

entbindung, die Umsetzung mit Cyanidlösung setzt unter Bildung einer orangefarbenen Lösung von $K_3[Cr(CN)_6]$ etwa 80% des theoret. geforderten Acetylens in Freiheit (Gl. 3).

Analyse: Sämtliche Einwaagen (100–200 mg) wurden in stickstoffgefüllten Wägeröhrchen in der früher beschriebenen Weise vorgenommen¹⁾.

Zur Bestimmung von Chrom wurde der mit Wasser zersetzte Komplex mit alkalischer Wasserstoffperoxyd-Lösung versetzt und fast zur Trockene eingedampft. Nach Aufnehmen mit Wasser und Ansäuern wurde das gebildete Chromat(VI) in bekannter Weise jodometrisch titriert.

Die Bestimmung des Kaliums als Perchlorat läßt sich ohne vorherige Abtrennung des Chroms durchführen. Die wäßrige Lösung des zersetzten Komplexes wurde mit einigen cem 60-proz. Überchlorsäure versetzt und zur breiigen Konsistenz eingengt. Nach dem Erkalten wurde in üblicher Weise mit Alkohol aufgenommen, filtriert, gewaschen und die krist. Fällung im Filtertiegel bei 230° etwa 4 Stdn. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das infolge des Ammoniakgehaltes der Substanz mitgefällte NH_4ClO_4 wird bei dieser Temperatur quantitativ zersetzt und verflüchtigt⁵⁾, während Kaliumperchlorat bis 450° stabil ist.

Zur Bestimmung des Ammoniakgehaltes wurde die Substanz in einem Kjeldahl-Kolben unter trockenem Stickstoff mit verd. Salzsäure zersetzt und Ammoniak nach Kjeldahl wie üblich bestimmt.

Nachdem die gasvolumetrische Acetylenbestimmung in der Verbindung sich als undurchführbar erwiesen hatte, wurde eine Mikro-CH-Bestimmung durch Verbrennung bei 1000° und Beimischung von Vanadinpentoxyd versucht⁶⁾. Die gefundenen Werte (Ber. C 45.12 H 2.07 Gef. C 37.44 H 2.40) zeigen, daß der stark hygroskopische Komplex beim Einbringen in das Verbrennungsrohr durch die kurze Berührung mit feuchter Luft unter Acetylenverlust teilweise hydrolysiert wird.

247. Eugen Bamann, Heinz Trapmann und Auguste Schuegraf: Metallkatalytische Spaltung von Phosphoproteiden¹⁾

[Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München]

(Eingegangen am 9. August 1955)

Casein, Vitellin, Phosphopepton sowie Serin- und Threonin-phosphorsäureester sind metallkatalytisch spaltbar. Von den phosphatistisch besonders wirksamen Ionen des Cers und des Lanthans zeigen sich bei der Hydrolyse der Phosphorsäureester des Serins und Threonins die ersteren den letzteren gegenüber weit überlegen; die Dephosphorylierung von Casein, Vitellin und Phosphopepton wird dagegen durch Lanthan-Ionen stärker beschleunigt.

Die Stabilität der Esterbindung der Phosphorsäureester der Oxyaminosäuren gegenüber H-Ionen, ihre Labilität gegenüber OH-Ionen und das gerade umgekehrte Verhalten des Glycerin-phosphorsäureesters bei der Einwirkung von Säuren bzw. Alkalien sind mit Hilfe der Elektronentheorie der chemischen Bindung zu erklären.

Ob die Dephosphorylierung phosphorhaltiger Eiweißstoffe, etwa des Caseins, des Phosphovitins, des Vitellins, des Vitellenins, des Ovalbumins und der Phosphopeptone in den Wirkungsbereich der üblichen tierischen und pflanzlichen Phosphatasen gehört oder

⁵⁾ D. Vorländer u. E. Kaascht, Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 1157 [1923].

⁶⁾ Die Verbrennungsanalysen wurden von Herrn Dr.-Ing. habil. K. Bürger, München, durchgeführt.

¹⁾ XV. Mitteil. der in Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1711, 1980, 2086, 2233 [1938], Chem. Ber. **81**, 442, 451, 455, 463 [1948], Biochem. Z. **325**, 413 [1954], **326**, 89, 161, 237 [1954], Chem. Ber. **88**, 199 [1955], Biochem. Z. **326**, 507 [1954/55] veröffentlichten Untersuchungsreihe. Vergl. auch: E. Bamann, Dtsch. Apotheker-Ztg. **94**, 528 [1954].

auf spezifische Enzyme zurückzuführen ist, hat in den letzten Jahren eine Reihe von Autoren zu entscheiden versucht. Wenn dabei die Existenz einer „Phosphoprotein-Phosphatase“ immer mehr gesichert erscheint²⁾, so bedarf es doch noch der experimentellen Überprüfung mancher Möglichkeiten, bevor diese Spezifitätsfrage als in vorgenanntem Sinne abgeschlossen gelten kann.

