

Tandis que la déshydratation de ce menthanol au contact d'anhydride phtalique ou de bromhydrate d'aniline conduit principalement à des menthènes, l'action de l'acide sulfurique donne, en proportion prédominante, des dérivés cyclopenténiques ou cyclopentaniques.

Les spectres *Raman* des produits de déshydratation ne montrent pas la présence de dihydro-sabinène (diméthyl-isopropyl-cyclopentène) ni celle de thuyane, non plus celle des produits de l'isomérisation de ce dernier au contact d'acide sulfurique.

Je remercie M. le Prof. *G. Dupont*, *M. Dulou* et leurs collaborateurs pour le concours qu'ils m'ont apporté par la détermination des spectres *Raman* dans les Laboratoires de Chimie de l'*Ecole Normale Supérieure*, Paris.

Laboratoires de Recherches de *L. Givaudan & Cie, S.A.*
Vernier-Genève.

257. Die Wirkungsweise verschiedener Effektoren auf die Aktivität der alkalischen Nierenphosphatase (Magnesium, Mangan, Na-Carbonat-Hydrogencarbonat, Ammonium-Ionen und Aminosäuren).

2. Mitteilung über Phosphatasen¹⁾

von *H. Aebi* und *I. Abelin*.

(4. X. 48.)

Gross ist die Zahl der heute bekannten Stoffe, die in förderndem oder hemmendem Sinne eine Wirkung auf die Aktivität der Phosphatase ausüben. Die bekanntesten Aktivatoren der alkalischen Gewebsphosphatase sind vor allem das Magnesium, ferner Mangan, Kobalt, Calcium usw.; die meisten geben 2-wertige Kationen. Die bestuntersuchte Gruppe von Hemmkörpern sind die Peptide und Aminosäuren, deren Wirkung bei der Messung der Phosphatase-Aktivität im ungereinigten Extrakt eine bedeutende Rolle spielen. Es gibt auch Effektoren, die je nach ihrer Konzentration sowohl hemmend als auch aktivierend wirken können; wie z. B. Glykokoll. Wir verweisen bezüglich Aktivierung der Phosphatase durch Metallionen auf die vergleichenden Untersuchungen von *Bamann* und *Heumüller*²⁾ und diejenigen von *Cloetens*³⁾. Aus beiden Arbeiten geht

¹⁾ Über einen Teil der hier mitgeteilten Versuche wurde an der 33. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen vom 3. Juli 1948 in Bern bereits kurz referiert.

²⁾ Naturwiss. **28**, 142 (1940); **28**, 535 (1940).

³⁾ Naturwiss. **28**, 252 (1940).

hervor, dass dem Magnesium als dem klassischen Aktivator der Phosphatase keine absolute Sonderstellung zukommt, indem die Phosphatase z. B. auch durch Mangan(II)-Ionen ebenso stark aktiviert werden kann.

Andererseits hat vor allem *O. Bodansky*¹⁾ den Mechanismus der Aminosäurehemmung untersucht, ebenso die sich praktisch daraus ergebenden Fragen bei der Bestimmung der Knochen-, Darm- und Nierenphosphatase. Während in Knochenpräparaten, im Gegensatz zu solchen aus Darm und Niere, keine Hemmkörper zu finden sein sollen (*Bawkin* und *O. Bodansky*²⁾), ist deren Vorkommen in ungereinigten Präparaten von Leber und Tumorgewebe schon vorher von *Edlbacher* und *Kutscher*³⁾ beobachtet worden. Auch *H.* und *E. Albers*⁴⁾ haben diese Befunde im Falle der Niere bestätigt. Diese das Enzym begleitenden Hemmstoffe, die von *Edlbacher* und *Kutscher* (loc. cit.) als Glutathion bzw. Cystin angesprochen wurden, konnten durch *O. Bodansky* als Aminosäuren und andere Rest-N-Stoffe identifiziert werden. Dieselben bewirken alle eine Abnahme der auf die gleiche Gewichtsmenge bezogenen Phosphatase-Aktivität bei der Verwendung von konzentrierteren Organextrakten, wie z. B. aus unserer vorangehenden Arbeit zu ersehen ist⁵⁾.

