

293. Analyse der Wirkungsbedingungen verschiedener Phosphatase-Präparate bezüglich Substratkonzentration und p_H . (Nierenphosphatase roh und gereinigt, Serumphosphatase)

4. Mitteilung über Phosphatasen

von H. Aebi.

(23. IX. 49.)

Das Vorkommen der alkalischen Phospho-monoesterase im tierischen und menschlichen Organismus ist sehr verbreitet. Nahezu alle Gewebsarten weisen eine mehr oder weniger grosse phosphatatische Wirksamkeit auf. Nach den systematischen Studien vom *Kay*¹⁾ und *Macfarlane*²⁾ soll sie lediglich in der Gefässwand der Aorta fehlen. Die Organe, die sich durch eine beträchtliche Phosphatase-Aktivität auszeichnen — vor allem Knochen, Niere und Darm-mucosa, sind schon oft untersucht worden³⁾. Andererseits kommt der Serumphosphatase in der Medizin hinsichtlich Diagnose und Prognose wegen ihrer Zugänglichkeit grosse Bedeutung zu.

In diesem Zusammenhang soll hier die fragliche Identität von Serum- und Gewebsphosphatasen untersucht werden, teils um die Wirkungsbedingungen des Enzyms in verschiedenen Materialien zu vergleichen, teils um einen Beitrag zur Frage der Herkunft der Serumphosphatase zu leisten. Es wird gezeigt, dass das (scheinbar) unterschiedliche Verhalten von Serum- und Gewebsphosphatase bezüglich p_H und Hemmbarkeit durch CO_3'' -Ionen bedingt ist durch verschiedene Art und Menge der das Enzym begleitenden Eiweisskörper. Diese sind demnach ihrerseits als Effektoren der Phosphatase-Aktivität zu betrachten. Auch bezüglich optimal aktivierender Magnesium-Konzentration ($q[Mg]$) und Verlauf der Zeit-Umsatzkurve bestehen Unterschiede.

Das vorliegende Untersuchungsmaterial an p_H -Aktivitätskurven — aufgenommen unter konstanten Versuchsbedingungen — lässt den Versuch einer quantitativen Erfassung des Kurvenverlaufs als gegeben erscheinen. Hierbei wird ausgegangen von den klassischen Untersuchungen von *Michaelis* et al.⁴⁾ über die Ampholytnatur der Proteine, im besonderen der Enzyme, und der Ergänzungen hierzu von *Kuhn*⁵⁾, von *Euler* et al.⁶⁾ sowie *Haldane*⁷⁾. Darnach stellt der

¹⁾ Biochem. J. **22**, 855 (1928).

²⁾ Biochem. J. **28**, 720 (1934).

³⁾ Übersichtsreferat: *H. Baur* in Z. Vi/Ho/Fe **2**, 507 (1948).

⁴⁾ Bioch. Z. **49**, 333 (1913); **110**, 217 (1920).

⁵⁾ Z. physiol. Ch. **125**, 28 (1923).

⁶⁾ Z. physiol. Ch. **134**, 39 (1924).

⁷⁾ Biochem. J. **19**, 338 (1925).

Verlauf der p_H -Aktivitätskurve unter gewissen Voraussetzungen eine Ampholyt-Dissoziationsrestkurve dar, und zwar diejenige der Enzym-Substratverbindung (= ES). Fussend darauf sind die Säure- und Basen-Dissoziationskonstanten der ES-Verbindung (K_a und K_b') für verschiedene Phosphatasepräparate näherungsweise bestimmt worden.

In der letzten Mitteilung¹⁾ ist K_s , die Dissoziationskonstante der hypothetischen ES-Verbindung der Nierenphosphatase, in verschiedenen Puffern bestimmt und ist auf Fehlerquellen bezüglich Phosphathemmung und CO_3'' -Gehalt der Pufferlösung hingewiesen worden. Versuche mit gereinigter Nierenphosphatase bestätigen die mitgeteilten Werte, zeigen aber, dass die Grösse K_s vom p_H abhängt, auf der sauren Seite des p_H -Optimums wenig, auf der alkalischen Seite dagegen beträchtlich. Diese bereits von *Folley* und *Kay*²⁾ gemachte Feststellung muss dahin ergänzt werden, dass die Grösse der p_H -Abhängigkeit von der Art des Puffers abhängt. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass *Neumann*³⁾ neulich die Abhängigkeit des p_H -Optimums von der Substratkonzentration bei der Phosphatase — erstmals beobachtet von *Asakawa*⁴⁾ — bestätigt hat. Dieser auch von uns erhobene Befund steht in voller Übereinstimmung mit der hier festgestellten p_H -Abhängigkeit der Dissoziationskonstante der ES-Verbindung, K_s . Die Verknüpfung dieser beiden Erscheinungen ist im Falle der Saccharase bereits u. a. von *Josephson*⁵⁾ diskutiert worden und soll hier für die alkalische Phosphatase experimentell belegt werden.

Die näherungsweise Bestimmung der für ein Enzym charakteristischen Daten, wie sie K_a und K_b' (die Säure- und Basen-Dissoziationskonstanten der ES-Verbindung), sowie K_s (die Dissoziationskonstante des Gleichgewichtes $E + S \rightleftharpoons ES$) darstellen, ist geeignet, die vielfältigen Einflüsse der Versuchsbedingungen auf einige wenige Daten zurückzuführen. Die vorliegenden Ergebnisse berechtigen hierzu, doch müssen die verwendeten Methoden weiter geklärt und ausgebaut werden.

Experimenteller Teil.

Die Methodik der Phosphatase-Bestimmung ist in den vorangehenden Mitteilungen⁶⁾ beschrieben worden. Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen folgende: Inkubierung des Ansatzes zu 10,0 cm³ während 30 Minuten bei 38°; als Puffer: Veronalnatrium-Soda/HCl-Puffer nach *Delory* und *King*⁷⁾ Substrat: Na- β -Glycerophosphat (*Eastman Kodak*, später *Siegfried*; beide gleichwertig). Konzentration im Ansatz 0,45% = 0,0144 m. Spaltungsausmass: bis 100 γ P/Ansatz (in einigen Versuchen bis 200 γ P) = 2.2

¹⁾ Helv. **32**, 464 (1949).

²⁾ Biochem. J. **29**, 1837 (1935).

³⁾ Biochim. et biophys. acta **3**, 117 (1949).

⁴⁾ Biochem. J. **10**, 157 (1928).

⁵⁾ Z. physiol. Ch. **34**, 50 (1924).

⁶⁾ Helv. **31**, 1761 und 1943 (1948); **32**, 464 (1949).

⁷⁾ Enzymologia **8**, 278 (1940).

(resp. 4,4) % Spaltung des Substrats. p_H -Bestimmung mittels Glaselektrode bei 20 resp. 25°. Bei den in Abschnitt 4, 5 und 6 beschriebenen Versuchen ist das p_H durchwegs bei 25° gemessen worden. Da die Inkubierung bei 38° erfolgt, ist bei den Ergebnissen zu berücksichtigen, dass p_{K_w} , der negative Logarithmus des Ionenproduktes des Wassers, bei 25° genau 14,0, bei 38° dagegen 13,6 beträgt. Es findet sich nur da ein weiterer Hinweis auf die Methodik, wo hievon abgewichen worden ist.

1. Vergleich der p_H -Aktivitätskurven von Nieren- (roh und gereinigt) und Serumphosphatase.

Um Vergleichsmöglichkeiten zu haben, sind die früher erwähnten Unterschiede im Verlauf der p_H -Aktivitätskurve bei Verwendung verschiedener Puffergemische auch für die nach *D. Albers*¹⁾ gereinigte Nierenphosphatase und die Serumphosphatase geprüft worden.

Tabelle 1.

p_H -Optima und relative Aktivitäten der Nieren- und Serumphosphatase in verschiedenen Pufferlösungen.

Enzym Material	NH ₃ /NH ₄ Cl Puffer 0,1-m.		Veronal-Na/HCl resp. NaOH 0,025-m.		Veronal-Na-Soda/ HCl ~ 0,05-m.		CO ₃ ''/HCO ₃ ' 0,1-m.	
	p_H - opt.	rel. Akt.	p_H - opt.	rel. Akt.	p_H - opt.	rel. Akt.	p_H - opt.	rel. Akt.
Serum {	9,50—	85%—	9,60	120—	9,30	100%	9,10	85%
	9,70	120%		140%				
Niere (roh)	9,65	105%	9,30	116%	9,20	100%	9,05	85%
Niere (gerei- nigt)	9,65	90% (0,05-m.)	9,35	98%	9,22	100%	9,07	98%

rel. Akt. = Aktivität bezogen auf Aktivität beim p_H -Optimum in Veronal-Na-Soda/HCl-Puffer = 100%.