Der breiten Wirkung unserer Phosphatase-Modelle entspricht es, daß wir neben Phosphoproteiden, wie Casein³⁾ und Vitellin, auch Phosphopeptone und weiter unter ihren kleinsten phosphorhaltigen Bausteinen den Serin- und Threonin-phosphorsäureester metallkatalytisch spaltbar finden. Von den phosphatatisch besonders wirksamen Ionen des Cers und des Lanthans zeigen sich die ersteren bei der Dephosphorylierung von Serin- und Threonin-phosphat den letzteren weit überlegen, wobei die Spaltung der Serin-phosphorsäure bei 37° unter unseren Versuchsbedingungen durch Cer 6.5mal, durch Lanthan 1.8mal rascher erfolgt als die der Methylserin-phosphorsäure. Die Casein-, Vitellin- und Phosphopepton-Hydrolyse wird demgegenüber stärker durch Lanthan beschleunigt. Diese Spezifität erinnert an die Beobachtungen bei den hochpolymeren Nucleinsäuren: Lanthan dephosphoryliert nämlich Ribonucleinsäure und Desoxyribonucleinsäure ebenfalls schneller als das gegenüber Mononucleotiden bedeutend wirksamere Cer⁴⁾.

Bei einer verhältnismäßig guten Resistenz des Serin- und Threonin-phosphorsäureesters gegenüber Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen ($n/1$ Säure bzw. Lauge, 70°) überwiegt doch diejenige gegenüber den Wasserstoff-Ionen. Durch dieses Verhalten unterscheiden sich diese Ester der Oxyaminosäuren von anderen Phosphorsäureestern, z. B. von der Glycerin-phosphorsäure, deren Esterbindung starken Laugen gegenüber selbst bei höheren Temperaturen stabil bleibt, während Wasserstoff-Ionen Hydrolyse bewirken. Wie wir bei diesem Ester gezeigt haben⁵⁾, können die Verseifbarkeit durch H-Ionen und der merkwürdige Stabilitätsunterschied der Esterbindung im Falle des Ions einerseits und gewisser Salze (beispielsweise des glycerinphosphorsäuren Lanthans) andererseits gegenüber OH-Ionen mit Hilfe der Elektronentheorie der chemischen Bindung erklärt werden. Wir forderten leichte alkalische Verseifbarkeit nicht nur bei der erwähnten „Salzbildung“, die sich bei unserer Metall-Ionen-Katalyse vollzieht, sondern auch bei anderen Abwandlungen des Ester-Ions, welche den Induktionseffekt der Säuregruppe verringern oder aufheben. Als Beispiele konnten damals Amidophosphorsäureester oder Ester vom Typus $P(OR)_3$ angeführt werden. Nunmehr kommen auch Serin- und Threonin-phosphorsäureester hinzu, in denen die Anwesenheit einer NH_2 -Gruppe im Alkoholmolekül für die so unterschiedliche Esterstabilität gegen-

²⁾ Siehe H. Mattenheimer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **292**, 276 [1953]; H. Mattenheimer, *Materia Medica Nordmark* V/5, 144 [1953]; hier finden sich auch Übersichten über die früheren Arbeiten anderer Autoren auf diesem Gebiete.

³⁾ E. Bamann u. M. Meisenheimer, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1711 [1938]; F. Egami u. M. Shimomura, Science [Japan] **18**, 472 [1948]; M. Shimomura u. F. Egami, Bull. chem. Soc. Japan **26**, 263 [1953].

⁴⁾ E. Bamann, H. Trapmann u. F. Fischler, Biochem. Z. **326**, 89 [1954].

⁵⁾ E. Bamann u. E. Nowotny, Chem. Ber. **81**, 455 [1948]; E. Bamann u. E. Ullmann, Chemiker-Ztg. **76**, 6, 44 [1952].

über H- und OH-Ionen verantwortlich zu machen ist. Für die 10-proz. Spaltung dieser Ester bei 70° ergeben sich folgende Verhältnisse: Durch 5 *n* H₂SO₄ wird Serin-phosphorsäure 3.54mal schneller gespalten als Threonin-phosphorsäure, durch 5 *n* NaOH Serin-phosphorsäure 7.43mal rascher als Threonin-phosphorsäure. Vergleicht man die Hydrolysegeschwindigkeiten der beiden Ester im sauren (5 *n*) und alkalischen (5 *n*) Milieu miteinander, so ist sie im alkalischen Medium bei der Serin-phosphorsäure 3.71mal, bei der Threonin-phosphorsäure nur 1.77mal größer. Die Ursache des kleineren Unterschiedes in den Verseifungsgeschwindigkeiten beim Threoninester gegenüber dem Serinester liegt im Ersatz eines H-Atoms durch die Elektronen stärker abstoßende CH₃-Gruppe. Demgegenüber besteht beim Casein und Phosphopepton – wohl als Folge der Häufung elektronenanziehender Gruppen – eine starke Verschiebung zugunsten der alkalischen Verseifung. In *n*/₁ HCl bzw. *n*/₁ NaOH werden bei 70° 10 % Spaltung eines Phosphopepton-Präparates in 50 Stdn. bzw. 1.4 Min. erreicht; das bedeutet, daß die Dephosphorylierung im alkalischen Medium 2143mal rascher vor sich geht als im sauren.

