

61. Vergleichende Untersuchungen über die Aktivität, Magnesium-Aktivierung und Stabilität der alkalischen Nierenphosphatase.

3. Mitteilung über Phosphatasen

von **H. Aebi.**

(29. I. 49.)

In früher mitgeteilten Versuchen¹⁾ ist gezeigt worden, welche Bedeutung der Wahl des Puffergemisches bei der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität zukommt. Je nach der Art und Stärke des verwendeten Puffers variiert das resultierende p_{H} -Optimum von Nierenhomogenat zwischen 9,05 und 9,7 und die dabei beobachteten Phosphatase-Aktivitäten schwanken beträchtlich (um ca. 100%). Die bei diesen Studien festgestellte hemmende Wirkung des bei der Phosphatasebestimmung oft verwendeten Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffers sowie des Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffers zeigt ein gegensätzliches Verhalten, indem die erstere vor allem nur auf dem alkalischen Schenkel, die letztere nur auf dem sauren Schenkel der p_{H} -Wirkungskurve hervorzutreten scheint²⁾.

In dieser Arbeit werden nun diese Hemmungserscheinungen näher untersucht; gleichzeitig wird auch das Verhalten der aktivierenden Wirkung des Magnesiums unter verschiedenen Reaktionsbedingungen in den Kreis der Betrachtungen einbezogen. Ausgehend von den grundlegenden Anschauungen von *Michaelis* und *Menten*³⁾ sowie *Haldane*⁴⁾, wonach die Fermentaktivität weitgehend durch die Konzentration der intermediär gebildeten Enzym-Substratverbindung resp. deren Zerfallsgeschwindigkeit gegeben sein soll, wird der Versuch unternommen, die gemachten Beobachtungen quantitativ zu erfassen.

Während die weiteren Versuchsbedingungen in bezug auf Art des Substrats, Versuchsdauer und Temperatur durch frühere Untersucher (z. B. *Delory* und *King*⁵⁾) eingehend diskutiert worden sind, soll hier lediglich noch ein Beitrag zur Frage geleistet werden, wie die Einheit der Phosphatase-Aktivität gewählt werden soll. Zu diesem Zwecke werden die beiden häufig angewandten Einheiten von *A. Bodansky*⁶⁾ (Maßstab: „Ausbeute“ an abgespaltenem Phosphat während einer bestimmten Zeitdauer) und *O. Bodansky*⁷⁾ (Maßstab: Reziproker Wert der Zeit, die zur Erzielung eines bestimmten „Umsatzes“ erforderlich ist) miteinander verglichen. Schliesslich stellt die

¹⁾ Helv. **31**, 1761 (1948).

²⁾ Helv. **31**, 1943 (1948).

³⁾ Bioch. Z. **49**, 333 (1913).

⁴⁾ Enzymes; Longmans, London, 1930.

⁵⁾ Biochem. J. **37**, 547 (1943).

⁶⁾ J. Biol. Chem. **101**, 93 (1933).

⁷⁾ J. Biol. Chem. **120**, 555 (1937).

unterschiedliche Stabilität der Nieren-Phosphatase in verschiedenen Puffergemischen eine weitere experimentelle Stütze für die von *Kay*¹⁾ geäußerte Hypothese dar, wonach die p_H -Aktivitätskurve als Resultante von Aktivitätskurve im eigentlichen Sinne und Stabilitätskurve zu betrachten ist.

Zwar ist im Falle der Phosphatase-Aktivität die Wünschbarkeit einer solchen vergleichenden Untersuchung ebenso gross, wie die Zahl der zu deren Messung vorgeschlagenen Methoden. Die weitere Verfolgung dieser unterschiedlichen Puffereinflüsse und anderer Effektorenwirkungen hat aber nicht zuletzt den Zweck, weitere Anhaltspunkte zur Klärung des Aufbaues der Phosphatase zu gewinnen.

Experimenteller Teil.

1. Methodik.

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität von Nierenhomogenat erfolgte nach der bereits mitgeteilten Methode²⁾. Diese beruht auf folgendem Prinzip: Es wird diejenige Menge an anorganischem Phosphat³⁾ bestimmt, die durch das im fein suspendierten Nierengewebe vorhandene Enzym (Phospho-mono-esterase) innert 30 Minuten vom Substrat (Natrium- β -Glycerophosphat) abgespalten wird. Sofern nicht ausdrücklich anders vermerkt ist, sind die übrigen Reaktionsbedingungen dieselben, wie sie bei der Standardmethodik beschrieben worden sind; d. h. als Puffer Veronal-Natriumcarbonat/HCl-Puffer $\sim 0,05$ -m. nach *King* und *Delory*⁴⁾, $p_H = 9,2$; als Substrat Natrium- β -Glycerophosphat (Kodak) 0,5-proz. = 0,016-m.; Temp. = 38°; t = 30 Minuten; alle p_H wurden durchwegs bei 20° mittels Glaselektrode bestimmt. Zum Ansatz von 9 cm³ wurde 1 cm³ in Puffer suspendiertes verdünntes Gewebehomogenat zugesetzt. Die Verdünnung betrug bei Rattennieren und Pferdenieren 1:80, d. h. pro 1 cm³ (resp. Ansatz) 12,5 mg Frischgewebe⁵⁾. Die Angabe der verwendeten Konzentration an Magnesiumchlorid wurde nach dem Vorschlag von *Kay* als q_{Mg} angegeben, wobei q_{Mg} den negativen Logarithmus der auf Mg bezogenen Molarität bedeutet, meistens $q_{Mg} = 2,3 = 0,005$ -m. bezüglich Mg.

2. Zeitlicher Verlauf der Phosphatabspaltung mit und ohne Magnesiumzusatz in verschiedenen Puffergemischen.

Schon die Grösse des früher mitgeteilten Konversionsfaktors von ca. 0,63, der zur Ermöglichung von Vergleichen zwischen 30 und 60 Minuten dauernden Versuchen berechnet wurde, lässt den Schluss zu, dass die Zeit-Umsatzkurve — wenigstens unter jenen Versuchsbedingungen — eine relativ stark gekrümmte Kurve darstellt; dieser Faktor gibt das Verhältnis an zwischen abgespaltenem Phosphat nach 30 Minuten und abgespaltenem Phosphat nach 60 Minuten Versuchsdauer (z. B. 0,63:1,0).

Es hat sich nun gezeigt, dass die Grösse dieses Faktors von verschiedenen Versuchsbedingungen abhängt, und zwar in erster Linie vom Magnesiumzusatz, dann von der Art des verwendeten Puffers, vom p_H und der sich mit zunehmender Phosphatabspaltung immer stärker bemerkbar machenden Phosphathemmung. In Tabelle 1 sind die beobach-

¹⁾ *Physiol. Reviews* **12**, 384 (1932).

²⁾ *Helv.* **31**, 1761 (1948).

³⁾ P-Bestimmung nach *A. Bodansky* (loc. cit.); photometrische Bestimmung als Molybdänblau.

⁴⁾ *Enzymologia* **8**, 278 (1940).

⁵⁾ Wie bei *A. Bodansky* soll diejenige Menge Enzym als 1 Phosphatase-Einheit betrachtet werden, die (bezogen auf 1 g Frischgewebe) unter den gegebenen Versuchsbedingungen 1 mg Phosphor (als Phosphat) abspaltet.

teten Konversionsfaktoren, die über den Verlauf der Zeit-Umsatzkurve ($t = 0-60$ Minuten) Aufschluss geben, zusammengestellt. Bei fast linearem Kurvenverlauf nähert sich der Faktor dem Grenzwert 0,5; je mehr dagegen der Wert ansteigt, um so grösser ist die im Versuchsverlauf festzustellende Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit. Zur Ermittlung dieser Werte wurde das Ausmass der Substratspaltung bei den jeweiligen Versuchsbedingungen nach 0, 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten bestimmt.

Vergleicht man die Zeit-Umsatzkurven in 0,1-m. Veronal-Na, 0,1-m. $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ und 0,1-m. $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer jeweils ohne und mit optimalem Magnesium-Zusatz (MgCl_2) bei ihren p_H -Optima miteinander, so ergibt sich das in Fig. 1 dargestellte Bild.

Am Verlauf dieser Kurven fällt vor allem das von Puffer zu Puffer verschiedene und auch vom Zeitpunkt abhängige Ausmass der aktivierenden Wirkung des Magnesiums auf. Man beachte den nahezu linearen Kurvenverlauf bei der Mg-Aktivierung in Veronal-Na und in $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ -Puffer. Während bei diesen beiden Puffern ohne Mg-Zusatz die Spaltungsgeschwindigkeit anfangs nicht wesentlich geringer zu sein scheint, nimmt diese jedoch im Verlauf des Versuches relativ rasch ab. Im Gegensatz zum Verhalten in diesen beiden Puffern ist die aktivierende Wirkung des Mg-Zusatzes im 0,1-m. $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer in der Nähe von dessen p_H -Optimum nur sehr gering; bei längerer Versuchsdauer bewirkt der Zusatz sogar eine Hemmung.

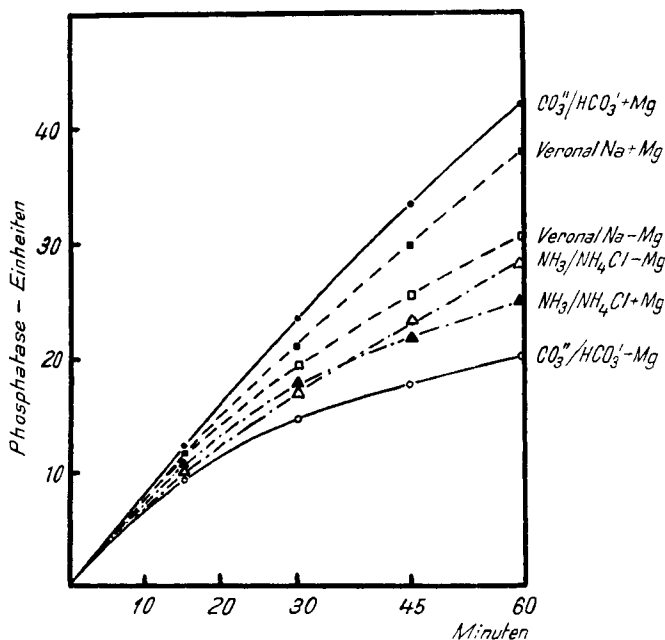


Fig. 1.

