

ÜBER EIN PHOSPHATÜBERTRAGENDES GÄRUNGSFERMENT

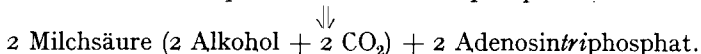
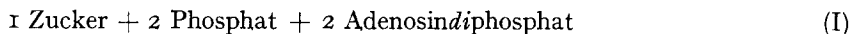
von

THEODOR BÜCHER

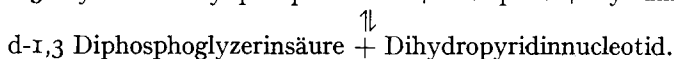
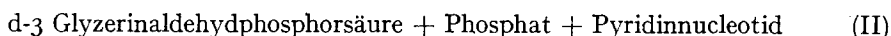
Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Liebenberg. Mark (Deutschland)

I. ÜBERSICHT

1905 entdeckten HARDEN und YOUNG¹, dass die Gärung nicht nur eine zuckerspaltende, sondern auch eine *phosphatbindende Reaktion* ist; eine Erkenntnis, die wir heute^{2,3,4} durch folgende Reaktionsgleichung ausdrücken dürfen:

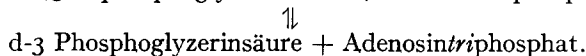


Der *Mechanismus der Phosphatbindung* wurde 1939 von WARBURG und Mitarbeitern nach der Reingewinnung des oxydierenden Gärungsferments⁵ durch Isolierung der d-1,3 Diphosphoglyzerinsäure im Sinne der folgenden Reaktionsgleichung aufgeklärt:



Wir nennen dies die phosphatbindende und oxydierende Reaktion der Gärung.

In der Kette der Gärungsreaktionen folgt auf die Phosphatbindung eine *Phosphatübertragung*, bei der ein Fermentprotein im Sinne der eingangs aufgestellten Bilanzgleichung die Anhydridphosphorsäure der d-1,3 Diphosphoglyzerinsäure auf Adenosindiphosphat überträgt:



Das phosphatübertragende Ferment, das in wässrigen Extrakten von Muskeln, Tumoren und im Serum (vgl. Tab. XV) nachgewiesen worden ist, ist wohl allen gärenden Zellen gemein. Seine Konzentration in Bierhefe beträgt 0.2% vom Frischgewicht.

Es ist für die angegebene Reaktion spezifisch und wirkt z.B. nicht mit Phosphobrenztraubensäure, 1,2-Diphosphoglyzerinsäure (GREENWALDScher Säure), Hefeadenylsäure, Muskeladenylsäure.

Ich beschreibe im Folgenden die Isolierung, die Kristallisation, Messungen, die Konstanten des Ferments und der Reaktion, die es bewirkt, betreffend, sowie Versuche zur Stellung dieser Reaktion in der Kette der Gärungsreaktionen.

Der *Test* für die Isolierung des Ferments ist ein optischer. Dabei wird die phosphatübertragende Reaktion, deren Teilnehmer weder im sichtbaren noch im nahen Ultraviolett farbig sind, mit der vorangehenden oxydierenden Gärungsreaktion gekoppelt und die bei 340 m μ entstehende Absorption von Dihydropyridinnucleotid verfolgt (vgl. Abb. 1).

In der Testlösung müssen ausser den Substraten noch *Magnesium-Ionen* vorhanden sein, denn das wirkende Ferment enthält Magnesium dissoziierend gebunden (vgl. Tab. XII). Wie bei anderen Fermenten kann Magnesium durch Mangan ersetzt werden.

Die Bestimmung des *Eiweissgehaltes*, die neben dem Test zur Ermittlung des Reinheitsgrades bei der Isolierung notwendig ist, geschieht nephelometrisch (vgl. Tab. III).

Zur *Isolierung* des Ferments aus LEBEDEVSAFT sind 6 Reinigungsschritte erforderlich: Nucleoproteidfraktionierung aus 15 % Alkohol zwischen p_H 5.2 und p_H 4.8, Erhitzen in m/50 Pyrophosphat bei p_H 7.5, Erhitzen in Ammonsulfat und Fraktionieren zwischen Sättigung 0.73 und Sättigung 0.875, Erwärmen in ammoniumsulfathaltigem 15 % Alkohol, Säurefällung des Ferments bei p_H 3.5 zur Abtrennung der Salze als Vorbereitung zur Abtrennung der Nucleinsäuren mit Salmiridin.

Die *Kristallisation* erfolgt aus 0.6 gesättigter Ammonsulfatlösung bei Zusatz von m/25 Pyrophosphat unter schwach alkalischer Reaktion (vgl. Abb. 2 und 3).

Das kristallisierte Protein übersteht eine fünftägige *Dialyse* gegen fließendes Wasser ohne Wirkungsverlust (vgl. Tab. II) und erweist sich dann in der *Analyse* als aschenfrei. Die elementare Zusammensetzung ist nicht bemerkenswert. Ein gewisser Phosphatgehalt, der sich nicht abdialysieren lässt, konnte durch Waschen des Kristallisats mit Ammonsulfatlösung ohne Wirkungsverlust abgetrennt werden.

Am *Absorptionsspektrum* ist bemerkenswert, dass die Bande bei 280μ nur halb so hoch wie die Norm ist (vgl. Tab. V). Unser Ferment teilt diese Eigenschaft mit einem anderen phosphatübertragenden Fermentprotein der Gärung*, das NEGELEIN aus Rattenmuskeln⁷ und KUBOWITZ und OTT aus Menschenmuskeln⁸ isoliert haben.

Bei der Bestimmung der *katalytischen Wirksamkeit des Ferments* war zu bedenken, dass bei zusammengesetztem Test der gemessene Umsatz der oxydierenden Gärungsreaktion nicht gleich dem Umsatz der phosphatübertragenden Reaktion ist. Dieser lässt sich jedoch berechnen, wenn man die Gleichgewichtskonstante der oxydierenden Gärungsreaktion kennt (vgl. Abb. 4 und 5).

Die katalytische Wirksamkeit des Ferments in der Hinreaktion (Bildung von Adenosintriphosphat und Phosphoglyzerinsäure).

$$W_H = 320\,000 \left[\frac{\text{Mole}}{\text{Minuten} \cdot 100\,000 \text{ g Ferment}} \right]$$

ist 8.8 mal grösser als bei der Rückreaktion.

Die *Rückreaktion* (Bildung von Adenosindiphosphat und Diphosphoglyzerinsäure) wurde ebenfalls durch Koppelung mit der oxydierenden Reaktion optisch verfolgt. Dabei wurde das System durch Abfangen des Endprodukts Phosphoglyzerinaldehyd mit Cystein irreversibel gemacht (vgl. Abb. 6).

Mit dem Protein des wirkenden phosphatübertragenden Ferments sind fünf verschiedene Substanzen dissoziierend verbunden. Vier der *Gleichgewichtskonstanten der Fermentdissoziationen* konnten direkt bestimmt werden (vgl. Tab. VII), während diejenige der Diphosphoglyzerinsäure aus Verdrängungsversuchen indirekt erschlossen werden musste. Dabei zeigte sich die bemerkenswerte Tatsache, dass die beiden Nucleotide Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat sich gegenseitig nicht am Fermentprotein verdrängen, obwohl sie bei der Reaktion auseinander entstehen. Dies gestattet einen ersten Einblick in den Bau der Wirkungsstelle des Ferments (vgl. Abb. 7).

* Reaktionsgleichung vgl. weiter unten.

Phosphatübertragung d-1,3-Diphosphoglyzerinsäure verbraucht und zur Erhaltung des Oxydationsgleichgewichts unter Bildung wachsender Mengen lichtabsorbierenden Dihydropyridinnucleotids nachgebildet, bis sich zum Schluss ein neues Gleichgewicht einstellt, das durch die Summe der Reaktionsgleichungen (II) und (III) formuliert ist. Dabei steigt die Lichtabsorption zunächst mit konstanter,

TABELLE I	
Zusammensetzung der Testlösung	Mole/ml
KNa-Phosphat	5 · 10 ⁻⁵
d-1,3-Phosphoglycerinaldehyd	8.3 · 10 ⁻⁷
Diphosphopyridinnucleotid	4.15 · 10 ⁻⁷
Adenosindiphosphat, MgSO ₄	{ 2.5 · 10 ⁻⁷
Glykokoll	
	5 · 10 ⁻⁷
	I %

Versuchstemperatur 25°, PH = 6.9.

dem zugegebenen phosphatübertragenden Ferment proportionaler Geschwindigkeit, die zwischen zwei Marken gestoppt wird.

TABELLE II
Testwerte für einige Fermentpräparate

Fermentpräparat	Trockengewicht mg/ml im Test	Gestoppte Zeit für $\Delta \log \frac{i_0}{i} = 0.04$ in Min.	Wirkung $\Delta \log \frac{i_0}{i} / \text{mg} \cdot \text{Min.}$
Lebedev-Saft	156 · 10 ⁻⁶	0.55	47
Trockenpulver	27 · 10 ⁻⁶	0.33	450
Kristalle	{ 2 · 10 ⁻⁵	0.72	2780
Dialyse		1.45	2750
	0.875 · 10 ⁻⁶	1.64	2780

Monochromatisches Licht der Hg-Linie 334 wurde mit Filtern gewonnen. Zur Messung diente ein Selenphotoelement in Verbindung mit einem Multiflexgalvanometer der Firma LANGE⁶. Temperaturkonstanz, Vorbedingung für die Reproduzierbarkeit kinetischer Versuche, wurde durch Einspannen des Versuchstroges in einen temperierten Metallblock erzielt.

