 6×10^{-2} Millimol Phosphor meist nullter Ordnung.

Wird nun die Fermentmenge kleiner, als sie normalerweise in einer gewissen Muskelquantität vorkommt, so ist anzunehmen, dass dann der Übergang vom Reaktionsverlauf erster Ordnung zu dem

¹⁾ Vgl. Nord und Weidenhagen, Handb. d. Enzymol. I, 207ff., Springer 1940.

nullter Ordnung schon bei kleineren Substratkonzentrationen eintreten kann. Mit andern Worten: grosse Substratkonzentration gegenüber kleiner Fermentkonzentration führt zur Reduktion der Reaktionsordnung. Daraus folgt, dass bei nebennierenlosen Tieren die Enzymkonzentration gegenüber der Norm herabgesetzt sein muss, da die Substratkonzentration im allgemeinen nicht über die kritische Konzentration hinaus vergrössert ist.

Diese Annahme liess sich dadurch bestätigen, dass es gelang, durch Zusatz von Desoxy-corticosteron zu einem Normalsystem mit experimentell übermaximaler Phosphatkonzentration die Reaktion wieder in die erste Ordnung zurückzuführen. Einige Versuche dieser Art sind in Tabelle X zusammengestellt, wo die für die betreffenden Anfangskonzentrationen des anorganischen Phosphats zu fordernden mittleren Geschwindigkeiten des Zeitraums 0—7 Minuten mit und ohne Zusatz von Desoxy-corticosteron den experimentell gefundenen gegenübergestellt sind. Ausserdem sind einige Versuche in graphischer Darstellung aus der Fig. 7 in ihrem ganzen Verlauf ersichtlich.

Tabelle X.

Tier Nr.	Geschwindigkeit der Reaktion in 10^{-2} Millimol P/Min. 1 g Muskel (von 0—7')					
	Normaler Ansatz		Ansatz mit erhöhtem Phosphatgehalt		Ansatz m. erhöhtem Phosphatgehalt + Desoxy-corticosteron	
	theoretisch	praktisch	theoretisch	praktisch	theoretisch	praktisch
R 185	0,215	0,214	0,348	0,240	0,338	0,250
R 186	0,225	0,257	0,335	0,278	0,375	0,379
R 187	0,225	0,201	0,425	0,137	0,450	0,300
R 188	0,193	0,194	0,425	0,193	0,435	0,300
R 189	0,212	0,193	0,439	0,202	0,445	0,300
R 190	0,252	0,277	0,445	0,163	0,465	0,230
R 191	0,200	0,230	0,445	0,270	0,445	0,386
R 192	0,193	0,175	0,503	0,186	0,503	0,257
R 193	0,210	0,213	0,551	0,228	0,551	0,257

Anmerkung: Bei den Versuchen 185, 186, 187, 188, 193 ist 2 mg Desoxy-corticosteron / g Muskel zugesetzt.

Bei den Versuchen 189, 190, 191, 192 ist 0,2 mg Desoxy-corticosteron / g Muskel zugesetzt.

Die Konzentration des anorganischen Phosphats beträgt jeweils das 20fache der angegebenen theoretischen Geschwindigkeit.

Eine Steigerung der Geschwindigkeit nach Zusatz von Desoxy-corticosteron ist in allen Fällen, mit Ausnahme von Versuch 185, zu sehen. Selbst in den Versuchen 192 und 193, wo die Konzentration

des anorganischen Phosphats mehr als das Dreifache des normalen erreicht, ist noch eine deutliche Geschwindigkeitserhöhung zu sehen.

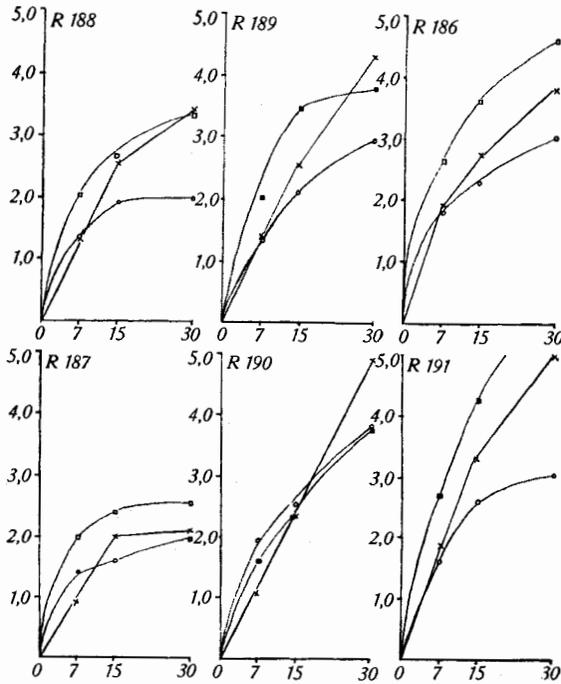


Fig. 7.