Zeit-Umsatzkurven der alkalischen Nieren-Phosphatase in verschiedenen Puffergemischen ohne (- Mg) und mit Zusatz (+ Mg) von MgCl_2 ($q_{\text{Mg}} = 2.3$) beim jeweiligen p_H -Optimum.

□ ■	= 0,1-m. Veronal-Na/HCl	$\text{p}_\text{H} = 9,25$	●	= mit Mg-Zusatz
○ ●	= 0,1-m. $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$	$\text{p}_\text{H} = 9,05$	○	= ohne Mg-Zusatz
△ ▲	= 0,1-m. $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{p}_\text{H} = 9,60$		

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, zeigen die Zeit-Umsatzkurven mit Mg-Zusatz — ausgenommen diejenige in $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ bei $\text{p}_\text{H} = 9,6$ — einen relativ geradlinigen Verlauf. Die geringe Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit in Veronal-Na- CO_3''/HCl -Puffer

+ MgCl₂ bei p_H = 8,6 lässt sich nun allein durch die Tatsache hinreichend erklären, dass die Substratkonzentration (S) nach der Zeit t nur noch (S-x) beträgt, vorausgesetzt, dass die Spaltungsgeschwindigkeit (k) in jedem Zeitpunkt der Reaktion zur jeweiligen Substratkonzentration proportional ist und die Enzymmenge (E) konstant bleibt.

Tabelle 1.

Abhängigkeit des Konversionsfaktors (Quotient aus P-Abspaltung in 30 Minuten: P-Abspaltung in 60 Minuten) vom Mg-Zusatz, der Art des Puffergemisches und dem p_H. Das Zeichen ↓ gibt an, in welchen Ansätzen das Auftreten einer Fällung beobachtet wurde.

Puffer	p _H	Q $\frac{30 \text{ Minuten}}{60 \text{ Minuten}}$							
		ohne Mg-Zusatz				mit Mg-Zusatz (q _{Mg} = 2,3)			
		Versuch No.							
		88	89	90	94	88	89	90	94
Veronal-Na-CO ₃ //HCl ~ 0,05-m.	8,6	0,59	0,60	0,57	0,55	0,52	0,53	0,53	0,51
	9,2	0,69	0,66	0,67	0,62	↓ 0,57	↓ 0,53	↓ 0,56	↓ 0,56
	9,6	0,64	—	0,64	—	↓ 0,55	—	↓ 0,54	—
		Versuch No.							
		91	95	96	98	91	95	96	98
CO ₃ //HCO ₃ ' 0,1-m. .	9,05	0,71	0,71	0,70	0,73	↓ 0,55	↓ 0,55	↓ 0,55	↓ 0,57
Veronal-Na 0,1-m. .	9,3	0,63	0,65	0,62	0,61	0,54	0,56	0,56	0,54
NH ₃ /NH ₄ Cl 0,1-m. .	9,6	0,59	0,58	0,57	—	↓ 0,71	↓ 0,70	↓ 0,68	—
		Versuch No.							
		99	100			99	100		
NH ₃ /NH ₄ Cl 0,1-m. .	9,1	0,55	0,53		0,58	0,54	0,53		0,54

Es wurde zu diesem Zweck die Zeit-Umsatzkurve — monomolekularen Verlauf bezüglich (S) annehmend — nach der Gleichung von *Wilhelmy*¹⁾ berechnet und aus diesen Kurven folgende Konversionsfaktoren

$$Q \frac{30 \text{ min}}{60 \text{ min}} \text{ abgelesen: } k \cdot (E) = \frac{1}{t} \cdot \log \left(\frac{S}{S-x} \right) \quad (1)$$

Bei einer Substratkonzentration von 0,5% = 0,016-m. zu Beginn des Versuches und bei einer Phosphatabspaltung entsprechend 200 γ P/30 Minuten ist Q 30/60 = 0,512 und bei einer solchen entsprechend 250 γ P/30 Minuten, Q 30/60 = 0,515. Daraus ist ersichtlich, dass der unter obigen Versuchsbedingungen beobachtete Kurvenverlauf allein durch die Abnahme der Substratkonzentration bedingt wird. Für diese Annahme spricht die Übereinstimmung der experimentell bestimmten Werte für Q 30/60 = 0,51—0,53 mit den auf Grund der Gleichung (1) berechneten Werten (Q = 0,51—0,52).

Mit den eingangs erwähnten Ausnahmen betragen alle andern bei Mg-Zusatz beobachteten Konversionsfaktoren 0,53—0,57. Für das weitere Ansteigen des Faktors um ca. 0,02—0,04 (von 0,52 auf 0,54—0,56) kommen zwei Ursachen in Frage. Wie aus Gleichung (1) zu ersehen ist, kann dieser Anstieg durch die Abnahme von (E) (= teilweise Inaktivierung des Enzyms) oder durch den Anstieg der Geschwindigkeitskonstante k im Sinne einer Reaktionsverlangsamung verursacht werden. Nimmt man die erste Möglichkeit als die wahrscheinlichere an — die Gründe hierfür sind unten diskutiert —, so be-

¹⁾ Zit. nach *Nord-Weidenhagen*, Handbuch der Enzymologie, Leipzig, 1940 (S. 255).

trägt die Abnahme der aktiven Enzymmenge von $t_1 = 30$ Minuten bis $t_2 = 60$ Minuten ca. 5—10%, sofern der nach (1) berechnete Kurvenverlauf einem Konversionsfaktor $Q_{30/60}$ von 0,54—0,56 entspricht (Werte im Experiment: $Q_{30/60} = 0,53—0,57$). Die Annahme einer Verminderung der aktiven Enzymmenge um 5—10% innert 30 Minuten steht mit den in Abschnitt 8 mitgeteilten Stabilitätsversuchen in Übereinstimmung.

Die ohne Mg-Zusatz resultierenden Zeit-Umsatzkurven weisen auf Grund ihres wesentlich höheren Konversionsfaktors auf eine weit bedeutendere Abnahme der aktiven Enzymkonzentration hin. In welchem Masse diese bedingt ist durch eine wahre Inaktivierung des Enzyms oder durch die Bindung als unwirksamer Enzym-Phosphatkomplex muss dahingestellt bleiben. Es sei hier lediglich darauf hingewiesen, dass die Abnahme der aktiven Enzymmenge (oder das Ansteigen der Reaktionskonstante) am ausgeprägtesten im 0,1-m. $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ -Puffer von *King* und *Delory* ist, während sie im $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer nicht grösser ist wie bei „Vollaktivierung“ mit Magnesium.

Diese Befunde geben nun auch eine Erklärung für das unterschiedliche Ausmass der aktivierenden Wirkung des Magnesiums bei Variierung der Versuchsdauer und Verwendung verschiedener Puffergemische, wenn man Magnesium weniger als Aktivator, denn als Stabilisator betrachtet. Sofern dies zutrifft, muss die Magnesium-Aktivierung mit der Versuchsdauer zunehmen und in jenem Puffergemisch am grössten sein, in welchem die schnellste Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit zu beobachten ist. Dass dies in der Tat der Fall ist, zeigt Tabelle 2. Die oben gemachten Feststellungen gelten zunächst nur für die Phosphatase-Aktivität von fein suspendiertem, frischem Nierengewebe.

Tabelle 2.

Aktivierende Wirkung des Magnesiums (MgCl_2) in Prozent bei variabler Versuchsdauer und verschiedenen Puffergemischen: Aktivität ohne Mg-Zusatz = 100%.

Art des Puffers	pH	Vers. No.	Versuchsdauer in Minuten				
			10	20	30	45	60
Veronal $\text{CO}_3^{''}/\text{HCl}$ ~ 0,05-m.	8,6	88	134,5%	143%	153,5%	164,5%	172,5%
		89	123,5	128	135	146	152,5
		90	122	123,5	129	138	141
		94	133	145,5	152	161	163,5
	9,2 (= opt.)	88	113	125,5	139,5	156	170
		89	112	128,5	144	167	183
		90	107,5	121,5	133	149	159
		94	119,5	124,5	139,5	148,5	154
$\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ 0,1-m.	9,05 (= opt.)	91	125	142,5	161	188	207,5
		95	130	144,5	161,5	188	213,5
		96	123,5	143,5	164	193	208,5
Veronal-Na 0,1-m.	9,3 (= opt.)	91	100	102	106	116	123
		95	103,5	110,5	117	128,5	134
		96	104	117	126	136,5	142
$\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ 0,1-m.	9,6 (= opt.)	91	105,5	105,5	103	94	86,5
		95	116	117	110	100,5	91,5
		96	115	115,5	109	100	92
	9,1	98	125	132,5	138,5	143,5	147,4
		99	140	127	137	141,5	137,5
		100	136,5	140	136	133	134,5

Während das Ausmass der aktivierenden Wirkung des Mg mit den gewählten Versuchsbedingungen beträchtlich variiert, zeigt der Grad der Aktivierbarkeit durch Mg bei derselben Methodik nur relativ geringe Unterschiede zwischen Gewebeproben (Niere) verschiedener Tiere, worauf bereits in der ersten Mitteilung (loc. cit.) hingewiesen worden ist.

3. Vergleich zweier zur Angabe der Phosphatase-Aktivität von Geweben oft verwendeter Einheiten. (a) „Ausbeute“: mg/Minuten; (b) „Umsatz“: Minuten⁻¹.

Es bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Angabe der phosphatatischen Wirksamkeit. Wie das bei den Phosphatase-Einheiten von *H. und E. Albers*¹⁾, *King* und *Armstrong*²⁾ und *A. Bodansky*³⁾ der Fall ist, bestimmt man diejenige Menge von anorganischem Phosphat (ausgedrückt in der äquivalenten Menge P oder P₂O₅), die während einer fest begrenzten Versuchsdauer durch eine bestimmte Menge von Gewebsextrakt oder gereinigtem Präparat abgespalten wird. Diese Menge wird dann z. B. auf 1 mg des Fermentpräparates bezogen und die pro Gewichtseinheit abgespaltene Anzahl γ oder mg-Phosphat gleich Einheiten Phosphatase gesetzt.