Eiweisskonzentration. Bei Ammonsulfatfraktionierungen nucleinsäurehaltiger Eiweisslösungen kann man die Eiweisskonzentration weder aus dem Stickstoffgehalt, noch durch Absorptionsmessung, noch durch das Trockengewicht bestimmen.

Wir haben uns bei der Reinigung, solange die Fermentpräparate Nucleinsäure enthielten, der nephelometrischen Methode bedient¹². Trichloressigsäure erzeugt in Lösungen

Literatur S. 313.

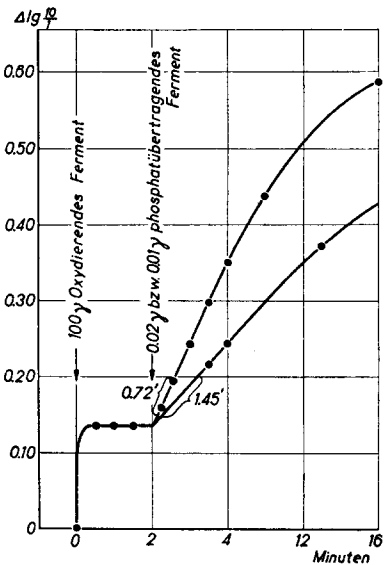


Abb. 1. Optischer Test für das phosphatübertragende Ferment. Ordinate: Licht absorption bei 334 mμ. Abszisse: Zeit in Minuten. Schichtdicke des Absorptionstroges: 0.495 cm. Zusammensetzung der Testlösung siehe Tabelle I

einer bestimmten Salzkonzentration haltbare Trübungen, die der Eiweisskonzentration proportional sind (Tabelle III).

Sulfosalicylsalzsäure-Trübungen sind in Gegenwart von Nucleinsäure nicht stabil. Chinidin ist kein Fällungsmittel für Eiweiss, sondern für Nucleinsäuren und dergleichen.

TABELLE III

ml Proteinlösung	Nephelometerablesung
0.40	15.2
0.20	30.0
0.10	63.0

Verfahren. Zu 16 ml Wasser werden 0.5 bis 5 mg Protein gegeben und Ammonsulfat zur Molarität 0.06 zugesetzt. Nach dem Mischen werden 0.5 ml 3 mol Trichloressigsäure einpipettiert und mit Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Gemessen wird nach einigen Minuten gegen die auf gleiche Weise erzeugte Trübung von 2 mg Ovalbumin.

Nach der Entfernung der Nucleinsäure haben wir die Konzentration der Fermentlösungen aus der Absorption bei $280\text{ m}\mu$ bestimmt⁵.

3. ISOLIERUNG DES FERMENTPROTEINS

Säure-Fraktionierung. 1.15 Liter LEBEDEV-Saft aus 850 g Trockenhefe¹³ und 2.55 Liter Wasser (3 Stunden bei 36°) werden in Eis und Salz auf -2° abgekühlt, unter Rühren 230 ml Alkohol und 138 ml Nucleinsäurelösung (in 100 ml 5 g Nucleinsäure MERCK und 7.5 ml n NaOH) in feinem Strahl zugegeben und mit etwa 40 ml 2 n Essigsäure auf $\text{pH } 5.2$ gebracht.

Der Niederschlag wird kalt abzentrifugiert (20 Minuten, 3000 Touren pro Minute) und das Obenstehende bei -2° mit etwa 42 cm^3 2 n Essigsäure auf $\text{pH } 4.8$ angesäuert. Dabei fällt der Hauptteil der Wirkung, der kalt abzentrifugiert (20 Minuten, 3000 Touren/Minute) und mit kaltem, 9%igem Alkohol einmal gewaschen wird.

Lösen und Trocknen. Der Niederschlag löst sich klar in einer kalten Mischung von 10 ml m/2 Na_2HPO_4 , 2.0 ml 2 n NH_4OH und 3.0 ml m/5 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Die Lösung wird im Vakuum der GÄDE-Pumpe über Kieselgel eingefroren und trocknet über Nacht bei Zimmertemperatur.

Ausbeute: 11.2 g, Wirkung siehe Tabelle II.

Das Trockenpulver behält seine Wirksamkeit, wenn es bei Zimmertemperatur im Exsikkator aufgehoben wird.

Lösen. 8 g Trockenpulver werden unter Rühren und leichtem Zerdrücken mit dem Glasstab in einer kalten Mischung von 8 ml m/5 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und 68 ml Wasser gelöst.

Erhitzen auf 50° . Die Lösung wird im Wasserbad 20 Minuten auf 50° erwärmt, wobei sie erstarrt. Das voluminöse, unwirksame Koagulat wird abzentrifugiert (10 Minuten, 3000 Touren/Minute), mit 73 ml kalten Wassers 10 Minuten digeriert und erneut zentrifugiert.

Literatur S. 313.

Ammonsulfatfraktionierung. Lösung und Waschwasser werden vereinigt (126 ml), unter Rühren werden zugleich mit 1.2 ml 2 n Ammoniak 38 g gepulvertes Ammonsulfat zugegeben und — nach dessen vollständiger Lösung — nach und nach 35 ml Null-Grad-gesättigter Ammonsulfatlösung zugesetzt.

60 Minuten Zentrifugieren (3000 Touren/Minute) gibt 173 ml klare Lösung, die 10 Minuten auf 63° erhitzt und nach dem Abkühlen mit 57 ml gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt wird: Abzentrifugieren und Verwerfen des Niederschlags (60 Minuten bei 3000 Touren).

*Filtrieren*¹⁴. Der klare Überstand wird mit 38 g gepulverten Ammonsulfat versetzt und der gebildete Niederschlag unter Saugen auf der Nutsche abfiltriert (Filter SCHLEICHER und SCHÜLL, 602 h, 7 cm Durchmesser). Die ersten trüb durchlaufenden 70 ml werden noch einmal auf das Filter gegeben, wenn es sich zugesetzt hat. Sobald der Niederschlag trocken geworden ist, jedoch bevor sich Risse bilden, wird die Nutsche mit 20 ml 0.875-gesättigter Ammonsulfatlösung ausgespült und der Niederschlag mit der gleichen Menge gewaschen. Dauer der gesamten Prozedur 120 Minuten.

Der Filterkuchen wird durch einmaliges Zusammenklappen des Filters zusammengeklebt und das Filter mit Hilfe eines Nirostaspatels abgezogen: 3.8 g feste, weisse Masse, die in einem weithalsigen ERLLENMEYER-Kölbchen über Nacht im Eisschrank verbleiben kann.

Erwärmen mit Alkohol. 3.8 g Filterkuchen werden kalt in einer Mischung von 10 ml Wasser, 5 ml m/5 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und einem Tropfen 2 n Ammoniak gelöst, zur kalten Lösung nach und nach 7.5 ml 45 %iger Alkohol gegeben und die Mischung 16 Minuten auf 32° erwärmt, dann hochtourig abzentrifugiert.

Säurefällung bei pH 3.5. Bei — 4° wird aus der klaren Lösung das Fermentprotein durch Ansäuern mit 1 ml 2 n Essigsäure und 0.65 ml 2 n Schwefelsäure auf pH 3.5 niedergeschlagen, kalt zentrifugiert (7 Minuten 3000 Touren) und zweimal mit unterkühltem, 15 %igem Alkohol gewaschen. Durch Lösen mit 4 ml Wasser und 0.35 ml 2 n Ammoniak zu lackmusneutraler Reaktion erhält man die zur Abtrennung der Nucleinsäuren nötige salzarme Proteinlösung.

*Protaminfällung*⁵. Zu 4.6 ml Fermentlösung werden portionsweise etwa 7 ml Salmiridinlösung (2 g Salmiridinsulfat und 3.2 ml n/10 NaOH in 100 ml) gegeben, bis die Lösung nach kurzem, kaltem Zentrifugieren einigermaßen klar übersteht. Dann wird weiter Salmiridin zugesetzt, bis die Tüpfelprobe sowohl gegen Salmiridin als auch Nucleinsäure negativ ausfällt. Zu der überstehenden, klaren Lösung werden 1.2 ml 30 Vol.-%iges Aluminiumhydroxyd gegeben und nach einigen Minuten abzentrifugiert (10 Minuten, 15000 Touren).

Ausfällen und Filtrieren. 16 ml Proteinlösung werden mit 4.0 ml m/5 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und einer Mischung von 30 ml gesättigter Ammonsulfatlösung mit 8.5 g festen Ammonsulfats — durch Evakuieren gasfrei gemacht — langsam in der Kälte versetzt und abfiltriert (Filter: SCHLEICHER und SCHÜLL, 602 h, 5 cm Durchmesser): 1.5 g fester Filterkuchen.