Zur weiteren Aufklärung dieser Effektorenwirkungen haben wir die Phosphatase-Aktivität von ungereinigten, nicht-dialysierten Fermentlösungen und von gereinigten Präparaten bei Zusatz von Magnesium-, Mangan- und Zinksalzen, Carbonat- bzw. Hydrogencarbonat-Ionen, sowie von Aminosäuren und Ammonium-Ionen untersucht. Wir sind hierbei von der bis jetzt zumeist geübten Betrachtungsweise abgewichen und haben auf Grund der in der vorangehenden Arbeit gemachten Beobachtungen nicht nur die Wirkung des in verschiedenen Konzentrationen zugesetzten Effektors beim p_H -Optimum untersucht (gleichsam „monochromatische“ Betrachtungsweise); wir haben vielmehr für jede Aktivatoren- oder Hemmkörperwirkung den gesamten Verlauf der p_H -Aktivitätskurve verfolgt. Wie aus den folgenden Darstellungen gut zu ersehen ist, erhält man bei diesem Vorgehen unterschiedliche Resultate je nach dem p_H , bei welchem untersucht worden ist. Die hier gemachten Feststellungen erscheinen nun geeignet, die vielen bisher bekannten Aktivatoren und Inhibitoren je nach ihrer Wirkungsweise auf den Verlauf der p_H -Aktivitätskurve wie auch auf die Beeinflussung des p_H -Optimums verschiedenen Gruppen zuzuordnen.

1) J. Biol. Chem. **165**, 605 (1946); **174**, 465 (1948).

2) J. Biol. Chem. **101**, 641 (1933).

3) Z. physiol. Ch. **207**, 1 (1932).

4) Z. physiol. Ch. **232**, 165, 189 (1935).

5) Helv. **31**, 1761 (1948).

Experimenteller Teil.

1. Methodik.

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität erfolgte nach der in der letzten Arbeit¹⁾ beschriebenen Methodik (12,5 mg Frischgewebe pro Ansatz zu 10 cm³; 30 Minuten bei 37° C inkubiert; Substrat: 0,5% Na- β -Glycerophosphat. Phosphor-Bestimmung nach A. Bodansky²⁾). Die ungereinigten Enzymsuspensionen wurden alle aus Rattennieren gewonnen. Die gereinigten Phosphatasepräparate wurden nach dem Verfahren von D. Albers³⁾ aus Pferdenieren dargestellt. Hierbei konnten z. B. aus 2 kg Pferdenieren mittels dieses Verfahrens, das aus einer Autolyse in 30-proz. Alkohol mit 5% Äthylacetat und fraktionierter Alkoholfällung besteht, ca. 500 mg Phosphatase-Präparat gewonnen werden, das eine Aktivität von 6 Phosphatase-Einheiten nach A. Bodansky pro mg Substanz aufweist (entsprechend ca. 14 Phosphatase-Einheiten nach D. Albers). Bei sämtlichen Phosphatase-Bestimmungen wurden parallel dazu laufend eine p_H-Kontrolle und ein Blindversuch durchgeführt. Die Bestimmung des p_H erfolgte durchgehend bei +20° C mittels Glaselektrode (p_H-Meter der Cambridge Instrument Co.).

2. Die Wirkung von Carbonat-Hydrogencarbonat-Ionen sowie Ammonium-Ionen auf die Phosphatase-Aktivität des Rohenzym.

Beim Vergleich verschiedener Puffergemische⁴⁾, die sich voneinander insbesondere durch ungleichen Gehalt an CO₃'' bzw. HCO₃'-Ionen unterscheiden, machten wir bei der Prüfung der Phosphatase-Aktivität von Nierenhomogenat die Beobachtung, dass diese Ionen eine hemmende Wirkung ausüben, jedoch nur in der Nähe des p_H-Optimums und im Bereich des alkalischen Schenkels der p_H-Aktivitätskurve, während die Werte im Bereich des sauren Schenkels der Kurve in den verschiedenen Puffergemischen übereinstimmen. Weiter hat sich gezeigt, dass sich dasselbe Verhalten einstellt, wenn man ein und denselben Puffer, z. B. Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer von King und Delory⁵⁾ oder Veronal-Na — Carbonat/HCl-Puffer von denselben Autoren⁶⁾, bei verschiedener Ionenstärke untersucht. Wie aus Fig. 1 zu ersehen ist, resultiert bei steigender CO₃''/HCO₃'-Konzentration eine zunehmende Hemmung, die vor allem durch das Wandern des rechten alkalischen Schenkels nach links bedingt wird. Das resultierende p_H-Optimum verschiebt sich dabei nach der sauren Seite.