Mit diesem Verfahren, bei welchem gleichsam die „Ausbeute“ während einer gegebenen Zeit bestimmt wird, hat sich *O. Bodansky*⁴⁾ eingehend auseinandergesetzt. In Anlehnung an die bei anderen Fermenten geübte Methodik hat er eine andere Einheit⁵⁾ vorgeschlagen, die auf der Bestimmung des zur Erreichung eines bestimmten „Umsatzes“ benötigten Zeit beruht. Diese Einheit ist demzufolge definiert als reziproker Zeitwert, der erforderlich ist zur Abspaltung von z. B. 100 γ P pro Ansatz. Wäre der Verlauf der Zeit-Umsatzkurve unter den hier gewählten Versuchsbedingungen ein linearer, so würde zwischen der Zeit *t* resp. 1/*t* und der Menge von abgespaltenem P direkte Proportionalität bestehen. Wie aus Fig. 1 zu ersehen ist, trifft dies nun nicht zu und es erscheint gerechtfertigt, unter Verwendung des hier vorliegenden Untersuchungsmaterials die mit den beiden Methoden erhaltenen Resultate miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zwecke wurden je 12 Abbaukurven mit und ohne Mg-Zusatz unter den in Fig. 2 angegebenen Versuchsbedingungen nach beiden Gesichtspunkten verfolgt. Trägt man nun die für einen bestimmten Punkt der Abbaukurve erhaltenen Einheiten in ein Koordinatensystem ein, in welchem die Abszisse die Einheiten in 1/*t* = Minuten⁻¹, die Ordinate diejenigen in mg P angibt, so resultieren die in Fig. 2 dargestellten Beziehungen.

Während beide Einheiten bei den mit Mg-aktivierten Ansätzen genau dasselbe besagen (lineare Funktion, d. h. Proportionalität im gesamten, beobachteten Bereich), ist bei den ohne Mg-Zusatz ausgeführten Versuchen eine mit steigender Phosphatase-Aktivität zunehmende Verzerrung der Skala zu beobachten. Diese ist im 10 Minuten dauernden resp. bis zur Spaltung von 100 γ P im Ansatz gehenden Versuch gering. Auch bei der hier üblichen Versuchsdauer von 30 Minuten ist die zu beobachtende Abweichung bis zu ca. 15 Phosphatase-Einheiten/30 Minuten nicht gross. Erst bei einer Phosphatase-Aktivität von 18 Einheiten/30 Minuten übersteigt sie 10%.

Da in der hier gewählten Versuchsmethodik die gemessenen Phosphatase-Aktivitäten von Nierengewebe (Ratte) meist 10–18, höchstens aber 20 Phosphatase-Einheiten/30 Minuten betragen, darf dieses einfachere Verfahren der Messung der Ausbeute nach bestimmter Zeit, das von *A. Bodansky* übernommen wurde, ohne Bedenken verwendet werden, wenn es sich darum handelt, die Phosphatase-Aktivitäten von Gewebeproben verschiedener Tiere und Organe miteinander zu vergleichen. Dies ändert indessen nichts an der Tatsache, dass die Einheit von *O. Bodansky* den Erfordernissen der Kinetik der Phos-

1) Z. physiol. Ch. **232**, 165 (1935).

2) Canad. Med. Ass. **31**, 376 (1934).

3) J. Biol. Chem. **101**, 93 (1933).

4) J. Biol. Chem. **101**, 641 (1933); **120**, 555 (1937).

5) Reziproker Wert derjenigen Zeit in Minuten, die zur Abspaltung von 0,05 mg P (als Phosphat) im Ansatz bei 24° in Veronalpuffer beim p_H-Optimum erforderlich ist.

phatase besser gerecht wird, weil hier die Spaltung immer bis zum gleichen Punkt beobachtet wird. Die durch die Phosphatanhäufung bedingte Reaktionsverzögerung ist daher in allen Fällen gleich gross. In praktischer Hinsicht ist jedoch der Nachteil dieser Methodik der, dass nicht nur eine Doppelbestimmung, sondern eine ganze Abbaukurve aufgenommen werden muss.

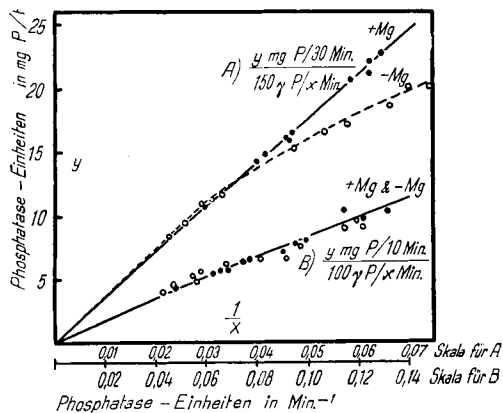


Fig. 2.

Fig. 2. Vergleich der Phosphatase-Einheit von *A. Bodansky* (Ausbeute) mit derjenigen von *O. Bodansky* (Umsatz). Darstellung der hier übernommenen Einheit von *A. Bodansky*¹⁾ als Funktion derjenigen von *O. Bodansky*²⁾. Enzym: Homogenat von Nierenfrischgewebe; 12,5 mg/Ansatz. Substrat: 0,5-proz. Na-β-Glycerophosphat. Puffer: Veronal-Na-Carbonat/HCl ~ 0,05-m. nach *Delory* und *King* (loc. cit.). Temp. 38°.

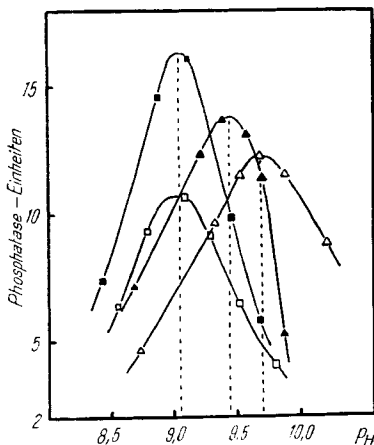


Fig. 3.

Fig. 3. p_H-Wirkungskurven der Nierenphosphatase mit und ohne Zusatz von MgCl₂ (q_{Mg} = 2,3) im 0,1-m. CO₃''/HCO₃'-Puffer und im 0,1-m. NH₃/NH₄Cl-Puffer.

- CO₃''/HCO₃'-Puffer 0,1-m. ohne Mg-Zusatz ○
- CO₃''/HCO₃'-Puffer 0,1-m. + MgCl₂ (q_{Mg} = 2,3) ■
- NH₃/NH₄Cl-Puffer 0,1-m. ohne Mg-Zusatz △
- NH₃/NH₄Cl-Puffer 0,1-m. + MgCl₂ (q_{Mg} = 2,3) ▲

4. Die aktivierende Wirkung des Magnesiums in Abhängigkeit von der Art des Puffers und des p_H.

Bei der Weiterführung der Versuche über die Abhängigkeit des p_H-Wirkungskurvenverlaufs vom Puffer konnte beobachtet werden, dass die Effektorenwirkung des Magnesiums nicht nur in Veronal CO₃''/HCl und in Veronal-Na-Lösung, sondern auch beim 0,1-m. CO₃''/HCO₃'-Puffer in jedem Kurvenbereich ungefähr gleichartig ist. Wie schon aus Tabelle 2 zu ersehen ist, wirkt derselbe Mg-Zusatz bei Verwendung des besonders von der deutschen Schule gebrauchten NH₃/NH₄Cl-Puffers im 30-Minuten-Versuch nur noch wenig aktivierend. Fig. 3 zeigt die p_H-Wirkungskurven der gleichen Portion von Nieren-

¹⁾ Phosphatase-Einheiten = Anzahl mg P (als Phosphat), die innert 30 Minuten unter den gegebenen Versuchsbedingungen abgespalten werden, bezogen auf 1 g Frischgewebe.

²⁾ Reziproker Wert derjenigen Zeit in Minuten, die zur Abspaltung von z. B. 0,05 mg P (als Phosphat) im Ansatz in Veronalpuffer beim p_H-Optimum erforderlich ist.

homogenat ohne und mit optimalem Mg-Zusatz ($q_{Mg} = 2,3$) in den beiden Puffergemischen. Im CO_3''/HCO_3' -Puffer resultiert bei Mg-Zusatz eine Aktivitätssteigerung um ca. 60% ohne nennenswerte Verschiebung des p_H -Optimums (9,05–9,1). Im NH_3/NH_4Cl -Puffer beträgt die Erhöhung der Phosphatase-Aktivität nur ca. 10%, dagegen resultiert eine Verschiebung des p_H -Optimums von 9,7 auf 9,4. Vor allem beim NH_3/NH_4Cl -Puffer fällt die Steilheit des alkalischen Kurvenschenkels bei „Vollaktivierung“ auf.

Mit 0,05- und 0,1-m. Glycocoll/NaOH-Gemisch ausgeführte Versuche zeigen ein analoges Ergebnis, wie das mit NH_3/NH_4Cl -Puffer erhaltene. (Aktivitätszunahme um ca. 8%; Verschiebung des p_H -Optimums von 9,4 nach 9,15.)

5. Einfluss des Magnesiums auf den Verlauf der p_S -Kurve der Nierenphosphatase (in Veronal-Carbonat/HCl-Puffer).

Zur Beurteilung der Bindungsverhältnisse zwischen Enzym und Substrat bedient man sich mit Vorteil der p_S -Kurve, durch welche die Beziehung zwischen Spaltungsgeschwindigkeit und dem Logarithmus der Substratkonzentration dargestellt wird. Ausgehend von der Voraussetzung, dass die Spaltungsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration der sich intermediär bildenden und wieder zerfallenden Enzym-Substrat-Verbindung [ES] ist, wurde der Begriff der Dissoziationskonstante auf enzymatische Vorgänge übertragen¹⁾. Auf Grund des Verlaufs der p_S -Kurve lässt sich nun die Dissoziationskonstante = K_s bestimmen, indem K_s gleich der Substratkonzentration [S] wird, wenn $[E] = [ES]$, d. h. die Dissoziationskonstante gibt diejenige Substratkonzentration an, bei welcher das Enzym [E] nur zur Hälfte an das Substrat gebunden ist (Gleichung 2). Die Bestimmung von K_s erfolgt am einfachsten nach dem von *Lineweaver* und *Burk*²⁾ vorgeschlagenen Verfahren, bei welchem $1/v$ als Funktion von $1/s$ dargestellt wird (Gleichung 3). Der Schnittpunkt der resultierenden Geraden mit der Ordinate ergibt $1:V_{max}$ (V bei $(S) \rightarrow \infty$) und der Punkt, bei welchem $y = 2 \cdot (1/V_{max})$, erlaubt ein direktes Ablesen von $1/s$, das unter dieser Bedingung auch zugleich $1/K_s$ darstellt.