Kristallisation. 1.5 g Filterkuchen werden in 4 ml folgender Mischung zerteilt und in den Eisschrank gestellt: 6 ml gesättigte Ammonsulfatlösung, 2 ml m/5 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.17 ml 2 n Ammoniak, mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

Literatur S. 313.

Am nächsten Morgen zeigen sich neben Amorphem grosse Mengen unspezifisch wetzsteinförmiger Kristalle (Abb. 2). Beides verschwindet bei weiterem Stehen zugunsten rechteckiger Tafeln, Stäbchen und Quader. Nach 4 Tagen wird abzentrifugiert und mit 2.5 ml obiger Mischung gewaschen. In der gleichen Mischung suspendiert sind die Kristalle ohne Wirkungsverlust im Eisschrank haltbar.

Zur Umkristallisation wird durch Zusatz von Wasser gelöst und Ammonsulfat bis zur Trübe zugesetzt. Die Kristallisation setzt sofort ein und wird durch Verweilen im Eisschrank vollständig. Durch wiederholte Umkristallisation steigt weder die Wirkung noch der Quotient der Absorptionskoeffizienten bei 280 und 260 $m\mu$ ⁵.

Die Kristallisation geht nicht ohne Zusatz von Pyrophosphat. Wir nehmen an, dass durch Pyrophosphat Nucleinsäure verdrängt wird, die noch am Fermentprotein gebunden ist. Jedenfalls steigt bei der Kristallisation und beim Waschen der Quotient der Absorptionskoeffizienten bei 280 und 260 $m\mu$ (Tabelle IV).

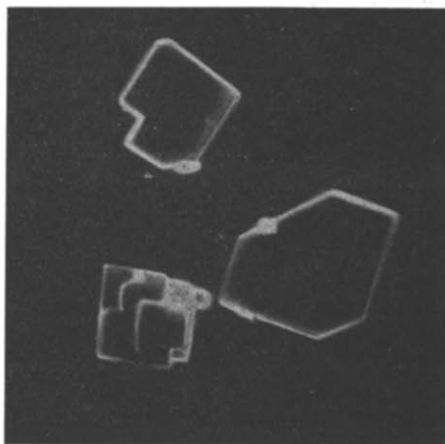


Abb. 2 und 3. Kristalle des phosphatübertragenden Ferments

Ausbeute. Nach der Wirkung (Tabelle II) beträgt der Anteil des phosphatübertragenden Ferments am Trockengewicht des LEBEDEV-Saftes (140 mg/ml) 1.7 % (0.2 % vom Lebendgewicht frischer Hefe).

Aus 800 ml LEBEDEV-Saft, entsprechend 1.9 g phosphatübertragenden Ferments, haben wir 265 mg Fermentkristalle erhalten; die Ausbeute beträgt danach 14 %.

TABELLE IV

	Gesamt- volumen ml	Ferment- gehalt mg/ml	$\frac{\beta_{280\ m\mu}}{\beta_{260\ m\mu}}$
Kristallsuspension . .	5.3	80	1.63
Waschwasser	2.5	8.6	1.46
Mutterlauge	4	16.6	1.53

Dialyse. Die fünftägige Dialyse des kristallisierten Ferments gegen fließendes Wasser geschieht ohne Wirkungsverlust.

Literatur S. 313.

2.0 ml Kristallsuspension (160 mg) werden abzentrifugiert, in 0.2 ml m/6 Pyrophosphatpuffer p_H 7.6 gelöst, mit Wasser auf 2.0 ml verdünnt und im dünnen Cellophanschlauch bei 0° unter Rühren^{5a} erst 24 Stunden gegen 500 ml m/500 Ammoniak, dann 4 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert.

Durch osmotische Wasseraufnahme steigt das Volumen auf 3 ml.
Trockengewicht: 44.25 mg/ml (100° in Luft bis zur Gewichtskonstanz), 43.5 mg/ml (60° im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz).

Wirkung siehe Tabelle II.

4. ANALYSE DES DIALYSIERTEN FERMENTS (W. LÜTTGENS)

4.615 mg, 9.124 mg CO₂, 2.977 mg H₂O, 0.000 mg Asche,
5.404 mg, 0.795 ml N₂ (21.5°, 756 mm Hg),
27.75 mg, 0.630 mg BaSO₄.
C = 53.92 %; H = 7.22 %; N = 16.96 %; S = 0.312 % (32 g S in 10.000 g Ferment).

Ein *Phosphorgehalt* (Pyrophosphat) von 0.21 %, der bei der Dialyse in salzfreier Lösung hartnäckig haften blieb, konnte durch viermaliges Waschen der Fermentkristalle mit 0.7 ml gesättigter Ammonsulfatlösung, die m/30 ammoniakalisch war, auf 0.001 % reduziert werden. Wirkung und Quotient der Absorptionskoeffizienten bei 280 und 260 m μ wurden durch die Waschung nicht verändert.

5. ABSORPTIONSSPEKTRUM

In Tabelle V sind die Absorptionskoeffizienten des dialysierten Ferments und die Quotienten der Absorptionskoeffizienten bei 280 m μ und den anderen Wellenlängen eingetragen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Daten für das oxydierende Gärungsferment⁵ und für Edestin (eigene Messung) gegenübergestellt.

Die Gegenüberstellung zeigt, dass auch im vorliegenden Falle die Absorption den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zuzuschreiben ist¹⁵, doch enthält das Ferment nur halb soviel an diesen Aminosäuren, wie die meisten Eiweisskörper.

TABELLE V

Konzentration 0.787 g/ml, Schichtdicke des Absorptionstrogos 0.495 cm

Wellenlänge m μ	Phosphatübertragendes Gärungsferment		Oxydierendes Gärungsferment		Edestin (in mol NaCl)	
	β_λ qcm/mg	$\frac{\beta_{280}}{\beta_\lambda}$	β_λ qcm/mg	$\frac{\beta_{280}}{\beta_\lambda}$	β_λ qcm/mg	$\frac{\beta_{280}}{\beta_\lambda}$
240	1.85	0.63	3.65	0.59	2.91	0.68
250	0.55	2.10	1.05	2.05	0.90	2.20
260	0.72	1.62	1.22	1.77	1.18	1.67
270	1.01	1.15	1.83	1.18	1.70	1.16
280	1.16	1.00	2.16	1.00	1.97	1.00
290	0.70	1.66	1.42	1.53	1.25	1.57

6. UMSATZ DER PHOSPHATÜBERTRAGENDEN REAKTION

Zeichenerklärung: Konzentration (Mole/ml) an:

γ Diphosphopyridinnucleotid,
 γ' Dihydrodiphosphopyridinnucleotid,
 α Adenosindiphosphat,
 α' Adenosintriphosphat,

R d-1, 3-Diphosphoglycerinsäure,
 F d-3-Phosphoglycerinaldehyd (FISCHER-Ester),
 N d-3-Phosphoglycerinsäure (NILSSON-Ester).

Die Indizes 0, t , ∞ deuten auf die Zeiten Null (Oxydationsgleichgewicht, Zugabe phosphatübertragenden Ferments), t und „unendlich“ (Endgleichgewicht) hin.

Die im Test gemessene Dihydropyridinbildung ist nicht gleich der umgesetzten 1,3-Diphosphoglycerinsäure, doch kann letztere errechnet werden, wenn man die Gleichgewichtskonstante der Oxydationsreaktion kennt.

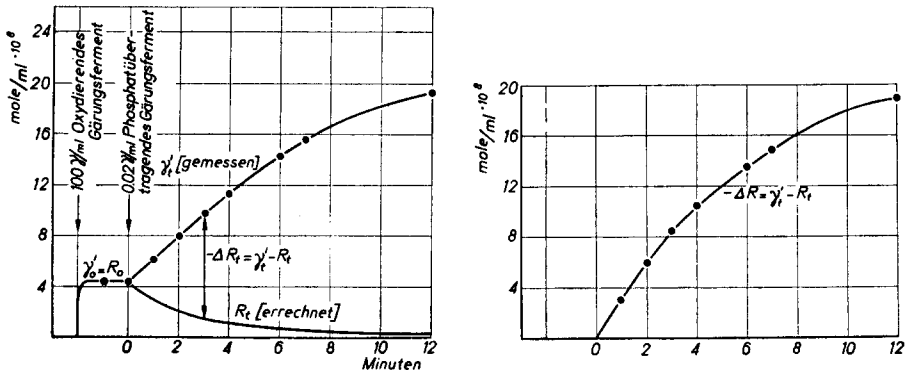


Abb. 4 und 5. Umsatz der phosphatübertragenden Reaktion aus dem optischen Test. Versuchsbedingungen siehe Abb. 1 und Tabelle I. Berechnung von R_t nach Gleichung (2) ($K^\gamma = 68.2$). Vgl. auch Tabelle VI

Bei den verschiedensten Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer bleibt bei konstanter Phosphatkonzentration und konstantem p_H (Bedingungen, die bei unseren Versuchen gegeben sind) der Quotient

$$K^\gamma = \frac{\text{d-3-Phosphoglycerinaldehyd} \cdot \text{Pyridinnucleotid}}{\text{d-1,3-Diphosphoglycerinsäure} \cdot \text{Dihydropyridinnucleotid}} \quad (1)$$

konstant.