Andererseits haben wir früher (loc. cit.) beobachtet, dass die p_H-Aktivitätskurve der Phosphatase bei Untersuchung in dem vor allem von der deutschen Schule verwendeten NH₃/NH₄Cl-Puffer eine beträchtliche Verschiebung nach der alkalischen Seite erfährt (p_H-Optimum = 9,7–9,8 (20° C)). Beim Vergleich der p_H-Optima in den verschiedenen Puffern ist festzustellen, dass eine solche Verschiebung nach der alkalischen Seite sonst nur noch beim Glykokoll-NaOH-Puffer zu beobachten ist, in welchem freie NH₂-Gruppen vorkommen (p_H-Optimum = 9,4), während die Optima aller übrigen untersuchten Puffer in den Bereich von p_H = 9,0–9,3 zu liegen kommen. Der in Fig. 2 wiedergegebene Versuch bestätigt die Vermutung, dass dieser Effekt der Gegenwart von Ammonium-Ionen zuzuschreiben ist. Versuche mit NH₃/NH₄Cl-Puffer verschiedener Ionenstärke und solche mit NH₄Cl-Zusätzen zu andern Puffergemischen ergeben ein gleichlautendes Resultat: Es erfolgt bei steigender NH₄⁺-Konzentration eine Verschiebung des linken, sauren Schenkels nach der alkalischen Seite bei relativer Konstanz des alkalischen Schenkels der p_H-Aktivitätskurve. Das dabei stetig abnehmende Optimum wandert nach der alkalischen Seite.

1) Helv. 31, 1761 (1948).

2) J. Biol. Chem. 99, 197 (1932); 101, 93 (1933); 120, 167 (1937).

3) Z. physiol. Ch. 265, 129 (1940).

4) H. Aebi, Helv. 31, 1761 (1948).

5) Biochem. J. 39, 245 (1945).

6) Biochem. J. 33, 1185 (1939); Enzymologia 8, 278 (1940).

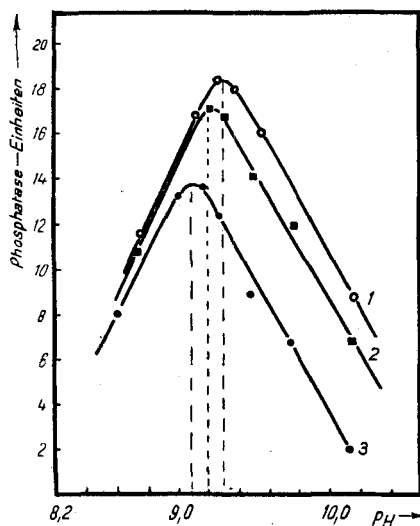


Fig. 1.

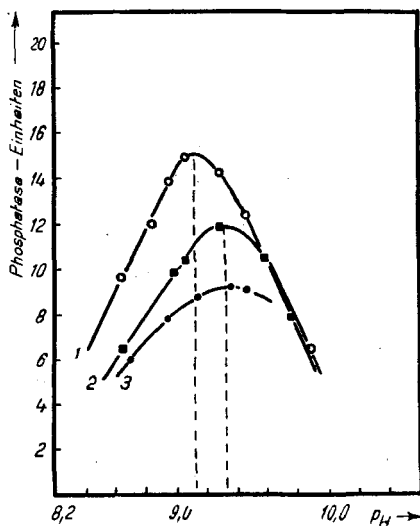


Fig. 2.

Hemmung der Phosphatase-Aktivität von Gewebehomogenat (Rattenniere) durch Carbonat-Hydrogencarbonat-Ionen (Fig. 1) und Ammonium-Ionen (Fig. 2).

