

of the nucleophilic agent water to the carbonyl carbon atom of either neighboring ester function in II can far exceed that in I, when the negative ends of the carbonyl dipoles are brought to their nearest approach distances (and presumably maximum interactions²) with the positive N atom.

A final noteworthy point lies in the experimental observation that acetylcholinesterase catalyzes³ the acetate hydrolysis in I, but the maximum hydrolytic activity thus obtained is only equivalent to that already characteristic of II–IV in the absence of enzymatic catalysis.

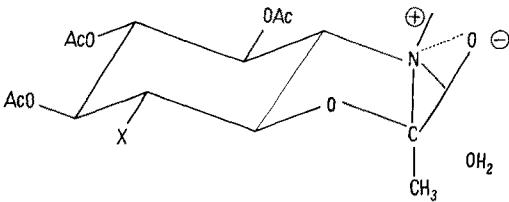
G. F. HOLLAND*, B. WITKOP* and S. L. FRIESS**

National Institute of Arthritis, and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Naval Medical Research Institute**, Bethesda (Md.), February 12, 1958.*

Zusammenfassung

Eine neue Art von Esterlabilisierung wurde in der Gruppe der Polyacetate tertiärer und (mono)quaternärer Inosamine und Streptamine entdeckt. Im Gegensatz zu den vergleichsweise beständigen Azetaten der quartären *cis*- und *trans*-Dimethylaminocyclohexanole zeigten Penta-O-acetyl-2-desoxy-2-trimethylammoniumscyllitol als auch D,L-Tetra-O-acetyl-1,3-bisdesoxy-1-dimethylamino-3-trimethylammoniumscyllitol rasche spontane Esterhydrolyse in wässrigem neutralen Medium, die grössenordnungsmässig vergleichbar war mit der unter Einwirkung von Cholinesterase beobachteten hydrolytischen Aktivität des – ohne Enzym beständigen – quartären Pentaacetats in der Myoinositol-Reihe. Offenbar spielt beim Zustandekommen solcher Labilisierungen die Totalkonformation der Molekel eine bisher nicht vermutete Rolle.

² For representative polar-type labilization of quaternary derivatives *via* some quasi-cyclic transition state (with greater planarity and stability in *scyllo* as compared with *myo*) such as that in the all



equatorial conformation of II, see the analogous postulation on hydrolysis of scopolamine methyl bromide [E. R. GARRETT, J. Amer. chem. Soc. 79, 1071 (1957); 77, 4002 (1955)] and the analogies of H. B. HENBEST *et. al.* [J. chem. Soc. 1957, 1965]].

³ Intrinsically the same shape for the activity vs. [S] profile was observed as that found previously for bifunctional cyclohexane derivatives; see ref. 1.

Phosphoribomutase- und 5-Phosphoriboisomerase-Aktivität in isolierten Zellkernen

In früheren Experimenten¹ wurde gezeigt, dass isolierte Zellkerne die Fähigkeit besitzen, anorganisches Phosphat in organische Verbindungen ohne besondere Energie-

zufuhr einzubauen. Als ein möglicher Weg wurde die Nukleosidphosphorylasereaktion² diskutiert. Diese Reaktion, bei der Ribose-1-phosphat entsteht, ist in Zellkernen nachgewiesen worden³. Wir haben nun den Stoffwechsel des Ribose-1-phosphats weiterverfolgt und konnten dabei Phosphoribomutase- und 5-Phosphoriboisomerase-Aktivität nachweisen. Phosphoribomutase katalysiert die Reaktion zwischen Ribose-1-phosphat (R1P) und Ribose-5-phosphat (R5P)⁴, 5-Phosphoriboisomerase die Reaktion zwischen R5P und Ribulose-5-phosphat (Ru5P)⁵.

Tabelle I

Phosphoribomutaseaktivität: Extrakte aus isolierten Zellkernen oder Gesamthomogenat wurden gleichermassen mit Ammoniumsulfatlösung fraktioniert. Die Aktivität des Enzyms wurde durch Messung der gebildeten, säurestabilen Phosphatester festgestellt (μ M säurestabilen Phosphat/mg Protein/20 min/37°C).

Fermentquelle	Mg ⁺⁺ -Endkonzentration	μ M säurestabilen Phosphat
Leberhomogenat	10 ⁻³	0,61
Leberzellkerne	0	0,46
	10 ⁻⁵	0,56
	10 ⁻⁴	0,68
	10 ⁻³	0,70
Nierenhomogenat	10 ⁻³	0,38
Nierenzellkerne	10 ⁻³	0,46

Methodik.—Die Zellkerne wurden aus gut entbluteten Lebern (erwachsene Ratten) oder Nieren (Schwein) durch Fraktionierung in hypertonischer Rohrzuckerlösung dargestellt⁶. Für die Messungen der Phosphoribomutase wurde das aus Zellkernen bestehende Sediment im Porzellanmörser eingefroren, mit Seesand zerrieben und mit destilliertem Wasser (auf pH 8 eingestellt) extrahiert. 15–20% des Gesamt-N waren im klaren Extrakt, der anschliessend mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung fraktioniert wurde⁴. Die Proteinfällung zwischen 60–80% Ammoniumsulfatsättigung wurde in destilliertem Wasser gelöst und nach Dialyse zum Enzymtest verwendet (8 bis 10 mg Protein/ml, gravimetrisch bestimmt).