Wegen der bedeutenden p_H -Abhängigkeit wird K^γ für jeden Versuch aus γ_0 , F_0 , γ'_0 , R_0 errechnet.

Gleichung (1) gibt für die zur Zeit t in der Versuchslösung tatsächlich *vorhandene* Diphosphoglycerinsäure

$$R_t = \frac{\gamma_t \cdot F_t}{\gamma'_t \cdot K^\gamma} \quad (2)$$

Die zur gleichen Zeit bereits *in Reaktion getretene* Diphosphoglycerinsäure ist, wie Abb. 4 veranschaulicht,

$$-\Delta R_t = \gamma'_t - R_t, \quad (3)$$

da bei der oxydierenden Reaktion gleiche Mengen γ' und R *gebildet* werden.

Da bei der Phosphatübertragung gleiche Mengen Diphosphoglycerinsäure und Adenosindiphosphat schwinden, ist weiterhin

$$-\Delta R_t = \alpha_0 - \alpha_t = \alpha'_t = N_t. \quad (4)$$

Tabelle VI zeigt einen Versuch, der auf diese Weise ausgerechnet wurde.

Literatur S. 313.

In der letzten Spalte der Tabelle VI wird gezeigt, dass die Reaktion fast bis zum Gleichgewicht nach der ersten Ordnung abläuft. Eine Erscheinung, bei der mehrere Faktoren — Verdrängungen und Dissoziationen — zusammenwirken, die zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit ausgenutzt wurde, denn es ist bei Reaktionen, die in erster Ordnung einem Gleichgewicht zustreben, allgemein

$$v_t = k (C_t - C_\infty)$$

in unserem Falle die Anfangsgeschwindigkeit

$$v_0 = k(a_0 - a_\infty).$$

TABELLE VI

VERSUCH DER ABB. 3 UND 4

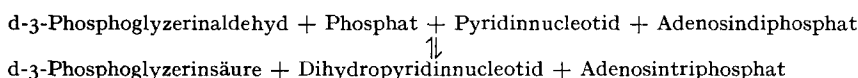
Zeit in Minuten; Konzentrationen in Mole/ml 10^8 ; Versuchsansatz siehe Tabelle I; $p_H = 6.86$; Versuchstemperatur 25° ; zur Zeit 0 wurden $2 \cdot 10^{-5}$ mg/ml phosphatübertragendes Ferment zugesetzt

$$K^{\gamma} = \frac{\gamma'_0 \cdot F_0}{\gamma_0 \cdot R_0} = 68.2$$

t	γ'_t	$F_t = \gamma_t$	R_t	$-\Delta R_t = a_0 - a_t = a'_t = N_t$	$a_t - a_\infty$	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a_0 - a_\infty}{a_t - a_\infty}$
0	4.48	37.1	4.48	0	23.9	
1	6.12	35.4	3.01	3.11	20.8	0.140
2	8.00	33.5	2.06	5.94	17.96	0.143
3	9.9	31.6	1.5	8.4	15.5	0.144
4	11.5	30.0	1.1	10.4	13.5	0.143
6	14.3	27.2	0.7	13.6	10.3	0.140
7	15.7	25.9	0.6	15.0	8.9	0.141
12	19.3	22.2	0.3	19.0	4.9	0.132
∞	24.1	17.4	0.18	23.9	0	
						$k = 0.142/\text{Min.}$ $v_0 = 23.9 \cdot 0.142$ $= 3.4 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mole}}{\text{ml Min.}}$

7. RÜCKREAKTION

Wie MEYERHOF und Mitarbeiter⁴ gezeigt haben, ist die Bilanzreaktion



reversibel.

Abb. 6 (obere Kurve) zeigt, wie man auf optischem Wege die Einstellung des Gleich-

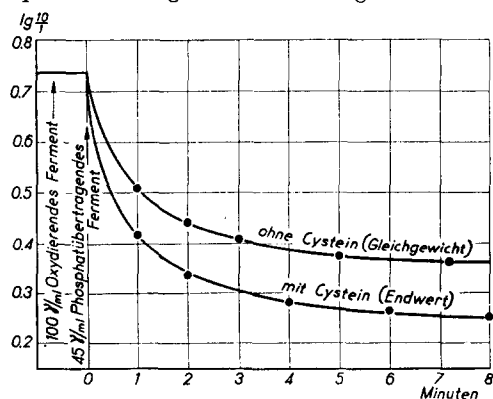


Abb. 6. Versuchsansatz (Mole/ml): Adenosintri-phosphat $1.85 \cdot 10^{-7}$, d-3-Phosphoglycerinsäure $1.85 \cdot 10^{-7}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 5 \cdot 10^{-6}$, Dihydroxyridinnucleotid $2.4 \cdot 10^{-7}$, NaHCO_3 $1.75 \cdot 10^{-6}$, Glykokoll 8 mg/ml, Cystein $2 \cdot 10^{-5}$ (untere Kurve), gesättigt mit 10% CO_2 in Ar, pH = 6.9, Versuchstemperatur 25°

gewichts von der Rückseite her — durch Messung der abnehmenden Lichtabsorption bei schwindendem Dihydropyridinnucleotid — verfolgen kann.

Durch *Zusatz von Cystein* kann man eins der Reaktionsprodukte — d-3-Phosphoglycerinaldehyd — abfangen; dadurch wird die oxydierende Rückreaktion irreversibel. Dann läuft die Reaktion nach Zusatz der Fermente bis zum Verbrauch eines der Substrate, und der gemessene Umsatz an Dihydropyridinnucleotid ist gleich dem Umsatz der phosphatübertragenden Reaktion (Abb. 6, untere Kurve).

In Gegenwart von Cystein kann die Reaktion zur UV-kolorimetrischen Bestimmung von Adenosintriphosphat und d-3-Phosphoglycerinsäure benutzt werden.

8. KATALYTISCHE WIRKSAMKEIT DES PHOSPHATÜBERTRAGENDEN FERMENTS

Im Versuch der Tabelle VI bewirken $2 \cdot 10^{-8}$ g phosphatübertragenden Ferments bei 25° einen Umsatz von $3.4 \cdot 10^{-8}$ Mole/Min. Wie später gezeigt wird (Tabelle IX), ist das Ferment in diesem Versuch an Magnesium und Substrat gesättigt, an Adenosindiphosphat 0.54 gesättigt. Aus diesen Daten errechnet sich die katalytische Wirksamkeit:

$$W_h = \frac{3.4 \cdot 10^{-8} \cdot 10^5}{0.54 \cdot 2 \cdot 10^{-8}} = 320\,000 \frac{\text{Mole}}{\text{Minuten} \cdot 100\,000 \text{ g Ferment.}}$$

Die *katalytische Wirksamkeit des Ferments in der Rückreaktion* errechnet man aus den Daten der Tabelle X. $2 \cdot 10^{-7}$ g Ferment bringen bei voller Sättigung mit Substrat und Co-Ferment der Rückreaktion einen Umsatz von $7.2 \cdot 10^{-8}$ Mol/Min zustande. Danach ist die katalytische Wirksamkeit bei der Rückreaktion

$$W_r = \frac{7.2 \cdot 10^{-8} \cdot 10^5}{2 \cdot 10^{-7}} = 36000 \frac{\text{Mole}}{\text{Minuten} \cdot 100\,000 \text{ g Ferment}}$$

8.8 mal kleiner als bei der Hinreaktion.

9. GLEICHGEWICHTSKONSTANTEN DER FERMENTDISSOZIATIONEN

Mit dem Protein des wirkenden phosphatübertragenden Ferments sind fünf verschiedene Substanzen dissoziierend verbunden: Adenosinphosphat, Adenosintriphosphat, d-1,3-Diphosphoglycerinsäure, d-3-Phosphoglycerinsäure und Magnesium.

Vier der Dissoziationskonstanten konnten auf dem üblichen Wege — Messung der Wirkung bei variiertter Konzentration eines Reaktionsteilnehmers — bestimmt werden. d-1,3-Diphosphoglycerinsäure wird so fest gebunden, dass das Ferment bei allen im Versuch möglichen Konzentrationen an ihr gesättigt ist. Doch wird sie durch das Substrat der Gegenseite, d-3-Phosphoglycerinsäure, verdrängt und aus dem Verdrängungsgrad lässt sich die Dissoziationskonstante errechnen.

TABELLE VII

Gleichgewichtskonstanten der Fermentdissoziationen

Adenosindiphosphat	$D_1 = 2 \cdot 10^{-7}$ Mole/ml
Adenosintriphosphat	$D_2 = 1.1 \cdot 10^{-7}$ „
d-1,3-Diphosphoglycerinsäure	$D_3 = 1.8 \cdot 10^{-9}$ „
d-3-Phosphoglycerinsäure	$D_4 = 2 \cdot 10^{-7}$ „
Magnesium	$D_5 = 2.5 \cdot 10^{-7}$ „

a.
$$D_1 = \frac{\text{Adenosindiphosphat} \cdot \text{Fermentprotein}}{\text{wirkendes Ferment}};$$

Für die Bestimmung dieser Konstante ist die hohe Festigkeit der Diphosphoglyzerinsäure-Proteidbindung ein günstiger Umstand, da beim zusammengesetzten Test die Konzentration der Diphosphoglyzerinsäure gering ist. Tabelle VIII zeigt, dass bei zwei verschiedenen geringen Diphosphoglyzerinsäurekonzentrationen unter sonst gleichen Bedingungen die Fermentwirkung konstant bleibt, das Ferment also gesättigt ist.