- | | |
|-----------|-------------------------|
| 1 0,02-m. | } Na-Carbonat-Hydrogen- |
| 2 0,05-m. | |
| 3 0,1 -m. | |
| | carbonatpuffer |

- | |
|---|
| 1 Veronal Na-Carbonat/HCl-Puffer |
| 2 + 0,059-m. NH_4Cl ; derselbe Puffer |
| 3 + 0,125-m. NH_4Cl ; derselbe Puffer |

Dass es sich hierbei um spezifische Einflüsse dieser Ionen handelt, geht daraus hervor, dass die Phosphatase-Aktivität von Rohenzym durch Zusatz von Neutralsalzen (z. B. NaCl , KCl , LiCl , Na_2SO_4) in demselben Konzentrationsbereich keine Änderung erfährt, ausser einer geringen Verschiebung des Optimums nach der sauren Seite; beim Vergleich der optimalen Aktivität in Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffer ohne und mit Zusatz von z. B. 0,2-m. NaCl (Endkonzentration) resultiert eine Differenz von ca. 0,15 pH -Einheiten, bei gleichbleibender Aktivität.

3. Wirkung von Magnesium- und Mangano-Ionen auf die Phosphatase-Aktivität des Rohenzym.

Zur Gewinnung weiterer Anhaltspunkte der oben beobachteten Hemmungsmechanismen haben wir die Wirkungsweise des Magnesiums und Mangans auf den Verlauf der pH -Aktivitätskurve untersucht. Dabei ist die Frage von Interesse, ob diese Unterschiede auch beim mit Magnesiumsalz¹⁾ optimal aktivierten Rohenzym zu finden sind. Wie aus Fig. 3 zu ersehen ist, tritt der durch $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ hervorgerufene Hemmungseffekt auch bei optimalem Zusatz von Mg ($q \text{ Mg} = 2,3$) auf. Das Kurvenpaar mit und jenes ohne Magnesiumzusatz weist ungefähr dasselbe pH -Optimum auf; es besteht hier somit keine Abhängigkeit der prozentualen Magnesium-Aktivierung vom pH . Dass jedoch nicht alle Aktivatoren in dieser Hinsicht den gleichen Effekt haben, geht aus Fig. 4 hervor. Obwohl z. B. die Zugabe von Mn ($q \text{ Mn} = 3,0$) dasselbe Aktivierungsausmass zeigt, ist hier jedoch eine deutliche Verschiebung des pH -Optimums zu beobachten im Sinne des für Carbonat-Hydrogencarbonat beschriebenen Effektes.

¹⁾ Zugesezt als MgCl_2 ; Angabe der resultierenden Konzentration im Versuch als negativer Logarithmus der auf Mg bezogenen Molarität ($= q [\text{Mg}]$).

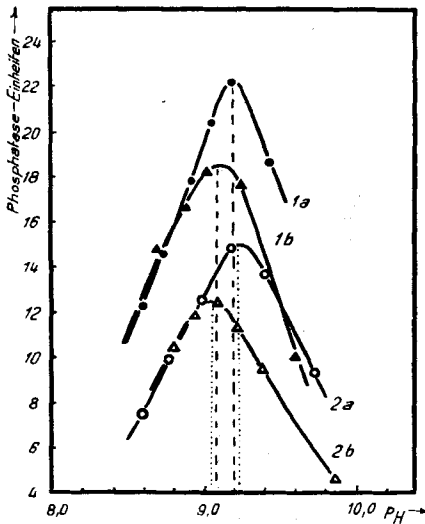


Fig. 3.

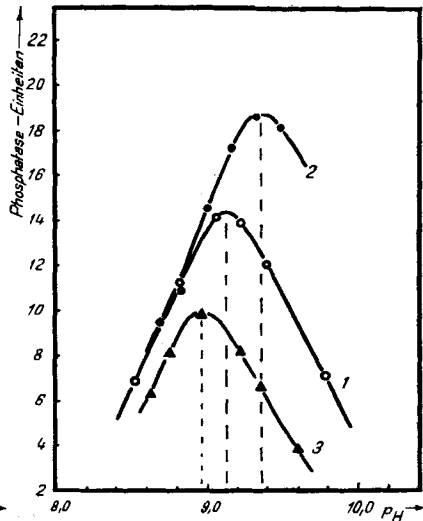


Fig. 4.