Nierenphosphatase roh: 12,5 mg fein suspendiertes Frischgewebe pro Ansatz.
Nierenphosphatase gereinigt: 50 γ nach *Albers* (loc. cit.) hergestelltes Präparat pro Ansatz.

Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass sich die Serumphosphatase in bezug auf Hemmbarkeit durch CO₃''-Ionen analog verhält wie die Aktivität des ungereinigten Nierenenzym. Es resultieren bei Untersuchung in den verschieden gebräuchlichen Puffergemischen ganz ähnliche p_H -Aktivitätskurven wie sie in der 1. Mitteilung²⁾ wiedergegeben worden sind. Bei zunehmendem Gehalt der Pufferlösung an CO₃''-Ionen resultiert eine immer stärker werdende Hemmung, die sich auf den alkalischen Schenkel der Kurve beschränkt. Dadurch erfolgt eine Verschiebung des p_H -Optimums von $p_H = 9,60$ in 0,025 Veronal-Na (Substrat-Pufferlösung CO₃''-Ionen-frei) nach $p_H = 9,30$ in Veronal-CO₃''/HCl-Puffer (Konzentration an HCO₃'/CO₃'' = 0,025-m.) und nach $p_H = 9,10$ in 0,1-m. NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer. Gleichzeitig sinkt die Aktivität von 140% auf 85%.

Andererseits zeigt das Serum, in NH₃-NH₄Cl-Puffer inkubiert, eine deutliche Aktivitätsverminderung gegenüber Veronal-Na-Lösung; diese NH₄'-Hemmung schwankt individuell auffallend stark. Über die möglichen Ursachen (schwankender Rest-N-Gehalt des Serums u. a.) soll an anderer Stelle berichtet werden. Die mit einem gereinigten Präparat³⁾ erhaltenen Vergleichswerte bestätigen den Wegfall der Hemmung durch CO₃''-

1) Z. physiol. Ch. **265**, 129 (1940).

2) Helv. **31**, 1761 (1948).

3) Aktivität des Präparates: = 10 *Bodansky* E./1 mg Substanz. Total N: 16,45%; Rest-N: 1,85%; Protein-N: 14,60%.

Ionen und das Bestehenbleiben der NH_4^+ -Hemmung bei der Abtrennung eines Grossteils der Begleitproteine.

Neben diesen beiden offenbar spezifischen Ionenwirkungen sind es noch 2 weitere Faktoren, die die Lage der resultierenden p_{H} -Optima bestimmen. Erstens ist es die Ionenstärke der Pufferlösung; ein Zusatz von 0,2-m. NaCl, entsprechend $\mu = 0,2$, bewirkt bei gleichbleibender Aktivität eine Verschiebung des p_{H} -Optimums um 0,16 p_{H} -Einheiten. Zweitens ist es die Konzentration des Ansatzes an Eiweiss. Die unter 2. mitgeteilten Versuche sollen zeigen, dass die unterschiedlichen p_{H} -Optima von Serum und Niere (z. B. in Veronal-Na- CO_3 -HCl-Puffer 9,30 resp. 9,20) allein durch den verschiedenen Eiweissgehalt der Proben bedingt sind.

Beim Vergleich der „aktivierenden“ Wirkung des Magnesiums bei den 3 verschiedenen Präparaten ergibt sich folgendes: Bei Serum und Niere (Rohextrakt) liegt das Optimum der Aktivierung durch MgCl_2 bei $q[\text{Mg}] = 3,0$, während es bei der gereinigten Nierenphosphatase bei $q[\text{Mg}] = 2,0$ oder sogar darunter liegt. Bei allen 3 Proben ist die prozentuale Aktivierung von derselben Grössenordnung. Sie ist am grössten bei der ungereinigten Nierenphosphatase und am kleinsten bei der Serumphosphatase trotz der längeren Versuchsdauer.

Tabelle 2.

Aktivierende Wirkung von MgCl_2 bei verschiedenen Mg-Konzentrationen ($q[\text{Mg}]$). Phosphataseaktivität ohne Mg-Zusatz = 100%.

Material:	$q[\text{Mg}] =$					
	5,0	4,0	3,0	2,3	2,0	1,5
Niere (roh) . . .	110,8%	134,8	144,3	142,5	126,0	111,0
Niere (gereinigt).	105,8	115,0	123,2	132,5	136,6	102,0
Serum (Rind) . .	111,0	119,5	126,0	117,8	101,8	71,0

Versuchsdauer für Niere = 30 Minuten, für Serum = 60 Minuten.

Der Quotient ($Q_{30/60}$) aus dem Abbau bei 30 Minuten und demjenigen bei 60 Minuten, der als grobes Mass für den Verlauf der Zeit-Umsatzkurve brauchbar ist, ergibt für die verschiedenen Phosphatasepräparate in Veronal-Na-Soda/HCl beim p_{H} -Optimum folgende Werte: Niere (roh) ohne Mg-Zusatz 0,65; mit Mg ($q \text{ Mg} = 2,3$) 0,54; Niere (gereinigt) ohne Mg-Zusatz 0,66; mit Mg ($q \text{ Mg} = 2,3$) 0,60; Serum ohne Mg-Zusatz 0,65; mit Mg ($q \text{ Mg} = 2,3$) 0,59.

2. Eiweiss als Effektor der Phosphatase.

In orientierenden Versuchen ist schon früher (loc. cit.) festgestellt worden, dass ein Zusatz von inaktiviertem Serum zu verdünntem Nierenhomogenat eine Erhöhung der Phosphatase-Aktivität im Bereich des alkalischen Kurvenschenkels bewirkt, verbunden mit einer Verschiebung des p_{H} -Optimums nach der alkalischen Seite. Es lässt sich nun nicht nur das p_{H} -Optimum des Nierenrohextraktes auf diese Weise beeinflussen, sondern auch dasjenige von gereinigten Enzymlösungen. Es braucht überdies gar kein inaktiviertes Serum zu sein, sondern es kann dieser Effekt durch den Zusatz irgendeines Eiweisses erzielt werden. Wird die Menge des zugesetzten Proteins so gewählt, dass eine dem Serum entsprechende Konzentration von 7—8% resultiert, so fällt das p_{H} -Optimum der enzymhaltigen Eiweisslösung mit demjenigen des Serums zusammen. (Erforderliche Eiweisskonzentration im Ansatz — infolge Verdünnung bei Zugabe zur Substrat-Pufferlösung um das 10fache — 0,7—0,8%.)

Art und Ausmass des Effektes bei Zusatz von Serum, welches durch 2ständiges Aufbewahren bei 60° (ohne Zusatz) inaktiviert worden ist, sind dieselben, wie sie beim Eialbumin festgestellt worden sind.

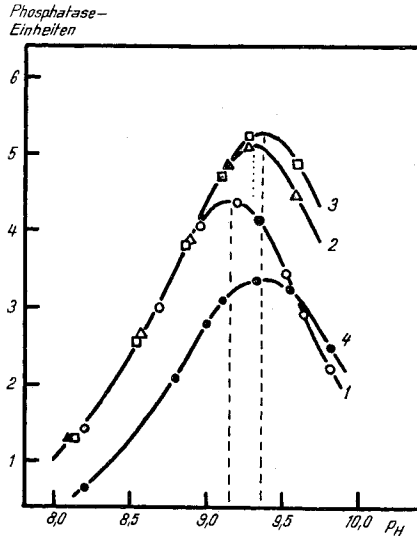


Fig. 1.

Effektorenwirkung von Eialbumin auf die Aktivität der gereinigten Nierenphosphatase.

Enzym: Gereinigtes Präparat von Nierenphosphatase; 50 γ pro Ansatz zu 10 cm³; 30 Minuten bei 38° C.

Eiweiss: getrocknetes Eialbumin.

Puffer: Veronal-Na-Soda/HCl.

Serum: normales Serum vom Menschen.