TABELLE VIII

Versuch 1 : $4.15 \cdot 10^{-7}$ Mole/ml Pyridinnucleotid. Versuch 2 : $1.5 \cdot 10^{-7}$ Mole pro ml Pyridinnucleotid.
Im übrigen Ansatz der Tabelle I. p_H 6.82

	d-1,3-Diphosphoglyzerinsäure Mole/ml	V Mole/ml/Min.
1	$0.455 \cdot 10^{-7}$	$0.362 \cdot 10^{-7}$
2	$0.275 \cdot 10^{-7}$	$0.364 \cdot 10^{-7}$

Tabelle IX zeigt die Anfangsgeschwindigkeiten V der phosphatübertragenden Reaktion bei verschiedenen Anfangskonzentrationen an Adenosindiphosphat a , bei Sättigung des Fermentproteids mit Magnesium und Substrat.

TABELLE IX

Ausser den wechselnden, in Spalte 2 angegebenen Adenosindiphosphatkonzentrationen: Zusammensetzung der Tabelle I. — Versuch 2 ist der Gleiche wie in Tabelle VI

	Adenosindiphosphat		$V_\infty = \frac{a_a - a_b}{\frac{a_a}{V_a} - \frac{a_b}{V_b}}$ 10^8 Mole/ml/Min.	$D_1 = \frac{V_\infty - V_a}{V_a} a_a$ 10^7 Mole/ml
	a 10^8 Mole/ml	V 10^8 Mole/ml/Min.		
1	10.7	2.18	$\left. \begin{array}{l} 6.7 \\ 6.0 \end{array} \right\} 6.4 \cdot 5.9$	2.0
2	25.0	3.43		2.1
3	50.0	4.60		1.8
4	98	5.25		2.0
	Mittel:		$6.3 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mole}}{\text{ml Min.}}$	$D_1 = 2 \cdot 10^{-7} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$

Setzt man voraus, dass die Geschwindigkeit der vom Ferment katalysierten Reaktion V proportional demjenigen Anteil P des Gesamtproteins ΣP ist, der ausser mit Substrat und Magnesium auch mit Adenosindiphosphat verbunden ist, dann ist, da a sehr viel grösser als ΣP ist,

$$D_1 = \frac{\Sigma P - P}{\Sigma P} a = \frac{V_\infty - V}{V} a,$$

dabei ist V_∞ die Grenzgeschwindigkeit bei unendlich grosser Co-Fermentkonzentration, die aus obenstehender Gleichung mit den Werten zwei verschiedener, endlicher Co-Fermentkonzentration erhalten wird:

$$V_\infty = \frac{a_a - a_b}{\frac{a_a}{V_a} - \frac{a_b}{V_b}}.$$

Die Bindungsfestigkeit des Adenosindiphosphats am phosphatübertragenden Ferment

$$D_1 = 2 \cdot 10^{-7} \text{ Mole/ml}$$

ist 6 mal geringer als die des Pyridinnucleotids am oxydierenden Ferment, 40 mal geringer als die des Dihydropyridinnucleotids am reduzierenden Gärungsferment der Muskeln und Tumoren.

$$b. \quad D_2 = \frac{\text{Adenosintriphosphat} \cdot \text{Fermentprotein}}{\text{wirkendes Ferment}} :$$

Tabelle X zeigt die Anfangsgeschwindigkeiten V der phosphatübertragenden Rückreaktion bei verschiedenen Anfangskonzentrationen an

TABELLE X

Versuchsansatz (Mole/ml): Adenosintriphosphat: wechselnde Mengen (Spalte 2), d-3-Phosphoglycerinsäure $5 \cdot 10^{-6}$, MgSO_4 $5 \cdot 10^{-6}$, Dihydropyridinnucleotid $2.4 \cdot 10^{-7}$, NaHCO_3 $1.75 \cdot 10^{-5}$, Cystein $2 \cdot 10^{-5}$, Glykokoll 8 mg/ml, gesättigt mit 10% CO_2 in Ar. $p_H = 6.9 \cdot 0.1$ mg/ml oxydierendes Gärungsferment, $2.0 \cdot 10^{-4}$ mg/ml phosphatübertragendes Gärungsferment. Versuchstemperatur 25°

	Adenosin- triphosphat α' $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	V $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml Min.}}$	$V_\infty = \frac{\frac{\alpha'_a - \alpha'_b}{\alpha'_a} - \frac{\alpha'_b}{\alpha'_b}}{\frac{V_a}{\alpha'_a} - \frac{V_b}{\alpha'_b}}$ $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml Min.}}$	$D_2 = \frac{V_\infty - V}{V} \alpha'$ $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$
1	7.85	2.96	} } 7.33 } } 7.28 } } 7.38 } } 7.40 }	11.6
2	15.7	4.32		11.0
3	31.4	5.36		11.4
4	62.8	6.2		11.6
		Mittel:	$7.34 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mole}}{\text{ml Min.}}$	$1.14 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$

Adenosintriphosphat α' . In allen Versuchen ist das Ferment an Substrat und Magnesium gesättigt. Die kinetisch begünstigte Hinreaktion wurde durch Zusatz von Cystein unterbunden.

Die durch den Cysteinzusatz erzeugte Irreversibilität der Oxydationsreaktion verhindert zudem die Anspeicherung von 1,3-Diphosphoglycerinsäure, die Adenosintriphosphat vom Ferment zu verdrängen vermag (siehe Seite 306).

Die Bindungsfestigkeit des Adenosintriphosphats am phosphatübertragenden Ferment

$$D_2 = 1.1 \cdot 10^{-7} \text{ Mole/ml}$$

ist nahezu doppelt so gross wie die des Adenosindiphosphats.

$$c. \quad D_4 = \frac{\text{d-3-Phosphoglycerinsäure} \cdot \text{Fermentprotein}}{\text{wirkendes Ferment}} :$$

Tabelle XI zeigt Versuche, analog denjenigen des vorigen Abschnitts, mit verschie-

denen Anfangskonzentrationen an d-3-Phosphoglyzerinsäure. Daraus berechnet sich die Bindungsfestigkeit der d-3-Phosphoglyzerinsäure

$$D_4 = 2.0 \cdot 10^{-7} \text{ Mole/ml}$$

TABELLE XI

Versuchsansatz: $62.7 \cdot 10^{-8}$ mole/ml Adenosintriphosphat, wechselnde Mengen d-3-Phosphoglyzerinsäure (Spalte 2), sonst wie in Tabelle X

	d-3-Phospho- glyzerinsäure = N $10^8 \cdot \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$	V $10^8 \cdot \frac{\text{Mole}}{\text{ml Min.}}$	$V_\infty = \frac{N_a - N_b}{\frac{V_a}{V_b}}$ $10^8 \cdot \text{Mole/ml/Min.}$	$D_4 = \frac{V_\infty - V}{V} N$ $10^8 \cdot \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$
1	18.5	2.23	} } 4.67 } } 4.25 } 4.54	19.5
2	67.8	3.60		18.4
3	370	4.33		21.4
		Mittel:	$4.58 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mole}}{\text{ml Min.}}$	$2.0 \cdot 10^{-7} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$

d.
$$D_5 = \frac{\text{Magnesium} \cdot \text{Fermentprotein}}{\text{wirkendes Ferment}} :$$

1931 entdeckte K. LOHMANN die komplexe Natur der Coxymase von HARDEN, als deren einen Bestandteil er Magnesium erkannt hatte¹⁷. Seither hat man auch das „Gärungsferment“, die Zymase, in eine Vielzahl von Fermentindividuen aufgespalten. Mehrere dieser Fermente sind Magnesiumfermente, z.B. die Enolase¹⁶ und das in dieser Arbeit beschriebene phosphatübertragende Ferment.

TABELLE XII

Ansatz: $62.7 \cdot 10^{-8}$ mole/ml Adenosintriphosphat, wechselnde Mengen der Spalte 2 Magnesium, sonst wie Tabelle X

	Mg. $10^8 \cdot \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$	V $10^8 \cdot \frac{\text{Mole}}{\text{ml Min.}}$	$D_2 = \frac{V_\infty - V}{V} \text{Mg.}$ $10^8 \cdot \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$
1	488.0	8.0	} } = V_∞
2	77.5	8.0	
3	15.2	4.33	24
4	3.16	2.04	27
5	0	1.2	—
		Mittel:	$2.5 \cdot 10^{-7} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$

Wie bei der Enolase, kann auch hier Mangan in seiner zweiwertigen Form Magnesium vertreten, es ist in kleinen Konzentrationen 5 mal wirksamer, weil es vom Ferment fester gebunden wird.

Literatur S. 313.