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_s; \text{ sofern } [E] = [ES]; [S] = K_s \quad (2)$$

$$\frac{1}{\bar{V}} = \frac{K_s}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[s]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

Es soll zunächst unberücksichtigt bleiben, ob die so ermittelte Grösse dem wahren Wert von K_s entspricht, oder ob es sich z. B. infolge einer im Versuch aufgetretenen Verdrängungshemmung (Competitive Inhibition) um einen scheinbaren Wert von K_s' handelt. Der reziproke Wert von K_s gilt als Mass für die Affinität zwischen Ferment und Enzym und wird als Affinitätskonstante bezeichnet.

Im Mittel aus je 6 p_S -Kurven wurde K_s resp. K_s' der Nierenphosphatase in Veronal- CO_3''/HCl -Puffer ohne Mg-Zusatz zu $K_s' = 0,0050$ Mol/l und mit $q_{Mg} = 2,3$ zu $K_s' = 0,0055$ Mol/l ermittelt. ($T = 38^\circ C$; $t = 30$ Minuten; Abspaltung von 150–200 γ P pro Ansatz.) Fig. 4 ergibt einen solchen Versuch wieder. Es ist daraus ersichtlich, dass die beiden K_s' -Werte wenig voneinander abweichen, dass aber die beobachtete Maximalgeschwindigkeit der Phosphatabspaltung mit Mg-Zusatz viel grösser ist als ohne Zusatz. Diese beiden Anhaltspunkte berechtigen zur Vermutung, dass die geringere Aktivität ohne Mg-Zusatz nicht auf irgendeiner Verdrängung (= Konkurrenz) -Hemmung beruht, sondern dass die Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substratkomplexes eine geringere ist, oder dass weniger Enzym in seiner wirksamen Form vorliegt. Am Kurvenverlauf fällt indessen auch auf, dass bei hoher Substratkonzentration ein Wiederabsinken der Fermentaktivität festzustellen ist, sofern kein Mg zugesetzt wird.

Zur Gewinnung übersichtlicher Verhältnisse ist nun in allen Versuchen die bestimmte V_{max} (theoretisch V bei $(S) \rightarrow \infty$) = 1,0 gesetzt worden, ohne die beobachtete Hemmung bei hoher Substratkonzentration zunächst zu berücksichtigen. Die Betrachtung

¹⁾ R. Kuhn, Bioch. Z. **125**, 1 und 28 (1923).

²⁾ Am. Soc. **56**, 658 (1934).

der relativen Geschwindigkeiten (verglichen mit $V_{\max} = 1,0$) ermöglichte nun die p_S -Kurven aus den verschiedenen Versuchen miteinander weitgehend zur Deckung zu bringen und die den Mittelwerten entsprechenden p_S -Kurven mit und ohne Mg-Zusatz zu berechnen (Fig. 5 und 6). Während nun die bei Vollaktivierung mit Mg resultierende p_S -Kurve den regulären Verlauf einer Dissoziationskurve zeigt, der durch die Lage des Wendepunktes ($= K_s'$) bestimmt wird, muss bei der ohne Mg-Zusatz resultierenden Kurve die hemmende Wirkung der hohen Substratkonzentration, die sog. Überschusshemmung berücksichtigt werden. Es sei hier vorweggenommen, dass diese bei den Phosphatasen erstmals von *Folley und Kay*¹⁾ beobachtete Erscheinung der Bildung einer nicht oder kaum aktiven Enzym-Substratverbindung der Zusammensetzung ES_2 zugeschrieben wird.

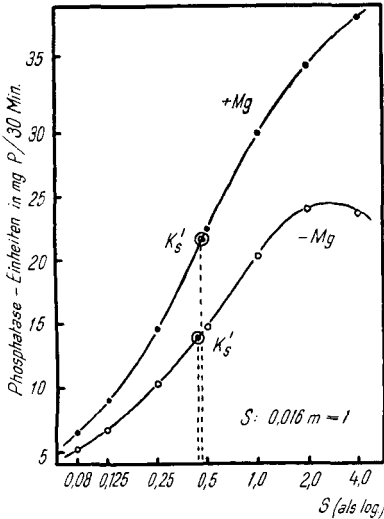


Fig. 4.

Fig. 4. p_S -Kurven der Nierenphosphatase ohne und mit Zusatz von Magnesium ($MgCl_2$; $q_{Mg} = 2,3$). 12,5 mg Nierenhomogenat pro Ansatz; $[S] = 0,001 - 0,64 m$. Na- β -Glycerophosphat; Veronal CO_3''/HCl -Puffer; 30 Minuten bei 38° ; $p_H = 9,2$.

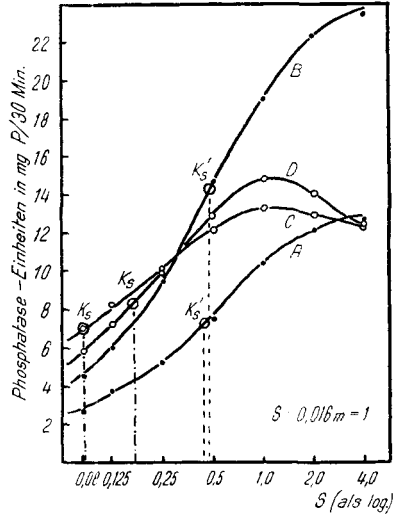


Fig. 7.

Fig. 7. Verlauf der p_S -Kurven der Nierenphosphatase in 0,1-m. CO_3''/HCO_3' und NH_3/NH_4Cl ohne und mit Magnesiumzusatz beim jeweiligen p_H -Optimum.

- | | |
|--|----------------|
| a) 0,1-m. CO_3''/HCO_3' -Puffer ohne Mg-Zusatz | } $p_H = 9,05$ |
| b) 0,1-m. CO_3''/HCO_3' -Puffer mit Mg, $q_{Mg} = 2,3$ | |
| c) 0,1-m. NH_3/NH_4Cl -Puffer ohne Mg-Zusatz | $p_H = 9,70$ |
| d) 0,1-m. NH_3/NH_4Cl -Puffer mit Mg, $q_{Mg} = 2,3$ | $p_H = 9,45$ |

In diesem Falle wird nun der Kurvenverlauf nicht nur durch die Dissoziationskonstante K_s (K_s') der Enzym-Substratverbindung bestimmt, sondern auch durch den Wert von K_2 , der Dissoziationskonstante der Verbindung ES_2 . Der resultierende Kurvenverlauf genügt folgender Gleichung (4)²⁾:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_s + \frac{[S]^2}{K_2}} \quad (4)$$

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{[S]}{K_2}} \quad (5)$$

¹⁾ Biochem. J. **29**, 1837 (1935).

²⁾ Haldane, Enzymes (London, 1930), zit. nach Lineweaver-Burk.

Beträgt, wie unten gezeigt werden soll, $n = 2$ und kürzt man durch $[S]$, so erhält man Gleichung (5). Diese Beziehung lässt sich nach *Lineweaver-Burk* (loc. cit.) als Gerade darstellen, welche eine planimetrische Bestimmung von K_2 und n zulässt. Die zu konstruierende Gerade genügt der Gleichung (6):

$$\log \left(\frac{[S]}{V} - \frac{K_s}{V_{\max}} - \frac{[S]}{V_{\max}} \right) = n \cdot \log [S] - \log K_2 \cdot V_{\max} \quad (6)$$

Wählt man — wie hier — $V_{\max} = 1,0$ (= 100%), so lässt sich die Bestimmung in einfacher Weise durchführen. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ergibt $-\log K_2$ und die Steigung entspricht n . In Übereinstimmung mit *Folley* und *Kay* wurde K_2 zu $n \sim 2$ gefunden.

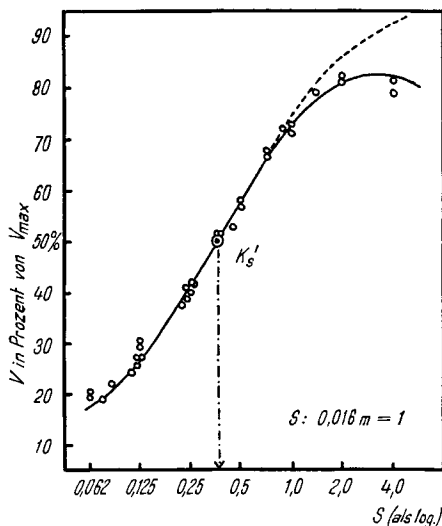


Fig. 5.

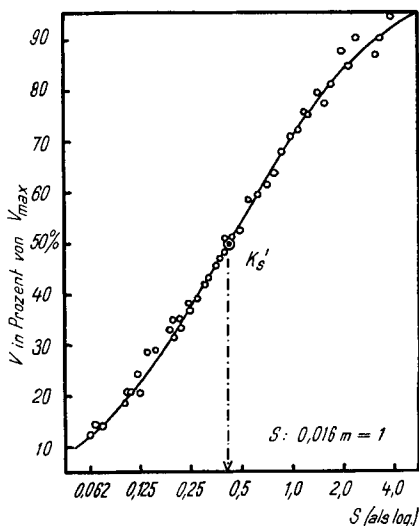


Fig. 6.

Vergleich zwischen theoretischem Kurvenverlauf und experimentellen Werten bei der p_S -Kurve der Nierenphosphatase ohne Mg-Zusatz (Fig. 5) und mit $MgCl_2$, $q_{Mg} = 2,3$ (Fig. 6), beide in Veronal-Carbonat/HCl-Puffer. Beobachtete Spaltungsgeschwindigkeiten ausgedrückt in Prozenten der nach *Lineweaver* und *Burk* (loc. cit.) bestimmten maximalen Spaltungsgeschwindigkeit ($V_{\max} = 100\% = 1,0$).

Aus Fig. 5 und Fig. 6, in welchen die berechneten Kurven mit den experimentell erhaltenen Werten verglichen worden sind, lassen sich die folgenden Daten ablesen: Aus der p_S -Kurve der Nierenphosphatase (Substrat: Na- β -Glycerophosphat; Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffer von *Delory* und *King*) ohne Mg-Zusatz: $K_s' = 0,0050$ Mol/l; $K_2 \sim 0,5$ (0,3–0,8) Mol/l; $n \sim 2$; aus der p_S -Kurve mit optimalem Mg-Zusatz ($q = 2,3$): $K_s' = 0,0055$ Mol/l; $K_2 = \infty$. Aus diesen Daten wie auch aus Fig. 5 und 6 ist ersichtlich, dass bei optimalem Mg-Zusatz im gesamten untersuchten Bereich keine Abweichung vom theoretischen Kurvenverlauf zu beobachten ist. $K_2 = \infty$, resp. dessen reziproker Wert, die Affinitätskonstante = 0, zeigen, dass bei $q_{Mg} = 2,3$ keine Neigung zur Bildung von ES_2 besteht. Ohne Mg-Zusatz hingegen beträgt K_2 ungefähr das Hundertfache von K_s' , d. h. die Affinität von $ES + S \rightleftharpoons ES_2$ ist etwa 100-mal kleiner, wie diejenige von $E + S \rightleftharpoons ES$.