Beeinflussung der Phosphatase-Aktivität von Gewebehomogenat (Rattenniere) durch Magnesium ($q \text{ Mg} = 2,3$) — als MgCl_2 zugesetzt — in verschiedenen Puffern (Fig. 3), sowie durch Mangan und Zink ($q \text{ Mn}$ resp. $\text{Zn} = 3,0$) — als Sulfat zugesetzt (Fig. 4).
 1a u. 1b mit Mg^{++} optimal aktiviert
 2a u. 2b ohne Mg^{++} -Zusatz
 a = Veronal Na/HCl bzw. NaOH ($\sim 0,02\text{-m.}$);
 b = Veronal Na-Carbonat/HCl-Puffer ($\sim 0,05\text{-m.}$)
 1 ohne Zusatz in Veronal Na-Carbonat/HCl-Puffer
 2 + MnSO_4 ($q \text{ Mn} = 3,0$); derselbe Puffer
 3 + ZnSO_4 ($q \text{ Zn} = 3,0$); derselbe Puffer

4. Einfluss der verschiedenen Aminosäuren.

Da Glykokoll/NaOH ein für Phosphatasestudien (Kay¹) u. a.) oft verwendeter Puffer ist und O. Bodansky²) jüngst über den Mechanismus der Aminosäure-Hemmung bei der alkalischen Gewebsphosphatase berichtet hat, haben wir verschiedene Typen von Aminosäuren nach unserer Methodik untersucht. Hierbei können wir die Feststellungen von O. Bodansky, wonach bei der Nierenphosphatase die basischen Aminosäuren bedeutend stärker, die sauren Aminosäuren schwächer als die Monoamino-monocarbonsäuren hemmen, nicht nur bestätigen, sondern es lässt sich auch zeigen, dass der Grad der Hemmung vom p_H abhängig ist. Wie der Fig. 5 zu entnehmen ist, zeigen die Kurven einen Verlauf, welcher teilweise an das Verhalten der in Fig. 2 dargestellten Kurven (Hemmung durch NH_4^+) erinnert. Abgesehen von der auffallend starken Hemmung durch die basischen Aminosäuren erkennt man, dass keine so starke p_H -Abhängigkeit des Optimums besteht, wie bei der Hemmung durch NH_4^+ , doch lässt sich eine Verschiebung desselben z. B. bei Glykokoll gut erkennen. Die vergleichende Prüfung von Asparaginsäure, Alanin und Histidin ergab ein gleichlautendes Resultat.

5. Wirkung der Carbonat-Hydrogencarbonat- bzw. Ammonium-Ionen auf die Aktivität von gereinigtem Phosphatase-Präparat.

Die p_H -Wirkungskurve dieses nach Albers (loc. cit.) gereinigten Präparates (80 γ pro Ansatz) zeigt bei Verwendung von Veronal Na-Carbonat/HCl-Puffer ein p_H -Optimum von 9,2 und einen Verlauf, der jenem beim Rohenzym durchaus ähnlich ist. Prüft man

¹) Biochem. J. **20**, 791 (1926).

²) J. Biol. Chem. **165**, 605 (1946); **174**, 465 (1948).

nun die Phosphatase-Aktivität dieses Präparates, die unter obigen Bedingungen ca. 6 Phosphatase-Einheiten/mg beträgt, bei verschiedenen Konzentrationen von $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3^{'}$ bzw. NH_4^{+} -Ionen, so ist auch hier ein unterschiedlicher Effekt festzustellen, allerdings

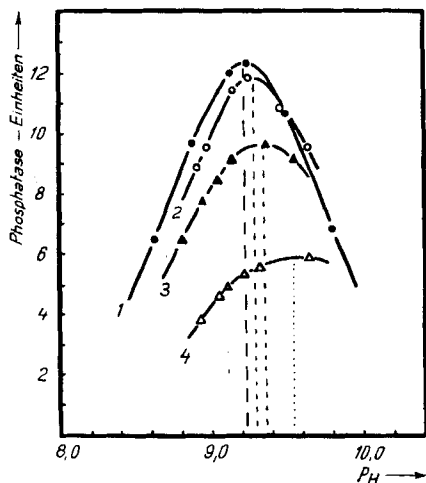


Fig. 5.