Wegen der verdrängenden Wirkung von Phosphat wurde die Bindungsfestigkeit des Magnesiums in der phosphatübertragenden *Rückreaktion* — analog den Versuchen der vorigen beiden Abschnitte — bestimmt. Tabelle XII zeigt die Versuche.

Die Bestimmung wird ungenau durch Metallspuren, die den Co-Fermentpräparaten entstammen und auch bei der Magnesiumkonzentration Null eine Restwirkung hervorbringen.

Unter der Annahme, dass die Restwirkung nicht von Magnesium, sondern von erheblich fester gebundenen Metallionen (Mangan) herrührt, wird die Restwirkung von den Wirkungen der Versuche 3 und 4 mit geringen Magnesiumkonzentrationen abgezogen.

Die Bindungsfestigkeit des Magnesiums am phosphatübertragenden Ferment

$$D^5 = 2.5 \cdot 10^{-7} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$$

ist um eine Größenordnung grösser als die des Magnesiums an der Enolase.

Um einen Überblick über den Zustand des phosphatübertragenden Ferments in der lebenden Zelle zu bekommen, haben wir (gemeinsam mit W. LÜTTGENS) den *Magnesium- und Mangangehalt von frischer*, gewaschener Bäckerhefe bestimmt. Wir fanden in 1 g Frischhefe (Trockengewicht 0.25 g, Asche 0.018 g) 0.615 mg Magnesium und 0.0024 mg Mangan. Demnach ist das Magnesium in der Zellflüssigkeit maximal m/20. Schon bei grössenordnungsmässig geringeren Magnesiumkonzentrationen ist das phosphatübertragende Ferment an Magnesium gesättigt. Der Mangangehalt ist zu gering, um trotz höherer Bindungsfestigkeit konkurrieren zu können.

e. *Gegenseitige Verdrängung der wirkenden Substanzen; Gleichgewichtskonstante der Diphosphoglyzerinsäuredissoziation*

Wie in anderen Arbeiten dieses Instituts ist auch im Vorausgegangenen gezeigt worden, dass die wirkenden Substanzen an bestimmte Wirkungsstellen des Fermentproteins, nach dem Massenwirkungsgesetz dissoziierend, d. h. chemisch, gebunden sind.

Konkurrieren zwei Substanzen mit den Konzentrationen c und c' , den Dissoziationskonstanten D und D' , um eine Wirkungsstelle des Fermentproteins, dann ist nach dem Massenwirkungsgesetz die Verteilung des gesamten Fermentproteins ΣP zwischen freiem Protein p und den mit einer der beiden Substanzen verbundenen Anteilen P und P' durch das System der folgenden drei Gleichungen mit drei Unbekannten gegeben:

$$\left. \begin{aligned} c \cdot p - D \cdot P &= 0 \\ c' \cdot p - D' \cdot P' &= 0 \\ p + P + P' &= \Sigma P \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

Daraus erhält man z.B. für P , den mit einer wirkenden Substanz verbundenen Anteil des Fermentproteins in Gegenwart einer konkurrierenden Substanz:

$$P = \frac{\Sigma P}{1 + \frac{D}{c} \left(1 + \frac{c'}{D'} \right)} \quad (2)$$

Der mit der gleichen Substanz verbundene Anteil des Fermentproteins in Abwesenheit der konkurrierenden Substanz P_0 ist [$c' = 0$]:

$$P_0 = \frac{\Sigma P}{1 + \frac{D}{c}} \quad (2a)$$

Bezeichnen wir mit V_0 die Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit der konkurrierenden Substanz, mit V die Reaktionsgeschwindigkeit im gleichen System jedoch in Gegenwart der konkurrierenden Substanz, dann ist

$$\left. \begin{aligned} \frac{V}{V_0} &= \frac{1 + \frac{D}{c}}{1 + \frac{D}{c} \left(1 + \frac{c'}{D'}\right)} \\ \frac{c}{D} &= \frac{\frac{c'}{D'}}{\frac{V}{V_0} - 1} - 1. \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

Die Tabelle XIII zeigt — durch die Quotienten V/V_0 ausgedrückt — die Verminderung der Anfangsgeschwindigkeit der phosphatübertragenden „Hin“-Reaktion durch die Teilnehmer der „Rück“-Reaktion.

Bei den Versuchen 1 und 2 fehlt zu Beginn jeweils einer der Teilnehmer der Rückreaktion, die Verminderung der Anfangsgeschwindigkeit ist daher ein reiner Verdrän-

TABELLE XIII

Versuchsansatz: ausser den in Spalte 3 und 5 angegebenen Zusätzen wie in Tabelle I. Versuchsdurchführung wie Abb. 4 und 5; Versuch 0 ist der Gleiche wie in Abb. 4 und 5 (Tabelle VI)

	Adenosin- diphosphat $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	Adenosin- triphosphat $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	d-1,3-Diphospho- glyzerinsäure $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	d-3-Phospho- glyzerinsäure $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	
0	25	0	4.5	0	$V_0 = 3.4 \cdot 10^8 \frac{\text{Mole}}{\text{ml Min.}}$ $\frac{V_\infty}{V_0} = 1.84$
1	25	63	4.0	0	$\frac{V_1}{V_0} = 0.83$
2	25	0	4.6	58	$\frac{V_2}{V_0} = 0.90$
3	25	62	4.2	422	$\frac{V'_3}{V_0} = 0.41$

gungseffekt. Bei Versuch 3 kommt dagegen zur Verminderung der Geschwindigkeit durch Verdrängung noch diejenige durch die mit der Fermentzugabe einsetzende Rück-

reaktion hinzu, die mit $\left[\frac{V_\infty}{V_0} - \frac{V}{V_0} \right] \frac{W_r}{W_h} V_0$ eingesetzt werden darf ($W_r/W_h = 0.11$: das Verhältnis der katalytischen Wirksamkeiten des Ferments bei Hin- und Rückreaktion).

Versuch 1 zeigt die merkwürdige Tatsache der *Nichtverdrängung von Adenosindiphosphat durch Adenosintriphosphat*. Bei Konkurrenz der beiden Substanzen um die gleiche Wirkungsstelle sollte der Zusatz der 2.5 fachen Menge Adenosintriphosphat $V/V_0 = 0.3$, d. h. eine Hemmung um 70 % ergeben. Gefunden wurde jedoch $V_1/V_0 = 0.83$, also eine Hemmung um 17 %. Danach muss die von Adenosintriphosphat verdrängte Substanz wesentlich *fester* an das Protein gebunden sein als Adenosindiphosphat. Nach Gleichung (3) errechnet man

$$\frac{c}{D} = 25.$$

Man ist versucht, hier die Konzentration der *Diphosphoglycerinsäure* einzusetzen und erhält dann

$$D_3 = 1.6 \cdot 10^{-9} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}.$$

Versuch 2 zeigt, dass auch der andere Teilnehmer der Rückreaktion — d-3-Phosphoglycerinsäure — nicht mit Adenosindiphosphat konkurriert. Wir errechnen, unter Einsatz der im vorigen Abschnitt bestimmten Dissoziationskonstante der d-3-Phosphoglycerinsäure, für die verdrängte Substanz wiederum

$$\frac{c}{D} = 25$$

und setzen wiederum die Konzentration der Diphosphoglycerinsäure ein und erhalten für die Dissoziationskonstante der d-1,3-Diphosphoglycerinsäure

$$D_3 = 1.8 \cdot 10^{-9} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}.$$

V_3/V_0 in *Versuch 3* muss, bevor wir es in die Gleichung einsetzen können, eine Korrektur für die Rückreaktion erfahren. Es ist nach dem oben Gesagten

$$\frac{V'_3}{V_0} = \frac{V_3 + 0.16 \cdot V_0}{V_0} = 0.57.$$

Unter Vernachlässigung des — gegen die eingesetzte Phosphoglycerinsäure geringen — Adenosintriphosphatzusatzes errechnet man für die verdrängte Substanz

$$\frac{c}{D} = 27$$

und bei Einsatz der Diphosphoglycerinsäurekonzentration

$$D_3 = 1.5 \cdot 10^{-9} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}.$$

Die Übereinstimmung der Werte für D_3 , die man aus den drei verschiedenen angelegten Verdrängungsversuchen erhält, ist eine Rechtfertigung des eingeschlagenen Verfahrens

und der Überlegung auf der es beruht. Sie führt zu dem überraschenden Schluss, dass beide Reaktionsteilnehmer der Rückreaktion auf *einen* Teilnehmer der Hinreaktion verdrängend wirken.

Das Schema der Abbildung 7, in dem angenommen ist, dass dem Fermentprotein

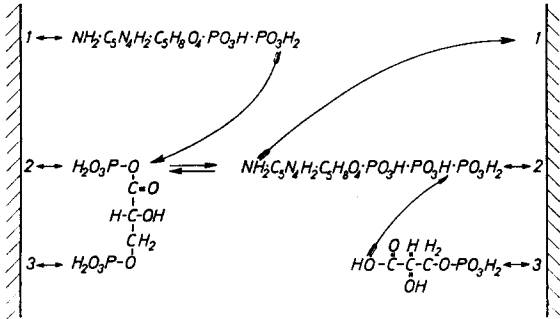


Abb. 7.

drei Wirkungsstellen zu eigen sind, deren zwei die Phosphatgruppen der Diphosphoglycerinsäure besetzen, deutet an, wie man diesen Befund möglichenweise deuten kann.