Es ist noch hinzuzufügen, dass kurze Dialyse (14 Stunden gegen strömendes Leitungswasser, 4 Stunden gegen aq. dest. bei 10^0) keine nennenswerte Änderung im Verlauf der p_S -Kurven zeitigte.

5. Verhalten der Dissoziationskonstante der Enzym-Substratverbindung (K_s resp. K_s') in verschiedenen Puffergemischen.

Der oben gemachte Vorbehalt bezüglich K_s erweist sich als berechtigt, wenn man den Verlauf der p_s -Kurven in verschiedenen Puffergemischen verfolgt. Zur Veranschaulichung des Verhaltens von K_s seien wiederum die beiden diametral verschiedenen Puffergemische 0,1-m. $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ und 0,1-m. $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ gewählt. Die resultierenden p_s -Kurven sind in Fig. 7 dargestellt, in welcher auch die im Diagramm $x = 1/s$, $y = 1/v$ bestimmten scheinbaren Dissoziationskonstanten K_s' eingetragen sind. Wie zu erwarten, bewirkt der Zusatz von aktivierendem MgCl_2 keine nennenswerte Änderung von K_s' ; die Tatsache hingegen, dass K_s' in $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ -Puffer ohne Mg -Zusatz ($K_s' = 0,0070$) ca. 4-mal grösser ist als in $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer ($K_s' = 0,0018$) lässt schliessen, dass die Dissoziation des Enzym-Substratkomplexes in $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ gehemmt wird. Diese Annahme wird durch die (unter 7) mitgeteilten Versuche bestätigt.

Da K_s' in 0,05-m. Veronal-Na ($p_H = 9,3$), wie auch in $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer verschiedener Stärke ($p_H = 9,6$) übereinstimmend zu $K_s = 0,0018$ (0,0023—0,0014) bestimmt wurde, ist dieser Wert als K_s zu betrachten. Im Gegensatz dazu nimmt K_s' mit zunehmender Konzentration von $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ -Ionen im Puffergemisch zu, wie Tabelle 3 zeigt.

Tabelle 3.

Beobachtete Dissoziationskonstante von (ES) der Nierenphosphatase (K_s') in verschiedenen Puffergemischen beim betreffenden p_H -Optimum. (Abspaltung von 150—200 γ P pro Ansatz zu 10 cm^3); Mittelwerte von 3—5 Bestimmungen.

Puffer	p_H	$K_s' =$	
		ohne Mg-Zusatz	mit MgCl_2 ($q_{\text{Mg}} = 2,3$)
Veronal- CO_3''/HCl 0,05-m..	9,2	0,0050 Mol/l (0,0045—0,0059)	0,0055 Mol/l (0,0044—0,0069)
Veronal-Na 0,05-m.	9,2	0,0020 (nur 1 Best.)	—
NH_3 - NH_4Cl 0,1-m.	9,6	0,0018 (0,0014—0,0023)	0,0025 (0,0021—0,0029)
$\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ 0,1-m.	9,1	0,0072 (0,0067—0,0094)	0,0060 (0,0052—0,0071)

Da nun der Wert K_s' nur durch verdrängend wirkende Hemmkörper eine Veränderung erfährt, gilt hier die Gleichung (7):

$$K_s' = K_s + \left(\frac{K_s \cdot I}{K_I} \right) \quad (7)$$

Diese Gleichung besagt, dass die beobachtete Grösse von K_s' sich bei Gegenwart eines „Competitive Inhibitors“ zusammensetzt aus der Summe von K_s , der wahren Dissoziationskonstante, und einem Korrekturfaktor, dessen Grösse mit steigender Hemmkörperkonzentration zunimmt. Da nun K_s' , die scheinbare Dissoziationskonstante; I, die molare Konzentration des Inhibitors und auch K_s bekannt sind, lässt sich K_I , die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor- (hier: $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$) Komplexes berechnen. Da obige Gleichung in der Form $y = mx + b$ vorliegt, geschieht dies am einfachsten planimetrisch. Wird K_s' als Funktion von (I) dargestellt (Fig. 8), so stellt die Steigung der Geraden den Wert $K_s:K_I$ dar. K_I wird nun gleich I, wenn $K_s' = 2 K_s$ ist. K_I , die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitorkomplexes, beträgt nun hier $K_I = 0,035$ Mol (—Mg) resp. $K_I = 0,070$ Mol ($q_{\text{Mg}} = 2,3$) $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ -Ionen/l. Andererseits bestätigt der Schnittpunkt der Ordinate mit der Geraden den angenommenen Wert von $K_s = 0,0018$

(ohne Mg-Zusatz) resp. $K_s = 0,0025$ (mit Mg; $q_{Mg} = 2,3$). Diese Werte stimmen mit den Literaturangaben gut überein¹).

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Grösse von K_s' bei sonst gleich bleibenden Versuchsbedingungen von der im Ansatz abgespaltenen Menge anorganischem Phosphat abhängt, konnte gezeigt werden, dass auch das Spaltprodukt Phosphat mit dem Substrat um das Enzym konkurriert. Die festzustellenden geringen seitlichen Verschiebungen der mit verschiedenen aktiven Gewebsproben erhaltenen p_s -Kurven sind schon dann merklich, wenn nur schon 150–200 γ von anorganischem Phosphat im Ansatz abgespalten werden. Dies begründet die Forderung, dass der Spaltungsgrad in den Versuchsansätzen immer in der gleichen Grösse gehalten werden soll. Fig. 9 zeigt K_s' in Abhängigkeit des Spaltungsausmasses des zugesetzten Substrats. Bei der erstmals eingehend von *Jacobsen*²) untersuchten Phosphathemmung handelt es sich somit vorwiegend um eine Konkurrenzhemmung.

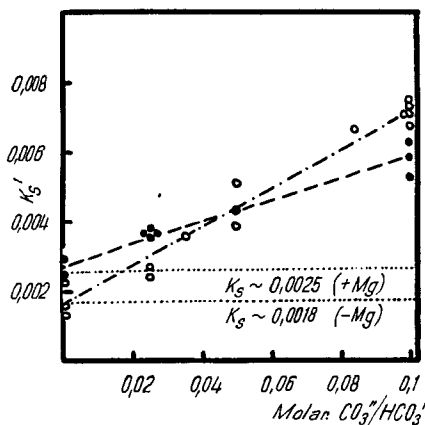


Fig. 8.

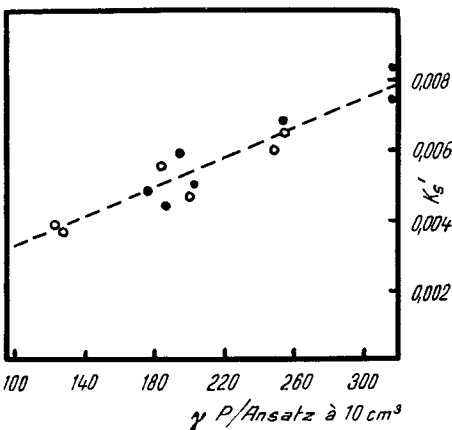


Fig. 9.

Die Abhängigkeit der beobachteten „scheinbaren“ Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) von der Carbonat-Hydrogencarbonat-Konzentration des Puffers (Fig. 8) und von der im Versuch abgespaltenen Phosphatmenge (Fig. 9). In Fig. 8 wurde die Phosphatabspaltung annähernd konstant gehalten (=150–200 γ P/Ansatz); in Fig. 9 ist durchwegs Veronal-Na-CO₃"/HCl-Puffer $\sim 0,05$ m. verwendet worden. Enzym: Homogenat von Nierenfrischgewebe, 12,5 mg/Ansatz; Substrat Na- β -Glycerophosphat. Die in Fig. 9 dargestellten Ergebnisse weisen auf eine Abhängigkeit von K_s' vom Ausmass der im Versuchsansatz erfolgten Substratspaltung hin, erlauben aber keine Bestimmung von K_I .

¹) K_s wurde von *O. Bodansky* (J. Biol. Chem. **165**, 605 (1946)) zu $K_s = 0,0019$ (Knochenphosphatase der Ratte) resp. $K_s = 0,0029$ (Darmphosphatase der Ratte) bestimmt. *Martland* und *Robison* (Biochem. J. **21**, 665 (1927)) erhielten $K_s = 0,0030$ für die Knochenphosphatase. *Delory* und *King* (Biochem. J. **37**, 547 (1943)) ermittelten $K_s = 0,0012$ bei einem gereinigten Präparat aus Hundefaeces. Diese Daten beziehen sich alle auf Messungen in der Nähe des p_H -Optimums unter Verwendung von Na- β -Glycerophosphat als Substrat. Die mit Phenylphosphat erhaltenen Daten sind niedriger ($K_s = 0,0006$ (*Delory* und *King*; loc. cit.) resp. $K_s = 0,0009$ (*Folley* und *Kay*; loc. cit.)) entsprechend der grösseren Affinität dieses Substrats zum Enzym.

²) Bioch. Z. **249**, 21 (1932); **267**, 89 (1933).

7. Analyse der Hemmung der Phosphatase-Aktivität durch $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ Ionen resp. Ionen des $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffers.

In 6. ist bereits vorweg genommen worden, dass die scheinbare Dissoziationskonstante der ES-Verbindung (K_s') um so grösser wird, je mehr $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ im Puffer vorhanden ist. Damit ist bereits gesagt, dass es sich bei der kürzlich mitgeteilten Hemmung der Phosphatase-Aktivität von homogenisiertem, frischem Nierengewebe durch $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ um eine typische Konkurrenzhemmung handelt. Diese Feststellung ist um so wichtiger, als in den Mitteilungen von *King* und *Delory*¹⁾ — welche diese $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ -haltigen Puffer für Phosphatasestudien empfohlen haben — davon nicht die Rede ist. Fig. 10 veranschaulicht diesen Hemmungsmechanismus. Es kann aus den seitlich gegeneinander verschobenen p_s -Kurven abgelesen werden, dass eine durch Verdoppelung der $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ -Konzentration hervorgerufene Aktivitätsabnahme, durch Verdoppelung der Substratkonzentration wieder beseitigt werden kann. Bei gleichbleibendem Verhältnis zwischen Substrat und Hemmkörper erfährt die Phosphatase-Aktivität fast keine Änderung.