Tabelle II

5-Phosphoriboisomerase: In den Versuchsansätzen konnten nach 20 min Inkubation bei 37°C folgende Mengen Ketozucker nachgewiesen werden (μ M Ru5P/mg N/ 20 min/37°C).

Fermentquelle	Substrat	μ M Ru5P
Leberhomogenat	R5P	13,1
Leberzellkerne	R5P	8,5–11,2
	R1P	2,2
	Ribose	0
Nierenhomogenat	R5P	11,0
Nierenzellkerne	R5P	5,1–14,4

¹ G. SIEBERT, K. LANG, S. LUCIUS und G. ROSSMÜLLER, Biochem. Z. 324, 311 (1953).

² H. M. KALCKAR, J. biol. Chem. 158, 723 (1945).

³ H. STERN, V. ALLFREY, A. E. MIRSKY und H. SAETREN, J. gen. Physiol. 35, 559 (1952). – K. LANG und K.-U. HARTMANN (unveröffentlicht).

⁴ A. J. GUARINO und H. Z. SABLE, J. biol. Chem. 215, 515 (1955).

⁵ B. L. HORECKER, P. Z. SMYRNIOTIS und I. E. SEEGMILLER, J. biol. Chem. 193, 383 (1951).

⁶ K. LANG und G. SIEBERT, Biochem. Z. 322, 360 (1952).

Die Zellkerne, die für Phosphoriboisomerasemessungen dienten, wurden zur Beseitigung des Rohrzuckers zweimal in Ringerlösung gewaschen und anschliessend in Ringerlösung suspendiert (0,8–1,1 mg N/ml, kjeldahlometrisch bestimmt). R1P wurde durch Phosphorolyse von Guanosin gewonnen⁴ und als Kaliumsalz verwendet (5 μ M/ml).

Das Reaktionsgemisch für die Mutaseteste (5 ml 0,2 M TRIS-HCl-Puffer pH 7,4, 2 ml R1P-Lösung und 2 ml 0,005 M $MgCl_2$ -Lösung) wurde 10 min auf 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe von 1 ml Prot.-inlösung wurde in bestimmten Zeitabständen je 1 ml Probe entnommen, mit gleicher Menge eiskalter, 5%iger Perchlorsäure enteiweicht und der Gehalt an anorganischem und leicht säurehydrolysierbarem Phosphat bestimmt⁷ (Hydrolyse 10 min bei 100°C in 1 N schwefelsaurer Lösung).

Die Phosphoriboisomeraseteste wurden nach BRUNS⁸ ausgeführt: Im Ansatz waren 1 Vol. 2%iger TRIS-HCl-Puffer pH 7,5, 1 Vol. 0,03 M Na-R5P-Lösung und 1 Vol. Zellkernsuspension. Während der Inkubation (mit 90 Schwingungen/min schüttelnd bei 37°C) wurden alle 5 min eine Probe (1,5 ml) entnommen, mit 8,5 ml eiskalter, 3%iger Trichloressigsäure enteiweicht und in 1 ml Überstand der Gehalt an Ketozucker mit Hilfe der Carbazolreaktion⁹ bestimmt.

Ergebnisse. Phosphoribomutase: Während der Inkubation nahm der Gehalt an säurelabilem Phosphat linear zur Zeit und zur Enzymkonzentration ab. Die spezifischen Aktivitäten der aus Leber- und Nierenzellkernen dargestellten Proteinfractionen waren einander ähnlich und lagen in derselben Grössenordnung wie eine ebenso hergestellte Proteinfraction aus Gesamthomogenat (Tab. I). Im Gegensatz zu den Befunden von GUARINO und SABLE⁴ wurde bei Zugabe von Mg-Ionen eine Steigerung der Enzymaktivität erreicht (Tab. I). Die Bildung von R5P konnte papierchromatographisch bestätigt werden.

5-Phosphoriboisomerase: Ketozuckerbildung war sowohl mit Leberzellkernen als auch mit Nierenzellkernen nachzuweisen. Die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzymquellen zeigten keine charakteristischen Unterschiede (Tab. II). Das Reaktionsprodukt des Carbazoltestes ergab das für Ribulose charakteristische Absorptionsmaximum bei 540 m μ . Ribose als Substrat gab keine messbare Ribulosebildung; R1P wurde in geringem Masse zum Ketozucker isomerisiert infolge vorangehender Phosphoribomutase-reaktion. Auf dem Papierchromatogramm wurde Ribulose-5-Phosphat gefunden.