- Kurven: 1. gereinigte Nierenphosphatase in Substrat-Pufferlösung ohne Zusatz.
- △ 2. desgl. + 0,4% Eialbumin (Endkonzentration).
- 3. desgl. + 0,8% Eialbumin (Endkonzentration).
- 4. Serum (ohne Zusatz).

3. Lage und Verlauf der p_H-Aktivitätskurve von gereinigter Nierenphosphatase und Serumphosphatase.

Auf Grund der Ergebnisse einer Anzahl von p_H-Aktivitätskurven, die unter konstanten Versuchsbedingungen aufgenommen worden sind, soll versucht werden, die Gesetzmässigkeit des Kurvenverlaufes bei der Nieren- u. Serumphosphatase quantitativ zu erfassen.

Nach *Michaelis* und *Menten* (loc. cit.) stellt die p_H-Aktivitätskurve eines Enzyms, dessen Dipol aktiv ist, eine Ampholyt-Dissoziationsrestkurve dar, wobei die für jedes p_H gegebene Grösse der Zahl der vorhandenen ungeladenen Teilchen der Enzym-Substratverbindung entspricht. Voraussetzung hierzu ist die Konstanz von K_s, der Dissoziationskonstante des Gleichgewichtes $E + S \rightleftharpoons ES$, worauf unten zurückzukommen ist.

Die von *Michaelis* gegebene Gleichung (1) zur Berechnung des Dipolanteiles (= ϱ) ist — unter Berücksichtigung, dass das Ionenprodukt des Wassers $K_w = (H^+) \cdot (OH^-)$ ist, und unter Ersetzung des Ausdruckes K_w/K_b durch die Konstante K_b' — wie folgt umgeformt worden (Formel 2):

$$\varrho = \text{Dipolanteil} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_a}{(H^+)} + \frac{K_b}{(OH^-)}\right)} \quad (1) \qquad K_b' = \frac{K_w}{K_b} \quad (1a)$$

$$\varrho = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_a}{(H^+)} + \frac{(H^+)}{K_b'}\right)} \quad (2)$$

In den Gleichungen (1) und (2) bedeuten (H') die Wasserstoffionenkonzentration resp. deren Aktivität, (OH') dasselbe für OH . K_a ist die Säuredissoziationskonstante, K_b die Basendissoziationskonstante der Enzym-Substrat-Verbindung. K_b' gibt wie K_a die Lage des Parameters (Wendepunktes) der Basen-Dissoziationskurve in (H')-Einheiten an. Da auf diese Weise K_a und K_b' im gleichen Mass (H') ausgedrückt werden können, stellt dies gegenüber der Verwendung von K_b (als Mass (OH')) eine Vereinfachung dar. In p_H -Einheiten ausgedrückt ergeben sich die folgenden Beziehungen: $p_H + p_{OH} = p_{K_w}$; $p_{K_b'} = p_{K_w} - p_{K_b}$ und $p_{K_b} = p_{K_w} - p_H$. Da nun sowohl $p_{K_b'}$ als auch $p_H = p_{K_w} - p_{K_b}$ sind, wird $p_{K_b'} = p_H$. Die Ähnlichkeit der früher mitgeteilten¹⁾ Formel von *Haldane* (loc. cit.) für die Berechnung der p_S -Kurven (Darstellung der Enzym-Aktivität als Funktion des Logarithmus der Substratkonzentration) mit Formel 2 ist offensichtlich.

Nimmt man die totale Enzymmenge, wie auch den I.E.P., d. h. die Symmetrieachse der Kurven als konstant an und lässt nun p_{K_a} und $p_{K_b'}$ auf beide Seiten gleichermaßen wandern, so resultiert eine Anzahl Ampholyt-Dissoziationsrestkurven, die sich voneinander in charakteristischer Weise unterscheiden. Man betrachte die von *Michaelis* gegebene Abbildung²⁾. Wie daraus zu ersehen ist, resultiert, wenn p_{K_a} und $p_{K_b'}$ weit voneinander entfernt sind, eine breite Kurve mit flachem Verlauf in Scheitelnähe und einer Steigung der beiden abfallenden Schenkel, welche beim Wendepunkt (Wendetangente) derjenigen der gewöhnlichen Dissoziationskurve annähernd gleichkommt. Beispiel: Der I.E.P. (= Scheitelpunkt) liege bei $p_H = 9,0$, p_{K_a} der negative Logarithmus der Dissoziationskonstante als Säure betrage 11,0 und derjenige als Base, $p_{K_b'} = 7,0$. Die Steigung, die diese Kurve beim Wendepunkt in der Nähe von p_H 7,0 und 11,0 aufweist, beträgt $\text{tg } \alpha = 2,24/4$ (bei der einfachen Dissoziationskurve $\text{tg } \alpha = 2,30/4 = 0,576$). Die relative Scheitelhöhe (gleichbedeutend wie ϱ in Formel 1 und 2) ist 98,0%. Innerhalb eines p_H -Intervalles von 0,5 p_H -Einheiten zu beiden Seiten des beim I.E.P.-liegenden Optimums nimmt ϱ nur um 1,5% (auf 96,5%) ab.

Betrachten wir andererseits eine Kurve, bei welcher die Konstanten p_{K_a} und $p_{K_b'}$ auf der p_H -Skala nahe beieinanderliegen, z. B. beide 0,5 p_H -Einheiten vom Kurvenscheitel entfernt, so resultiert ein steiler Kurvenverlauf mit einem relativ spitzen Kurvenscheitel. ϱ (entsprechend der Höhe des Scheitels) beträgt nur noch 61,3% und die Steigung der Wendetangente $\text{tg } \alpha = 1,92/4$. In einer Entfernung von 0,5 p_H -Einheiten vom Optimum beträgt ϱ nur noch 47,6%.

Da die Form dieser Kurven allein gegeben ist durch die Differenz von $p_{K_a} - p_{K_b'}$ (resp. den Quotienten aus K_a/K_b') sind nun zur Bestimmung dieser Grösse einige dieser oben erwähnten, für den Kurvenverlauf charakteristischen Daten als Funktion von ($p_{K_a} - p_{K_b'}$) berechnet worden. Wie aus Fig. 2 ersichtlich ist, besteht eine Abhängigkeit zwischen $p_{K_a} - p_{K_b'}$, dem Abstand der Wendepunkte der beiden Dissoziationskurven ausgedrückt in p_H -Einheiten einerseits, und 1) der Abnahme von ϱ (übertragen: Aktivitätsabnahme) bei einer Verschiebung um 0,5 resp. 1,0 p_H -Einheiten vom p_H -Optimum, 2) dem p_H , bei welchem ϱ auf den halben Wert (= $\varrho_{\max}/2$) absinkt (übertragen: Aktivitätsabnahme um die Hälfte); 3) der relativen Höhe des Kurvenscheitels = ϱ_{\max} (Anteil an Dipolen beim I.E.P. bezogen auf die Totalmenge Enzym) und 4) der Steigung der Wendetangente andererseits.

$\varrho_{\max}/2$ lässt sich auch rein rechnerisch ermitteln, und zwar auf Grund folgender Formel, die der Autor der Freundlichkeit von Herrn Prof. *W. Wilbrandt* verdankt.

Darnach gelten die folgenden Beziehungen:

$$\frac{1}{\varrho_{\max}} = 1 + \frac{K_a}{(H')_{\text{opt}}} + \frac{(H')_{\text{opt}}}{K_b'} \quad (3) \quad \text{und} \quad \frac{2}{\varrho_{\max}} = 1 + \frac{K_a}{(H')_x} + \frac{(H')_x}{K_b'} \quad (4)$$

¹⁾ *Helv.* **32**, 464 (1949), Seite 472; Formel (5).

²⁾ *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, Springer Verlag Berlin 1922, Seite 54.

darin bedeuten: $(H')_{opt} = (H')$ beim p_H -Optimum.

$(H')_x = (H')$, bei welcher die Aktivität die Hälfte der beim p_H -Optimum gemessenen beträgt.

ϱ_{max} = Dipolanteil beim p_H -Optimum als Mass für die Ordinate des Kurvenscheitels.

