

Abhängigkeit von deren Zusammensetzung studieren. Auch heterogene Reaktionen in elektrochemischen Zellen lassen sich so gut verfolgen.

Frage zur Elektronen- und Raumstruktur gasförmiger Moleküle können mit der Massenspektrometrie nicht unmittelbar angegangen werden. Allerdings hat die Massenspektrometrie zur Identifizierung von Partikeln bei Molekularstrahlexperimenten im magnetischen oder elektrischen Feld schon viel beigetragen^[147]. Vielversprechend sind Kombinationen optischer mit massenspektrometrischen Untersuchungen unter Einbeziehung von Mikrowellen- und Matrix-Techniken^[148], desgleichen Kombinationen mit

[147] *L. Wharton, R. A. Berg u. W. Klemperer*, *J. chem. Physics* 39, 2023 (1963); *A. Büchler, J. L. Stauffer, W. Klemperer u. L. Wharton*, *ibid.* 39, 2299 (1963); *M. Kaufman, L. Wharton u. W. Klemperer*, *ibid.* 43, 943 (1965); *R. A. Berg, L. Wharton u. W. Klemperer*, *ibid.* 43, 2416 (1965); *A. Büchler, J. L. Stauffer u. W. Klemperer*, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 4544 (1964).

[148] *W. Weltner jr.* in: *Condensation and Evaporation of Solids*. Gordon and Breach, New York 1964, S. 243; *W. Weltner jr. u. D. McLeod jr.*, *J. Molecular Spectroscopy* 17, 276 (1965); *J. physic. Chem.* 69, 3488 (1965); *D. Wite, K. S. Seshadri, D. F. Mann u. M. J. Linovsky*, *J. chem. Physics* 39, 2463 (1963); *R. L. Barger u. H. P. Broida*, *ibid.* 43, 2364, 2371 (1965); *P. H. Kasai u. W. Weltner jr.*, *ibid.* 43, 2553 (1965).

Strukturuntersuchungen durch Elektronenstreuung^[149]. Viele Probleme und Systeme, die hier erwähnt wurden, werden regelmäßig in Übersichtsartikeln behandelt und diskutiert^[150].

Wir danken unseren Mitarbeitern für deren Arbeitsbeiträge und Diskussionen. Wir danken ferner dem European Office of Aerospace Research, dem Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, dem Fonds National de la Recherche Scientifique und dem Fonds National de la Recherche Fondamentale Collective, welche die materiellen Mittel für die diesem Beitrag zugrundeliegenden eigenen Arbeiten gaben.

Eingegangen am 5. Januar 1966,
ergänzt am 13. Februar 1967 [A 574]

[149] *A. N. Khodchenkov, V. P. Spiridonov u. P. A. Akishin*, *Ž. strukturnoj Chim.* 6, 634, 764, 765 (1965).

[150] *Annual Review of Physical Chemistry*, *Ann. Rev. Inc.*, Palo Alto, Calif. (USA); *Progress in Inorganic Chemistry*, Interscience, New York; *Advances in High Temperature Chemistry*. Academic Press, New York.

Acetylcholin-Esterase^[**]

von N. ENGELHARD, K. PRCHAL UND M. NENNER^[*]

Die lebenswichtige Bedeutung, die die Acetylcholin-Esterase bei der Nervenfunktion besitzt, bringt es mit sich, daß ihre Blockade durch Phosphon- und Phosphorsäureester, die u.a. als Schädlingsbekämpfungsmittel Bedeutung haben, zu schweren physiologischen Schäden führt. Das Enzym und sein Wirkungsmechanismus, der zahlreiche Parallelen zu dem anderer Hydrolasen aufweist, sowie die Entwicklung von therapeutischen Mitteln (Reaktivatoren) gegen Phosphon- und Phosphorsäureester-Vergiftungen werden zusammenfassend besprochen.

A. Einführung

Die Fortleitung von Nervenimpulsen und ihre Übertragung auf andere Nerven oder die Endorgane ist ein kompliziertes Zusammenspiel bioelektrischer und biochemischer Vorgänge^[1-3].

Die Nervenzelle (Neuron) besteht in der Regel aus dem eigentlichen, den Zellkern enthaltenden Zelleib, von dem kurze, stark verästelte Fasern (Dendriten) und eine bis zu

[*] Dr. N. Engelhard

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Göttingen, Strahlenbiochemisches Laboratorium, jetzt: 5301 Rötingen, Merler Allee 45
Dipl.-Chem. K. Prchal
43 Essen, Bredestr. 17
Dipl.-Chem. M. Nenner
Physiologisch-chemisches Institut der Universität Göttingen, Strahlenbiochemisches Laboratorium
34 Göttingen, Humboldtallee 7

[**] Auszugsweise vorgetragen am 2. Juni 1964 in der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen, und am 19. Mai 1965 im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Abteilung Strahlenchemie, Mülheim/Ruhr.

[1] Übersichten zur Nervenphysiologie und -chemie: a) *J. P. Schadé u. D. H. Ford*: *Basic neurology, an introduction to the structure and function of the nervous system*. Elsevier, Amsterdam-London-New York 1965; b) *W. Blasius in Landois-Rosemann*: *Lehrbuch der Physiologie des Menschen*, 28. Aufl., Urban

1 m lange, am Ende meistens verästelte Faser (Neurit, Axon) ausgehen, und wird von einer Membran umschlossen. Während der Fortleitung des Erregungsimpulses läuft eine aus selektiven Konzentrationsverschiebungen von Na^+ - und K^+ -Ionen durch die Membran resultierende elektrische Po-

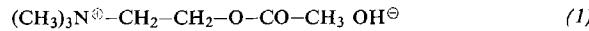
u. Schwarzenberg, München-Berlin 1962, Bd. 2, S. 629; c) *H.-D. Henatsch* in [1b], Bd. 2, S. 547; d) *A. v. Murralt*: *Die Signalübermittlung im Nerven*. Birkhäuser, Basel 1946; e) *Neue Ergebnisse der Nervenphysiologie*. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958; f) *J. C. Eccles*, *Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol.* 51, 299 (1961); g) *The physiology of synapses*. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964; h) *A. L. Hodgkin*, *Angew. Chem.* 76, 661 (1964); i) *A. F. Huxley*, *ibid.* 76, 668 (1964); k) *J. C. Eccles*, *ibid.* 76, 674 (1964); l) *J. del Castillo u. B. Katz*, *Progr. Biophysics biophysic. Chem.* 6, 122 (1956), vgl. dort S. 126; m) *C. G. Schmidt* in *B. Flaschenträger u. E. Lehnartz*: *Physiologische Chemie*. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956, Bd. II/2a, S. 613; n) *H. McIlwain*, *Annu. Rep. Progr. Chem.* 1960, 57, 367 (1961); o) *R. Whittam*, *ibid.* 57, 379 (1961); p) Vorträge beim „Symposium on the function of acetylcholin as a synaptic transmitter“. Vancouver 1962, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 41, 2553-2653 (1963).

[2] a) *D. Nachmansohn*, *Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol.* 48, 575 (1955); b) *Chemical and molecular basis of nerve activity*. Academic Press, New York-London 1959; c) *Bull. Soc. Chim. biol.* 45, 29 (1963); d) in *M. Sela*: *New perspectives in biology*. Elsevier, Amsterdam-London-New York 1964, S. 176.

[3] *G. B. Koelle* in *Heffter-Heubners Handbuch der experimentellen Pharmakologie*. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963, Erg.-Werk Bd. 15.

tentialwelle (Aktionspotential) das Neuron entlang. Die Übertragung des Impulses auf andere erregbare Strukturen (Neuronen, Muskeln, Drüsenorgane) geschieht an Kontaktstellen (Synapsen) zwischen Neuriten und entsprechenden „Empfängern“, z.B. den Dendriten anderer Nervenzellen. An der präsynaptischen Membran der Neuriten-Verästelung sind kleinste Bläschen angeordnet. Durch das Aktionspotential wird, wahrscheinlich aus diesen Bläschen, eine chemische Substanz (Aktionssubstanz, Überträgersubstanz, neurohumoraler Transmitter usw. genannt) in den ca. 100–200 Å breiten „synaptischen Spalt“ zwischen der präsynaptischen und der postsynaptischen Membran, dem Empfangsorgan der anderen erregbaren Struktur, ausgeschüttet und bewirkt hier über noch unbekannte spezifische Rezeptoren eine sehr schnelle Änderung der Ionen-Permeabilität der Membran und damit die Ausbildung eines elektrischen Potentials.

Die erste derartige Aktionssubstanz wurde 1921 von *Loewi* bei Versuchen am Nervus vagosympathicus isolierter Froschherzen gefunden^[4], „Vagusstoff“ genannt, und später als *O-Acetylcholin* (1), dessen Wirkung auf Blutdruck, Herz



und Nerven bereits seit 1914 bekannt war^[5], identifiziert^[6, 7]. In der Folgezeit wurde Acetylcholin als die wesentliche Aktionssubstanz der motorischen und parasympathischen Nervenfasern, sowie der sympathischen Nervenfasern vom Rückenmark und Gehirn bis zu den Nervenknoten (Ganglien), erkannt. Diese Gruppe von Nervenfasern wird als „cholinergisch“ bezeichnet. Die restlichen (postganglionären) Nervenfasern des Sympathicus sind dagegen „adrenergisch“, d.h. ihre Aktionssubstanzen sind Noradrenalin und Adrenalin („Sympathin E“ und „I“).

Die Einzelheiten der Funktion, die Acetylcholin bei der Permeabilitätsbeeinflussung der Membran ausübt, sind noch wenig bekannt. Eine Theorie hierfür entwickelte *Nachmansohn*^[2, 8], der die Substanz sowohl für die Übertragung des Impulses an den Synapsen als auch für die Impulsleitung entlang der Neuron-Membran verantwortlich macht. Soweit sie die Acetylcholin-Funktion bei der Impulsleitung betrifft, ist diese Theorie umstritten und die Theorie von *Dale* und seiner Schule^[11], die dem Acetylcholin nur bei der synaptischen Übertragung eine Rolle zuschreiben, wird als zutreffender angesehen.

Eine interessante Theorie stellte *Koelle* zur Diskussion^[9]. Nach ihr bewirkt das Aktionspotential an der präsynaptischen Membran, wahrscheinlich auch nicht-cholinergischer (!) Nerven, nur die Ausschüttung einer kleinen Menge Acetylcholin, die ihrerseits zusätzliche größere Mengen Acetylcholin – oder bei nicht cholinergischen Nerven andere Aktionssubstanzen – freisetzt, die nun erst den Reiz über den synaptischen Spalt hinweg auf die postsynaptische Membran übertragen.

[4] *O. Loewi*, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 189, 239 (1921).

[5] a) *H. H. Dale*, J. Physiology 48, Proc. III (1914); b) *R. Hunt*, Amer. J. Physiol. 45, 197, 231 (1918).

[6] a) *W. R. Witanowski*, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 208, 694 (1925); b) *O. Loewi* u. *E. Navratil*, ibid. 214, 678, 689 (1926).

[7] *E. Engelhart* u. *O. Loewi*, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 150, 1 (1930).

[8] *D. Nachmansohn* in [3], S. 701.

[9] a) *G. B. Koelle*, J. Pharmacy Pharmacol. 14, 65 (1962); b) *D. N. McKinstry*, *E. Koenig*, *W. A. Koelle* u. *G. B. Koelle*, Canad. J. Biochem. Physiol. 41, 2599 (1963).

Um nach einem Erregungsimpuls den nächsten Impuls zu ermöglichen, d.h. den ursprünglichen Membranzustand wieder herzustellen, muß das Acetylcholin in einer Erholungsphase rasch wieder entfernt werden. An dieser Stelle tritt das hochwirksame Enzym Acetylcholin-Acetylhydrolase-[3.1.1.7], Acetylcholin-Esterase, in Aktion, und hydrolysiert das Acetylcholin in wenigen μ sec zu Essigsäure und physiologisch kaum wirksamem Cholin. Das 1943 von *Nachmansohn* und *Machado*^[10] gefundene Enzym Acetyl-CoA : Cholin - *O*-Acetyltransferase - [2.3.1.6], Cholin-Acetylase, resynthetisiert das Acetylcholin in Gegenwart von ATP und CoA. In einer unwirksamen Speicherform wird Acetylcholin schließlich zur Wiederausschüttung bereitgestellt^[2, 8, 10, 11] (Abb. 1).