Ordinate: Konzentration des anorganischen Phosphats in 10^{-2} Millimol P/g Muskel

Abszisse: Zeit in Minuten

○—○ normale Phosphatkonzentration $3,8 - 4,5 \times 10^{-2}$ Millimol P/g Muskel

—×— erhöhte Phosphatkonzentration $\sim 8,5 \times 10^{-2}$ Millimol P/g Muskel
(R 186: $6,7 \times 10^{-2}$ Millimol P)

□—□ Zusatz von 2 mg Desoxy-corticosteron/g Muskel } zum System mit erhöh-
■—■ Zusatz von 0,2 mg Desoxy-corticosteron/g Muskel } tem Phosphatgehalt.

Diskussion.

Diese Befunde scheinen darauf hinzudeuten, dass das Desoxy-corticosteron in irgendeiner Form fermentativ in den phosphorolytischen Prozess eingeschaltet ist, indem die Konzentration dieses Stoffes im Verhältnis zur Substratkonzentration den Reaktionscharakter bestimmt. Die bei Nebenniereninsuffizienz in Erscheinung tretende Muskeladynamie ist demnach primär bedingt durch eine Verminderung einer für die Geschwindigkeit der Phosphorolyse des Glykogens notwendigen Komponente des bei dieser Reaktion im Spiele stehenden Fermentsystems. Diese Komponente scheint Desoxy-corticosteron zu sein. Bezüglich der Wirkung anderer ähnlich wirkender Steroide fehlen entsprechende Erfahrungen, doch ist es möglich, dass auch sie seine Rolle einnehmen können.

Zusammenfassung.

1. Es wurde der Reaktionsablauf der Phosphorolyse des Glykogens durch Muskel *in vitro*, an Hand von experimentellen Ergebnissen reaktionskinetisch ausgewertet.

2. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion bei normalen Tieren (Ratte, Katze, Hund) als Reaktion erster Ordnung, bei nebennierenlosen Tieren aber als Reaktion nullter Ordnung verläuft.

3. Desoxy-corticosteron und sein Acetat können in gewissen Dosen den Reaktionsablauf bei nebennierenlosen Tieren *in vitro* ebenso wie *in vivo* wieder weitgehend normalisieren.

4. Durch Steigerung der Phosphatkonzentration bei normalen Muskeln konnte experimentell gezeigt werden, dass Überkonzentration von Substrat gegenüber dem Ferment die gleiche Wirkung auf den Reaktionstypus hat wie eine Nebennierenextirpation. Dieser Effekt wird durch Desoxy-corticosteron, ebenso wie die durch Nebennierenmangel bedingte Veränderung behoben.

5. Aus diesen Befunden wird geschlossen, dass Desoxy-corticosteron eine notwendige Komponente des Fermentsystems der Glykogen-Phosphorolyse im Muskel ist.

Physiologisches Institut der Universität Basel.

92. Zur Kenntnis der Sesquiterpene.

(58. Mitteilung ¹⁾).

4,8-Dimethyl-6-isopropyl-azulen

von Pl. A. Plattner und H. Roniger.

(29. III. 43.)

Aus unseren Untersuchungen über Alkyl-azulene hat sich ergeben, dass aus den Absorptionsbanden dieser Verbindungen im sichtbaren Bereich des Spektrums interessante und recht weitgehende Schlüsse auf die Konstitution unbekannter alkyl-substituierter Azulene gezogen werden können²⁾. Das früher betrachtete experimentelle Material weist aber insofern eine Lücke auf, als Azulene mit Alkylsubstitution in 6-Stellung bisher nicht bekannt sind. Es schien uns deshalb von besonderem Interesse, einen derartigen Vertreter der Azulene-Reihe herzustellen.

Nach der Diazo-ester-Methode in ihrer ursprünglichen Form, d. h. der Kondensation von Indanen mit Diazo-essig-ester sind 6-Alkyl-azulene, wie wir vor kurzem ausgeführt

¹⁾ 57. Mitt. Helv. **25**, 1674 (1942).

²⁾ Vgl. dazu besonders Pl. A. Plattner, Helv. **24**, 283 E (1941).