Subtrahiert man nun die Gleichung (4) von der mit 2 multiplizierten Gleichung (3) und eliminiert eine der Konstanten K_a oder K_b' auf Grund der Beziehung $(H')_{opt}^2 = K_a \cdot K_b'$, dann erhält man z. B.

$$K_b' = \frac{(H')_{opt}^2}{(H')_x} + (H')_x - 4 (H')_{opt}. \quad (5)$$

Setzen wir die Daten aus Fig. 3 ein (p_H -Optimum = 9,20; $p_{H_x} = 8,48$), so resultiert:

$$K_b' = \frac{(10^{-9,20})^2}{10^{-8,48}} + 10^{-8,48} - 4 \cdot 10^{-9,20}; \quad K_b' = 9,12 \cdot 10^{-10}.$$

$$p_{K_b'} = 9,04$$

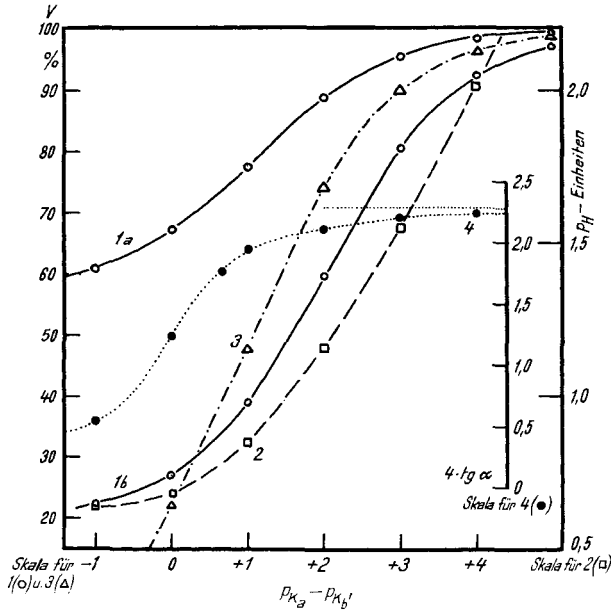


Fig. 2.

Funktionen von $p_{K_a} - p_{K_b'}$ (Abstand des Parameters der Säure-Dissoziationskurve von demjenigen der Basen-Dissoziationskurve) zur Bestimmung des Verlaufs einer Ampholyt-Dissoziationsrestkurve.

- 1a) relative Abnahme von ϱ bei $\pm 0,5$ p_H -Einheiten Entfernung vom p_H -Optimum;
- 1b) relative Abnahme von ϱ bei $\pm 1,0$ p_H -Einheiten Entfernung vom p_H -Optimum; beide bezogen auf ϱ beim p_H -Optimum (= ϱ_{max}). ϱ_{max} bedeutet den Dipolanteil resp. die Aktivität beim p_H -Optimum.
- 2) Entfernung vom Kurvenscheitel (p_H -Optimum) in p_H -Einheiten, bei welcher ϱ auf den halben Wert absinkt verglichen mit ϱ_{max} (beim p_H -Optimum).
- △ 3) Absolute Grösse von ϱ_{max} .
- 4) Steigung der Wendetangente $tg \alpha$ (dargestellt: $4 \cdot tg \alpha$).

Unter der Voraussetzung, dass die von *Michaelis* generell gemachte Annahme auch für die alkalische Phosphatase zutreffen sollte, ist nun $p_{K_a} - p_{K_b}$, auf Grund der Beziehungen 1 und 2 bestimmbar, ohne dass der rationale Masstab der Ordinate zunächst bekannt sein muss. Ist $p_{K_a} - p_{K_b}$, auf Grund der in Fig. 2 dargestellten Beziehungen und damit auch ϱ ermittelt worden, so können nun die unter 3. und 4. erwähnten Funktionen ihrerseits zur Probe herangezogen werden, indem für einen bekannten Wert von $(p_{K_a} - p_{K_b})$ der Dipolanteil und $\text{tg } \alpha$, die Steigung der Wendetangente, gegeben sind.

Folgendes Beispiel soll das Gesagte veranschaulichen: Bei einer p_H -Aktivitätskurve¹⁾ von gereinigter Nierenphosphatase (80 γ pro Ansatz zu 10 cm^3 ; $t = 30$ Minuten; $T = 38^\circ$) lassen sich bei der graphischen Darstellung folgende Daten ablesen: p_H -Optimum 9,20; Aktivität beim p_H -Optimum 3,93 Phosphatase-Einheiten, Aktivität bei $p_H = 9,20 - 0,5 = 8,70$ 2,79 Phosphatase-Einheiten = 71,0% der optimalen Aktivität, bei $p_H = 9,20 + 0,5 = 9,70$ 2,73 Phosphatase-Einheiten = 69,5% der optimalen Aktivität. Die beim Optimum beobachtete Aktivität sinkt auf die Hälfte bei $p_H = 8,43$ resp. $p_H = 9,92$. Die aus diesen Daten abzulesenden Werte für $p_{K_a} - p_{K_b}$, lauten in gleicher Reihenfolge: +0,40; +0,25; +0,62; +0,32. Die Tatsache, dass die Werte für den alkalischen Kurvenschenkel kleiner sind, soll weiter unten erörtert werden. Die diesen Werten zugeordneten Grössen für ϱ_{max} sind: 45%, 40,5%, 51% und 43%, im Mittel $\varrho_{\text{max}} \approx 45\%$.

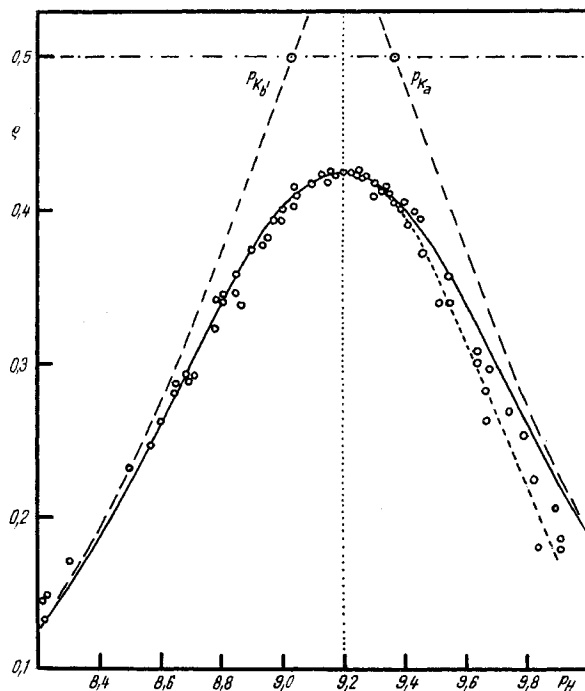


Fig. 3.

Verlauf der p_H -Aktivitätskurve von gereinigter Nierenphosphatase in Veronal-Na-Soda/HCl-Puffer. Die ausgezogene Kurve genügt der Gleichung (2), in welche die Daten $p_{K_a} = 9,37$ und $p_{K_b} = 9,03$ eingesetzt worden sind. Die Punkte sind experimentelle Werte aus 10 Versuchen. $S = 0,45\%$ Na-Glycerophosphat; $t = 30$ Minuten; $T = 38^\circ \text{C}$; 80 γ Präparat pro Ansatz zu 10 cm^3 . Gestrichelte Kurve siehe Text.

¹⁾ Als Beispiel soll diejenige p_H -Aktivitätskurve gewählt werden, die in der 2. Mitteilung (loc. cit.) auf Figur 7 als Kurve Nr. 1 dargestellt worden ist.

In dieser Weise wurden 10 p_H -Aktivitätskurven, bestehend aus je 7–8 experimentell bestimmten Punkten analysiert und folgende Mittelwerte erhalten: p_H -Optimum $9,20 \pm 0,01^1$; $p_{K_a} = 9,33 \pm 0,05$ (Methode 1) resp. $9,42 \pm 0,02$ (Methode 2); $p_{K_b} = 9,07 \pm 0,03$ (Methode 1) resp. $8,99 \pm 0,02$; $q_{\max} = 43,5\% \pm 1,0$.

Für die Serumphosphatase resultieren beim gleichen Verfahren unter Benützung von 5 Kurven die folgenden Werte:

p_H -Optimum $= 9,32 \pm 0,01$; $p_{K_a} = 9,56 \pm 0,05$ resp. $9,62 \pm 0,06$; $p_{K_b} = 9,08 \pm 0,06$ resp. $9,03 \pm 0,05$; $q_{\max} = 48,5\% \pm 3,1$.