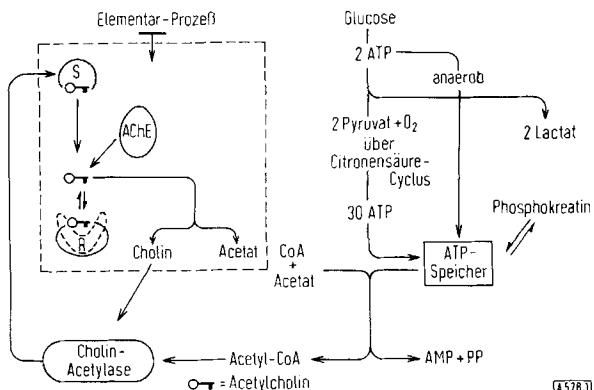


Abb. 1. Schema der Wirkung von Acetylcholin und Acetylcholin-Esterase und Beziehungen zum Stoffwechsel nach [2b]. (Man vergleiche dazu auch [1a], S. 207). AChE = Acetylcholin-Esterase; R = Rezeptorprotein; S = Speicherprotein. Die gestrichelte Figur in R symbolisiert die Konformationsänderung des Rezeptorproteins. Dadurch wird die Ionen-Permeabilität der Membran verändert. (Berichtigung: statt „30 ATP“ lies „36 ATP“).

Eine Hemmung der Acetylcholin-Esterase führt zu einer Anhäufung von Acetylcholin. Dadurch kann der ursprüngliche Membranzustand nicht wieder hergestellt werden, so daß eine schwere, oft tödliche „endogene Vergiftung“, u.a. mit Erregungs- und folgenden Lähmungserscheinungen, resultiert. Die entscheidende Todesursache ist meist eine Atemlähmung^[3, 12, 13].

Die gefährlichsten Acetylcholin-Esterase-Hemmer sind „Alkylphosphate“, gemischte Anhydride von Phosphon- oder Phosphorsäureestern mit anorganischen und organischen Säuren^[12, 14]. Hierzu gehören Schädlingsbekämpfungsmittel wie Parathion (E 605[®]) (2), Systox[®] (4), OMPA (Schradan) (5), TEPP (6) und hochwirksame Kampfstoffe („Nervengase“) wie DFP (7), Tabun (8), Sarin (9), Soman (10). Ein-

[10] a) *D. Nachmansohn* u. *A. L. Machado*, J. Neurophysiology 6, 397 (1943); b) *D. Nachmansohn* in [3], S. 40.

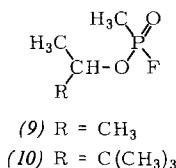
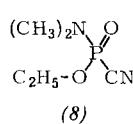
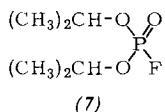
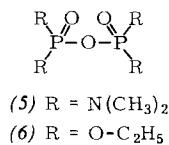
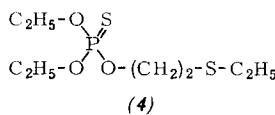
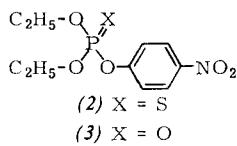
[11] *C. Hebb* in [3], S. 55.

[12] a) *B. C. Saunders*: Some aspects of the chemistry and toxic action of organic compounds containing phosphorus and fluorine. University Press, Cambridge 1957; b) *R. D. O'Brien*: Toxic phosphorus esters, Academic Press, New York-London 1960; c) *R. D. O'Brien* in *R. M. Hochster* u. *J. H. Quastel*: Metabolic inhibitors. Academic Press, New York-London 1963, Bd. 2, S. 205; d) *D. F. Heath*: Organophosphorus poisons, anticholinesterases and related compounds. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1961.

[13] *W. D. Erdmann* u. *L. Lendle*, Ergebn. inneren Med. Kinderheilkunde (N.F.) 10, 104 (1958).

[14] *G. Schrader*: Die Entwicklung neuer insektizidier Phosphorsäure-ester. 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1963.

zelne Alkylphosphate werden gelegentlich in der Humanmedizin eingesetzt. Paraoxon (E 600, Mintacol®) (3) findet z.B. als Mioticum (pupillenverengendes Mittel) in der augenärztlichen Praxis Verwendung.



Die Fragen nach der physiologischen Bedeutung der Acetylcholin-Esterase und die Forderungen nach einer wirkungsvollen Therapie^[13] der häufigen Alkylphosphatvergiftungen haben die Erforschung dieses Enzyms stark gefördert. Im folgenden soll ein Überblick über die wesentlichen Ergebnisse gegeben werden.

B. Allgemeine Eigenschaften der Acetylcholin-Esterase^[2, 3, 15-17]

I. Entdeckung und Charakterisierung

Loewi^[7] vermutete bereits 1926, daß das Acetylcholin von einer Esterase im Blut sehr rasch hydrolysiert wird und deshalb nur schwer identifiziert werden kann. Tatsächlich wurden derartige Enzyme im Blut und in fast allen tierischen Geweben und Organen nachgewiesen^[18]. *Stedman, Stedman* und *Easson*^[19] gelang 1932 schließlich die etwa siebenfache Anreicherung einer Esterase aus Pferdeserum, die Cholinesterase rasch hydrolysierte und als das für die Acetylcholin-Zerstörung verantwortliche Enzym angesehen wurde. *Alles* und *Hawes* bewiesen jedoch 1940/1941^[20], daß in den roten

[15] a) *K.-B. Augustinsson*, Acta physiol. scand. 15, Suppl. 52, 1 (1948); b) in *J. B. Sumner u. K. Myrbäck*: The enzymes. Academic Press, New York 1950, Bd. I/1, S. 443; c) *I. B. Wilson* in *P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck*: The enzymes. 2. Aufl., Academic Press, New York-London 1960, Bd. 4/A, S. 501; d) *K.-B. Augustinsson* in [15c], Bd. 4/A, S. 521; e) *D. Nachmansohn* in *G. Pincus u. K. V. Thimann*: The hormones. Academic Press, New York 1950, Bd. 2, S. 515; f) *R. Ammon* in *R. Ammon u. W. Dirscherl*: Fermente, Hormone, Vitamine. G. Thieme, Stuttgart 1959, Bd. 1, S. 128.

[16] *D. Nachmansohn u. I. B. Wilson*, Advances in Enzymol. 12, 259 (1951).

[17] *R. M. Krupka*, Canad. J. Biochem. 42, 677 (1964).

[18] a) *E. Abderhalden u. H. Paffrath*, Fermentforsch. 8, 299 (1926); b) *F. Plattner* et al., Arbeiten in Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 214, 112 (1926) bis 236, 175 (1935); c) *K. Matthes*, J. Physiology 70, 338 (1930).

[19] *Edgar Stedman, Ellen Stedman u. L. H. Easson*, Biochem. J. 26, 2056 (1932).

[20] a) *G. A. Alles u. R. C. Hawes*, J. biol. Chemistry 133, 375 (1940); b) *R. C. Hawes u. G. A. Alles*, J. Lab. clin. Med. 26, 845 (1941); c) Vgl. auch *D. Richter u. P. G. Croft*, Biochem. J. 36, 746 (1942).

Blutkörperchen eine weitere, mit der Nerven-, aber nicht mit der Serum-Acetylcholin-Esterase identische Esterase vorliegt, die das eigentliche für Acetylcholin spezifische Enzym ist.

Die zahlreichen späteren Untersuchungen führten dazu, daß man heute als Cholin-Esterasen im weiteren Sinn alle Cholinesterase spaltenden Hydrolasen (Esterasen) bezeichnet, die sich durch Physostigmin (Eserin) in einer Konzentration 10^{-5} M hemmen lassen. Diese Cholin-Esterasen unterteilt man in zwei Gruppen^[15b, 15d, 21]:

a) Acetylcholin-Acetylhydrolase-[3.1.1.7]^[22], Acetylcholin-Esterase (AChE), das eigentliche acetylcholin-spaltende Enzym, für das man früher u.a. folgende Synonyma benutzte: Erythrocyten- (bzw. e-Typ-) Cholinesterase, „wahre“ oder „spezifische“ Cholinesterase und Cholinesterase I.

b) Acylcholin-Acylhydrolase-[3.1.1.8]^[22] mit den Synonyma: Cholinesterase (ChE), Pseudocholinesterase, Serum- (bzw. s-Typ-) Cholinesterase, „nicht spezifische“ oder „unspezifische“ Cholinesterase, Cholinesterase II, X-Cholinesterase, oder spezifischere Namen wie z.B. Propionyl-, Butyryl- usw. Cholinesterase. Eine strenge Unterscheidung der beiden Gruppen ist schwierig, da Enzympräparate oft auch Anteile der anderen Gruppe enthalten können.

Unterscheidungskriterien für die beiden Gruppen^[15d, 21, 24-26] sind z.B.: 1. In der Reihe der homologen *O*-Acylcholine entspricht die relative Acetylcholin-Esterase-Aktivität der Reihenfolge Acetyl- \geq Propionyl- $>$ Butyryl-cholin; für die Cholin-Esterase gilt die umgekehrte Reihenfolge. 2. Acetylcholin-Esterase wird durch höhere Acetylcholin-Konzentrationen ($>$ ca. $3 \cdot 10^{-3}$ M) gehemmt, die Cholin-Esterase dagegen auch durch wesentlich höhere Acetylcholin-Konzentrationen (10^{-1} M) noch nicht. 3. Besonders wichtig ist die unterschiedliche Hemmbarkeit durch selektive Inhibitoren.

Für die Acetylcholin-Spaltung im Organismus ist anscheinend im wesentlichen nur die Acetylcholin-Esterase verantwortlich. Die physiologische Rolle der anderen Cholin-Esterasen ist noch unklar. Unsicher ist auch noch, ob die aus verschiedenen Organen und Tieren gewonnenen Acetylcholin-Esterase-Präparate vollständig identisch sind; zur exakten Charakterisierung sollte daher stets auch die Herkunft angegeben werden.

1. Vorkommen^[2, 15, 27]

Die Acetylcholin-Esterase ist eines der im Tierreich am weitesten verbreiteten Enzyme. Bei Einzellern sind ihr Vorkommen und ihre Identität umstritten. In Pflanzen wurde sie bisher nicht nachgewiesen.

Die Acetylcholin-Esterase ist im Gewebe besonders dort angereichert, wo sie ihre biologische Funktion ausübt. Daneben

[21] *K.-B. Augustinsson* in [3], S. 93.

[22] Systematischer Name [23].

[23] Enzyme nomenclature, recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of enzymes, together with their units and the symbols of enzyme kinetics, in *M. Florkin u. E. H. Stotz*: Comprehensive Biochemistry. 2. Aufl., Elsevier, Amsterdam-London-New York 1965, Bd. 13.

[24] *D. Nachmansohn u. M. A. Rothenberg*, J. biol. Chemistry 158, 653 (1945).

[25] *K.-B. Augustinsson*, Arch. Biochemistry 23, 111 (1949).

[26] *K.-B. Augustinsson* in *D. Glick*: Methods of biochemical analysis. Interscience, New York-London 1957, Bd. 5, S. 1.

[27] *G. B. Koelle* in [3], S. 187.

kommt aber auch Acetylcholin-Esterase vor, deren Identität mit der Nerven-Acetylcholin-Esterase nicht völlig sichergestellt ist und/oder deren physiologische Funktion unklar ist. Beim Menschen und den meisten Säugetieren ist eine solche Acetylcholin-Esterase im Blut praktisch vollständig in den Erythrocyten lokalisiert, während das Serum (ausgenommen Rinderserum) selbst reichlich Cholin-Esterase enthält. Fische und Vögel haben dagegen in den Erythrocyten meist keine oder nur sehr wenig Acetylcholin-Esterase, dafür aber reichlich im Serum. Hydrolasen vom Typ der Acetylcholin-Esterase findet man schließlich auch im Blut der Weinbergschnecke^[27a] und in manchen Schlangengiften, z.B. dem der Kobra.

Besonders bedeutungsvoll ist der hohe Gehalt an Acetylcholin-Esterase im elektrischen Organ^[28, 29] der Zitteraaale (*Electrophorus electricus*), dem bevorzugten Ausgangsmaterial zur Gewinnung angereicherter Präparate dieses Enzyms. Weitere Quellen sind der Zitterrochen (*Torpedo marmorata*, *T. ocellata* und *T. occidentalis*), sowie die Kopfganglien von Tintenfischen (*Loligo pealii*, *Sepia officinalis*).

2. Analytische Bestimmung^[21, 26]

Die Verfahren zur Bestimmung der Acetylcholin-Esterase-Aktivität in biologischen Flüssigkeiten, Homogenaten, Extrakten und Enzympräparaten sowie für kinetische Untersuchungen beruhen im Prinzip entweder auf der Bestimmung des restlichen Substrats nach einer festgelegten Inkubationszeit mit dem Enzym oder auf der Bestimmung der enzymatisch gebildeten Produkte, z.B. der Essigsäure bei Verwendung von Acetylcholin als Substrat. Es können aber auch andere Substrate eingesetzt werden. Die früher vielfach benutzten biologischen Verfahren zur Bestimmung des Rest-Acetylcholins wurden wegen ihrer geringen Genauigkeit aufgegeben.