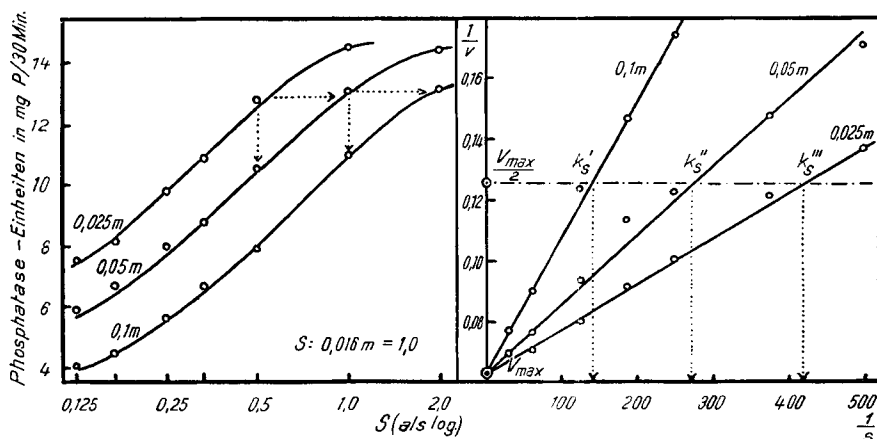


Fig. 10a.

Fig. 10b.

Fig. 10a: Konkurrenzhemmung der alkalischen Nierenphosphatase durch $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$; p_s -Kurven der gleichen Extraktportion in $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3'$ -Puffer verschiedener Stärke (A: 0,025-m.; B: 0,05-m.; C: 0,1-m.).

Fig. 10b: Darstellung der gleichen Kurven in Form der Beziehung $1/v = 1/s$ zur Bestimmung von V_{\max} und K_s' . ($V_{\max} = 15,9$ mg P/30 min; $K_s^I = 0,0024$ resp. $0,0037$ resp. $0,0070$ Mol/l).

Fig. 10b zeigt, dass der Grenzwert der maximalen Spaltungsgeschwindigkeit ($V_{\max} = V$ bei sehr grosser Substratkonzentration) derselbe ist, während K_s' mit (I) zunimmt. Dies besagt, dass die Affinität zwischen Ferment und Substrat infolge Konkurrenz abnimmt.

Ganz im Gegensatz hierzu ist nun bei der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer verschiedener Konzentration keine Änderung von K_s zu beobachten ($K_s =$ z. B. $0,0023$ Mol/l), während V_{\max} mit zunehmender Ionenstärke des Puffers abnimmt (z. B. 21,7; 20,0; 16,9 mg P/30 Minuten). Diese Daten belegen die Tatsache, dass es sich hierbei um eine gewöhnliche Hemmung (non-competitive inhibition) handelt. Der in Fig. 10 wiedergegebene Versuch wurde ohne Mg Zusatz ausgeführt. Wenn auch bei Zusatz von Mg geringe Abweichungen zu beobachten sind, ändern diese nichts am vorherrschenden Typus der Hemmung (vgl. Resultate in Tabelle 3).

¹⁾ *Enzymologia* **8**, 278 (1940, resp. *Biochem. J.* **39**, 245 (1945).

8. Die Stabilität der Nierenphosphatase in verschiedenen Puffergemischen.

Die Tatsache, dass das resultierende p_H -Optimum der alkalischen Nierenphosphatase beim gleichen Fermentpräparat und demselben Substrat von der Versuchsdauer abhängt, führte *Kay*¹⁾ zum Schluss, dass die p_H -Aktivitätskurve die Resultante sei aus der nach der alkalischen Seite ansteigenden Aktivitätskurve im eigentlichen Sinn und der nach der alkalischen Seite fallenden Stabilitätskurve des Fermentes, ohne dabei die Dissoziationsverhältnisse zu berücksichtigen. Diese beiden Qualitäten machen sich bei variabler Versuchsdauer in unterschiedlicher Weise geltend; das resultierende p_H -Optimum ist dann ein Mass für den Quotienten dieser beiden sich gegensätzlich verhaltenden Faktoren. Die in der ersten Mitteilung beschriebene, teilweise beträchtliche Abhängigkeit des p_H -Optimums von der Art des Puffers wurde in analoger Weise, wie dies *Kay* getan hat, zu erklären versucht.

Diese Vermutung, dass die Phosphatase in den verschiedenen Puffergemischen eine unterschiedliche Stabilität aufweist, konnte inzwischen, wie Fig. 11 zeigt, experimentell belegt werden. Das hier wiedergegebene Versuchsergebnis wurde in folgender Weise erhalten: Durch gutes Verreiben von zerkleinerten Gewebsstücken aus der Rindenpartie einer frischen Pferdeniere (+ aq. dest.) mit Quarzsand und nachfolgendem kurzem Abzentrifugieren wurde ein wässriger Nierenextrakt gewonnen (1 cm³ entspr. 125 mg Frischgewebe = 1:8). Von diesem wurden nun je 10 cm³ zu einer Anzahl von je 40 cm³ Pufferlösung von verschiedenem p_H enthaltenden grossen Reagensgläsern gegeben; das p_H dieser Ansätze wurde nach sorgfältigem Mischen mittels Glaselektrode bei 20° nachgeprüft; nach Verschliessen der Gefässe mit einem Stopfen wurden diese in den Thermostaten von 38° gestellt und genau 2 Stunden darin belassen (25 mg Frischgewebe pro 1 cm³). Es wurden total 25 Ansätze in dieser Weise behandelt: ein Kontrollversuch in Wasser, p_H auf 7,3 eingestellt und 3 aus je 8 Proben bestehende Serien, enthaltend 0,1-m. CO₃''/HCO₃'-Puffer, 0,1-m. Veronal-Na und 0,1-m. NH₃/NH₄Cl-Puffer, deren p_H sich über einen Intervall von $p_H = 8,0$ bis 10,6 erstreckte.

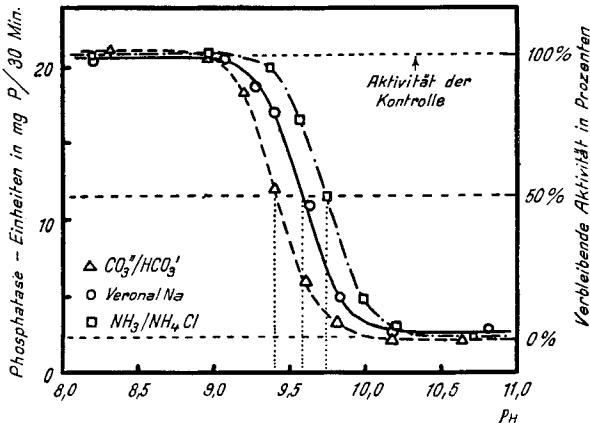


Fig. 11.

Die Stabilität der alkalischen Nierenphosphatase in CO₃''/HCO₃'-, Veronal-Na-, NH₃/NH₄Cl-Puffer je 0,1-m. Aufbewahrung der verdünnten Gewebesuspension in diesen Puffergemischen während 2 Stunden bei 38° und variablem p_H .

Nach Ablauf von 2 Stunden wurde ein jeder Ansatz für sich herausgenommen, in Eiswasser bis auf 20° abgekühlt und das p_H des Ansatzes kontrolliert. Die beobachtete p_H -Differenz überschritt in den meisten Fällen den Wert von 0,08 nicht. Nun wurden

¹⁾ *Physiol. Reviews* **12**, 384 (1932).

10 cm³ eines jeden Ansatzes sofort in 10 cm³ Veronal-Na-CO₃''/HCl-Puffer pipettiert und das Gemisch durch tropfenweisen Zusatz von n.HCl oder NaOH auf ein p_H von 9,2 gebracht, gut gemischt und dann 1 cm³ dieser dadurch auf 1:80 verdünnten gepufferten Gewebssuspension (12,5 mg Frischgewebe pro 1 cm³) in die vorgewärmte Substrat-Puffer-Lösung pipetiert. Der weitere Gang der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität folgt der beschriebenen Methodik.

Das Ergebnis des Kontrollversuches stimmt mit den in den Puffern von niedrigem p_H erhaltenen Werten vollständig überein. Der Blindwert wurde ermittelt, indem Substrat-Pufferlösung und Gewebesuspension separat 30 Minuten bei 38° gehalten wurden und nach Zusatz von 1 cm³ der letzteren zur Substrat-Pufferlösung die Trichloressigsäure sofort zugesetzt wurde. Die in drei verschiedenen Versuchen ermittelten p_H-Werte, bei welchen die Aktivität noch 50% beträgt, zeigen gute Übereinstimmung (Tabelle 4).

Da auch der zeitliche Reaktionsablauf der Fermentinaktivierung interessierte, wurde die Versuchsdauer variiert. Die im 30-Minuten-Versuch erhaltenen Kurven besagen dasselbe und sind nur wenig nach rechts verschoben, diejenigen im 14-Stunden-Versuch etwas nach links. Darüber gibt Tabelle 4 Aufschluss. Als Anhaltspunkt für die Stabilität ist die Anzahl Prozent angegeben, um welche die Fermentaktivität unter den gegebenen Versuchsbedingungen abnimmt, sowie das p_H, bei welchem eine Abnahme auf genau die Hälfte zu beobachten ist. (Analogie: Halbwertszeit.) Es ist daraus zu ersehen, dass sich bei einem bestimmten p_H die Aktivitätsabnahme bereits nach 30 Minuten Verweildauer dem Endwert nähert. Das anfänglich sehr rasche Absinken der Phosphatase-Aktivität, die nachher nur noch sehr wenig ändert, weist darauf hin, dass es sich um das Einstellen eines Gleichgewichtes handelt, das aber in den verschiedenen Puffern anders beschaffen ist.

Tabelle 4.

p_H-Werte, bei welchen eine Aktivitätsabnahme der Gewebephosphatase um 50% erfolgt (A), resp. prozentuale Aktivitätsabnahme der Phosphatase bei p_H 9,0, 9,5 und 10,0 (B). Temp. = 38°. Methodik siehe Text.