Die analog wie in Fig. 3 verlaufende Kurve unterscheidet sich davon lediglich durch den höheren Wert von p_{K_a} , bei befriedigender Übereinstimmung von p_{K_b} , d. h. gereinigte Nieren- und Serumphosphatase haben den sauren Schenkel gemeinsam, während der alkalische Schenkel der Serumphosphatase weiter nach der alkalischen Seite zu verschoben ist, folglich auch das resultierende p_H -Optimum.

In Fig. 3 ist die Divergenz von berechneter Kurve und experimentellen Werten im Bereich des alkalischen Schenkels oberhalb von $p_H \sim 9,5$ auffallend. Über die wahrscheinliche Ursache dieser Abweichung von der theoretischen Annahme wird unter 5) berichtet werden. Es sei vorweggenommen, dass K_s , die Dissoziationskonstante des Gleichgewichtes $E + S \rightleftharpoons ES$, bis gegen $p_H \sim 9,5$ nur wenig abhängig ist vom p_H , oberhalb davon aber stark anzusteigen beginnt. Es wird sich daher oberhalb dieser Grenze infolge stark abnehmender Affinität zwischen E und S weniger aktives ES als berechnet bilden können.

Das ähnliche Verhalten der Saccharase ist durch *Myrbäck*²⁾ in folgender Weise formelmässig dargestellt worden.

$$\text{Relative Aktivität} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_a}{H}\right) \cdot \left[1 + \frac{K_s}{S} \left(1 + \frac{K_b}{OH}\right)\right]} \quad (6)$$

Es ist daraus ersichtlich, dass die oben gegebene Gleichung der Formel (2) entspricht, wenn K_s verglichen mit $[S]$ sehr klein ist. Der Korrekturfaktor $(1 + K_s/S)$ tritt im Sinne einer Aktivitätsverminderung dann stark in Erscheinung, wenn K_s gegenüber $[S]$ relativ gross zu werden beginnt. Bei sinngemässer Übertragung dieser Formel (6) auf die Phosphatase resultiert die in Fig. 3 gestrichelt dargestellte asymmetrische Kurve, deren Übereinstimmung mit dem Experiment eine befriedigende ist. Gleichwohl bedarf diese Formel noch einer Prüfung auf ihre inhaltliche Richtigkeit bei der Phosphatase.

Die zu Beginn gemachte Annahme, dass es sich um eine symmetrische Kurve handelt, ist somit nur näherungsweise erfüllt.

4. Abhängigkeit des p_H -Optimums von der Substratkonzentration.

Wie *Folley* und *Kay*, *Neumann* (loc. cit.) u. a. beobachtet haben, stellt die Substratkonzentration (= $[S]$) neben der Art des Substrates (siehe *King*³⁾), der Versuchsdauer (*Lundsteen* und *Vermehren*⁵⁾), der Versuchstemperatur und der Beschaffenheit des Milieus einen weiteren Faktor dar, welcher die Lage des p_H -Optimums beeinflusst. Die unten gewählte Darstellungsweise ist indessen eher geeignet davon eine richtige Vorstellung zu vermitteln: Wie aus Fig. 4, in welcher nicht die relativen Werte, sondern die absoluten Aktivitäten aufgetragen sind, zu ersehen ist, erinnern die für verschiedene Werte von $[S]$ aufgenommenen Kurven an die Wirkung der Effektoren vom Typ II⁴⁾. Während der linke Schenkel in seiner Lage nicht stark von $[S]$ abhängig zu sein scheint,

1) $M = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$.

2) Z. physiol. Ch. **158**, 160 (1926); **159**, 1 (1926).

3) Biochem. J. **33**, 1185 (1939); **37**, 547 (1943).

4) Enzymologia **1**, 273 (1936).

5) Helv. **31**, 1943 (1948).

ist es der alkalische Schenkel in ausgesprochenem Masse. Dass bei $p_H = 8,6$ die Aktivität — absolut genommen — bereits bei einer Substratkonzentration von $0,1$ ($= 0,0014\text{-m.}$) annähernd dieselbe ist wie bei der zehnfachen Konzentration $[S] = 1,0^1$, besagt, dass die Affinität zwischen E und S hier relativ gross, resp. die Dissoziationskonstante K_s sehr klein sein muss. Alle 3 betrachteten Punkte fallen in den Bereich der p_s -Kurve, wo infolge asymptotischer Annäherung an den Maximalwert keine Abhängigkeit der Ferment-Aktivität von der Substratkonzentration $[S]$ mehr besteht. Bei $p_H = 9,6$ hingegen ist bis $[S] = 1,0$ (und darüber hinaus) eine fortschreitende Zunahme der Aktivität zu beobachten. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, mit andern Worten die Sättigung des Enzyms mit Substrat, wird erst bei relativ hoher Substratkonzentration erreicht. Auf Grund dieser Betrachtungen lässt sich bereits aussagen, dass die Abhängigkeit des p_H -Optimums von $[S]$ im wesentlichen bedingt wird durch die Abnahme der Affinität des Enzyms zum Substrat nach der alkalischen Seite resp. durch das Ansteigen der das Gleichgewicht $E + S \rightleftharpoons ES$ bestimmenden Konstante K_s .

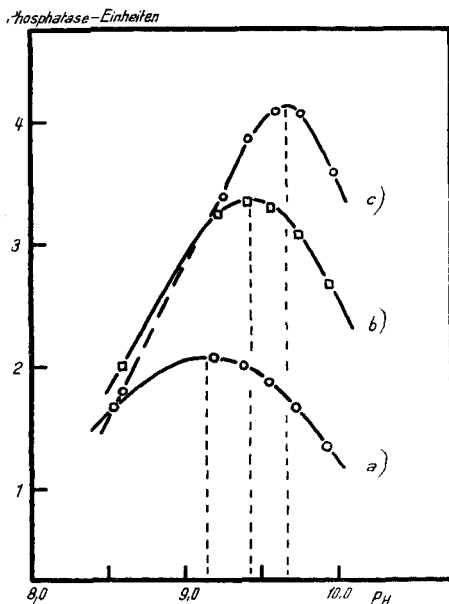


Fig. 4.

Substratkonzentration $[S]$ und p_H -Optimum der gereinigten Nierenphosphatase.

80 γ gereinigtes Präparat pro Ansatz; Substratkonzentration $[S]$.

o a) $0,0014\text{-m.}$ ($0,1$) \square b) $0,0057\text{-m.}$ ($0,4$) o c) $0,0144\text{-m.}$ ($1,0$).

Puffer: $0,07\text{-m.}$ NH_3/NH_4Cl -Puffer.

Bei Durchführung desselben Versuches in Veronal-Na-Soda/HCl-Puffer ist das Wandern des p_H -Optimums nach der sauren Seite bei abnehmender Substratkonzentration noch ausgesprochener. Dieses beträgt bei $[S] = 2,5$ $p_H = 9,20$; $[S] = 1,0$ $p_H = 9,18$; $[S] = 0,4$ $p_H = 9,03$; $[S] = 0,1$ $p_H = 8,62$. Es ist wahrscheinlich, dass für diese beträchtliche Verschiebung des Optimums nach dem Neutralpunkt zu nicht nur die Variabilität von K_s verantwortlich zu machen ist, sondern auch die Zunahme der relativen Phosphathemmung (*Jacobsen*²⁾) nach der alkalischen Seite, sowie das unterschiedliche Spaltungsausmass bezogen auf das angebotene Substrat.

1) Unter Substratkonzentration $[S] = 1,0$ ist die üblicherweise verwendete $[S]$ zu verstehen; diese ist $0,0144$ m Endkonzentration.

2) *Bioch. Z.* **267**, 89 (1933).

Wird $[S]$ konstant (z. B. bei 1,0) gehalten und $[E]$ variiert, so tritt ebenfalls eine merkliche Verschiebung des Optimums auf. Es resultieren (in Veranol-Na-Soda/HCl-Puffer) folgende Optima: Bei einer zugesetzten Enzymmenge von 25 γ Präparat $p_H = 9,20$; bei 80 γ Präparat $p_H = 9,17$ und bei 200 γ Präparat $p_H = 9,12$. Dieser Befund spricht dafür, dass es abgesehen von der Variabilität von K_s weniger auf den Quotienten Enzym/Substrat als auf die absolute Grösse von $[S]$ ankommt.