Die häufig benutzte chemische Mikro-Methode (*Hestrin*^[30]) beruht auf der Umsetzung des unverbrauchten Acetylcholins mit alkalischer Hydroxylaminolösung zu Acethydroxamsäure, die als Fe(III)-Komplexion photometriert wird. Modifikationen der Hestrin-Methode arbeiteten u.a. *Pilz*^[31] sowie *Bockendahl* und *Ammon*^[32] aus. Diese beiden Vorschriften sollen sich als klinische Routinemethoden bewährt haben.

Die Hestrin-Methode erlaubt zwar eine Variation der Inkubationsparameter, wie sie z.B. bei kinetischen Untersuchungen notwendig ist, soll jedoch um 15–20 % zu niedrige Werte für die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion liefern^[33]. Man wird die Methode daher besser nur für rasche Serienmessungen benutzen.

Von den photometrischen Methoden zur direkten Bestimmung der Reaktionsprodukte sei eine empfindliche Mikro-

[27a] *H. Bockendahl u. Th.-M. Müller*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 341, 185 (1965).

[28] *H. Grundfest*, Progr. Biophysics biophysic. Chem. 7, 1 (1957).

[29] *C. Chagas u. A. P. de Carvalho*: Bioelectrogenesis, a comparative survey of its mechanisms with particular emphasis on electric fishes. Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton 1961.

[30] *S. Hestrin*, J. biol. Chemistry 180, 249 (1949).

[31] *W. Pilz* in *H.-U. Bergmeyer*: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962, S. 765.

[32] *H. Bockendahl u. R. Ammon* in [31], S. 771.

[33] *L.T. Kremzner u. I. B. Wilson*, J. biol. Chemistry 238, 1714 (1963).

methode erwähnt^[34, 35], bei der *S*-Acetylthiocholin als Substrat dient und das gebildete Thiocholin mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoësäure) bestimmt wird. Die Methode eignet sich besonders auch zur kontinuierlichen Verfolgung der Hydrolyse mit Acetylcholin-Esterase^[35].

Bei der wichtigen und häufig benutzten Ammonschen Acetylcholin-Esterase-Bestimmung wird das aus NaHCO_3 durch die enzymatisch gebildete Essigsäure freigesetzte CO_2 im Warburg-Apparat manometrisch gemessen^[32, 36, 37]. Diese Methode erlaubt die zeitliche Verfolgung der Enzymreaktion in einem einzigen Ansatz und empfiehlt sich daher für kinetische Untersuchungen; für routinemäßige Aktivitätsbestimmungen dürfte sie dagegen meist zu zeitraubend sein. Ein Nachteil im Hinblick auf kinetische Messungen ist aber, daß der pH-Wert des Ansatzes kaum variiert werden kann. Bei weiteren Bestimmungsmethoden wird entweder die durch die gebildete Essigsäure verursachte geringe pH-Änderung in einem gepufferten Ansatz colorimetrisch^[38] oder elektrometrisch^[39] gemessen und aus der pH-Änderung in der Zeiteinheit die Enzymaktivität berechnet, oder durch laufende Titration der Essigsäure mit Natronlauge der pH-Wert konstant gehalten^[40], wobei der Natronlauge-Verbrauch dem umgesetzten Acetylcholin direkt proportional ist. Mit automatischen und registrierenden Titratoren (pH-Stat)^[41, 42] wurde eine genaue und schnelle Bestimmungsmethode entwickelt, die für enzymkinetische Untersuchungen die Variation der Versuchsparameter (z.B. pH, Art und Konzentration von Salzen, Substraten und Inhibitoren, Temperatur usw.) in weiten Grenzen erlaubt. Für cytologische Untersuchungen besonders geeignete Bestimmungsmethoden stellte *Koelle* zusammen^[27].

3. Gewinnung angereicherter Acetylcholin-Esterase-Präparate^[15a, 15b, 16, 21, 43]

Als Ausgangsmaterialien zur Gewinnung angereicherter Acetylcholin-Esterase-Präparate kommen vor allem Säugetier-Erythrocyten und elektrische Organe von Fischen in Frage.

Die Gewinnung aus Erythrocyten stößt auf Schwierigkeiten, weil die Acetylcholin-Esterase anscheinend an der Zellmembran haftet^[15a, 44]. *Augustinsson*^[15a] benutzte daher Lyssolecithin zur Abtrennung des Enzyms vom Stroma, während *Cohen* und *Warringa*^[45] dafür einen Pankreasextrakt, *Zittle*

[34] *P. J. Garry u. J. I. Routh*, Clin. Chem. (New York) 11, 91 (1965).

[35] *G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres jr. u. R. M. Featherstone*, Biochem. Pharmacol. 7, 88 (1961).

[36] *R. Ammon*, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 233, 486 (1934).

[37] *R. F. Witter*, Toxicol. appl. Pharmacol. 4, 313 (1962).

[38] *H. Croxatto, R. Croxatto u. F. Huidobro*, An. Acad. biol., Univ. Chile 3, 55 (1939); Chem. Abstr. 38, 5516 (1944).

[39] *H. O. Michel*, J. Lab. clin. Med. 34, 1564 (1949).

[40] a) *D. Glick*, Biochem. J. 31, 521 (1937); b) *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim.* 21, 225, 263 (1938).

[41] a) *C. F. Jacobsen u. J. Léonis*, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 27, 333 (1951); b) *I. B. Wilson u. E. Cabib*, J. Amer. chem. Soc. 76, 5154 (1954); c) *J. B. Neilands u. M. D. Cannon*, Analytic. Chem. 27, 29 (1955); d) *L. Larsson u. B. Hansen*, Svensk. kem. Tidskr. 68, 521 (1956); e) *L. W. Cunningham* in *K. Lang u. E. Lehnartz*: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10. Aufl., Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg - New York 1964, Bd. 6/A, S. 279.

[42] Die Theorie des pH-Stat besprechen z.B. *C. F. Jacobsen, J. Léonis, K. Linderström-Lang u. M. Ottesen* in [26], Bd. 4, S. 171.

[43] *D. Nachmansohn u. I. B. Wilson* in *S. P. Colowick u. N. O. Kaplan*: Methods in enzymology. Academic Press, New York 1955, Bd. 1, S. 642.

[44] *S. Paléus*, Arch. Biochemistry 12, 153 (1947).

[45] a) *J. A. Cohen u. M. G. P. J. Warringa*, Biochim. biophysica Acta 10, 195 (1953); b) *M. G. P. J. Warringa u. J. A. Cohen*, ibid. 16, 300 (1955).

und Mitarbeiter^[46] das oberflächenaktive Polyoxyäthylen-sorbitanlaurat (= Tween 20) verwendeten. Die besten bisher beschriebenen Acetylcholin-Esterase-Präparate aus Erythrocyten wiesen aber nur die spezifische Aktivität^[47] 42 auf^[45], die Ausbeuten waren außerdem gering.

Wesentlich höher angereicherte Präparate konnten aus den elektrischen Organen von *Electrophorus electricus* gewonnen werden, in denen die spezifische Aktivität von vornherein größer ist. Beispielsweise erhielten Rothenberg und Nachmansohn^[43,48] Präparate mit spezifischen Aktivitäten bis 7700. Anknüpfend an diese Versuche reicherten schließlich Kremzner und Wilson^[33] das Enzym bis zu einer spezifischen Aktivität von 11000 (pH = 7,0; 25 °C) an, die nahezu dem maximalen Reinheitsgrad entspricht. Die Autoren chromatographierten die vorgereinigten^[48] Extrakte nacheinander an Benzyl-DEAE-Cellulose, Sephadex G-200, Cellex P und zweimal an DEAE-Cellulose.

4. Physikalische Eigenschaften des Acetylcholin-Esterase-Moleküls und kinetische Werte

Für das Molekulargewicht der Acetylcholin-Esterase wurden Werte zwischen 70000 und 31 Millionen mitgeteilt. Selbst die extremsten Werte waren durchaus plausibel, denn die Präparate mußten nach Kriterien wie Elektrophorese, Sedimentation und Chromatographie als weitgehend einheitlich angesehen werden. Auch wenn man annimmt, daß die Präparate noch unrein waren und daß auch das Ausgangsmaterial eine Rolle spielt, sind die Ursachen für die Diskrepanzen nicht klar. Man muß möglicherweise mit mehreren verschiedenen großen „Assoziaten“ oder „Polymeren“ der Acetylcholin-Esterase-Moleküle, sowohl untereinander als auch mit anderen Proteinen, rechnen, deren Bildung oder Beständigkeit stark von den Versuchsbedingungen abhängt^[46,48-51].

Kremzner und Wilson^[52] zeigten, daß sich Präparate mit spezifischen Aktivitäten zwischen 5000 und 11000 bei der Sedimentation völlig gleich verhielten, obwohl die weniger aktiven Präparate chromatographisch in mehrere Komponenten getrennt werden konnten.

Am zuverlässigsten dürften die von Kremzner und Wilson an ihrem hochaktiven Präparat mit der spezifischen Aktivität 11000 (25 °C; pH = 7,0) aus *Electrophorus*^[33] bestimmten Werte sein^[52] (Tabelle 1).

[46] a) C. A. Zittle, E. S. DellaMonica u. J. H. Custer, Arch. Biochem. Biophysics 48, 43 (1954); b) C. A. Zittle, E. S. DellaMonica, J. H. Custer u. R. Krikorian, ibid. 56, 469 (1955).

[47] Definitionen nach [23]: „spezifische Aktivität“ gleich Anzahl Enzymeinheiten je mg Protein; „Enzymeinheit“ gleich Enzymmenge, die in 1 min 1 µMol Substrat (hier Acetylcholin) unter den angegebenen Bedingungen (hier meist pH = 7-7,5 und 37-38 °C) umsetzt.

[48] M. A. Rothenberg u. D. Nachmansohn, J. biol. Chemistry 168, 223 (1947).

[49] H. C. Lawler, J. biol. Chemistry 234, 799 (1959); 238, 132 (1963).

[50] H. C. Lawler, J. biol. Chemistry 236, 2296 (1961).

[51] a) A. B. Hargreaves in [29], S. 397; b) A. B. Hargreaves, A. G. Wanderley, F. Hargreaves u. H. S. Gonçalves, Biochim. biophysica Acta 67, 641 (1963).

[52] L. T. Kremzner u. I. B. Wilson, Biochemistry 3, 1902 (1964).

Tabelle 1. Physikalische Eigenschaften und kinetische Werte der Acetylcholin-Esterase.

| | | |
|---|---|------|
| Sedimentationskonstante $s_{20^{\circ}\text{C},w}$ | 10,8 S | [52] |
| Diffusionskoeffizient $D_{4^{\circ}\text{C}}$ | $2,6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ | [52] |
| Reibungsverhältnis f/f_0 | ≈ 1,25 | [52] |
| Molekulargewicht | | |
| aus Sedimentation und Diffusion | ≈ 230000 | [52] |
| durch Gelfiltration | ≈ 250000 | [52] |
| aus Aktivität pro Wirkstelle [50] | > 240000 | [52] |
| Äquivalentgewicht pro Wirkstelle | ≈ 54000 | [52] |
| UV-Absorptionsspektrum | $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 2,29$) | [53] |
| | $\lambda_{\text{min}} = 250 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 1,37$) | [55] |
| pH-Optimum | Schultern bei 290, 278 und 258 $\text{m}\mu$ | [54] |
| Michaelis-Konstante K_m (bei 15-35 °C mit automatischem Titriator bestimmt) | $8,25 (8,0-8,5)$ $1 \cdot 10^{-4}$ | [55] |
| Aktivität pro mol Wirkstellen [56] | $6,1 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ([52], s. auch [57,50]) | |

Aus dem Äquivalentgewicht pro Wirkstelle ergibt sich eine Zahl von vier Untereinheiten pro sedimentierende Einheit, jedoch ist noch unklar, ob es sich hierbei um dissoziierbare und unabhängig aktive Untereinheiten handelt.

Über die kinetischen Werte der Acetylcholin-Esterase liegen zahlreiche Untersuchungen unter den verschiedensten Bedingungen vor^[2b,3,15,54] (siehe auch Tabelle 1).

Die Zahl der Wirkstellen wurde z.B. durch Hemmung mit Diäthoxyphosphoryl-thiocholin oder ^{32}P -markiertem Tetraäthylpyrophosphat [TEPP, (6)] bestimmt^[50]. Wilson und Harrison^[57] titrierten mit *N,N*-Dimethylcarbaminsäure-fluorid; Bender und Stopps^[61] beschrieben kürzlich eine Methode mit *o*-Nitrophenyl-*N,N*-dimethylcarbamat. Aus der Aktivität pro mol Wirkstellen wurde auch berechnet, daß unter physiologischen Bedingungen die örtliche Konzentration der Acetylcholin-Esterase ca. $5 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ N sein muß, um einen genügend schnellen Abbau des Acetylcholins zu gewährleisten^[57].