Puffer	A			B			
	30 Min.	Verweildauer		p _H	Verweildauer		
		2 Stunden	14 Std.		30 Min.	2 Std.	14 Std.
CO ₃ ''/HCO ₃ ' 0,1-m.	p _H 9,51	9,40	9,28	9,0	98%	97%	71%
		9,41		9,5	50%	38%	33%
		9,46		10,0	14%	4%	2%
Veronal-Na 0,1-m.	—	9,58	—	9,0	—	100%	—
		9,60		9,5	—	67%	—
		9,60		10,0	—	7%	—
NH ₃ /NH ₄ Cl 0,1-m.	9,87	9,73	9,60	9,0	100%	100%	91%
		9,75		9,5	92%	88%	59%
		9,79		10,0	34%	16%	12%

Diskussion.

Bei der Besprechung der vorliegenden Ergebnisse werden zunächst die sich in praktischer Hinsicht ergebenden Folgerungen diskutiert und dann soll davon ausgehend versucht werden, einige weitere Anhaltspunkte über den Aufbau der Phosphomonoesterase der Niere zu geben.

Bei der Messung der Phosphatase-Aktivität einer Gewebsprobe darf wohl im Hinblick auf die am besten zu wählende Methode ein Unterschied gemacht werden, ob diese zum Studium der Reaktionskinetik dient oder ob es lediglich darum geht, Unterschiede in der phosphatatischen Wirksamkeit verschiedener Gewebsproben festzustellen. Im letzteren Fall gilt es — bei gleichbleibenden Versuchsbedingungen — lediglich zu berücksichtigen, dass es ohne Zusatz von Magnesium bei der Prüfung von sehr aktiven Proben (über 20 Phosphatase-Einheiten; entsprechend einer Phosphatabspaltung von $250 \gamma \text{ P/Ansatz}$ zu 10 cm^3 in 30 Minuten) zu einer in Fig. 2 dargestellten Verzerrung der Skala kommt, wenn man die früher hier für Vergleichszwecke empfohlene einfache Methodik mit dem vom kinetischen Standpunkt korrekten, aber komplizierteren Verfahren von *O. Bodansky* vergleicht. Diese Verzerrung überschreitet indessen den Betrag von 10% erst oberhalb der oberen Grenze des hier vorliegenden Untersuchungsbereiches von 10–18 Phosphatase-Einheiten¹). Diese Unstimmigkeit kann durch Zusatz von Mg vollständig aufgehoben werden, doch sind die Ansichten über die Wünschbarkeit eines „Aktivator“-Zusatzes geteilt, besonders dann, wenn die „Eigenaktivität“ eines Gewebes, als Resultante der enthaltenen Fermentmenge und aller darin vorkommenden Effektoren bestimmt werden soll. Darüber ist bereits (*loc. cit.*) diskutiert worden und auch *Köhler*²) u. a. haben sich damit auseinandergesetzt.

In reaktionskinetischer Hinsicht fällt zunächst der ziemlich geradlinige Verlauf der Phosphatabspaltung bei Zusatz von optimal aktivierendem Magnesiumsalz auf, was bereits von *Erdtman*³) u. a. beobachtet worden ist. Die unter diesen Bedingungen verfolgten Zeit-Umsatz-Kurven stimmen nun im beobachteten Bereich von 0–60 Minuten, mit dem berechneten Kurvenverlauf einer monomolekularen Reaktion entweder direkt überein ($p_{\text{H}} = 8,6$) oder es genügt zur Deutung der festgestellten Abweichung die Annahme, dass es zu einer nur geringfügigen Verminderung der wirksamen Fermentmenge von 5–10% kommt ($p_{\text{H}} 9,05\text{--}9,3$), was auf Grund der ausgeführten Stabilitätsversuche anzunehmen ist. Während hier bei Mg-Zusatz in verschiedenen Puffergemischen dasselbe Verhalten zu beobachten ist, schwankt die im Versuch festzustellende Verlangsamung der Reaktion bei Vermeidung eines Mg-Zusatzes je nach p_{H} und Puffer beträchtlich. Diese Verzögerung ist im $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer gering, im $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3^-$ -Puffer beträchtlich.

Von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet kommt dem Magnesium nun weniger die Rolle eines Aktivators als die eines Stabilisators

¹) Durch die Wahl einer stärkeren Extraktverdünnung (statt 1:80 z. B. 1:200) lässt sich dieser Bereich vergrößern.

²) *Z. physiol. Ch.* **172**, 182 (1927); **177**, 211 (1928).

³) *Z. physiol. Ch.* **223**, 98 (1934).

der zu Versuchsbeginn vorhandenen Phosphatase-Aktivität zu. Welche der beiden bereits öfters in Betracht gezogenen Möglichkeiten der Wirkungsweise hier nun zutrifft resp. vorherrscht, lässt sich nicht entscheiden; entweder handelt es sich lediglich um eine Ausschaltung der Phosphathemmung, indem das vom Substrat abgespaltene Phosphat als schwer lösliches $MgNH_4$ - oder Mg -Salz ausgefällt wird, oder es garantiert das Erhaltenbleiben des Enzyms in seiner aktiven Form. Während die erstere Annahme auf *Erdtman* (loc. cit.) und *Holmberg*¹⁾ zurückgeht, hat *Cloetens*²⁾ aufschlussreiche Ergebnisse mitgeteilt, die mit Deutlichkeit für die letztere Anschauung sprechen. Ausgehend von der Annahme, dass die Phospho-monoesterase der Niere in ihrer wirksamen Form aus einem Eiweiss-Mg-Komplex bestehen soll, hat der Autor die zeitlich gut messbare Reaktion des Abdissoziierens des Mg und den Vorgang der Resynthese der aktiven Verbindung verfolgt. Mit dieser Anschauung ist die hier beobachtete Konstanz der Spaltung bei Gegenwart eines Mg-Überschusses und das Absinken derselben bei dessen Abwesenheit in Einklang zu bringen, indem ein Zusatz von Mg ($q_{Mg} = 2,3$) der Dissoziation entgegenwirkt, während ohne Mg-Zusatz eine Reaktion im System $E - Mg \rightleftharpoons E + Mg$ von links nach rechts erfolgt im Sinne der Einstellung eines neuen Gleichgewichtes. Für die Tatsache, dass es sich — wenigstens bei der Untersuchung von frischem Gewebehomogenat — nicht um eine Aktivierung, sondern um eine Stabilisierung der zu Versuchsbeginn vorhandenen Aktivität handelt, spricht auch der Befund, dass die Anfangsgeschwindigkeiten V_0 (Tangenten an die Abbaukurven bei $t = 0$) ohne und mit Mg-Zusatz bei gleichen Versuchsbedingungen nur relativ geringe Unterschiede aufweisen verglichen mit den nach $t = 10$ – 60 Minuten auftretenden Differenzen (vgl. Tabelle 2).

Die hierbei anzutreffenden, grossen Unterschiede in der „aktivierenden Wirkung“ des Mg je nach Versuchsdauer — ganz abgesehen von der Art des Puffers —, weisen darauf hin, dass Angaben über die prozentuale Mg-Aktivierbarkeit lediglich als Vergleichsdaten betrachtet werden dürfen. Es ist schon früher ausgesprochen worden (*Köhler*, loc. cit.), dass in rohen Gewebsextrakten bereits genügend Mg zur vollen Aktivierung vorhanden sei; erst *Cloetens* hat aber dieses Verhalten befriedigend gedeutet.

Schliesslich ist noch hervorzuheben, dass bei kinetischen Studien der Zusatz von Mg den Vorteil bietet, dass V_0 bis zu einer Abspaltung von 100–150 γ P kaum abnimmt, im Vergleich zur deutlichen Abnahme ohne Mg-Zusatz. Bei den hier angegebenen Aktivitäten sind somit nur diejenigen Resultate als annähernd proportional zur An-

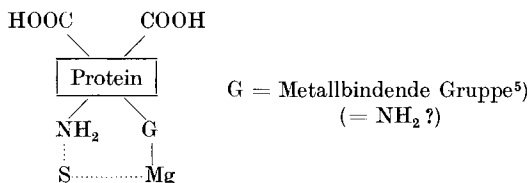
¹⁾ Bioch. Z. **279**, 145 (1935).

²⁾ Bioch. Z. **307**, 352 (1941); **308**, 37 (1941); **310**, 42 (1941).

fangsgeschwindigkeit V_0 zu betrachten, die mit Mg-Zusatz erhalten worden sind. Die Werte für V_0 bei den ohne Mg-Zusatz erhaltenen Zeit-Umsatz-Kurven sind relativ höher als die im 30-Minuten-Versuch bestimmten Aktivitäten und nähern sich dem entsprechenden, mit Mg-Zusatz erhaltenen Resultat.

Wenn auch einige Aussagen über bestimmte reaktionsfähige Gruppen der Phosphomonoesterase der Niere gemacht werden können, muss berücksichtigt werden, dass die Beschaffenheit des Trägerproteins ungewiss ist und stark von der Herstellungsweise des Enzympräparats abhängt. Nach *Kabat*¹⁾ lässt sich die Nierenphosphatase aus frischem Rohextrakt fast völlig abzentrifugieren (1 Stunde bei 27000 U/Minuten), was bei einer Woche autolysierten Extrakten nicht gelingt. Daraus schliesst der Autor auf eine Bindung des Enzyms, dessen Molekulargewicht von *Albers*²⁾ zu ca. 6—10000 bestimmt worden ist, in der Zelle an hochmolekulare Eiweisskörper, welche im Verlauf der zur Darstellung oft angewandten Autolyse abgespalten werden.

In Anlehnung an die von *Bauer*³⁾ und *Cloetens* (loc. cit.) postulierten Strukturschemen und unter Annahme der von *Delory* und *King* (loc. cit.) vermuteten und von *Cedrangolo*⁴⁾ belegten Tatsache, dass der alkalischen Phosphatase ein IEP von ca. p_H 9 (= Wirkungsoptimum) zukommt, kann der Bau der Phosphomonoesterase der Niere in folgender Weise zu deuten versucht werden:



Dieses Schema steht nun mit folgenden Beobachtungen in Einklang:

1. Ohne Mg-Zusatz kommt es während des Versuches zu einer beträchtlichen Spaltung des aktiven Fermentes. (Protein-G-Mg \rightarrow Protein-G + Mg.) Protein-G ist aber nicht oder nur wenig wirksam. Es erfolgt daher eine Abnahme der aktiven Enzymmenge während des Versuches.