5. Die Abhängigkeit der Affinität Enzym-Substrat vom p_H .

Die geringgradige Asymmetrie der p_H -Aktivitätskurve, sowie die Abhängigkeit des p_H -Optimums von der Substratkonzentration haben bereits die Vermutung aufkommen lassen, dass K_s , die Dissoziationskonstante des Gleichgewichtes $E + S \rightleftharpoons ES$ (als reziproker Wert ein Mass für Affinität), von der Grösse der (H^+) -Konzentration abhängt.

Die Bestimmung von K_s erfolgt am einfachsten, wie früher beschrieben¹⁾, unter Verwendung der Darstellungsweise von *Lineweaver* und *Burk*²⁾. Dabei wird die gefundene Dissoziationskurve in eine Gerade umgewandelt, deren Schnittpunkt mit der Ordinate die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}), und somit auch K_s ($= [S]$ bei $V_{max}/2$) bestimmen lässt. Fig. 5 soll das Gesagte veranschaulichen. Die Parallelverschiebung der 3 Kurven lässt die Abhängigkeit von K_s , welches auf der Darstellung identisch ist mit $[S]$ bei V_{max} : 2, also bei 50%, ohne weiteres erkennen.

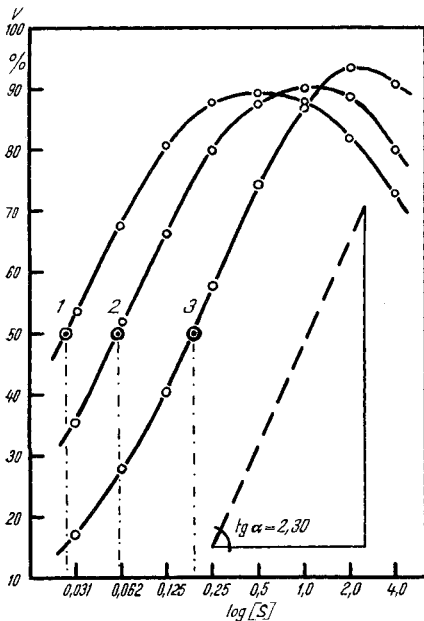


Fig. 5a.

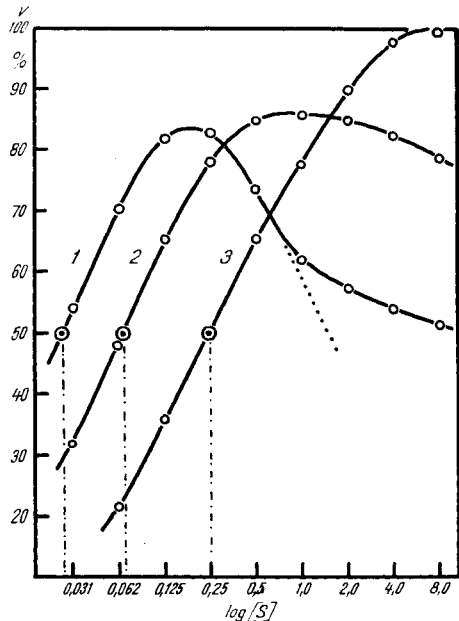


Fig. 5b.

p_S -Kurven der gereinigten Nierenphosphatase bei verschiedenem p_H .

Fig. 5a) Puffer: 0,05-m. Veranol-Na/HCl; Fig. 5b) 0,05-m. NH_3/NH_4Cl

- 1) $p_H = 8,5$
- 2) $p_H = 9,0$
- 3) $p_H = 9,45$

- 1) $p_H = 8,5$
- 2) $p_H = 9,25$
- 3) $p_H = 9,9$

¹⁾ Helv. **32**, 464 (1949): Formel 3; Figur 10.

²⁾ Am. Soc. **56**, 658 (1935).

Die Kurven stellen die bei den betreffenden Bedingungen beobachteten relativen Aktivitäten dar verglichen mit $V_{\max} = 100\%$. $[S] = 1,0 = 0,0144\text{-m.}$

Aus Fig. 5a lassen sich folgende Werte für K_s herauslesen: $p_H = 8,5$ $K_s = 0,0004$; $p_H = 9,0$ $K_s = 0,00084$; $p_H = 9,45$ $K_s = 0,0023$. Die Substratkonzentration $[S]$, bei welcher eine optimale Aktivität resultiert, beträgt in gleicher Reihenfolge: $0,0072\text{-m.}$ (0,5); $0,0173\text{-m.}$ (1,2); $0,0288\text{-m.}$ (2,0). Diese Daten geben die Lage des Scheitelpunktes der p_s -Kurve an, sofern nicht eine (der Theorie entsprechende) asymptotische Annäherung an den Wert $V_{\max} = 100\%$ bei $S \rightarrow \infty$ erfolgt. Für den gleichen Versuch in $0,05\text{-m.}$ $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (Fig. 5b) ergibt sich: $p_H = 8,5$ $K_s = 0,0004$; $p_H = 9,25$ $K_s = 0,00094$; $p_H = 9,9$ $K_s = 0,0036$. $[S]$ bei optimaler Aktivität beträgt: $0,0029\text{-m.}$ (0,2); $0,0144\text{-m.}$ (1,0); über $0,15\text{-m.}$ (8,0).

Das verschiedenartige Verhalten des gereinigten Enzyms in Veronal-Na/HCl, $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer und in Veronal-Na-Soda/HCl besteht in folgendem:

a) Obwohl die ersten beiden Puffer frei sind von Bestandteilen, die kompetitiv hemmen, ist K_s bei gleichem p_H in $\text{NH}_3\text{—NH}_4\text{Cl}$ -Puffer kleiner als in Veronal-Na/HCl.

b) Die p_H -Abhängigkeit ist in $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer wenigstens bei einem p_H unter 9,5 geringer.

c) Die Tendenz zur Bildung einer Enzym-Substrat-Verbindung von der Formel ES_2 bei hoher $[S]$ — charakterisiert durch deren Dissoziationskonstante K_2 — ist in allen Puffergemischen zu beobachten, allerdings in verschiedenem Masse.

d) Im Veronal-Na-Soda/HCl-Puffer lässt sich K_2 relativ gut bestimmen, da dieser Wert in einem Bereich liegt, der experimentell gut erreichbar ist (Fig. 7). Die erhaltenen Kurven entsprechen der Theorie unter der Bedingung, dass die sich bildende Verbindung ES_2 inaktiv ist. K_2 wurde für $p_H = 8,6$ und $9,2$ zu $K_2 \approx 0,15$ ermittelt. Da $\text{CO}_3^{''}$ -Ionen zugegen sind, kann nicht sicher entschieden werden, ob die (H')-unabhängige Grösse von K_2 derjenigen von ES_2 oder evtl. von S—E-Carbonat entspricht, was ebenfalls möglich ist.

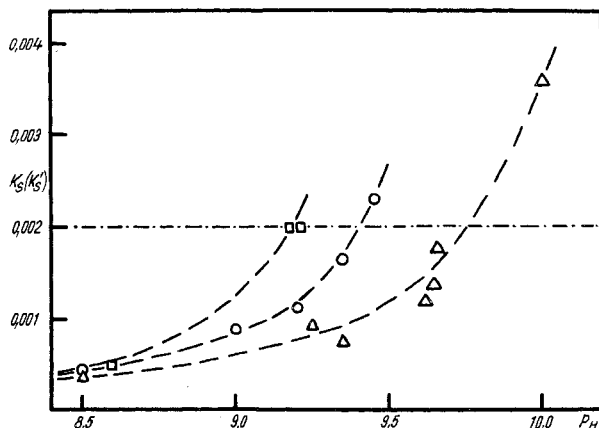


Fig. 6.

K_s , die Dissoziationskonstante der Enzym-Substrat-Verbindung der Phosphatase in Abhängigkeit von p_H und Puffer.

- 1) K_s bestimmt in Veronal-Na-Soda/HCl ($\sim 0,05\text{-m.}$).
- 2) desgleichen in $0,05\text{-m.}$ Veronal-Na-HCl;
- △ 3) desgleichen in $0,05\text{-m.}$ $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$;

30 γ gereinigtes Präparat pro Ansatz zu 10 cm^3 ; 30 Minuten bei 38° .

e) Der Kurvenverlauf in $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ (Fig. 5b) lässt vermuten, dass die Verbindung ES_2 , deren Bildungstendenz wenigstens bei niedrigen p_H -Werten deutlich vorhanden ist, ebenfalls aktiv ist, allerdings schwächer als ES . Für diese Annahme spricht die schon

früher beobachtete Tatsache, dass die p_S -Kurve nach Überschreiten des Optimums einen auffallend flach abfallenden Verlauf zeigt. Bei niedrigem p_H (z. B. $p_H = 8,5$), wo die Differenz der Zerfallsgeschwindigkeiten von ES und ES_2 am grössten zu sein scheint, fällt die Kurve (Fig. 5b; No. 1) zunächst gleich steil wie die Kurven in Fig. 7 ab, biegt dann um und nähert sich asymptotisch einem Grenzwert, der gegeben ist durch die Zerfallsgeschwindigkeit der Verbindung ES_2 verglichen mit derjenigen von ES .