Die Aktivität des Enzyms wird von anorganischen Ionen beeinflußt^[54]. Durch NaCl wird es bei Acetylcholin-Konzentrationen $>$ ca. 10^{-3} M aktiviert, darunter gehemmt. Myers^[58] deutet diese Erscheinungen als Einfluß der Ionenstärke auf die Gleichgewichtskonstanten des Michaelis-Komplexes (ES) und eines substratgehemmten Komplexes (ES₂). Zweiwer-

[53] In Klammern spezieller Extinktionskoeffizient in $\text{cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$.

[54] J. A. Cohen u. R. A. Oosterbaan in [3], S. 299.

[55] I. B. Wilson u. E. Cabib, J. Amer. chem. Soc. 78, 202 (1956).

[56] Engl.: „activity per site“ oder „catalytic center activity“; die frühere Bezeichnung „Wechselzahl“ („turnover number“) soll nicht mehr benutzt werden [23].

[57] I. B. Wilson u. M. A. Harrison, J. biol. Chemistry 236, 2292 (1961).

[58] D. K. Myers, Arch. Biochem. Biophysics 37, 469 (1952).

[59] Man vgl. z.B. [41b] und S. L. Friess, I. B. Wilson u. E. Cabib, J. Amer. chem. Soc. 76, 5156 (1954).

[60] Acetylcholin-Esterase-Handelspräparate enthalten solche Zusätze meist von vornherein; z.B. Erythrocyten-Acetylcholin-Esterase von Mann Research Lab., New York, laut Firmenmitteilung auf ca. 20 mg Enzym 100 mg Gelatine, gelöst in 5 ml 1 M Na-Phosphat, pH = 7,6, und 30,7 mg NaCl.

[61] M. L. Bender u. J. K. Stoops, J. Amer. chem. Soc. 87, 1622 (1965).

tige Ionen, z. B. Mg^{2+} , erhöhen die Aktivität des Enzyms wesentlich stärker als einwertige. Der Grund ist noch unklar, die Acetylcholin-Esterase ist jedoch wahrscheinlich kein „Metall-Enzym“^[59]. Um vor unkontrollierbaren Einflüssen sicher zu sein, werden daher Lösungen als günstig angesehen^[54], die etwa 0,15 M an NaCl und 0,01–0,04 M an $MgCl_2$ sind. Alle kinetischen Untersuchungen, die im folgenden erwähnt werden, beziehen sich auf solche salzhaltigen Lösungen. Öfter wird auch Protein (z.B. Gelatine) zur Stabilisierung der gelösten Acetylcholin-Esterase zugesetzt^[60].

C. Wirkungszentrum und Reaktionsmechanismus^[2b, 15, 17, 54, 62-64]

Von den im folgenden beschriebenen Erkenntnissen gelten die meisten nicht nur für die Acetylcholin-Esterase, sondern auch für verwandte Hydrolasen. Umgekehrt sind aber auch viele Befunde, die z.B. bei Cholin-Esterase^[65] und besonders bei α -Chymotrypsin^[66] gewonnen wurden, auf die Acetylcholin-Esterase übertragbar.

Die katalytische Wirkung der Acetylcholin-Esterase beruht nicht auf einem Coenzym, sondern auf dem Bau des Enzymproteins selbst. Durch die Faltung des Proteins rücken einige Aminosäuren aus entfernten Bereichen der Kette nahe aneinander und bilden das „aktive Zentrum“ („Wirkungszentrum“, „active site“). In diesem Zentrum sind zwei „Wirkstellen“ vorhanden: Die eine ist für die Fixierung des Substrats und weitgehend auch für die Spezifität des Enzyms verantwortlich; die andere bewirkt die Substratspaltung.

I. Substratfixierung und Spezifität („Anionische Wirkstelle“)

Die Acetylcholin-Esterase spaltet bevorzugt Ester, die eine kationische Gruppe (Alkylammoniumgruppe) enthalten. Das beste Substrat ist Acetylcholin; Ester, deren kationische Gruppe näher oder weiter als zwei CH_2 -Gruppen vom Alkohol-Sauerstoff entfernt ist, sind schlechtere Substrate. Derartige Ester werden aber manchmal gut von anderen Cholin-Esterasen hydrolysiert. Auch Kettenverzweigungen und sterische Verhältnisse spielen eine Rolle. Neutrale Ester, z.B. Äthylacetat, werden weitaus langsamer gespalten.

Die Bevorzugung von Substraten mit einer kationischen Gruppe legt es nahe, im aktiven Zentrum der

[62] I. B. Wilson in W. D. McElroy u. B. Glass: A symposium on the mechanism of enzyme action. Johns Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 642.

[63] F. Bergmann, Advances Catalysis related Subjects 10, 130 (1958).

[64] Mehrere Vorträge zum Thema in: a) Discuss. Faraday Soc. 20 (1955); b) P. A. E. Desnuelle: Molecular basis of enzyme action and inhibition (Proc. 5th International Congress of Biochemistry, Moscow 1961, Bd. 4), Internat. Union Biochemistry, Symposium Serie, Pergamon Press, Oxford 1963, Bd. 24.

[65] O. Svensmark, Acta physiol. scand. 64, Suppl. 245 (1965).

[66] Übersicht z.B.: M. L. Bender u. F. J. Kézdy, J. Amer. chem. Soc. 86, 3704 (1964).

Acetylcholin-Esterase eine negativ geladene („anionische“) Wirkstelle („anionic site“) anzunehmen^[67-71], die das Substrat mit Coulomb-Kräften bindet und auf die benachbarte „esteratische Wirkstelle“ („esteratic site“), welche die Hydrolyse katalysiert, ausrichtet. Die Vermutung, daß das Enzym zwei anionische Wirkstellen besitzt^[63, 72, 73], trifft wahrscheinlich nicht zu^[15c, 74].

Weitere Beweise für die Existenz der anionischen Wirkstelle lieferten Versuche mit reversibel abspaltbaren Inhibitoren. Die wirksamsten haben ebenfalls ein positiv geladenes Stickstoffatom; ihre Hemmwirkung wird geringer, wenn man die kationische Gruppe in eine ungeladene überführt^[68]. Schließlich deutet auch der Salzeffekt anorganischer Ionen bei der Hemmung auf ein Zusammenwirken geladener Gruppen bei der Fixierung^[70].

Außer Coulomb-Kräften tragen van-der-Waals-Kräfte an den Methylgruppen des Cholins und ungeladener Substrate^[71, 74, 75] sowie schwache covalente Kräfte zwischen dem Carbonyl-C-Atom des Esters und der esteratischen Wirkstelle^[76-78] zur Substratfixierung bei. Wegen Wasserstoffbrücken siehe^[71, 80b].

II. Substratpaltung („Esteratische Wirkstelle“)

Nach Wallenfels und Streffer handelt es sich bei der Mehrzahl enzymatischer Katalysen um Variationen der Säure-Base-Katalyse^[86]. Dazu müssen in der esteratischen Wirkstelle eine „saure“ und eine „basische“ Wirkgruppe vorliegen, deren Funktion bei der enzymatischen Reaktion vom Protonierungsgrad und damit vom pH-Wert abhängig ist. Die Existenz derartiger Wirkgruppen in der Acetylcholin-Esterase folgerten Wilson und Bergmann^[68, 76] aus der glockenförmigen pH-Aktivitätskurve (Abb. 2), die den reversiblen Aktivitätsverlust beiderseits des pH-Optimums zeigt.

Der Aktivitätsabfall im sauren Bereich bezieht sich auf die Inaktivierung der basischen Wirkgruppe durch Protonierung. Durch kinetische Studien der pH-Abhängigkeit der maximalen Spaltungsgeschwindigkeit von geladenen und ungeladenen Substraten kam Krupka zu dem Schluß, daß sich die basische Wirkgruppe aus einer „ersten“ (B_1) und einer „zweiten“

[67] E. A. Zeller u. A. Bissegger, Helv. chim. Acta 26, 1619 (1943).

[68] I. B. Wilson u. F. Bergmann, J. biol. Chemistry 185, 479 (1950).

[69] D. H. Adams u. V. P. Whittaker, Biochim. biophysica Acta 4, 543 (1950).

[70] D. K. Myers, Arch. Biochemistry 27, 341 (1950).

[71] I. B. Wilson, J. biol. Chemistry 197, 215 (1952).

[72] F. Bergmann, I. B. Wilson u. D. Nachmansohn, Biochim. biophysica Acta 6, 217 (1950).

[73] F. Bergmann, Discuss. Faraday Soc. 20, 126 (1955).

[74] S. A. Bernhard, J. Amer. chem. Soc. 77, 1966, 1973 (1955).

[75] S. L. Friess, B. Witkop, R. C. Durant, L. J. Reber u. W. C. Thommesen, Arch. Biochem. Biophysics 96, 158 (1962).

[76] I. B. Wilson u. F. Bergmann, J. biol. Chemistry 186, 683 (1950).

[77] F. Bergmann, I. B. Wilson u. D. Nachmansohn, J. biol. Chemistry 186, 693 (1950).

[78] I. B. Wilson, Biochim. biophysica Acta 7, 466 (1951).

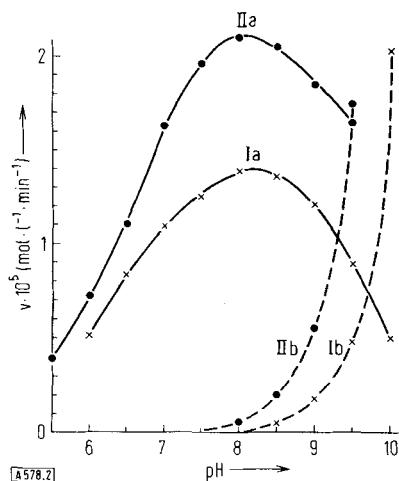


Abb. 2. pH-Aktivitätskurven der Acetylcholin-Esterase.

Ia und IIa: Geschwindigkeit der enzymatischen Acetylcholin-Spaltung; Ib und IIb: Selbstverseifungsgeschwindigkeit des Acetylcholins. Acetylcholin-Konzentration: $\times: 2,06 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $\bullet: 8,24 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Enzymkonzentration: 10 mg/l (Enzym aus Rinder-Erythrocyten; Mann Research/New York; vgl. [60]) in 0,1 M NaCl + 0,01 M MgCl₂-Lösung. Nach pH-Stat-Methode (Titrigraph von Radiometer/Copenhagen) mit 0,02 N NaOH bei 35 °C unter N₂ titriert.

(B₂) Gruppe ($pK = 6,3$ bzw. 5,5) zusammensetzt [80]. Der Aktivitätsabfall im alkalischen Bereich ist dagegen auf die inaktivierende Deprotonierung der sauren Wirkgruppe AH ($pK = 9,2$) zurückzuführen [78, 79]. Gleichungen für die pH-Abhängigkeit der Aktivität siehe [76, 79, 81, 82].

Im einfachsten Schema für enzym-katalysierte Reaktionen bilden das Enzym (E) und das Substrat (S) einen Komplex (ES), aus dem die Produkte der Reaktion hervorgehen. Bei der Acetylcholin-Esterase entstehen aus dem Enzym-Substrat-Komplex (ES) ein acetyliertes Enzym (EAc) [84, 85] und Cholin; das acetylierte Enzym (EAc) wird schließlich zu Acetat und freiem Enzym hydrolysiert (siehe Abb. 4).

Bei nicht-enzymatischen Esterhydrolysen, die im allgemeinen nach einem B_{Ac2}-Mechanismus ablaufen, ist der elektrophile Estercarbonyl-Kohlenstoff der Angriffspunkt des Hydroxidions, der „basischen Gruppe“. Ebenso ist es bei der enzymatisch katalysierten Acetylcholin-Hydrolyse wahrscheinlich, daß der Carbonyl-Kohlenstoff mit Hilfe der basischen Wirkgruppe B₂ nucleophil unter Bildung des acetylierten Enzyms (EAc) angegriffen wird. Dabei bildet die saure Gruppe (AH) zunächst eine Wasserstoffbrücke zum Alkohol-Sauerstoff, und im nächsten Schritt wird dann der Cholinrest abgespalten. Die acetylierte Gruppe wird schließlich durch eine Konformationsänderung in die Nähe der zweiten basischen Gruppe B₁ gebracht, welche die Desacetylierung durch Wasser oder andere nucleophile Agentien katalysiert [78, 83] (siehe Abb. 3).

