

Giftwirkungen auf die Kartoffel-Apyrase

Es wird im allgemeinen angenommen, dass Enzyme, die ATP zum Substrat haben, SH-Enzyme sind. Wie aus der vorliegenden Arbeit zu ersehen ist, bildet die Kartoffel-Apyrase eine Ausnahme von dieser Regel.

Fig. 1 zeigt, dass die Kartoffel-Apyrase¹ von Salyrgan überhaupt nicht beeinflusst wird, obwohl die angewandte Eiweissmenge viel kleiner (5 μ g), dagegen die angewandte maximale Salyrgan-Konzentration viel grösser ist (0.005 *M*), als es sonst in Hemmungsversuchen üblich ist. Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, haben auch alle anderen anerkannten SH-Reagenzien (weder Oxydationsmittel, noch organische Arsen- und Quecksilberverbindungen oder Alkylierungsmittel) unter Bedingungen, unter denen sie spezifisch mit Protein-SH-Gruppen reagieren³, keinen Einfluss auf die Aktivität der Kartoffel-Apyrase. Es lässt sich ausserdem zeigen, dass nach einer Denaturierung des gereinigten Enzyms mit Guanidin-Hydrochlorid die Nitroprussid-Reaktion fehlt. Werden diese Befunde zusammengefasst, so ergibt sich die Schlussfolgerung, dass an der Spaltung des ATP durch Kartoffel-Apyrase keine Protein-SH-Gruppen beteiligt sind.

TABELLE I

EINFLUSS VON VERSCHIEDENEN SH-REAGENZIEN AUF DIE
AKTIVITÄT DER KARTOFFEL-APYRASE

Reaktionsansätze: 5 μ g Enzym, 0.02 *M* Histidinpuffer pH 7.0 und die neutralisierten SH-Reagenzien. Inkubationszeit bei Zimmertemperatur: 20 Min, sonst wie bei Fig. 1.

Reagenz	Konzentration (<i>M</i>)	ATP-Spaltung in μ Molen P/Min	
		mit Ca	ohne Ca
<i>o</i> -Jodosobenzoat	0.005	1.01	0.40
Oxarsan	0.005	1.18	0.45
<i>p</i> -Chlormercuribenzoat	0.005	1.12	0.44
Methyl-Mercurinitrat	0.005	1.03	0.47
N-Äthylmaleimid	0.005	1.27	0.44
Jodacetat	0.10	0.99	0.39
Jodacetamid	0.10	0.95	0.38
Kontrolle		1.20	0.45

Die Aktivität der Kartoffel-Apyrase bleibt auch in Gegenwart von Polyäthensulfosaurem Natrium* — bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml — erhalten, obwohl saure und alkalische Phosphatasen durch Heparin gehemmt werden⁴. Ebenso ist Protamin, eine basische Substanz, auch in hoher Konzentration (0.5 mg/ml) wirkungslos, obgleich wenige μ g von Protamin die Muskel-Phosphorylase A vergiften⁵.

Formaldehyd hemmt bis zu einer Konzentration von 3.5 % Formaldehyd die Aktivität der Kartoffel-Apyrase gleichfalls nicht, obwohl durch diese Formaldehyd-Konzentration die $-NH_2$ Gruppen der Proteine blockiert werden³. Wird aber die Formaldehyd-Konzentration weiter erhöht, so vermindert sich auch die ATP-Spaltung (Fig. 2).

Kartoffel-Apyrase ist nicht empfindlich gegen 1.0 *M* KI und wird in 3.0 *M* KI etwa um 50 % gehemmt. 20 Min Behandlung der dünnen Enzymlösung mit hohen

* Das Präparat verdanken wir den Farbwerken Hoechst, Frankfurt/M.

Urea-Konzentrationen bei Zimmertemperatur führt zu einer zunehmenden Inaktivierung des Enzyms. Diese Inaktivierung ist nach Entfernung von Urea teilweise reversibel (Fig. 3).