Hrn. Prof. Dr. Th. Wagner-Jauregg, Army Chemical Center, Maryland U.S.A., danken wir für die freundliche Überlassung von Serin- und Threonin-phosphorsäure auf das herzlichste.

Beschreibung der Versuche

1. Versuchsergebnisse

Tafel I gibt das Verhalten von Serin- und Threonin-phosphorsäure gegenüber Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen wieder.

Tafel I. Verhalten von Serin- und Threonin-phosphorsäure gegenüber Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen bei 70°
Der Versuchsansatz enthielt die Ester in 0.001 *m* Lösung
Die Zahlen geben die Spaltung der Ester in % an

Reakt.-zeit (Stdn.)	<i>n</i> / ₁ HCl		<i>n</i> / ₁ NaOH		5 <i>n</i> H ₂ SO ₄		5 <i>n</i> NaOH	
	Serin-phosphorsäure	Threonin-phosphorsäure	Serin-phosphorsäure	Threonin-phosphorsäure	Serin-phosphorsäure	Threonin-phosphorsäure	Serin-phosphorsäure	Threonin-phosphorsäure
5	—	—	4.4	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	5.2	1.8	23.7	2.2
24	8.5	1.6	12.9	2.5	18.7	4.9	63.7	9.3
48	—	—	—	—	—	10.5	—	18.6
72	15.3	3.2	—	—	—	—	—	—

Darnach werden bei 70° 10-proz. Spaltung erreicht:

	durch 5 <i>n</i> H ₂ SO ₄	durch 5 <i>n</i> NaOH
bei Serin-phosphorsäure in	13 Stdn.	in 3.5 Stdn.
bei Threonin-phosphorsäure in	46 Stdn.	in 26 Stdn.

Diese Gegenüberstellung ergänzt Beobachtungen von F. Lipmann⁶⁾, M. Damodaran und B. V. Ramachandran⁷⁾ sowie C. Rimington⁸⁾.

⁶⁾ Biochem. Z. **262**, 3, 9 [1933]. ⁷⁾ Biochem. J. **35**, 122 [1941].

⁸⁾ Biochem. J. **35**, 321 [1941].

Den katalytischen Einfluß von Cer- und Lanthan-Ionen auf die Spaltung von Serin- und Threonin-phosphat in schwach alkalischem Milieu zeigen die Versuche der Tafel 2 auf.

Tafel 2. Spaltung von Serin- und Threonin-phosphat bei 37° und p_H 8.6 durch Cer und Lanthan

Der Versuchsansatz von 20 ccm enthielt 0.00002 Mol Ester, 0.0001 Mol Ce- bzw. La-Salz, 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer; Zugabefolge B. Die Zahlen geben die Spaltung der Ester in % an

Reakt.- Zeit (Stdn.)	Serin-phosphat			Threonin-phosphat		
	ohne Metall- Katalysator	mit Ce (nach Abzug der Puffer-Spaltung)	mit La	ohne Metall- Katalysator	mit Ce	mit La
1	0	17.7	—	0	4.0	—
2	0	25.8	—	0	5.6	—
3	0	33.9	—	0	8.7	—
6	0	54.4	6.0	0	17.1	2.0
24	0	79.0	16.0	0	60.2	10.1
48	1.3	85.6	23.5	0	72.1	19.0
72	2.0	—	29.0	0	83.0	24.2

10% Spaltung werden danach bei 37° und p_H 8.6 erreicht:

	Serin-phosphat	Threonin-phosphat
mit Cer in	$\frac{1}{2}$ Stde.	in $\frac{3}{4}$ Stdn.
mit Lanthan in	13 Stdn.	in 24 Stdn.

Das Verhalten von Casein und Phosphopepton gegenüber Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen bei 70° lassen die Versuche in Tafel 3 erkennen.