Für Acetylcholin, Acetylthiocholin und Phenylacetat ist die Desacetylierung geschwindigkeitsbestimmend, dagegen für

[79] a) K. J. Laidler, Trans. Faraday Soc. 51, 528, 540, 550 (1955); b) R. M. Krupka u. K. J. Laidler, ibid. 56, 1467, 1477 (1960).

[80] a) R. M. Krupka, Biochemistry 5, 1983 (1966); b) ibid. 5, 1988 (1966).

[81] J. A. Cohen u. R. A. Oosterbaan in [3], S. 299.

[82] R. M. Krupka, Arch. Biochem. Biophysics 97, 277 (1962).

[83] I. B. Wilson, F. Bergmann u. D. Nachmansohn, J. biol. Chemistry 186, 781 (1950).

[84] A. K. Balls u. F. L. Aldrich, Proc. nat. Acad. Sci. USA 41, 190 (1955).

[85] A. K. Balls u. H. N. Wood, J. biol. Chemistry 219, 245 (1956).

relativ schlechte Substrate wie Methylaminoäthylacetat die Acetylierung [80]. Beweise für den postulierten Mechanismus sind u.a. der ¹⁸O-Austausch zwischen Acetat und H₂¹⁸O in Gegenwart von Acetylcholin-Esterase [87, 88] und die Tatsache, daß die auf dieser Basis erweiterten kinetischen Gleichungen die Meßwerte am besten beschreiben. Die Bildung eines acetylierten Enzyms erklärt ferner die Beobachtung, daß Acetylcholin-Esterase transacetylieren kann [83] und hat eindeutige Parallelen in der Bildung eines phosphorylierten Enzyms bei der Reaktion mit Alkylphosphaten.

1. Chemische Natur der Wirkstellen und Wirkgruppen

a) Anionische Wirkstelle

Als Träger der negativen Ladung in der anionischen Wirkstelle sind die ω -Carboxygruppen von Aminodicarbonsäuren am wahrscheinlichsten. Abbaustudien zeigten, daß im vermuteten aktiven Zentrum Glutaminsäure vorliegt; andere Esterasen enthalten stattdessen Asparaginsäure [89, 90].

b) Esteratische Wirkstelle

Zahlreiche Befunde deuten darauf, daß das Serin, das in allen Hydrolasen enthalten ist [89, 90], mit seiner Hydroxygruppe in der esteratischen Wirkstelle eine wichtige Rolle spielt [91]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß sich die Hydrolasen stöchiometrisch mit ³²P-markiertem Diisopropylfluorophosphat [DFP, (7)] hemmen lassen [92, 93] (vgl. auch [50, 57]) und die anschließende Hydrolyse des Proteins O-Diisopropoxy-phosphorylserin liefert [94] (vgl. auch [95]). Auch wenn nachgewiesen wurde, daß diese Phosphorylierung sowie die Acetylierung mit *p*-Nitrophenylacetat [96] am Serin vor sich gehen, bestehen noch Zweifel über den Ort der Acetylierung bei der normalen Substratpaltung [97].

In der bisher nur bezüglich eines Tripeptids aufgeklärten Aminosäuresequenz der Acetylcholin-Esterase sind Glutaminsäure und Alanin dem Serin benachbart: —Glu—Ser—Ala— [98]. Die Butyrylcholin-Esterase zeigt die gleiche Teilsequenz, während in mehreren anderen Esterasen die Gruppierung —Asp—Ser—Gly— gefunden wurde [89, 90].

Freies Serin katalysiert unter physiologischen Bedingungen weder Esterhydrolysen [99] noch reagiert es mit Alkylphos-

[86] K. Wallenfels u. C. Streffer in: Mechanismen enzymatischer Reaktionen (Vortrag beim 14. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, Mosbach/Baden 1963). Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964, S. 6, und Diskussionsbemerkung M. Eigen, S. 42.

[87] S. S. Stein u. D. E. Koshland jr., Arch. Biochem. Biophysics 45, 467 (1953).

[88] R. Bently u. D. Rittenberg, J. Amer. chem. Soc. 76, 4883 (1954).

[89] F. Sanger, Proc. chem. Soc. (London) 1963, 76.

[90] R. A. Oosterbaan u. J. A. Cohen in T. W. Goodwin, J. I. Harris u. B. S. Hartley: Structure and activity of enzymes (Federation European Biochemical Societies Symposium No. 1, London 1964). Academic Press, London-New York 1964, S. 87.

[91] D. E. Koshland jr., Bull. Soc. Chim. biol. 46, 1745 (1964).

[92] E. F. Jansen, M. D. F. Nutting, R. Jang u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 179, 189, 201 (1949).

[93] H. O. Michel u. S. Krop, J. biol. Chemistry 190, 119 (1951).

[94] N. K. Schaffer, S. C. May jr. u. W. H. Summerson, J. biol. Chemistry 206, 201 (1954).

[95] W. N. Aldridge, Annu. Rep. Progr. Chem. 53, 294 (1957).

[96] R. A. Oosterbaan u. M. E. v. Adrichem, Biochim. biophysica Acta 27, 423 (1958).

[97] S. A. Bernhard, S. J. Lau u. H. Noller, Biochemistry 4, 1108 (1965).

[98] D. C. Shaw, unveröffentlicht, siehe [89].

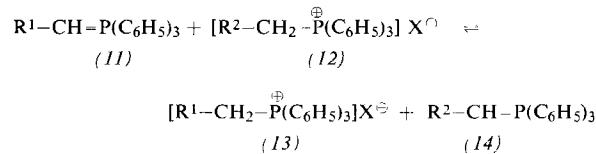
[99] V. I. Rozengart, Doklady Akad. Nauk SSSR 133, 1223 (1960); vgl. Dokl. Biochem. Sect. (Engl. Transl. Biochem. Sect. Proc. Acad. Sci. USSR) 130/35, 179 (1960/61).

H-Atome der CH_2 -Gruppe. Ersetzt man den Triphenylphosphinrest in (7) durch den Tricyclohexylphosphinrest, so wirkt sich der (-I)-Effekt der drei Cyclohexylreste im Phosphoniumbromid (9) festigend auf die CH-Bindungen der Methylengruppe aus. Zur Deprotonisierung von (9) reicht Natriumcarbonat-Lösung nicht mehr aus; man benötigt verdünnte Natronlauge [12].

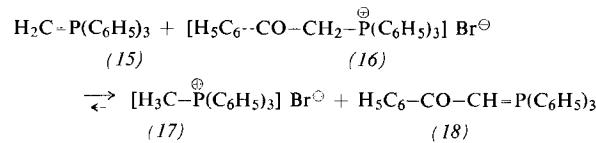
Tricyclohexylphosphin-methoxycarbonylmethylen (10) ist basischer als die Triphenylverbindung (8). Im Gegensatz zu (8) wird (10) schon nach einigem Stehen in kaltem Wasser zersetzt.

C. Die Umylidierung

Da Phosphoniumsalze und Phosphinalkylen im Verhältnis eines Säure-Base-Paars zueinander stehen und die Reste R^1 und R^2 die Stärke dieser Säuren und Basen beeinflussen, stellt sich zwischen Triphenylphosphinalkylenen (11) und Triphenylphosphoniumsalzen (12) ein Säure-Basen-Gleichgewicht ein [13].



Die Lage des Gleichgewichtes wird durch die Reste R^1 und R^2 bestimmt. Ist die Basizität von (11) und (14) bzw. der Säurecharakter von (12) und (13) sehr verschieden, so bildet sich bevorzugt das am schwächsten basische Phosphinalkylen und das am wenigsten saure Phosphoniumsalz. Bei der Umsetzung von Triphenylphosphinmethylen (15) mit Triphenylphenacylphosphoniumbromid (16) erhält man in fast 90-proz. Ausbeute Triphenyl-methylphosphoniumbromid (17) und Triphenylphosphinbenzoylmethylen (18), ein Beispiel für eine Umsetzung, die als Umylidierung bezeichnet werden soll.



Die Umylidierung ermöglicht einen Vergleich der Stärke der mesomeren oder induktiven Effekte, die von den Substituenten auf die CH-Acidität der zum P-Atom α -ständigen Methylengruppe der Phosphoniumsalze bzw. auf die Basizität der Phosphinalkylen ausübt werden. Dabei ergibt sich folgende Reihe:



Setzt man Phosphoniumsalze $[\text{R}^1-\text{CH}_2-\overset{\oplus}{\text{P}}(\text{C}_6\text{H}_5)_3] \text{X}^\ominus$ mit Phosphinalkylenen $\text{R}^2-\text{CH}=\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ um, bei denen R^2 in der obigen Reihe rechts von R^1 steht, so tritt Umylidierung ein.

Durch Umsetzung mit tritiummarkierten Phosphoniumsalzen wurde bewiesen, daß auch dann eine Umylidie-

zung stattfindet, wenn in (11) und (12) $\text{R}^1=\text{R}^2$ ist oder wenn die induktiven oder mesomeren Effekte von R^1 und R^2 nur wenig voneinander verschieden sind [13].

Arbeitsvorschrift:

Triphenylphosphin-benzoylmethylen durch Umylidierung [13]

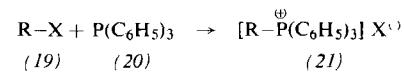
Zu einer salzfreien Lösung (Darstellung siehe Abschnitt D 2) von 0,02 Mol Triphenylphosphinmethylen (15) in 100 ml absolutem Toluol gibt man 9,24 g im Vakuum über P_2O_5 getrocknetes, fein pulverisiertes Triphenyl-phenacylphosphoniumbromid (16) [14] und kocht dann unter Feuchtigkeits- und Sauerstoffausschluß 24 Std. unter Rückfluß. Anschließend wird Triphenylphosphin-benzoylmethylen (18) abgesaugt, mit Toluol gewaschen und die Lösung im Vakuum eingedampft. Der kristalline Rückstand wird mit 15 bis 20 ml Essigester versetzt und abgesaugt. Beim langsamen Verdunsten der Mutterlauge erhält man eine geringe zweite Fraktion. Gesamtausbeute 6,65 g (87,5 %), Fp und Misch- Fp mit Triphenylphosphin-benzoylmethylen = 180 °C.

Der abgesaugte Salzrückstand wiegt 7,8 g. Er wird unter Erwärmen in 60 ml Wasser gelöst, und die Lösung wird mit verdünnter Natronlauge auf $\text{pH} = 13-14$ gebracht. Dabei fällt (18) aus, das aus unumgesetztem Triphenyl-phenacylphosphoniumbromid (16) gebildet wird (0,65 g). Man saugt ab und säuert die wäßrige Lösung mit Essigsäure an. Danach wird zum Sieden erhitzt und eine Lösung von 3 g NaJ in 10 ml Wasser zugegeben. Beim Abkühlen kristallisiert Triphenyl-methylphosphoniumjodid aus. Ausbeute 4,9 g (60,8 %), Fp und Misch- Fp = 182 °C (aus Isopropanol).

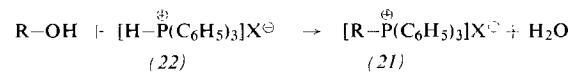
D. Zur Darstellung von Phosphoniumsalzen und Phosphinalkylenen

1. Phosphoniumsalze

Phosphoniumsalze (21) werden im allgemeinen aus Alkylhalogeniden (19) und Triphenylphosphin (20) dargestellt [2].



Von großem präparativem Interesse ist folgendes Verfahren [15, 16]:



Aus einem Alkohol erhält man durch Umsetzung mit Triphenylphosphinhydrogenhalogenid (22) (vorzugsweise -bromid) ein Phosphoniumsalz (21). Triphenylphosphinhydrogenbromid (22), $\text{X}=\text{Br}$, lagert sich an die Enden mancher Polyenketten unter ω,ω' -Addition an. Aus dem Trien (23) und dem Hydrogenbromid (22), $\text{X}=\text{Br}$, entsteht unter 1,6-Addition das Phosphoniumsalz (24) [16].

[14] F. Ramirez u. S. Dershowitz, J. org. Chemistry 22, 41 (1957).

[15] DBP 1046046 (11. Dez. 1958), BASF, Erf.: W. Sarnecki u. H. Pommer.

[16] H. Pommer, Angew. Chem. 72, 811 (1960).

