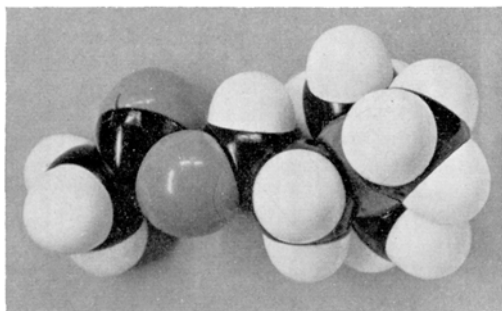
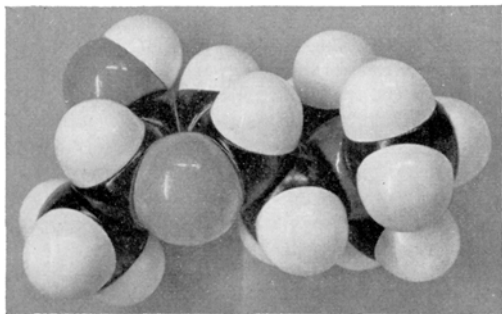


apsen erregt und später blockiert werden. Für die Wirkung ist weiterhin die quartäre Trimethylammoniumgruppe, deren wirkungsverstärkender Einfluss beim tertiären Normuscarin fehlt (Tabelle II), absolut notwendig.



Stuartmodelle des natürlichen (+)-Muscarins (oben) und des Acetylcholins (unten).

Der kationische Stickstoff kann weder beim Acetylcholin noch beim Muscarin mit den beiden ersten pharmophoren Gruppen in eine gemeinsame Kontaktebene gebracht werden, da hier die N-Methylgruppen sterisch hindern. Dass mindestens 3 am Rezeptor haftende Gruppen notwendig sind, beweist auch die eindeutige Wirkungsspezifität der Antipoden, von denen nur eine der beiden Formen gleichzeitig mit 3 entsprechenden Rezeptorpunkten in Verbindung treten kann. Bei dem bis dahin untersuchten Muscarin ist die natürliche Form doppelt so wirksam wie das Racemat (*d,l*-Muscarin). (–)-Muscarin hat dementsprechend höchstens einige Prozent der Wirksamkeit des (+)-Muscarins³. Es ist anzunehmen, dass für die Antipoden der übrigen Stereoisomeren ähnliche Unterschiede existieren. Nur die untersuchten Muscarone scheinen in ihrer Wirkung wenig stereospezifisch zu sein.

Auch die Molekülgrösse spielt für die Wirkung eine bedeutende Rolle. Eine Vergrösserung des Ringes oder eine Verlängerung der «Acetylcholkette»⁸ vermindert die Aktivität bedeutend. Vielleicht ist auch die viel weniger selektive Wirkung des Muscarons Folge der etwas kleineren Molekülgrösse. Aus diesen Gründen muss man erneut schliessen, dass die Rezeptorgegend räumliche Form hat und nicht einfach planar gebaut ist⁶.

Muscarin besitzt damit 3 nachgewiesene pharmophore Gruppen, deren Stellung im Molekül wenigstens für 2 definiert ist. Das gleiche gilt auch für Acetylcholin, und alle Vorschläge für den Bau des cholinergischen Rezeptors werden darauf Rücksicht nehmen müssen.

⁸ P. G. WASER und C. H. EUGSTER, in Vorbereitung.

Für die Unterstützung dieser Arbeit danken wir der Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz, sowie Herrn PD. Dr. C. H. EUGSTER, Universität Zürich, und Herrn Dr. F. HÄFLIGER der J. R. Geigy AG., Basel für die Überlassung der Muscarinverbindungen.

P. G. WASER

*Pharmakologisches Institut der Universität Zürich,
25. Juni 1958.*

Summary

All synthetic isomers of (+)-muscarine, the racemic forms of epi-muscarine, allo-muscarine, and epiallo-muscarine are at least 100 times less potent on blood pressure of cats and isolated frog hearts than the natural alkaloid. Only muscarones are more potent and exhibit strong nicotinic action on the frog rectus and in blocking ganglionic and neuro-muscular transmission in the cat. They closely resemble acetylcholine in their structure and action.

The activity of the isomers depends on the position of the constituents on the tetrahydrofurane ring. Steric hindrance of the hydroxy or carbonyl group and of ether-oxygen plays an important part in the contact with the cholinergic receptor. As nor-muscarine without the quaternary nitrogen is inactive, at least 3 different points of contact have to be considered. This is stressed by the fact that muscarine is highly stereospecific in its action, whereas muscarone is not.