Die Abhängigkeit der Grösse K_s vom p_H und der Art des Puffergemisches ist in Fig. 6 dargestellt. Der reziproke Wert von K_s gilt als Mass für die Affinität zwischen Enzym und Substrat. Die gestrichelte Linie soll auf die aufschlussreiche Tatsache hinweisen, dass K_s in den verschiedenen Puffern immer gerade dort einen Wert von ca. $K_s \approx 0,002$ überschreitet, wohin das p_H -Optimum im betreffenden Puffer zu liegen kommt.

6. Vergleich der p_S -Kurven verschiedener Phosphatase-Präparate.

Nierenphosphatase roh und in gereinigtem Zustand, sowie Serumphosphatase weisen, in NH_3/NH_4Cl 0,07-m., bei $p_H = 9,6$ bestimmt, Werte für K_s auf, die alle von gleicher Grössenordnung sind, z. B. Niere (roh) $K_s = 0,00122$; Niere (gereinigt) $K_s = 0,00115$ und Serum (bei einer doppelt so langen Versuchsdauer von 60 Minuten, aber gleich grossem Spaltungsausmass) $K_s = 0,00116$.

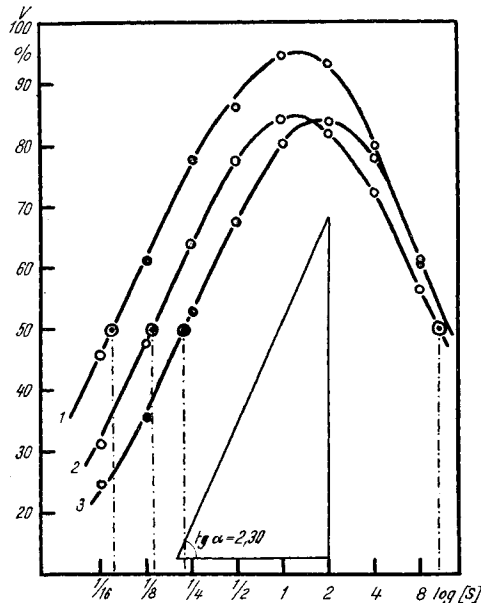


Fig. 7.

p_S -Kurven von roher und gereinigter Nierenphosphatase und Serumphosphatase in Veronal-Na-Soda/HCl-Puffer von *Delory* und *King*.

- 1) Frisches Serum eines gesunden Menschen ($t = 60$ Minuten).
- 2) Gereinigtes Präparat von Nierenphosphatase: 30 γ pro Ansatz zu 10 cm^3 ($t = 30$ Minuten).
- 3) Homogenat von Rattenniere; 6,7 mg Frischgewebe pro Ansatz ($t = 30$ Minuten).

Bei Verwendung des für praktische Zwecke am besten geeigneten Puffers, Veronal-Na-Soda/HCl, tritt die kompetitive Hemmung durch die CO_3'' -Ionen des Puffers als Parallelverschiebung nach rechts in wechselndem Masse in Erscheinung. Im Gegensatz dazu zeigt der durch die Überschusshemmung bedingte rechte Schenkel der Kurve fast

keine Abhängigkeit von der Art des Präparates. K_2 beträgt für gereinigte Nierenphosphatase 0,15, für Nierenrohenzym 0,18, für Serum 0,18. Aus Fig. 7 ist zu entnehmen, dass K_s resp. der scheinbare Wert K_s' bei $p_H = 9,2$ für Niere (roh) 0,0031, für Niere (gereinigt) 0,0020 und für Serum 0,0011 beträgt.

Die in diesem Puffergemisch beobachteten optimalen Substratkonzentrationen liegen alle in der Nähe der üblicherweise verwendeten Konzentration von 0,0144-m. (= 1,0). Das Optimum beträgt für Niere (roh) 0,0259-m. (1,8), Niere gereinigt 0,0173-m. (1,2) und Serum 0,0159-m. (1,1). Die in Figur 7 ebenfalls dargestellte, berechnete Steigung der Wendetangente dieser p_s -Kurven (bei 4facher Überhöhung des rationellen Ordinatenmassstabes $\text{tg } \alpha = 2,23$ resp. 2,30) lässt die gute Übereinstimmung von Berechnung und Experiment erkennen.

Diskussion.

Da die alkalische Phosphatase noch nicht in reiner, krystallisierter Form erhalten worden ist, stellt die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität unter Zugrundelegung von willkürlich festgelegten „scheinbaren“ Einheiten den einzigen Weg dar, um sich über den Enzymgehalt von Geweben etc. zu orientieren. Die grosse Zahl von Faktoren, die diese Aktivität beeinflussen, erklärt die vielen vorgeschlagenen Mass-Einheiten und den Umfang der darüber existierenden Literatur. Die Tatsache, dass ein und dieselbe Enzymmenge je nach Versuchsbedingungen quantitativ und qualitativ verschieden wirken kann, begründet die Forderung einer präzisen Kenntnis aller Wirkungsbedingungen.

Ein sehr umfangreiches Material ist bereits zusammengetragen worden; viele Befunde widersprechen sich indessen. Unter anderem ist dies dadurch begründet, dass viele Studien in der Weise gemacht werden, dass ein Effektor oder ein Faktor bei sonst festen Versuchsbedingungen auf Art und Ausmass der resultierenden Wirkung geprüft wird. Besonders zur Aufdeckung grösserer Zusammenhänge ist es aber notwendig, eine Wirkung in mehreren Dimensionen gleichzeitig zu verfolgen, um eine „räumliche“ Übersicht zu erhalten. Dieser Forderung entsprechend sind hier das wechselseitige Verhalten von p_H , Substratkonzentration und Aktivität in verschiedenen Puffern untersucht worden. Dabei wurde der Versuch gemacht, die Enzymaktivität generell bestimmenden Daten, wie K_a , K_b , K_s und K_2 zu ermitteln, um einen besseren Überblick zu gewinnen.

Aus den Abschnitten 3, 4 und 5, die diesem Zwecke dienen, ist insbesondere zu ersehen, dass die geringgradige Asymmetrie der p_H -Aktivitätskurve und das Wandern des p_H -Optimums nach dem Neutralpunkt zu bei abnehmender $[S]$ nichts anderes als Konsequenzen der p_H -Abhängigkeit der Grösse K_s , der *Michaelis*-, „Konstante“, darstellen. Betrachtet man das in Figur 6 dargestellte Verhalten von K_s (in Gestalt des reziproken Wertes $1/K_s$ als Mass für die Affinität), so resultiert eine Abhängigkeit der Affinität von der Art des Puffers, die mit den früher (3. Mitteilung) beobachteten Stabilitätsverhältnissen völlig übereinstimmt.

Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen lässt sich die Lage und der Verlauf der p_H -Aktivitätskurve der alkalischen Phosphatase in folgender Weise charakterisieren: Die Kurve entspricht im grossen ganzen dem Verlauf einer Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten. Während der saure Schenkel diesem ziemlich genau entspricht, zeigt der alkalische Schenkel eine zunehmende Abweichung davon, die bedingt ist durch den starken Anstieg von K_s resp. den Abfall der Affinität E—S nach der alkalischen Seite. Die Nähe von p_{K_a} und $p_{K_b'}$ (0,4—0,6 p_H -Einheiten) erklärt den auffallend steilen und spitzen Verlauf, der wegen seiner Lage im alkalischen Gebiet (p_H 9—10) in der Praxis methodische Schwierigkeiten bereitet. Dass die vom p_H -abhängige Dipol-Konzentration, welche durch die Kurve dargestellt wird, tatsächlich diejenige der E—S-Verbindung wiedergibt, ist in den eingangs zitierten Arbeiten von *Michaelis* et al., von *Euler*, *Kuhn* und *Haldane* eingehend dargetan worden, so dass hier darauf verzichtet werden kann.