[13] H. J. Bestmann, Chem. Ber. 95, 58 (1962).

hemmt. Diese Substrathemmung ist charakteristisch für Acetylcholin-Esterase und hilft bei der Unterscheidung von anderen Hydrolasen. Die Hemmung wurde früher als Anzeichen für die Bildung eines inaktiven (oder schwach aktiven^[58]) Disubstrat-Enzym-Komplexes (ES₂) gedeutet, in dem die anionische und die esteratische Wirkstelle von je einem Molekül Acetylcholin besetzt sind, so daß sterische Verhältnisse die Aktivierung der Esterbindung verhindern^[20a, 67]. Die auf dieser Basis entwickelten kinetischen Gleichungen (z.B. ^[58, 120, 121], vgl. auch ^[54]) konnten die Messungen aber nicht ausreichend erklären. Plausibler ist die Theorie, daß das intermediäre Acetyl-Enzym (EAc), in dem wie im freien Enzym die anionische Wirkstelle unbesetzt ist, mit überschüssigem Substrat zu dem wesentlich weniger aktiven Komplex EAcs zusammentritt^[119]. Die von Krupka und Laidler^[119] entwickelten kinetischen Gleichungen stützen diese Theorie.

Als reversible Inhibitoren definiert man im Gegensatz zu den irreversiblen solche, die einen dissoziierbaren Enzym-Inhibitor-Komplex bilden, z.B. also durch Dialyse wieder vom Enzym entfernt werden können. Im weitesten Sinne kann man zu ihnen alle Stoffe zählen, die eine mehr oder weniger starke Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms haben, z.B. also auch Substrate, Spaltprodukte und die sogenannten Reaktivatoren.

Bei diesen Substanzen handelt es sich im wesentlichen um substituierte Ammonium-Derivate, die auf Grund ihrer Struktur ähnlich wie die eigentlichen Substrate vor allem von der anionischen Wirkstelle gebunden werden und so die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) oder auch die Desacetylierung von EAc^[124] blockieren können. (Eine ausführliche Zusammenstellung der Verbindungen, deren reversible Hemmwirkung bisher untersucht wurde, gab z.B. Long^[122].)

Die Substratsspaltung und die Hemmung durch Substrat (S) wie durch reversible Inhibitoren (I) lassen sich mit dem folgenden, von Krupka und Laidler vorgeschlagenen Schema am besten deuten (Abb. 4)^[17, 119].

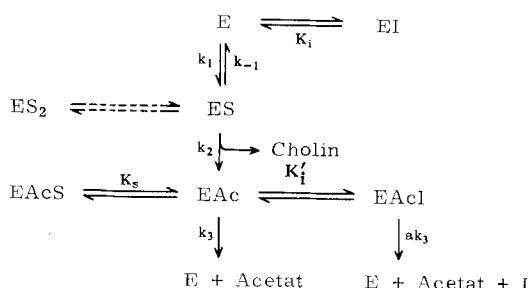


Abb. 4. Schema der Spaltung des Substrats und Hemmung durch Substrat [17, 119].

[120] W. Hardegg, Habilitationsschrift, Universität Heidelberg, 1958.

[121] C. Marmasse, Biochim. biophysica Acta 77, 530 (1963).

[122] J. P. Long in [3], S. 374.

[123] Man vergleiche dazu auch die Diskussion zwischen G. E. Hein sowie R. M. Krupka u. K. J. Laidler, Nature (London) 193, 1155 (1962).

Die Gleichgewichts-Behandlung liefert die allgemeine Gleichung für die Geschwindigkeit der Substratsspaltung in Gegenwart von Hemmern und überschüssigem Substrat:

$$v = \frac{k_2 [E]_0 \bar{K} [S]}{1 + K_I [I] + \bar{K} [S] \left\{ 1 + \frac{k_2}{k_3} \left(\frac{1 + K_I [I] + K_S [S]}{1 + a K_I [I]} \right) \right\}}$$

mit $\bar{K} = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}$ und $[E]_0$ = Enzym-Gesamtkonzentration.

Die Gleichung für ausschließliche Hemmung durch Substrat läßt sich daraus mit $[I] = 0$ ableiten. Bei sehr kleiner $[S]$ vereinfacht sich die Gleichung auf die übliche Form

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]},$$

in der aber nun bei der Acetylcholin-Esterase-Reaktion

$$V_{\max} = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \frac{k_2}{k_3}} \text{ und } K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 \left(1 + \frac{k_2}{k_3} \right)}$$

bedeuten ([17, 119, 123], s. auch [124, 125]).

II. Hemmung durch irreversible Inhibitoren (Alkylphosphate) [2b, 12a, 12b, 12d, 13, 126, 194]

Im Unterschied zu der Hemmung durch Substrate und reversible Inhibitoren beruht die irreversible Hemmung der Acetylcholin-Esterase durch die in Abschnitt A erwähnten Alkylphosphate (2)–(10) auf einer Phosphorylierung, die im Prinzip der Acetylierung des Enzyms bei der Enzymreaktion entspricht. Im Gegensatz zum acetylierten Enzym wird das phosphorylierte Enzym durch Wasser höchstens sehr langsam hydrolysiert^[127]. Erst durch starker nucleophile Reagentien wird der Phosphorsäurerest rasch vom Enzym abgelöst und dieses somit reaktiviert^[127]. Als Modellreaktion für die Phosphorylierung des Enzyms kann die normale Alkylphosphat-Hydrolyse dienen; an die Stelle des Hydroxid-Ions bei der S_N2-Reaktion^[128] tritt ein Zentrum relativ hoher Elektronendichte am Enzym. Diese Analogie zeigt sich auch in der Ähnlichkeit der Aktivierungsenergien der Phosphorylierung des Enzyms (Diäthyl-p-nitrophenylphosphat [(3), Paraoxon] + Acetylcholin-Esterase: $E = 10,6 \text{ kcal/mol}$ ^[129]) und der Alkylphosphat-Hydrolyse (Paraoxon + OH^- : $E = 12,4 \text{ kcal/mol}$ ^[130]). Da das Alkylphosphat aber um mehrere Zehnerpotenzen schneller mit dem Enzym als mit dem Hydroxid-Ion

[124] R. M. Krupka, Biochemistry 2, 76 (1963); 3, 1749 (1964); 4, 429 (1965).

[125] I. B. Wilson u. J. Alexander, J. biol. Chemistry 237, 1323 (1962).

[126] B. Holmstedt in [3], S. 428.

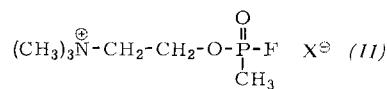
[127] I. B. Wilson, J. biol. Chemistry 190, 111 (1951).

[128] a) L. Larsson, Svensk kem. Tidskr. 70, 405 (1958); b) D. F. Heath, J. chem. Soc. (London) 1956, 3804.

[129] W. N. Aldridge, Biochem. J. 54, 442 (1953).

[130] a) J. A. A. Ketelaar, H. R. Gersmann u. K. Koopmans, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 71, 1253 (1952); b) D. F. Heath, J. chem. Soc. (London) 1956, 3796.

reagiert [129, 131, 130b], kann man eine für die Folgereaktion günstige Fixierung des Alkylphosphates an den Wirkstellen des Enzyms vermuten [132]. Die Affinität des Inhibitors zum Enzym und damit seine Hemmwirkung wird analog wie bei den anderen Substraten durch Einführung einer kationischen Gruppe unter Berücksichtigung des Abstandes von anionischer und esteratischer Wirkstelle (2 CH₂-Gruppen) in das Alkylphosphat erhöht („Tammelinsche Ester“, z.B. Methyl-fluorophosphonsäure-cholinester (11) [133]):



Aber auch die Tatsachen, daß der Hemmprozeß in ähnlicher Weise vom pH-Wert abhängt wie die Acetylcholin-Spaltung [68] und daß Acetylcholin selbst mit dem Inhibitor konkurrieren kann [134], rechtfertigen es, die Alkylphosphate als besonders schlechte Substrate aufzufassen und die Reaktion z.B. von Diisopropylfluorophosphat mit der esteratischen Wirkstelle in Analogie zur normalen Substrat-Spaltung zu beschreiben [15c].

Die Untersuchung wird *in vitro* und besonders *in vivo* erschwert, weil das phosphorylierte Enzym in einer relativ langsamem Folgereaktion in einen nicht mehr reaktivierbaren Zustand übergeht („Alterung“) [135–138]. Diese Alterung beruht wahrscheinlich darauf, daß sich aus dem Dialkylphosphoryl-enzym ein Alkylrest abspaltet und das verbleibende Monoalkylphosphoryl-enzym-Anion durch das Anion eines Reaktivators nicht mehr angreifbar ist [139]. Bei einer durch Sarin (9) gehemmten und gealterten Acetylcholin-Esterase gelang es, den abgespaltenen Isopropylalkohol nachzuweisen [140], vgl. [141].

Für die Hemmwirkung des Inhibitors hat sich in der Literatur die Angabe der molaren Konzentration, bei der die Acetylcholin-Esterase zu 50 % gehemmt ist, oder die Angabe des negativen Logarithmus pI₅₀ dieser Konzentration eingebürgert [142]. Die pI₅₀-Werte liegen in der Regel zwischen 6 und 9 [143]. Seltener findet man allgemein gültige Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten angegeben.

Die vielfältigen Faktoren, die bei der Hemmung eine Rolle spielen, erschweren die Entdeckung eines Zusammenhangs zwischen chemischer Struktur und Hemmwirkung. Eine gute Korrelation ergab sich z.B. zwischen der Hemmwirkung und den Hammettschen σ -Konstanten der Substituenten in einer Serie von 17 aromatischen Dialkylphosphaten [144].

[131] H. S. Aaron, H. O. Michel, B. Witten u. J. I. Miller, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 456 (1958).

[132] Vgl. [12d], S. 124.

[133] L. E. Tammelin, *Acta chem. scand.* 11, 859 (1957).

[134] K.-B. Augustinsson u. D. Nachmansohn, *J. biol. Chemistry* 179, 543 (1949).

[135] F. Hobbiger, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* 12, 438 (1957).

[136] I. B. Wilson, *Discuss. Faraday Soc.* 20, 119 (1955).

[137] D. R. Davies u. A. L. Green, *Biochem. J.* 63, 529 (1956).

[138] E. Heilbronn, *Biochem. Pharmacol.* 12, 25 (1963).

[139] Vgl. [12d], S. 129.

[140a] F. Berends, C. H. Posthumus, I. v. d. Sluys u. F. A. Deierkauf, *Biochim. biophysica Acta* 34, 576 (1959).

[140b] T. E. Smith u. E. Usdin, *Biochemistry* 5, 2914 (1966).

[141] J. H. Fleisher u. L. W. Harris, *Biochem. Pharmacol.* 14, 641 (1965).

[142] Vgl. [12b], S. 77.

[143] Vgl. [12b], S. 73.

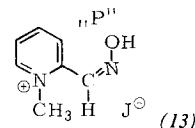
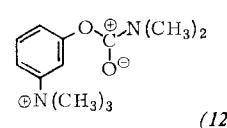
[144] T. R. Fukutu u. R. L. Metcalf, *J. agric. Food Chem.* 4, 930 (1956).

E. Reaktivierung [2b, 12b, 12d, 13, 145, 194]

I. Entwicklung von Reaktivatoren

Die Reaktivierung der Acetylcholin-Esterase durch Verdrängung des Phosphatrestes mit nucleophilen Reagentien beansprucht nicht nur theoretisches Interesse, sondern ist auch Voraussetzung für eine wirkungsvolle Therapie von Alkylphosphatvergiftungen, die durch Atropin, den pharmakodynamischen Antagonisten des Acetylcholins, allein schwer zu beherrschen sind [146]. Da das acetylierte Enzym den Acetylrest auf Hydroxylamin unter Bildung von Acethydroxamsäure übertragen kann [147], konnte man annehmen, daß auch das phosphorylierte Enzym mit Hydroxylamin entsprechend reagiert. Die Beobachtung von Wilson [127], daß eine 0,7 M Hydroxylamin-Lösung eine 50-proz. Reaktivierung einer mit TEPP (6) gehemmten Acetylcholin-Esterase bewirkt, war Anlaß, zahlreiche nucleophile Reagentien auf ihre Reaktivierungsfähigkeit zu prüfen [148]. Die Reaktivierung mit Hydroxylamin und anderen Reaktivatoren, die keine positive Ladung tragen, gelingt erst bei Konzentrationen, die eine therapeutische Verwendung ausschließen.

Die Tatsache, daß Cholin trotz seines schwachen nucleophilen Charakters relativ gut reaktiviert [148], zeigt, daß ein Reaktivator – ebenso wie ein Substrat oder Inhibitor – als wesentliches Strukturmerkmal ein kationisches Zentrum besitzen muß, um an der anionischen Wirkstelle des Enzyms fixiert zu werden [149]. Der Gedanke, die für die Verdrängung des Phosphatrestes notwendige nucleophile Gruppe mit einem kationischen Zentrum zu kombinieren, veranlaßte Wilson, den reversiblen Inhibitor Neostigmin (12) als Modell für den Bau eines Reaktivators zu benutzen. Dem Carbamat-Kohlenstoff im Neostigmin entspricht der Phosphor („P“) im aktiven Zentrum des



phosphorylierten Enzyms. 2-Hydroxyiminomethyl-1-methylpyridiniumjodid (2-PAM) (13) ([150], vgl. [151, 152]) wird den sterischen Gegebenheiten des aktiven Zentrums am besten gerecht.