2. Bei Zusatz von Mg wird auf Grund der Massenwirkung ein nennenswertes Abdissoziieren von Mg verhindert; Folge: keine oder

¹⁾ Science **93**, 43 (1941).

²⁾ Z. physiol. Ch. **232**, 165 (1935).

³⁾ Z. physiol. Ch. **248**, 213 (1937): Bildung der labilen ES-Verbindung durch Ringschluss, dann Zerfall des Ringes in die Spaltprodukte, (Pyrophosphatase!).

⁴⁾ Enzymologia **6**, 72 (1939), (Gehirnphosphatase!).

⁵⁾ *Cloetens* nimmt die Existenz zweier metallbindender Gruppen G_2 und G_2' an, wovon eine das Magnesium bindet. Ein zweites Metallatom ist direkt an das Eiweiss gebunden: Zwischen diesen beiden Metallen soll die Bildung des Ringschlusses erfolgen.

nur geringe Abnahme der aktiven Enzymmenge während des Versuches. Der Mg-Zusatz „stabilisiert“. (Vgl. *Cloetens*¹.)

3. Der Komplex Protein-G-Mg hat keine Affinität zu einer zweiten Substrat-Molekel; die p_s -Kurve in Versuchen mit Mg-Zusatz entspricht dem theoretischen Verlauf derselben.

4. Wird kein Mg zugesetzt, bewirken grosse Substratkonzentrationen eine Hemmung; es besteht eine geringe Neigung zur Bildung der Verbindung Enzym-(Substrat)₂ (vgl. Fig. 4). Es wird zusätzlich Enzym als ES_2 aus dem System $E \cdot Mg \rightleftharpoons E + Mg$ herausgenommen, was eine Reaktionsbeschleunigung im Sinne von links nach rechts bewirkt (vgl. *Folley* und *Kay*²).

5. Carbonat/Hydrogencarbonat hemmt durch Verdrängung, indem auch es eine Affinität zur substratbindenden NH_2 -Gruppe besitzt und mit dem Substrat um diese NH_2 -Gruppe konkurriert.

6. Dazu bewirkt Carbonat-Hydrogencarbonat ohne Mg-Zusatz eine beschleunigte Abnahme der wirksamen Enzymmenge (vgl. Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve), indem es wie grosse Substratkonzentrationen in 4 eine zusätzliche Verschiebung des Gleichgewichtes $E \cdot Mg \rightleftharpoons E + Mg$ nach rechts bewirkt, infolge Bildung von inaktivem E-Carbonat.

7. Dasselbe besagt die geringe Stabilität der Phosphatase in CO_3''/HCO_3' -Puffer.

8. Besonders wenn kein Mg zugesetzt wird, bewirkt auch das abgespaltene anorganische Phosphat eine Konkurrenzhemmung, indem es mit dem Substrat um die substratbindende NH_2 -Gruppe konkurriert.

9. Die Verschiebung des p_H -Optimums nach der sauren Seite bei Zusatz von steigenden Mengen CO_3''/HCO_3' lässt sich folgendermassen deuten; da das CO_3''/HCO_3' nicht nur mit der substratbindenden Aminogruppe, sondern auch mit den anderen NH_2 -Gruppen des Enzyms reagiert, kommt es zu einer Abschwächung des basischen Charakters des Enzyms. Da die Wirkung der nicht dissoziierten Ferment-Molekel zugeschrieben wird, verschiebt sich deren p_H -Optimum zusammen mit dem IEP nach der sauren Seite. Dasselbe gilt für den entgegengesetzt wirkenden NH_4' -Ionen-Effekt. (Verschiebung des p_H -Optimums nach der alkalischen Seite.)

Die hier angenommene Struktur steht zudem in Einklang mit den von anderen Autoren gemachten Beobachtungen:

a) Je stärker die Säurenatur (K_s) des Substrates, desto grösser ist die Affinität zwischen Substrat und der substratbindenden Gruppe des Enzyms (*Delory* und *King*³), welcher basische Natur zugeschrieben wird.

b) Die Gegenwart von Substrat hemmt den Verlauf der Resynthese $E + Mg \rightarrow E \cdot Mg$, weil sich das Substrat an die metallbindende Gruppe G (oder Mg) anlagert (*Cloetens*¹).

¹) *Bioch. Z.* **307**, 352 (1941).

³) *Biochem. J.* **37**, 547 (1943).

²) *Biochem. J.* **29**, 1837 (1935).

c) Das Substrat und Magnesium schützen das Enzym vor der hemmenden Wirkung des anorganischen Phosphats (*Cloetens*¹).

d) Die Einwirkung von 0,5-(Gew.)-proz. Formaldehyd bewirkt eine vollständige Inaktivierung der Nierenphosphatase (Blockierung der NH_2 -Gruppen) (*Roche und Abul Fadl*²).

e) Wird Nierenextrakt mittels Keten acetyliert, so kommt es zu einem raschen Abfall der Phosphatase-Aktivität des Extraktes. Auf Grund der Reaktionsgeschwindigkeit wird angenommen, dass diese Aktivitätsabnahme auf der Blockierung von primären Aminogruppen beruht. Es soll sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um ϵ - NH_2 -Gruppen des Lysins handeln (*Gould*³).

f) In diesem Zusammenhang interessiert, dass die Art der Gruppen, welche auf Effektoren ansprechen, und vor allem die Natur der substratbindenden Gruppe in dieser Annahme die gleichen sind, wie sie von *Myrbäck*⁴ für die Saccharase angegeben worden sind ($-\text{COOH}$ resp. NH_2 -Gruppe).

Das oben wiedergegebene Fermentmodell, welches eine Vereinfachung und Präzisierung der Auffassung von *Cloetens* darstellt, soll als Arbeitshypothese für die Fortsetzung dieser Arbeiten gewertet werden. Wenn sich auch an Hand dessen manches scheinbar einfach deuten lässt, müssen andererseits viele Fragen noch offen gelassen werden. Dies gilt insbesondere für die weiteren, am Aufbau des Enzyms beteiligten Metalle (M_2), die Verankerung des Enzyms an die Gewebsstruktur, sowie die genaue Abgrenzung von Apo- und Cofermentanteil.

Zusammenfassung.

1. Es wird der Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve der Phospho-mono-esterase der Niere unter variablen Versuchsbedingungen verfolgt und die in diversen Puffergemischen bei verschiedenem pH beobachteten Abweichungen vom monomolekularen Verlauf zu deuten versucht.

2. Die mit der Versuchsdauer zunehmende Steigerung der Glycerophosphatsspaltung durch Zusatz von Magnesium-Ionen ist nicht als Aktivierung, sondern als Stabilisierung der zu Versuchsbeginn vorhandenen Phosphatase-Aktivität zu betrachten. Dies gilt zunächst nur für die Untersuchung von frischem, ungereinigtem Gewebemogenat.

Die beiden in Frage kommenden Stabilisierungsmechanismen, wie auch die praktischen Folgerungen werden diskutiert.

3. Es wird die Grösse K_s , die Dissoziationskonstante der Enzym-Substratverbindung der Phospho-mono-esterase der Niere, zu $K_s = 0,0018$ (ohne Mg-Zusatz) resp. $0,0025$ ($q_{\text{Mg}} = 2,3$) bestimmt, Werte, welche mit denen der Literatur übereinstimmen.

¹) *Enzymologia* **7**, 333 (1939).

²) *Bl. Soc. Chim. Biol.* **30**, 427 (1948).

³) *J. Biol. Chem.* **156**, 365 (1944).

⁴) *Z. physiol. Ch.* **158**, 160 (1926).

4. Bei den beobachteten Hemmungen durch das im Versuch abgespaltene Phosphat sowie durch $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$, handelt es sich grösstenteils um eine Verdrängungshemmung, indem Phosphat und Carbonat mit dem Substrat um die substratbindende Gruppe konkurrieren. Infolgedessen ergibt die Bestimmung von K_s in carbonathaltigen Puffern und auch bei zu weit gehender Substratspaltung fehlerhafte (zu hohe) Resultate. Die Hemmung durch NH_4 -Ionen verläuft nach dem gewöhnlichen Typus (non-competitive Inhibition).

5. Unter Verwertung eigener Beobachtungen und derjenigen anderer Autoren wird ein vereinfachtes Enzymmodell skizziert, das als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen dienen soll.

Herrn Prof. *Abelin*, der mich zur Durchführung dieser Untersuchungen veranlasst hat, möchte ich an dieser Stelle für sein Wohlwollen und sein Interesse hiermit herzlich danken.

Bern, Medizinisch-chemisches Institut der Universität.

62. Über die Cholinesterase des Elefantengehirns

12. Mitteilung über Cholinesterasen¹⁾

von **E. A. Zeller**.

(31. I. 49.)

Aus vielen Gründen bildet das Elefantengehirn ein interessantes Studienobjekt. Als sich die Gelegenheit bot, ein solches zu untersuchen²⁾, wurden einige Fragen der Physiologie und Chemie der Cholin-esterasen (ChE) geprüft, um das seit manchen Jahren gesammelte Material über die ChE verschiedener Tierarten³⁾ durch Daten ergänzen zu können, die vom Gehirn des einzigen Landtieres stammen, das ein grösseres Hirngewicht als der Mensch besitzt.

¹⁾ Die bisherigen Publikationen über die Cholinesterasen werden nach ihrem Erscheinungsdatum fortlaufend nummeriert, um künftighin die Literaturhinweise vereinfachen zu können: 1. Mitt. Helv. **23**, 1457 (1940); 2. Mitt. Helv. **23**, 1460 (1940); 3. Mitt. Helv. **24**, 120 (1941); 4. Mitt. Helv. **24**, 962 (1941); 5. Mitt. Helv. **24**, 1465 (1941); 6. Mitt. Helv. **25**, 216 (1942); 7. Mitt. Helv. **25**, 1099 (1942); 8. Mitt. Helv. **26**, 1619 (1943); 9. Mitt. Helv. **26**, 2063 (1943); 10. Mitt. Helv. **32**, 94 (1949); 11. Mitt. Helv. **32**, 338 (1949).

²⁾ Herrn Prof. Dr. *H. Hediger* sei für die Überlassung dieses und vieler anderer Materialien aus dem Zoologischen Garten Basel bestens gedankt.

³⁾ *E. A. Zeller*, *H. Birkhäuser*, *H. Mislin* und *M. Wenk*, Helv. **22**, 1381 (1939); ferner 1., 7. und 8. Mitt., 1. c.