10. GLEICHGEWICHTSKONSTANTE DER PHOSPHATÜBERTRAGENDEN REAKTION

Lässt man die Reaktionen, deren Anfangszustände in Tabelle XIII eingetragen sind, ablaufen, dann findet man im Gleichgewicht die in Tabelle XIV eingetragenen Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer. Aus diesen ergibt sich die Gleichgewichtskonstante der phosphatübertragenden Gärungsreaktion:

$$\frac{\text{Adenosindiphosphat} \cdot \text{d-1, 3-Diphosphoglycerinsäure}}{\text{Adenosintriphosphat} \cdot \text{d-3-Phosphoglycerinsäure}} = 3 \cdot 10^{-4}.$$

TABELLE XIV
Gleichgewichtszustand der Ansätze der Tabelle XIII

	Adenosin- diphosphat $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	Adenosin- triphosphat $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	d-1,3-Diphospho- glyzerinsäure $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	d-3-Phospho- glyzerinsäure $\frac{10^8 \cdot \text{Mole}}{\text{ml}}$	$K = \frac{\text{Adenosin-} \cdot \text{Diphospho-}}{\text{Adenosin-} \cdot \text{Phospho-}} \frac{\text{diphosphat}}{\text{triphosphat}} \frac{\text{glyzerinsäure}}{\text{glyzerinsäure}}$
0	1.1	23.9	0.18	23.9	$3.5 \cdot 10^{-4}$
1	2.8	85.4	0.21	22.4	$3.1 \cdot 10^{-4}$
2	2.4	24.2	0.24	81.2	$2.9 \cdot 10^{-4}$
3	12.3	73.8	0.78	434	$3.0 \cdot 10^{-4}$
				Mittel:	$K = 3.1 \cdot 10^{-4}$

Beim gleichem p_H 6.9 beträgt die Gleichgewichtskonstante der phosphatbindenden und Oxydationsreaktion der Gärung, wie demnächst ausführlich mitgeteilt wird:

$$\frac{\text{Phosphat} \cdot \text{d-3-Phosphoglyzerinaldehyd} \cdot \text{Diphosphopyridinnucleotid}}{\text{d-1,3-Diphosphoglyzerinsäure} \cdot \text{Dihydrophosphopyridinnucleotid}} \\ = 4 \cdot 10^{-3} \frac{\text{Mole Phosphat}}{\text{ml}}$$

Durch Multiplikation der beiden Konstanten erhält man die Konstante der Bilanzreaktion (bei p_H 6.9):

$$\frac{\text{Adenosindiphosphat} \cdot \text{Phosphat} \cdot \text{Phosphoglyzerinaldehyd} \cdot \text{Pyridinnucleotid}}{\text{Adenosintriphosphat} \cdot \text{Phosphoglyzerinsäure} \cdot \text{Dihydroxydinnucleotid}} \\ = 1.2 \cdot 10^{-6} \frac{\text{Mole Phosphat}}{\text{ml}}$$

Setzt man den Phosphatgehalt im Zellsaft lebender Hefe mit $4 \cdot 10^{-5}$ Mole/ml, dann bekommt man

$$\frac{\text{Adenosindiphosphat} \cdot \text{Phosphoglyzerinaldehyd} \cdot \text{Pyridinnucleotid}}{\text{Adenosintriphosphat} \cdot \text{Phosphoglyzerinsäure} \cdot \text{Dihydroxydinnucleotid}} \\ = 3 \cdot 10^{-2}.$$

Die Konstante der phosphatübertragenden Reaktion ist wenig p_H -abhängig, die Konstante der phosphatbindenden und oxydierenden Reaktion dagegen ändert sich assuerordentlich mit dem p_H . Daher errechnet man für die Konstante der Bilanzreaktion bei p_H 7.4 einen wesentlich geringeren Wert als bei p_H 6.9, nämlich $3 \cdot 10^{-7}$ Mole Phosphat/ml.

Wie NEGELEIN und BRÖMEL gefunden haben⁶ zerfällt Diphosphoglyzerinsäure von selbst mit erheblicher Geschwindigkeit (Halbwertszeit 27 Minuten) in Phosphoglyzerinsäure und Phosphat. Da die *phosphatbindende Reaktion zugleich die energieliefernde Reaktion der Muskelkontraktion ist*, würde der Selbstzerfall der Diphosphoglyzerinsäure einen Verlust für die lebende Zelle darstellen. Dieser Verlust wird durch das Zusammenwirken zweier verschiedener Umstände vermieden:

Erstens liegen — wie Tabelle XIII zeigt — die Gleichgewichte der Diphosphoglyzerinsäure erzeugenden und verbrauchenden Reactionen beide im Sinne sehr geringer stationärer Diphosphoglyzerinsäurekonzentration.

Zweitens ist das Product aus Konzentration und Wirksamkeit des Disphosphoglyzerinsäure verbrauchenden phosphatübertragenden Ferments in der Zelle grösser als das des Diphosphoglyzerinsäure erzeugenden oxydierenden Ferments.

II. PHOSPHATÜBERTRAGENDES FERMENT IM SERUM

Das phosphatübertragende Ferment ist im Serum von Tumorratten nicht in grösserer Konzentration vertreten als im Normalserum. Wir tragen hier den Versuch nach, dessen Ergebnis bereits anderwärts mitgeteilt worden ist¹⁸.

Zur Gewinnung des Serums wurde herzpunktiertes Blut erstickter Ratten kalt geronnen und abzentrifugiert. Der Tumor wog 80 g (30 % des Lebendgewichts der Ratte) und hatte nur geringe Nekrosen. Das Blut der Tumorratte war zu 50 % anämisch. Das Tumorseum war kaum, das Normalserum nicht hämolysiert.

Zur Vermeidung von Störungen durch Isomerase und andere Gärungsfermente benutzten wir als Test die phosphatübertragende Rückreaktion mit hohen Ausgangskonzentrationen an Adenosintriphosphat und d-3-Phosphoglyzerinsäure in Gegenwart von Cystein.

Das Serum war im Versuch $1/_{25}$ verdünnt. Die Messergebnisse zeigt Tabelle XV.

TABELLE XV

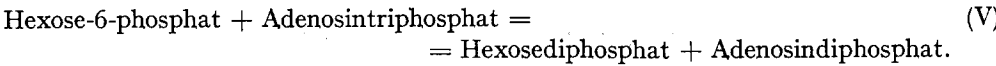
	Trockengewicht des Serums	Anfangsgeschwindigkeit im Test	mg phosphat- übertragendes Ferment ml Serum
Normalserum . . .	77.6 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	$0.465 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mole}}{\text{cm} \cdot \text{Min.}}$	$3.9 \cdot 10^{-4} \frac{\text{Mole}}{\text{ml}}$
Tumorserum . . .	62.6 „	$0.550 \cdot 10^{-8}$ „	$4.6 \cdot 10^{-4}$ „

12. EIN WEITERES PHOSPHATÜBERTRAGENDES GÄRUNGSFERMENT

Das Prinzip, durch das in den optischen Testen die einzelnen Reaktionen der Gärungskette getrennt werden, ist die Anwendung der Cofermente in stöchiometrischen Mengen: Die Cofermente sind also im Test nicht Katalysator sondern Substrat.

Fasst man jedoch mehrere Fermente und Substrate geeignet zusammen, dann laufen die Reaktionen auch in vitro wie in der lebenden Zelle mit katalytischen Cofermentmengen. Ich schildere in diesem und im folgenden Abschnitt derartige Synthesen: dreifach zusammengesetzte optische Teste.

Fraktioniert man NEGELEINS A-Protein⁹ mit Ammonsulfat der Sättigung 0.5, dann bleibt das in dieser Arbeit beschriebene phosphatübertragende Ferment (I) in Lösung. Der Niederschlag enthält jedoch ebenfalls ein katalytisch wirksames Prinzip, und zwar, wie ich in einem dreifach zusammengesetzten optischen Test mit katalytischen Mengen Adenosindiphosphat zeigen kann, ebenfalls ein spezifisches phosphatübertragendes Ferment. Dies sei vorübergehend mit (II) bezeichnet. Es wirkt in der Reaktion²¹:



Der Versuch ist in Abbildung 8 dargestellt. Er zeigt den Aufbau des Systems übersichtlich, weil die Indikatorreaktion (die phosphatbindende und oxydierende Gärungsreaktion) an erster Stelle steht. Diese liefert das Substrat für die erste phosphatübertragende Reaktion, die jedoch nur kurz laufen kann, da die Versuchslösung — im Prinzip die des in dieser Arbeit ausgearbeiteten Testes (Tab. 1) — nur *katalytische* Mengen Adenosindiphosphat enthält. Der eigentliche Umsatz erfolgt erst nach Zusatz des zweiten phosphatübertragenden Ferments, das mit Hilfe von Robisonester, der sich gleichfalls in der Versuchslösung befindet, zu Adenosindiphosphat regeneriert.