2-PAM in Kombination mit Atropin hat sich inzwischen als Gegenmittel (Antidot) für Alkylphosphat-

[145] F. Hobbiger in [3], S. 921.

[146] K. Bethe, W. D. Erdmann, L. Lendle u. G. Schmidt, *Nauyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol.* 231, 3 (1957).

[147] S. Hestrin, *Biochim. biophysica Acta* 4, 310 (1950).

[148] I. B. Wilson, *J. biol. Chemistry* 199, 113 (1952).

[149] I. B. Wilson, S. Ginsberg u. E. K. Meislich, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 4286 (1955).

[150] I. B. Wilson, *Biochim. biophysica Acta* 18, 168 (1955).

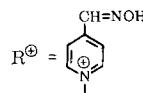
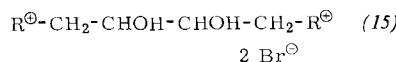
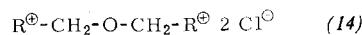
[151] A. F. Childs, D. R. Davies, A. L. Green u. J. P. Rutland, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* 10, 462 (1955).

[152] I. B. Wilson, S. Ginsburg u. C. Quan, *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 286 (1958).

vergiftungen in der Klinik bewährt [153, 154]. Allerdings ist nachteilig, daß das große Kation von 2-PAM die Blut-Liquor-Schranke nicht passieren kann und daher die gehemmte Acetylcholin-Esterase im Zentralnervensystem nicht zu reaktivieren vermag [155].

Nach der Wilsonschen Hypothese von der Stellung des Phosphors im phosphorylierten Enzym sollte das *anti*-Isomere des 4-Hydroxyiminomethyl-1-methylpyridiniumjodids (4-PAM) aktiver sein als das *syn*-Isomere [152]. Da aber Poziomek [156] das Gegenteil nachweisen konnte, ist es angebracht, die Wilsonschen Vorstellungen nur als Arbeitshypothese zu betrachten.

Die Idee, Reaktivatoren den reversiblen Inhibitoren nachzubauen, erwies sich weiterhin als sehr fruchtbar [157]. Sie führte zur Darstellung einer neuen Gruppe von Reaktivatoren, die sich aus zwei über eine Kette verknüpften Hydroxyiminomethyl-pyridiniumresten zusammensetzen [158–160], also reversiblen Inhibitoren mit zwei positiven Zentren entsprechen. Die Hydroxyiminomethyl-Gruppe muß hier nicht in 2-, sondern in 4-Stellung stehen. So ist das 1,1'-Trimethylen-bis-(4-hydroxyiminomethyl-pyridinium)-dibromid, TMB-4, dem 2-Isomeren weit überlegen [160, 161]. Die relativ hohe Toxizität des TMB-4 erschwert aber eine therapeutische Anwendung [165, 162]. Oxy-bis-(4-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium)-dichlorid, LüH6, Toxogonin® (14) [163, 164] ist weniger toxisch als das TMB-4 [165], therapeutisch besser wirksam als das 2-PAM [166–168] und vermag auch im Zentralnervensystem gehemmte Acetylcholin-Esterase zu reaktivieren [169, 168b]. Die gegenüber TMB-4 verbesserte Reaktionsfähigkeit [170] des Toxogonins® zeigt, daß der Kette, welche



[153] W. D. Erdmann, Dtsch. med. Wschr. 85, 1014 (1960).

[154] D. Grob in [3], S. 989.

[155] H. Kewitz u. D. Nachmansohn, Arch. Biochem. Biophysics 66, 271 (1957).

[156] E. J. Poziomek, D. N. Kramer, W. A. Mosher u. H. O. Michel, J. Amer. chem. Soc. 83, 3916 (1961).

[157] I. B. Wilson u. S. Ginsburg, Biochem. Pharmacol. 1, 200 (1958).

[158] E. J. Poziomek, B. E. Haekley u. G. M. Steinberg, J. org. Chemistry 23, 714 (1958).

[159] F. Hobbiger, D. G. O'Sullivan u. P. W. Sadler, Nature (London) 182, 1498 (1958).

[160] W. K. Berry, D. R. Davies u. A. L. Green, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 14, 186 (1959).

[161] F. Hobbiger u. P. W. Sadler, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 14, 192 (1959).

[162] a) J. H. Wills, Federat. Proc. 18, 1020 (1959); b) J. F. O'Leary, A. M. Kunkel u. A. H. Jones, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 132, 50 (1961).

[163] Hersteller: E. Merck AG., Darmstadt.

[164] A. Lüttringhaus u. I. Hagedorn, Arzneimittel-Forsch. 14, 1 (1964).

[165] W. D. Erdmann u. H. Engelhard, Arzneimittel-Forsch. 14, 5 (1964).

[166] E. Heilbronn u. B. Tolagen, Biochem. Pharmacol. 14, 73 (1965).

[167] K. Bisa, G. Fischer, O. Müller, H. Oldiges u. E. Zoch, Arzneimittel-Forsch. 14, 85 (1964).

[168] a) W. D. Erdmann u. M. v. Clarmann, Dtsch. med. Wschr. 88, 2201 (1963); b) H. L. Staudacher, Ärztl. Forschung 17, 441 (1963).

[169] W. D. Erdmann, Arzneimittel-Forsch. 15, 135 (1965).

[170] H. Engelhard u. W. D. Erdmann, Klin. Wschr. 41, 525 (1963).

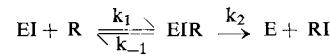
die beiden substituierten Pyridinium-Reste verbindet, eine wichtige Rolle bei der Reaktivierung zukommt [171]. Bei systematischer Variation dieser Kette wurde ein weiteres, in seiner Wirksamkeit an das Toxogonin® heranreichendes Antidot, 2,3-Dihydroxybutylen-(1,1'-bis-(4-hydroxyiminomethyl-pyridinium))-dibromid, R 21, (15), gefunden [172].

II. Wirkungsweise der Reaktivatoren

Die Fähigkeit eines Reaktivators, alkylphosphat-gehemmte Acetylcholin-Esterase zu reaktivieren, hängt von Faktoren ab, die einerseits die Bildung des Reaktionskomplexes zwischen Reaktivator und gehemmtem Enzym und andererseits die Ablösung des Phosphorylrestes vom Enzym beeinflussen.

1. Der Reaktionskomplex

Der erste Schritt der Reaktivierung ist der enzymatischen Acetylcholin-Hydrolyse insofern ähnlich, als auch hier die Bildung eines Reaktions-Komplexes (EIR), in diesem Fall zwischen gehemmtem Enzym (EI) und Reaktivator (R), dem Zerfall zu freiem Enzym (E) und Folgeprodukt vorangeht ([149, 137], vgl. [173b]):



$$\text{mit } K_r = \frac{[EI] \cdot [R]}{[EIR]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Sieht man die Konstanten K_r für verschiedene Reaktivatoren (Tabelle 2) formal wie Michaeliskonstanten K_m für verschiedene Substrate an und vergleicht die K_r -Werte, so erkennt man, daß K_r für ungeladene Reaktivatoren, z.B. Hydroxyimino-aceton, erheblich größer ist als für solche mit einem kationischen Zentrum, z.B. 2-PAM. Das 2-PAM wird dadurch selbst

Tabelle 2. Gleichgewichtskonstante (K_r) und Zerfallsgeschwindigkeitskonstante k_2 des Reaktionskomplexes EIR.

| Reaktivator | blockierende Gruppe | K_r (mol/l) | k_2 (min ⁻¹) |
|-----------------------------------|--|----------------------|----------------------------|
| Hydroxyimino-aceton [173] | i-C ₃ H ₇ O-P(CH ₃) ₂ O | 1×10 ⁻² | 2,4×10 ⁻¹ |
| Hydroxyimino-aceton [173] | (C ₂ H ₅ O) ₂ PO | 2×10 ⁻² | 1,6×10 ⁻¹ |
| 2-PAM (13) [174] | (C ₂ H ₅ O) ₂ PO | 1,4×10 ⁻⁴ | 8,1×10 ⁻² |
| 2-PAM (13) [174] | (i-C ₃ H ₇ O) ₂ PO | 8×10 ⁻⁴ | 1,5×10 ⁻² |
| 3-Pyridin-carboxy-droxsäure [149] | (C ₂ H ₅ O) ₂ PO | 3,4×10 ⁻² | |

zu einem schwachen reversiblen Hemmer und kann mit Kationen um die anionische Stelle konkurrieren [175]. Einen ähnlichen Effekt übt ein von der estera-

[171] N. Engelhard, Bull. Soc. Chim. biol. 46, 178 (1964).

[172] N. Engelhard u. W. D. Erdmann, Arzneimittel-Forsch. 14, 870 (1964).

[173] a) A. L. Green u. H. J. Smith, Biochem. J. 68, 28 (1958); b) R. J. Kitz, S. Ginsburg u. I. B. Wilson, Biochem. Pharmacol. 14, 1471 (1965).

[174] A. L. Green u. H. J. Smith, Biochem. J. 68, 32 (1958).

[175] A. L. Green u. H. J. Smith, Biochim. biophysica Acta 27, 212 (1958).

tischen Wirkstelle zur anionischen Wirkstelle herübergreifender sperriger Rest (zum Beispiel Isopropyl bei diisopropylfluorophosphat-gehemmter Acetylcholin-Esterase) aus, der dem kationischen Zentrum des 2-PAM den Zutritt zur anionischen Wirkstelle erschwert [136, 137, vgl. [176]. Eine weitere wichtige Größe ist die Geschwindigkeitskonstante k_2 für den Zerfall des Reaktionskomplexes (EIR) zu reaktiviertem Enzym (E) und phosphoryliertem Reaktivator (RI). Die Methode zu ihrer Bestimmung haben *Green* und *Smith* [174] angegeben.

Verbindungen mit zwei Hydroxyiminomethyl-pyridinium-Gruppen, besonders solche mit einer dreigliedrigen Kette (z.B. TMB-4 [177] und Toxogenin® [170]), reaktivieren noch schneller als 2-PAM. Dafür kann eine zusätzliche Bindung an eine gelegentlich vermutete zweite anionische Stelle [157] oder eine erhöhte Reaktionsfähigkeit mit dem phosphorylierten Enzym selbst verantwortlich sein [178]. Wahrscheinlich ist, daß das Enzym je nach Art der vom Reaktivator angebotenen bindungsfähigen Gruppen [179, 172] mit diesen in Wechselwirkung tritt, z.B. bei der 2-Pyridin-carbohydroxamsäure durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke [173] zum Pyridin-Stickstoff.

2. Ablösung des Phosphorylrestes vom Enzym

Nach der Komplexbildung des Reaktivators an den Wirkstellen des Enzyms reagiert seine nucleophile Gruppe mit dem elektrophilen Phosphoratom unter Freisetzung des Enzyms [180]. Die Reaktivierungsgeschwindigkeit hängt von der Elektrophilie des Phosphoratoms [181] und von der Nucleophilie des angreifenden Agens ab [145]. Ein Maß für die nucleophile Aktivität eines Reaktivators ist seine Fähigkeit, die Hydrolyse der entsprechenden Alkylphosphate zu beschleunigen [128a, 182–187].

Bei Stoffen, deren Anion nucleophil angreift, spielt der pK_a -Wert eine wesentliche Rolle. Für die Therapie sollte die Dissoziation im physiologischen Bereich von $pH = 7$ bis $pH = 8$ möglichst vollständig sein. Da ein für die Dissoziation günstiger niedriger pK_a -Wert eine geringere Nucleophilie des Moleküls bedingt, ist die optimale Reaktionsgeschwindigkeit eine Funktion von

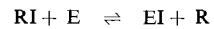
- [176] *F. Berends*, *Biochim. biophysica Acta* 81, 190 (1964).
- [177] *F. Hobbiger, M. Pitmann u. P. W. Sadler*, *Biochem. J.* 75, 363 (1960).
- [178] *N. Engelhard*, Abstract Volume of the sixth International Congress of Biochemistry, New York 1964, S. 305.
- [179] *G. Gilbert, Th. Wagner-Jauregg u. G. M. Steinberg*, *Arch. Biochem. Biophysics* 93, 469 (1961).
- [180] *B. J. Jandorf, E. A. Crowell u. A. P. Levin*, *Federat. Proc.* 14, 231 (1955).
- [181] *A. N. Davison*, *Biochem. J.* 60, 339 (1955), vgl. [12d], S. 125.
- [182] *T. Wagner-Jauregg*, *Arzneimittel-Forsch.* 6, 194 (1956).
- [183] *A. L. Green, G. L. Sainsbury, B. Saville u. M. Stansfield*, *J. chem. Soc. (London)* 1958, 1583.
- [184] *B. E. Hackley jr., R. Plapinger, M. Stolberg u. T. Wagner-Jauregg*, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3651 (1955).
- [185] *M. A. Stolberg u. W. A. Mosher*, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 2618 (1957).
- [186] *G. F. Endres u. J. Epstein*, *J. org. Chemistry* 24, 1497 (1959).
- [187] *T. Wagner-Jauregg*, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 527 (1954).

pK_a und dem pH-Wert. Für substituierte Hydroxamsäuren gilt: $pK_a = pH + 0,6$ ([188], vgl. [172]).