Tafel 3. Dephosphorylierung von Casein und Phosphopepton durch n_1 Säure und Lauge bei 70°

Der Versuchsansatz enthielt die Substrate in 0.001 m Lösung, ber. auf g-Atom P. Die Zahlen geben die Spaltung der Ester in % an

Reakt.- Zeit	Casein ⁹⁾		Phosphopepton	
	n_1 HCl	n_1 NaOH	n_1 HCl	n_1 NaOH
5 Min.	—	15.3	—	34.1
10 „	—	—	0	55.1
15 „	—	33.8	—	—
20 „	—	—	—	76.5
30 „	—	66.0	1.6	82.5
24 Stdn.	0	—	6.5	—
48 „	1.0	—	9.3	—
96 „	18.2	—	—	—

Aus Versuchen früherer Autoren^{7,8,10,11)} — durchgeführt unter anderen Bedingungen — ergibt sich für Casein und Phosphopepton-Präparate gleichfalls eine wesentlich leichtere Dephosphorylierbarkeit im alkalischen Medium.

⁹⁾ Bei der Einwirkung von n_1 HCl auf Casein (Vers. der Tafel 3) erfolgt zunächst Koagulation, die über 48 Stdn. bestehen bleibt; dann tritt Auflösung des Niederschlages ein. Erst in diesem Stadium ist merklich Dephosphorylierung zu beobachten.

¹⁰⁾ T. Sorimati, J. Biochemistry [Tokyo] **29**, 289 [1939].

¹¹⁾ J. Schormüller u. H. Huth, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **99**, 280 [1954].

Die phosphatatische Wirkung von Cer und Lanthan gegenüber Casein, Vitellin und Phosphopepton bei p_H 8.6 und 37 bzw. 70° zeigen die Versuche der Tafel 4.

Tafel 4. Dephosphorylierung von Casein, Vitellin und Phosphopepton durch Cer und Lanthan bei p_H 8.6 und 37 bzw. 70°

Der Versuchsansatz von 20 ccm enthielt 0.00002 Mol Ester, ber. auf g-Atom P, 0.0001 Mol Ce- bzw. La-Salz, 4 ccm 2.5 n Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer; Zugabefolge B. Die Zahlen geben die Spaltung der Ester in % an

Reakt.- Zeit (Stdn.)	Casein			Vitellin			Phosphopepton		
	Puffer- Spaltung ohne Kataly- sator	Cer	Lan- than	Puffer- Spaltung ohne Kataly- sator	Cer	Lan- than	Puffer- Spaltung ohne Kataly- sator	Cer	Lan- than
		Gesamtspaltung (Metall + Puffer)			Gesamtspaltung (Metall + Puffer)			Gesamtspaltung (Metall + Puffer)	
$t = 37^\circ$									
24	—	—	—	—	—	—	—	—	11.3
48	0	—	9.0	0	—	10.5	0	—	13.7
120	0	—	12.5	—	—	—	—	—	—
168	—	—	—	0.8	4.1	19.3	—	—	—
312	0.6	—	39	—	—	—	—	—	—
366	—	<2.6	—	3.4	7.3	—	—	<2	—
$t = 70^\circ$									
1	—	—	—	—	1.0	4.7	—	—	—
3	—	—	—	0	3.5	13.1	0	6.9	12.9
6	—	—	—	—	3.5	22.8	0	15.3	22.7
24	7.0	15.4	32.9	7.3	—	38.8	5.7	21.8	38.7
48	16.7	19.9	37.0	16.2	—	47.7	11.3	—	—
72	—	—	—	—	—	—	12.9	32.2	48.5
120	21.9	23.1	87.0	—	—	—	—	—	—

2. Angaben zu den Versuchsansätzen

Substrate: Casein nach Hammarsten, Merck (List. Nr. 2242), dialysierte Lösung nach H. Mattenheimer¹²⁾, an Stelle von Veronal-Puffer: Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, P-Gehalt = 0.69%. Phosphopepton aus Casein nach Angaben von H. Mattenheimer, H. Nitschmann und P. Zahler¹³⁾, P-Gehalt = 3.45%. Vitellin nach Angaben von H. O. Calvery und A. White¹⁴⁾, P-Gehalt = 1.02%. Serin-phosphorsäure¹⁴⁾: $C_3H_5O_6NP$ (185.1). Threonin-phosphorsäure¹⁴⁾: $C_4H_{10}O_6NP$ (199.1).

Metallsalze, Versuchsansatz, Bestimmung des anorg. Phosphats: S. die Angaben in der X. Mitteil.⁴⁾ dieser Untersuchungsreihe. — Während des 30 Min. langen Verweilens in $n/1$ schwefelsaurem Milieu, das die kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Phosphorsäure verlangt, wurde bei keinem Substrat eine meßbare Abspaltung von Phosphorsäure festgestellt.

¹²⁾ Helv. chim. Acta **35**, 1970 [1952].

¹³⁾ J. biol. Chemistry **94**, 635 [1932].

¹⁴⁾ R. E. Plapinger u. T. Wagner-Jauregg, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5757 [1953].