Sul meccanismo della eptoformazione non ossidativa nel muscolo scheletrico

In una precedente nota¹ abbiamo riferito sulla eptoformazione non ossidativa a partire da glucoso-6-fosfato (G-6-P) e da fruttosio-6-fosfato (F-6-P), in estratti di muscolo scheletrico di ratto (trattati con carbone per eliminare i nucleotidi, presenti in forte concentrazione, e tra questi l'ATP, il TPN e il DPN).

Circa il meccanismo di tale eptoformazione, si poteva ammettere – come suggerito da BONSIGNORE² – che essa fosse dovuta a reazioni transaldolasiche e transchetolasiche, tra il substrato aggiunto (G-6-P o F-6-P), e un metabolita (per esempio trioso-fosfato), presente già in tracce nell'estratto, e rigenerantesi nel corso delle reazioni stesse di interconversione glicidica. La concentrazione di questo metabolita (trioso-fosfato), nell'estratto, sarebbe stato quindi fattore limitante della modica eptoformazione verificatasi.

Per suffragare questa ipotesi, abbiamo pensato di vedere se si aveva un aumento della eptoformazione aumentando la concentrazione del trioso-fosfato. A tale scopo, abbiamo aggiunto alle nostre prove enzimatiche il fruttosio-1,6-difosfato (F-1,6-P)³, il quale, per azione aldolasica, si sarebbe scisso in trioso-fosfati. Questi, d'altra parte, nelle nostre condizioni, non potevano essere sottratti alla eptoformazione dalla via glicolitica, perchè impediti dalla mancanza di DPN (adsorbito dal carbone) e dalla presenza di acido monoiodoacetico, inibitore della trioso-fosfato-deidrase.

¹ V. MORET e S. SPERTI, *Exper.* 14, 309 (1958).

² A. BONSIGNORE, S. PONTREMOLI, G. FORNAINI e E. GRAZI, *G. Biochimica* 6, 241 (1957).

³ Nelle nostre prove, il F-1, 6-P non poteva formarsi per azione fosfochinasi a partire da F-6-P (o G-6-P), a causa della mancanza di ATP nel mezzo.

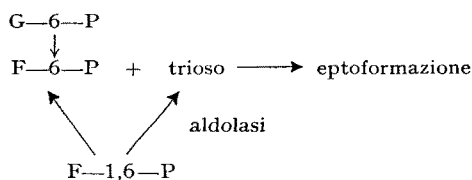
Il metodo di preparazione dell'estratto, le condizioni sperimentali seguite nelle prove enzimatiche, e i metodi di dosaggio, sono descritti nella nota precedente¹. L'unica variante era costituita dall'aggiunta del F-1,6-P alle prove enzimatiche contenenti il G-6-P (o il F-6-P). Prove enzimatiche di controllo contenevano il solo F-1,6-P. I risultati medi ottenuti da diverse esperienze sono riassunti nella Tabella.

Tabella

| Substrato | μM eptoso/mg N_2 proteico |
|---|---|
| 7,5 μM glucoso-6-P | 0,15 |
| 7,5 μM glucoso-6-P + 1,8 μM fruttosio-1,6-P | 0,56 |
| 1,8 μM fruttosio-1,6-P | 0,12 |

Come si vede, nelle prove enzimatiche contenenti il G-6-P insieme al F-1,6-P, si aveva la formazione di un numero di μM di eptoso molto superiore alla somma dei valori ottenuti nelle due prove in cui era presente singolarmente uno solo dei due substrati⁴.

Questa maggiore eptoformazione, a nostro parere, suffragherebbe l'ipotesi fatta precedentemente. I risultati ottenuti sono infatti facilmente interpretabili ammettendo che il meccanismo della eptoformazione sia identico in tutte e tre le prove. Esso potrebbe essere molto succintamente così schematizzato:



Secondo lo schema, per la eptoformazione sarebbero necessari sia l'esoso-6-fosfato quanto il trioso.

Nelle nostre condizioni sperimentali, nelle prove in cui era presente il solo G-6-P, la velocità di eptoformazione sarebbe stata limitata dalle tracce di trioso-fosfato presenti nell'estratto; nelle prove in cui era presente il solo F-1,6-P, il processo sarebbe stato limitato dalla quantità di F-6-P derivato, durante l'incubazione, per idrolisi del F-1,6-P a livello del legame fosforico in posizione 1⁵.— Nelle prove infine in cui erano presenti insieme ambedue i substrati, G-6-P e F-1,6-P, la velocità di eptoformazione

sarebbe stata evidentemente molto maggiore, in quanto sarebbe aumentato di concentrazione il substrato che faceva da fattore limitante nel caso della eptoformazione a partire da G-6-P o da F-1,6-P separatamente.

S. SPERTI e V. MORET

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova, 12 Luglio 1958.