Der Stoß des nucleophilen Agens kann durch den Zug einer elektrophilen Gruppe gefördert werden. So wird für die Reaktion von Kupfer(II)-hydroxid [189], Wasserstoffperoxid [190–192] und vom Monoanion des Brenzcatechins mit dem Alkylphosphat das Zug-Stoß-Prinzip [193] angenommen. Das entsprechende Monoanion, in dem die beiden Pyridiniumkerne vermutlich sandwich-artig angeordnet sind [164], konnte beim Toxogenin® isoliert werden [164]. Für die Hypothese des Zusammenspiels von zwei Gruppen spricht ferner, daß das Brenzcatechin-Monoanion dem Resorcin- und Hydrochinon-Monoanion überlegen ist [195] (vgl. auch [178]).

3. Rephosphorylierung des Enzyms

Der bei der Reaktivierung des Enzyms gebildete phosphorylierte Reaktivator (RI) kann die Acetylcholin-Esterase in einer unerwünschten Rückreaktion wieder phosphorylieren ([196], vgl. [197]):



Die wichtigsten phosphorylierten Reaktivatoren passen in das P–XYZ-System der Phosphorylierungsmittel [198]. Sowohl die α -Hydroxyimino-ketone als auch die Hydroxyiminomethyl-pyridiniumsalze besitzen den benötigten Elektronenakzeptor Z, der die Elektronen der P–X-Bindung bei der Phosphorylierung aufnehmen kann. Als Elektronenakzeptor dient eine Carbonylfunktion bzw. der Pyridinium-Stickstoff. Dieser ist mit der Hydroxyiminomethyl-Gruppe durch ein konjugiertes System Y verbunden, das im UV-Spektrum eine negative Solvatochromie beim 2-PAM und 4-PAM, aus Konjugationsgründen aber nicht beim unwirksamen 3-PAM, zeigt [199]. Während die phosphorylierten α -Hydroxyimino-ketone [200] und Hydroxamsäuren [201] nicht faßbar sind, da sie rasch zu Folgeprodukten zerfallen, sind die durch Sarin (9) phosphorylierten Hydroxyiminomethyl-pyridiniumsalze, die im Bauprinzip den hochtoxischen Tammelinschen

[188] *R. Swidler, R. E. Plapinger u. G. M. Steinberg*, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 3271 (1959).

[189] *J. Epstein u. D. H. Rosenblatt*, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 3596 (1958).

[190] *L. Larsson*, *Acta chem. scand.* 12, 723 (1958).

[191] *J. Epstein, M. M. Demek u. D. H. Rosenblatt*, *J. org. Chemistry* 21, 796 (1956).

[192] Das dabei gebildete Peroxyphosphonat erlaubt einen empfindlichen Nachweis des Alkylphosphates: *B. Gehauf, J. Epstein, G. B. Wilson, B. Witten, S. Sass, V. E. Bauer u. W. H. C. Rueggeberg*, *Analytic. Chem.* 29, 278 (1957).

[193] a) *J. Epstein, R. E. Plapinger, H. O. Michel, J. R. Cable, R. A. Stephani, R. J. Hester, C. Billington jr. u. G. R. List*, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 3075 (1964); b) *J. Epstein, H. O. Michel, D. H. Rosenblatt, R. E. Plapinger, R. A. Stephani u. E. Cook*, *ibid.* 86, 4959 (1964).

[194] *E. Heilbronn-Wikström*, *Svensk kem. Tidskr.* 77, 11 (1965).

[195] *B. J. Jandorf, T. Wagner-Jauregg, J. J. O'Neill u. M. A. Stolberg*, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 1521 (1952).

[196] *J. F. Scaife*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 1301 (1959).

[197] *J. A. Cohen, R. A. Oosterbaan u. F. Berends*, Abstracts of the 6th international Congress of Biochemistry, New York 1964, S. 251.

[198] *V. M. Clark, D. W. Hutchinson, A. J. Kirby u. S. G. Warren*, *Angew. Chem.* 76, 704 (1964); *Angew. Chem. internat. Edit.* 3, 678 (1964).

[199] *N. Engelhard u. B. Werth*, *Tetrahedron Letters* 1963, 661.

[200] *A. L. Green u. B. Saville*, *J. chem. Soc. (London)* 1956, 3887.

[201] *R. Swidler u. G. M. Steinberg*, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 3594 (1956).

Estern (11) ähneln, noch stabil genug^[202], um die Acetylcholin-Esterase zu phosphorylieren und damit zu hemmen^[203]. Deshalb kann die Hemmung der Cholinesterasen im Plasma durch Rogor®^[204] durch hohe Toxogonin-Gaben noch verstärkt werden. Spezifische Antidote dürfen daher niemals überdosiert werden^[205].

In diesem Zusammenhang sind Versuche wichtig, die Aufschluß geben, unter welchen Bedingungen das phosphorylierte Oxim oder eine Modellverbindung irreversibel zu nicht toxischen Produkten zerfällt. So liefert 2-PAM mit warmem Acetanhydrid das Nitrit^[206], ebenso geht das an der Hydroxy-

[202] B. E. Hackley jr. u. O. O. Owens, J. org. Chemistry 24, 1120 (1959).

[203] J. C. Lamb, G. M. Steinberg u. B. E. Hackley, Biochim. biophysica Acta 89, 174 (1964).

[204] Rogor® ((CH₃O)₂P(S)S-CH₂-CO-NH-CH₃) ist ein Schädlingsbekämpfungsmittel [14].

[205] a) W. D. Erdmann, R. Zech, P. Franke u. I. Bosse, Arzneimittel-Forsch. 16, 492 (1966); b) R. Zech, H. Engelhard u. W. D. Erdmann, Biochim. biophysica Acta 128, 363 (1966).

[206] S. Ginsburg u. I. B. Wilson, J. Amer. chem. Soc. 79, 481 (1957).

iminomethyl-Gruppe durch *p*-Nitrobenzoylchlorid veresterte 4-PAM in siedendem Äthanol in das Nitrit^[207], vgl. [208].

Ferner ist bemerkenswert, daß Pyridiniumchloride, die wie Toxogonin® einen zum Pyridin-Stickstoff α -ständigen Äther-Sauerstoff haben, in siedendem Äthanol unter Abspaltung der Seitenkette in Pyridin-hydrochloride übergehen. Bei der Solvolysen der entsprechenden Benzoyloxy-iminomethyl-pyridinium-Verbindungen entsteht in Abhängigkeit von Lösungsmittel und Temperatur ausschließlich 4-Cyanpyridiniumchlorid oder ein Gemisch aus diesem und Pyridin-4-aldoxim-hydrochlorid^[207].

Der Fraunhofer-Gesellschaft, München, und dem Bundesamt für zivilen Bevölkerungsschutz, Bad Godesberg, danken wir für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 21. Oktober 1965 [A 578]

[207] M. Nenner u. N. Engelhard, unveröffentlichte Versuche.

[208] J. H. Blanch u. O. T. Onsager, J. chem. Soc. (London) 1965, 3734.

ZUSCHRIFTEN

8,9-Diacetyl-sesquifulvalen

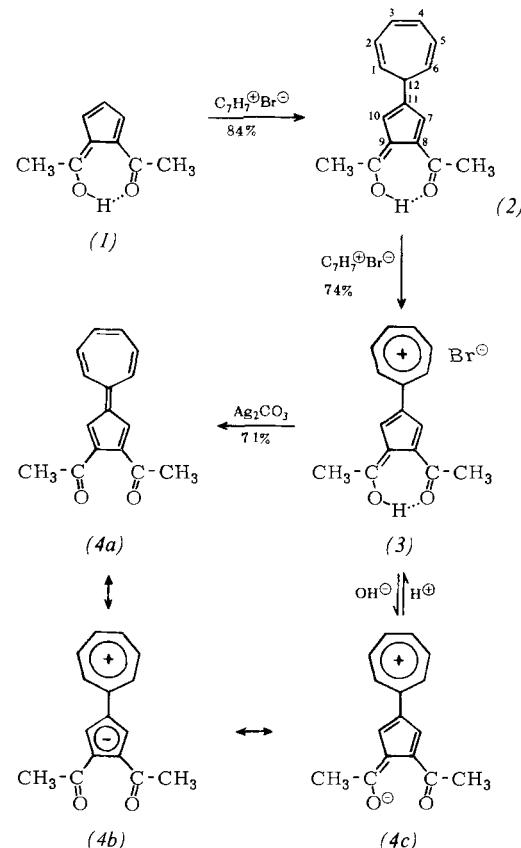
Von E. Koerner von Gustorf, M. C. Henry und P. V. Kennedy^[1*]

Herrn Professor G. Wittig zum 70. Geburtstag gewidmet

In der Reihe der Sesquifulvalene waren 8,9-disubstituierte Derivate bislang nicht bekannt. Wir fanden, daß 8,9-Diacetyl-sesquifulvalen nach der Reaktionsfolge (1) \rightarrow (4) mit guter Ausbeute zugänglich ist.

Beim Zutropfen von Tropyliumbromid in CH₃OH zu 1,5-Diacetyl-cyclopentadien^[1], dessen Vorliegen in der tautomeren Fulvenstruktur (1) durch ¹H-NMR-Untersuchungen bestätigt wurde^[2], fällt (2) in Form gelber Nadeln (Fp = 135,5–136,5 °C) aus. Geringe Beimengungen von (3) lassen sich leicht abtrennen, da (3) in Äther unlöslich ist. (3) entsteht durch Hydridübertragung beim Zufügen von (2) in Äther zu Tropyliumbromid in CH₃OH und scheidet sich als karminrote Plättchen (Zers.-P. 230 °C) ab. Schütteln von (3) mit überschüssigem Ag₂CO₃ in CH₃OH liefert analysesreines schwarz-rote 8,9-Diacetyl-sesquifulvalen (4), das an der Luft beständig ist, Fp = 127–128 °C (Zers.).

Die sich aus den NMR-Daten ergebende erhöhte bzw. erniedrigte Abschirmung der Protonen am 5- und 7-Ring zeigt die Beteiligung dipolarer Grenzstrukturen wie (4b) und (4c) am Grundzustand von (4) an. Die Protonierung von (4) erfolgt überwiegend am Carbonyl-Sauerstoff; die ¹H-NMR-Spektren von (3) und (4) sind daher in CF₃COOH gleich. Form und chemische Verschiebung der Signale der Protonen am 7-Ring in (3) entsprechen denjenigen von 7,8,9,10-Tetraphenyl-sesquifulvalen in CF₃COOH^[3]. Die Verbindungen (3) und (4) sind (nach Anlösen mit CH₃OH) wasserlöslich. Die Basizität des Wassers reicht aus, um (3) in (4) umzuwandeln. Die Protonierung von (4) ($\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 4,596$)^[4] zu (3) ($\lambda_{\text{max}} = 467 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 4,568$)^[4] (z.B. mit HCl) im wäßrigen System ist mit einem Farbumschlag von rotorange nach gelb verbunden. Da sich das Wechselspiel von Deprotonierung (z.B. mit verd. NH₃) und Protonierung beliebig oft wiederholen läßt, eignet sich dieses System zur pH-Indikation. Konzentrierte NaOH entfärbt (4), wahrscheinlich durch Angriff an der Doppelbindung zwischen C-11 und C-12; auch dieser Prozeß ist reversibel.



¹H-NMR-Daten (8-Werte, Tetramethylsilan als innerer Standard) [6].

| | (2) in CCl ₄ | (4) in CDCl ₃ | (3), (4) in CF ₃ COOH |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 2 CH ₃ | 2,51 (S) [a] | 2,40 (S) | 2,80 (S) |
| —OH···O=C\ | 17,8 (S) | — | unter CF ₃ COOH |
| H(7), H(10) | 7,18 (S) | 6,92 (S) | 8,25 (S) |
| H(1), H(6) | 5,3 (M) | 6,7 (M) | 8,5 (M) |
| H(2), H(5) | 6,2 (M) | 7,4 (M) | 9,0 (M) |
| H(3), H(4) | 6,65 (M) | — | — |
| H(12) | 2,6 (M) | — | — |

[a] S = Singulett, M = Multiplett.