Für die aufgestellte Reaktionsgleichung ist der Versuch insofern beweisend, dass sich Robisonester nicht durch Hexose ersetzen lässt, und dass die erste phosphatübertragende Reaktion Adenosintriphosphat erzeugt und nicht mit anderen Adenin-nucleotiden als Adenosindiphosphat läuft. Das Substrat der Gegenseite ist damit Hexosediphosphat; sehr wahrscheinlich, aber nicht bewiesen, da ich die Rückreaktion nicht untersucht habe.

Literatur S. 313.

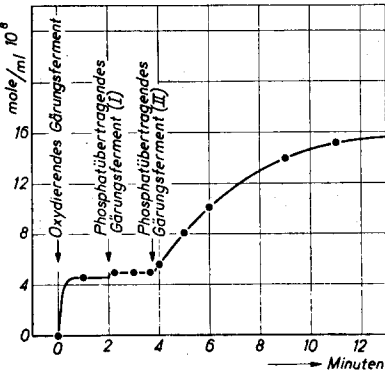


Abb. 8. Versuchsansatz $\left[\frac{\text{Mole}}{\text{ml}} \right] 10^8$:

Diphosphopyridinnucleotid 16, Adenosindiphosphat 2, d-3 Phosphoglyzerinaldehyd 33, Robisonester 333, Mangan 15, Phosphat 840

13. MYOSIN

Im Muskel wird das bei der Gärung gebundene Phosphat wieder durch Myosin, die kontraktile Substanz, freigemacht. Wie ENGELHARDT und LJUBIMOWA gefunden haben¹⁰, katalysiert Myosin, das kürzlich von A. SZENT-GYÖRGYI kristallisiert wurde¹⁹, die Reaktion

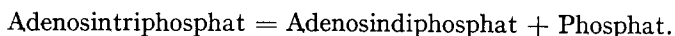
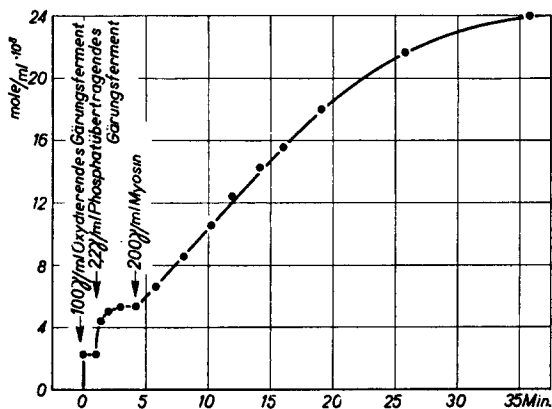


Abb. 9 zeigt, wie man das Zusammenwirken von Phosphatbindung, Phosphatübertragung und Phosphatabspaltung, den *Phosphatkreislauf der Muskelkontraktion*, optisch verfolgen kann.



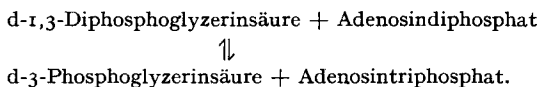
Abt. 9. Versuchsansatz $\left[\frac{\text{Mole}}{\text{ml}} \right] 10^3$: Diphosphopyridinnucleotid 37; d-3-Phosphoglycerinaldehyd 37; KNa-Phosphat 1000; Adenosindiphosphat 4.5; Mangan 4; Calcium 220; Glykokoll 8 mg/ml; Natriumbicarbonat 14 mg/ml; gesättigt mit 100 % Kohlendioxyd; pH 6.93. Versuchstemperatur 25°

Die Versuchslösung — im Prinzip die des Testes für das phosphatübertragende Ferment (Tabelle I) — enthält *katalytische* Mengen Adenosindiphosphat, daher kann der eigentliche Umsatz erst nach Zusatz des Adenosindiphosphat regenerierenden Myosins erfolgen. In der Versuchslösung befindet sich ausserdem Calcium, das Co-Ferment des Myosins, und zum Ersatz für Magnesium, das Myosin hemmt^{19, 20}, Mangan.

Der Versuch beweist die oben eingeführte Reaktionsgleichung.

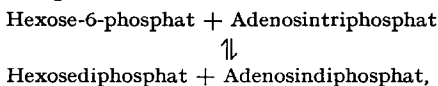
ZUSAMMENFASSUNG

Aus LEBEDEVSAFT wurde ein spezifisches Fermentprotein isoliert, das in Verbindung mit Mg^{++} die reversible Reaktion katalysiert:



Mit Hilfe des kristallisierten Ferments wurden gemessen:

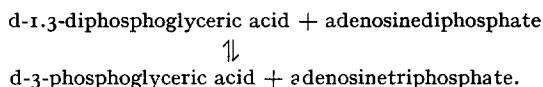
Die Konstanten der Fermentdissoziationen mit Magnesium, Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat, Diphosphoglycerinsäure, Phosphoglycerinsäure, die katalytische Wirksamkeit des Ferments in der Hin- und Rückreaktion, die Gleichgewichtskonstante der Reaktion, die Wirkungsweise eines weiteren spezifischen phosphatübertragenden Fermentproteins im dreifach zusammengesetzten optischen Test, das die Reaktion katalysiert:



die Wirkungsweise von Myosin.

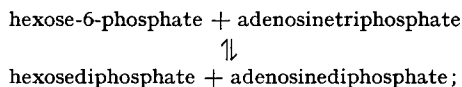
SUMMARY

A specific protein has been isolated from LEBEDEV-juice that, in combination with Mg^{++} , catalyses the reversible reaction:



Using the crystallised ferment the following were measured:

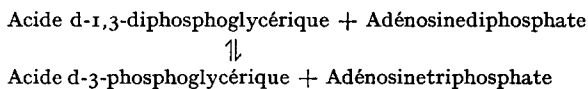
The ferment dissociation constants with respect to magnesium, adenosinetriphosphate, diphosphoglyceric acid, phosphoglyceric acid;
the catalytic activity of the ferment in the forward and back reaction;
the equilibrium constant of the reaction;
the reactivity in the triple optical test of a further specific phosphate-transferring enzyme that catalyses the reaction:



the reactivity of myosin.

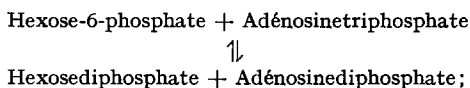
RÉSUMÉ

Isolement à partir du jus de macération de levure préparé d'après LEBEDEV, d'un enzyme spécifique, qui en présence de l'ion Mg catalyse la réaction réversible:



L'emploi de l'enzyme cristallisé a permis de mesurer:

La constante de dissociation du composé donné par l'enzyme avec le magnésium, l'adénosine-diphosphate, l'adénosinetriphosphate, l'acide diphosphoglycérique et l'acide phosphoglycérique;
l'action catalytique de l'enzyme dans chacun des sens de la réaction;
la constante d'équilibre de la réaction;
le mode d'action d'un nouvel enzyme spécifique transporteur de phosphate, catalysant la réaction:



le mode d'action de la myosine.

LITERATUR

- ¹ A. HARDEN UND W. J. YOUNG, *Proc. Chem. Soc. London* (A), 21 (1905) 189.
- ² K. LOHMANN, *Naturwissenschaften*, 17 (1929) 624; C. H. FISKE UND Y. SUBBAROW, *Science*, 15 (1929) 381.
- ³ J. K. PARNAS, *Ergeb. Enzymforsch.*, 6 (1937) 64.
- ⁴ O. MEYERHOF, P. OHLMEYER UND W. MÖHLE, *Biochem. Z.*, 297 (1938) 113.
- ⁵ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *ebenda*, 303 (1939) 46.
- ⁶ M. KUNITZ UND H. S. SIMMS, *J. Gen. Physiol.*, 11 (1928) 641.
- ⁷ E. NEGELEIN UND H. BRÖMEL, *Biochem. Z.*, 303 (1939) 132.
- ⁸ E. NEGELEIN, unveröffentlicht.
- ⁹ F. KUBOWITZ UND P. OTT, *Biochem. Z.*, 317 (1944) 329.
- ⁹ E. NEGELEIN, *ebenda*, 287 (1936) 329.
- ¹⁰ U. A. ENGELHARDT UND M. N. LJUBIMOWA, *Nature*, 144 (1939) 668.
- ¹¹ TH. BÜCHER UND J. KASPERS, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 21, bes. Tab. III.
- ¹² H. KLEINMANN, *Biochem. Z.*, 234 (1931) 25.

- ¹³ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 254 (1932) 455.
¹⁴ M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1939) 15.
¹⁵ E. R. HOLIDAY, *Biochem. J.*, 30 (1936) 1795.
¹⁶ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 310 (1942) 384.
¹⁷ K. LOHMANN, *Naturwissenschaften*, 19 (1931) 18c.
¹⁸ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 314 (1943) 401.
¹⁹ A. SZENT GYÖRGYI, *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged*, 3 (1943) 76.
²⁰ GREVILLE UND LEHMANN, *Nature*, 152 (1943) 81.
²¹ Vgl. J. K. PARNAS, *Handbuch der Enzymologie*, Leipzig 1940, Seite 926, letzter Absatz, sowie Tab. 4 Gleichung 4a.

Eingegangen den 13. November 1946.