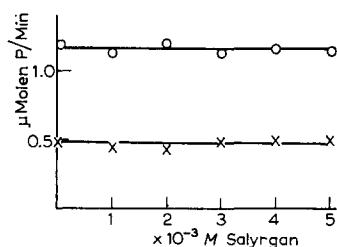


Fig. 1.

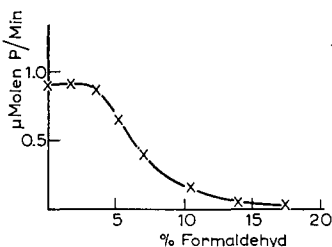


Fig. 2.

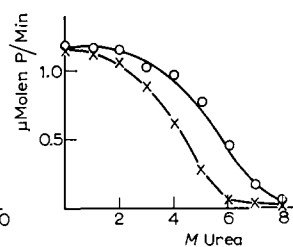


Fig. 3.

Fig. 1. Einfluss von Salyrgan auf die Aktivität der Kartoffel-Apyrase. Je 5 μg Enzym wurden mit 1–5 μMol Salyrgan, in 0.02 M Histidinpuffer, pH 7.0, 10 Min bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurde die Spaltung im Wasserbad von 25° durch Zugabe von 10 μMol ATP in Gang gebracht und die Reaktion nach 3 Min mit 10% Trichloressigsäure unterbrochen. $\bigcirc\text{---}\bigcirc\text{---}\bigcirc$: mit 10 μMol CaCl_2 (2); $\times\text{---}\times\text{---}\times$: ohne CaCl_2 .

Fig. 2. Abhängigkeit der Apyrasewirkung von der Formaldehyd-Konzentration. Abszisse: Formaldehyd-Konzentration während der Spaltung. Versuchslösungen: 5 μg Enzym, Formaldehyd, 10 μMol CaCl_2 , 0.02 M Borat-Puffer pH 8.0. Inkubationszeit 10 Min, Spaltungszeit 5 Min, sonst wie Fig. 1.

Fig. 3. Abhängigkeit der Apyrasewirkung von der Urea-Konzentration. Abszisse: Urea-Konzentration während der Inkubation. Versuchslösungen: während der Inkubation—20 Min, 25°—: 55 μg Enzym, 1–8 M Urea, 0.02 M Histidinpuffer, pH 7.0; während der Spaltung: $\times\text{---}\times\text{---}\times$: Enzym 10 mal verdünnt, Urea und Puffer wie in der Inkubation, 10 μMol ATP und CaCl_2 ; $\bigcirc\text{---}\bigcirc\text{---}\bigcirc$: Enzym und Urea 10 mal verdünnt, Puffer wie in der Inkubation, 10 μMol ATP und CaCl_2 .

Diese Beobachtungen zeigen nicht nur, dass die Kartoffel-Apyrase kein SH-Ferment ist, sondern dass auch eine Reihe anderer Gruppen nicht an der ATP-Spaltung beteiligt sind, die an der Aktivität anderer Phosphatasen teilnehmen. Dies gilt für alle Aminogruppen der Lysinreste sowie für alle anderen basischen Gruppen, die durch oberflächliche Lage auf dem Apyrasemolekül der Reaktion mit Polyäthensulfosäure zugänglich sind. Ebenso sind die oberflächlichen und damit dem Protamin zugänglichen Carboxylgruppen für die Aktivität entbehrlich.

*Institut für Physiologie im Max-Planck-Institut
für medizinische Forschung, Heidelberg (Deutschland)*

M. BÁRÁNY

K. BÁRÁNY

¹ M. SZÉKELY, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 1 (1951) 325.

² P. S. KRISHNAN, in COLOWICK AND KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. II, Academic Press Inc., New York, 1955, S. 591.

³ F. W. PUTNAM, in NEURATH AND BAILEY, *The Proteins*, Vol. Ib, Academic Press Inc., New York, 1953, S. 904.

⁴ L. M. BURNINA, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 306.

⁵ E. G. KREBS, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 50.

Eingegangen den 26. Januar, 1959