Summary

F-1,6-P has been shown to increase the rate of 'non-oxydative heptofomation' from glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate in enzymatic preparations of rat skeletal muscle. The mechanism of this increase – probably due to triose-phosphate, formed by aldolase action on F-1,6-P – is discussed.

Sulla biochimica della fermentazione citrica da parte dell'*Aspergillus niger*

II^o. Attività aspartico-glutamico transaminasica

In un lavoro precedente¹ abbiamo osservato che quando un ceppo selezionato di *Asp. niger* veniva coltivato (coltura superficiale) per circa 30 ore in un terreno carente di azoto (BERNHAUER) in cui si aveva accumulo di acido citrico, il rapporto tra la sua attività succino-deidrasica e quella «citrico-deidrasica» era molto maggiore rispetto a quello che si aveva allorché la stessa muffa veniva coltivata in un terreno completo (RAULIN) in cui l'acido citrico non si accumulava.

Questa osservazione suffragava l'ipotesi che nel nostro ceppo di *Asp. niger* potesse esser operante il ciclo tricarbossilico di Krebs e che l'accumulo di acido citrico, che si verificava allorché tale ceppo veniva coltivato in terreno di BERNHAUER, fosse dovuto ad una deficiente attività «citricodeidrasica».

Questo meccanismo non poteva però, da solo, spiegare il fatto che l'accumulo di acido citrico, durante la coltura del ceppo nello stesso terreno di BERNHAUER, aumentasse via via nel tempo in modo ben superiore a quello imputabile all'accrescimento della massa miceliare. D'altra parte abbiamo osservato che, coll'aumentare del tempo di coltura in BERNHAUER, diminuiva nel micelio dell'*Asp. niger* l'attività succino-deidrogenasica. Questo, a nostro parere, indicava che via via nel tempo diminuiva la velocità di rifornimento dell'acido ossalacetico, sia attraverso il ciclo tricarbossilico, sia anche attraverso il ciclo bicarbossilico eventualmente presente, perché la deidrogenazione dell'acido succinico è una delle tappe obbligatorie, in ambedue i cicli, per la formazione dell'acido ossalacetico.

Essendo d'altra parte quest'ultimo il necessario precursore per la biosintesi dell'acido citrico (com'è stato dimostrato da vari autori²), bisognava pensare che nel nostro ceppo sussistesse un altro meccanismo enzimatico, fornte acido ossalacetico, la cui attività aumentasse durante il tempo di coltura (30–48 h) in cui si verificava l'accumulo di acido citrico.

Nella ricerca oggetto di questa nota, abbiamo rivolto la nostra attenzione all'attività aspartico-glutamico transaminasica.

¹ V. MORET e M. LORINI, Rend. Acc. Naz. Lincei 23, 77 (1957).

² K. F. LEWIS e S. WEINHOUSE, J. Amer. chem. Soc. 73, 2500 (1951). – W. W. CLELAND e M. J. JOHNSON, J. Biol. Chem. 208, 679 (1954). – E. B. CHAIN, Proc. 3^o Cong. Int. Biochem. Bruxelles, 523 (1955).

⁴ Lo stesso aumento, per quanto minore, si verificava anche nelle prove in cui, accanto al F-1,6-P, il G-6-P era sostituito dal F-6-P. Infatti, in presenza di 7,5 μM di F-6-P + 1,8 μM di F-1,6-P, si formavano 0,42 μM di eptoso/mg di N_2 proteico; in presenza invece delle sole 7,5 μM di F-6-P, se ne formavano 0,19 μM .

⁵ L'idrolisi del F-1,6-P è stata constatata dosando i fosfati liberi nel mezzo, prima e dopo l'incubazione, con il metodo di BERENBLUM e CHAIN⁶. Tale idrolisi si svolgeva soltanto a livello del legame fosforico in posizione 1. Infatti, come avevamo precedentemente constatato⁴, durante l'incubazione non si aveva alcuna idrolisi del legame fosforico in posizione 6 del G-6-P e del F-6-P.

L'idrolisi del legame fosforico in posizione 1 del F-1,6-P, come abbiamo potuto constatare in prove enzimatiche a parte, veniva molto aumentata dall'aggiunta di Mg^{++} , il quale, come è noto, attiva la F-1,6-P-asi del muscolo scheletrico⁷.

Tracce di F-6-P erano d'altra parte già inizialmente presenti nel preparato commerciale di F-1,6-P da noi usato (NBCo), come è stato constatato mediante l'analisi elettroforetica su carta⁸.

⁶ I. BERENBLUM e E. CHAIN, Biochem. J. 32, 295 (1938).

⁷ K. LOHMANN, Biochem. Z. 262, 137 (1933).

⁸ H. E. WADE e D. M. MORGAN, Biochem. J. 60, 264 (1955).