Die Abhängigkeit der p_H -Optima in den verschiedenen Puffern erscheint unter Berücksichtigung der Variabilität von K_s resp. der Affinität verständlich. Lage und Steigung des linken, sauren Schenkels — als Ausdruck für die Aktivität — werden beeinflusst durch nichtkompetitiv hemmende Pufferbestandteile wie NH_4^+ . Die Lage des alkalischen Schenkels ist früher gewertet worden als Ausdruck der Stabilität. Wie hier gezeigt wird, ist sie es auch gleichermassen für die Abnahme der Affinität nach der alkalischen Seite. Dort, wo diese erst spät (z. B. bei $p_H = 9,7$) einen bestimmten Betrag von ca. $1/0,002 = 500$ unterschreitet, liegt das Optimum relativ weit im alkalischen Gebiet bei $p_H = 9,7$. Sinkt die Affinität schon früher, d. h. bei weniger stark alkalischer Reaktion auf diesen Grenzwert ab, so verschiebt sich das p_H -Optimum nach der sauren Seite auf z. B. 9,35 resp. 9,20. Inwiefern die beiden Begriffe „Stabilität“ und Affinität, die sich teilweise überdecken, in ihrem Wesen identisch sind, lässt sich noch nicht entscheiden.

Die beobachtete Verschiebung des p_H -Optimums nach der sauren Seite bei abnehmendem [S] ist wohl zum überwiegenden Teil bedingt durch die Variabilität von K_s , doch dürfte sich dabei auch die Tatsache auswirken, die *Jacobsen* (loc. cit.) festgestellt hat, wonach die relative Phosphathemmung (der kompetitive Anteil derselben) nach der alkalischen Seite an Stärke zunimmt und bei abnehmendem [S] immer stärker in Erscheinung tritt. Gleichwohl verdient diese Tatsache im Hinblick auf die physiologischen Reaktionsbedingungen des Enzyms in Gewebe und Körpersäften einige Beachtung. Was hierbei nämlich schwer zu verstehen ist, ist die Tatsache, dass dieses Ferment, das im Stoffwechselgeschehen eine bedeutende Rolle spielt, ein p_H -Optimum haben soll, das weit vom physiologischen p_H -Bereich entfernt ist. Da nun im Organismus die Substratkonzen-

tration sehr klein ist und auch beträchtliche Mengen von freiem Phosphat zugegen sind, berechtigen die oben gemachten Feststellungen zur Annahme, dass das optimale p_H viel näher bei der aktuellen Reaktion der Körperflüssigkeiten liegen muss, als auf Grund theoretisch begründeter, aber unphysiologischer Versuchsbedingungen allgemein angenommen wird.

Im Hinblick auf die zweite eingangs gestellte Frage der Identität der Gewebs- und der Serumphosphatase erlauben die vorliegenden Resultate die folgenden Schlüsse: Trotz scheinbar unterschiedlicher Ergebnisse darf die Frage entschieden bejaht werden, denn es hat sich gezeigt, dass die beobachteten Differenzen durch die Effektorenwirkung inaktiver Begleitstoffe hervorgerufen werden, und dass nach Eliminierung derselben die Übereinstimmung eine befriedigende ist. Diese erstreckt sich auf die folgenden geprüften Eigenschaften: p_H -Optimum, optimales $q[Mg]$, Verlauf der Zeit-Umsatzkurve, p_S -Kurve, sowie die Daten K_a , K_b und K_s . Das zunächst verschiedene p_H -Optimum ist bedingt durch die Effektorenwirkung der Serumeiweisskörper, einem unspezifischen Effekt, der eine Verschiebung des Optimums nach der alkalischen Seite bewirkt. Die obige Folgerung steht in Übereinstimmung mit der geltenden Anschauung, wonach die Serumphosphatase als eine normalerweise geringgradige Ausschwemmung des Gewebsenzym in den Säftestrom zu betrachten ist. Erfahrungsgemäss kommt es immer dann zu einem Ansteigen der Serumphosphatase, wenn es von seiten eines Organs (z. B. Knochen) zu einer vermehrten Bildung und Ausschwemmung des Fermentes kommt.

Zusammenfassung.

1. Es werden a) der Verlauf der p_H -Aktivitätskurve; b) die Mg-Aktivierung bei variablem $q[Mg]$, c) die Zeit-Umsatzkurve und d) die Affinität zwischen Enzym und Substrat in verschiedenen Puffergemischen untersucht. Gegenstand der Untersuchung bilden die rohe und nach *D. Albers* gereinigte Nierenphosphatase, sowie die Serumphosphate.

2. Rohe und gereinigte Nierenphosphatase unterscheiden sich voneinander durch die CO_3'' -Hemmbarkeit, welche bei der Reinigung verschwindet, und die Änderung des optimal aktivierenden $q[Mg]$, welches sich von $q[Mg] = 3,0$ nach Werten unter 2,0 verschiebt. Die Hemmung durch NH_4' -Ionen bleibt unverändert bestehen.

3. Nierenphosphatase (roh) und Serumphosphatase zeigen hinsichtlich der oben erwähnten Eigenschaften gute Übereinstimmung. Es besteht einzig eine Differenz bezüglich p_H -Optimum, welche durch die begleitenden Serumeiweisskörper (Effektor vom Typ II) verursacht wird. Es darf daher angenommen werden, dass die alkalische Phospho-mono-esterase der Gewebe (h. l. Niere) und des Serums identisch sind.

4. Die Dissoziationskonstante K_s der Enzym-Substratverbindung bei der gereinigten Nieren-Phosphatase hängt vom p_H und von der Pufferlösung ab. K_s ist unterhalb $p_H = 9,0$ klein und steigt nach der alkalischen Seite stark an. Bei gleichem p_H ist K_s in NH_3/NH_4Cl kleiner und in Veronal-Na-Soda/HCl grösser als in Veronal-Na/HCl.

5. Die Variabilität von K_s erklärt die hier bestätigte Verschiebung des p_H -Optimums nach dem Neutralpunkt zu bei abnehmender Substratkonzentration.

6. Die Analyse der p_H -Aktivitätskurve, betrachtet als Ampholyt-Dissoziationsrestkurve, ergibt für die Säure- und Basen-Dissoziationskonstante, welche den Verlauf bestimmen, näherungsweise folgende Werte:

Nieren-phosphatase gereinigt: $p_{K_a} = 9,33—9,42$, $p_{K_b} = 8,99—9,07$. Serumphosphatase $p_{K_a} = 9,56—9,62$, $p_{K_b} = 9,03—9,08$ (in Veronal-Na-Soda/HCl). Der von obiger Annahme abweichende, asymmetrische experimentelle Kurvenverlauf wird auf Grund der Variabilität von K_s zu deuten versucht.

Herrn Prof. *I. Abelin*, der diese Untersuchungen mit Ratschlägen und Wohlwollen gefördert hat, sei an dieser Stelle herzlich gedankt. Herrn Prof. *W. Wilbrandt* schulde ich Dank für Rat und Kritik, insbesondere für die bereitwillige Überlassung der auf Seite 2278 wiedergegebenen Ableitung.

Bern, Medizinisch-chemisches Institut der Universität.

294. Nachweis der Citrullinbildung in Mitochondriensuspensionen und Gewebsschnitten aus Leber durch Papierchromatographie¹⁾

von **A. F. Müller** und **F. Leuthardt**.

(23. IX. 49.)

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die biologische Citrullinsynthese²⁾ versuchten wir, das Citrullin auch mittels der Papierchromatographie nachzuweisen³⁾. Wir hielten uns dabei vor allem an die Angaben von *C. E. Dent*⁴⁾. Wir verwendeten eine mit Wasser gesättigte Phenollösung. Es zeigte sich aber, dass auch ziemlich beträchtliche Citrullinmengen auf dem Chromatogramm nicht in Erscheinung treten. In Versuchen mit Mitochondriensuspensionen, in

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

²⁾ *F. Leuthardt* und *A. F. Müller*, *Exper.* **4**, 478 (1948); *F. Leuthardt*, *A. F. Müller* und *H. Nielsen*, *Helv.* **32**, 744 (1949).

³⁾ *R. Conden*, *A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin*, *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).

⁴⁾ *C. E. Dent*, *Biochem. J.* **43**, 169 (1948).