K. LANG und K.-U. HARTMANN

Physiologisch-chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 26. Januar 1958.

Summary

The existence of phosphoribomutase and 5-phosphoriboisomerase has been demonstrated in isolated cellular nuclei from rat liver and swine kidney. Phosphoribomutase has been shown to require Mg-ions for optimal activity.

⁷ J. B. MARTIN und D. M. DOTY, Anal. Chem. Wash. 21, 965 (1951).

⁸ F. H. BRUNS, Biochem. Z. 327, 523 (1956).

⁹ Z. DISCHE und E. BORENFREUND, J. biol. Chem. 192, 583 (1951).

On the Location of Cholinesterase in Fishes

There seem to be few reports in the literature about the cholinesterase (ChE) activity in fish muscles¹. However, AUGUSTINSSON² has reported an unusually high activity of acetylcholinesterase (AChE) in the guppy, *Lebistes reticulatus* and NACHMANSOHN³ has found the same in the goldfish, *Carassius auratus*. The activities amount to 20 to 50 mg acetylcholine (ACh) hydrolyzed per 100 mg tissue/h (PROSSER⁴). Similar results have been obtained by the present author (LUNDIN⁵). It is remarkable that the activity per unit weight is as high as about 1/10th that of the electric organ in the electric eel (*Gymnotus electricus*), which is the richest source of ChE as yet known (e.g. PROSSER⁴).

The present paper comprises a preliminary study on the basis for the high ChE activity in the muscles of guppy and goldfish and on the location of the activity.

The dependence of the ChE activity on the substrate-concentration and the inhibiting power of Mipafox [bis-(monoisopropylamido)-phosphoryl fluoride] and B & W 284C51 [bis-(p-N-dimethyl-allyl-ammoniumbenzyle)-acetone dibromide] have been recorded by means of an electro-metric method (TAMMELIN⁶).

The tail muscles of a number of fishes, of which only guppy, goldfish and bream (*Abramis brama*) will be mentioned here, have been examined histochemically for ChE activity according to the method of KOELLE⁷ as modified by HOLMSTEDT⁸.

The biochemical investigations show that an esterase in the homogenized tail muscles of guppy and goldfish have the same properties as AChE (e.g. AUGUSTINSSON²). Thus the enzyme is completely inhibited by 10⁻⁵ M eserine and the substrate curves for ACh, propionylcholine and acetyl- β -methylcholine are bell shaped. Butyrylcholine is hydrolysed very slowly if at all. Thus it seems probable that no or only insignificantly small amounts of butyrylcholinesterase (BuChE) are present.

Furthermore, using the two specific inhibitors mentioned above, and after an incubation time of 30 min, it is observed that B & W 284C51, which inhibits AChE when acting on the enzyme in the fish muscle and on AChE from electric organ, gives inhibition curves that coincide fairly well between $pI_{50} \approx 7$ and $pI_{100} \approx 5$. The same is true for Mipafox, the corresponding values being about 5 and 3. BuChE from serum is otherwise inhibited by Mipafox in far smaller concentrations, pI_{100} being about 6.5. (The values on electric organ and serum were kindly given by Dr. BO HOLMSTEDT.)

The results of the histochemical investigation are shown in Figures 1 to 4. Figure 1 shows the location of the AChE

¹ K.-B. AUGUSTINSSON, Acta Physiol. Scand. 15, Suppl. 52, 65 (1948); Arch. Biochem. 23, 111 (1949). – P. LAURENT, C. R. Soc. biol. 146, 1521 (1952). – G. SIOT, C. R. Soc. biol. 149, 1422 (1955). – C. L. PROSSER, Comparative Animal Physiology (W. B. Saunders Company, 1950), p. 609. – D. NACHMANSOHN, C. W. COATES, and R. T. COX, J. gen. Physiol. 25, 75 (1941).

² K.-B. AUGUSTINSSON, Arch. Biochem. 23, 111 (1949).

³ D. NACHMANSOHN, C. W. COATES, and R. T. COX, J. gen. Physiol. 25, 75 (1941).

⁴ C. L. PROSSER, Comparative Animal Physiology (W. B. Saunders Company, 1950), p. 609.

⁵ S. J. LUNDIN, Acta physiol. Scand. 42, Suppl. 145, 102 (1957).

⁶ L.-E. TAMMELIN, Scand. J. clin. lab. Invest. 5, 267 (1953).

⁷ G. B. KOELLE, J. Pharmacol. exp. Therap. 103, 153 (1951).

⁸ B. HOLMSTEDT, Acta physiol. Scand. 40, 322, 338 (1957).

⁹ K.-B. AUGUSTINSSON, Methods of Biochemical Analysis, vol. V (Ed. D. Glick, 1957), p. 2-3.