Hemmung der Phosphatase-Aktivität von Gewebehomogenat (Rattenniere) durch verschiedene Typen von Aminosäuren (0,05-m. Endkonzentration).

1 ohne Aminosäure-Zusatz

3 + Glykokoll (0,05-m.)

2 + L(+)-Glutaminsäure (0,05-m.)

4 + L(+)-Lysin (0,05-m.)

alle 4 Reihen in Veronal Na-Carbonat/HCl-Puffer; Aminosäuren „Roche“-Präparate.

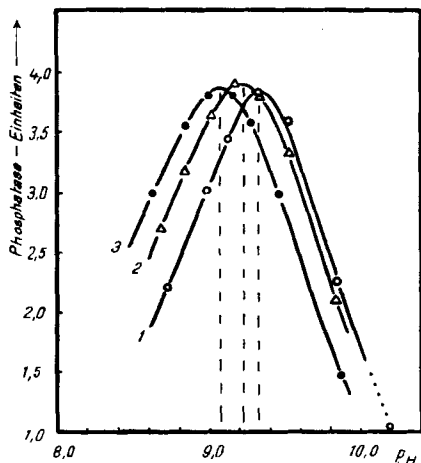


Fig. 6.

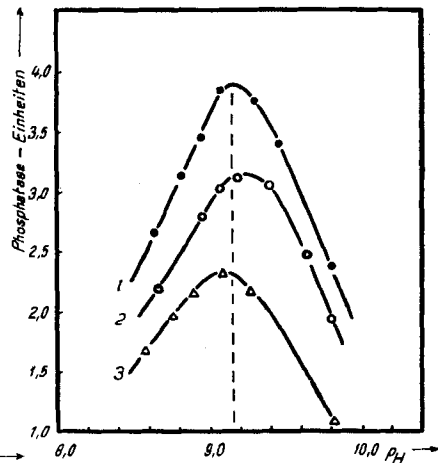


Fig. 7.

Beeinflussung der Phosphatase-Aktivität eines gereinigten Präparates durch $\text{CO}_3^{''}/\text{HCO}_3^{'}$ (Fig. 6) bzw. NH_4^{+} -Ionen (Fig. 7). (Präparat nach D. Albers aus Pferdenieren dargestellt.)

1 Veronal Na/HCl bzw. NaOH ($\sim 0,02$ -m.)

1 Veron. Na-Carb./HCl-Puffer ($\sim 0,05$ -m.)

2 Veronal Na-Carbonat/HCl-Puffer ($\sim 0,05$ -m.)

2 + 0,059-m. NH_4Cl ; derselbe Puffer

3 Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer ($\sim 0,1$ -m.)

3 + 0,125-m. NH_4Cl ; derselbe Puffer

in einer anderen Weise, als es beim Rohenzym beobachtet werden konnte. Wie aus Fig. 6 zu ersehen ist, bewirkt die Konzentrationserhöhung von $\text{CO}_3''\text{--HCO}_3'$ -Ionen hier keine Hemmung der beim Optimum beobachteten Phosphatase-Aktivität. Die bei verschiedenen $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ -Konzentrationen resultierenden Kurven unterscheiden sich lediglich durch eine geringe Verschiebung der gesamten Kurve, ein Effekt, wie er auch durch Zugabe von Neutralsalzen (NaCl , Na_2SO_4 usw.) erzielt werden kann. Wird nun das gereinigte Präparat durch Zusatz von Mg ($q \text{ Mg} = 2,3$) optimal aktiviert, so ist indessen auch hier das Verhalten zu beobachten, wie es im Kurvenpaar 1a + 1b in Fig. 3 dargestellt ist.

Während die $\text{CO}_3''/\text{HCO}_3'$ -Ionen auf das gereinigte Präparat ohne Magnesiumzusatz keinen hemmenden Einfluss mehr ausüben, ist die NH_4^+ -Ionen-Hemmung auch hier vorhanden, wie auf Fig. 7 zu sehen ist, allerdings ohne deutliche Änderung des p_{H} -Optimums.

Bei der Besprechung dieser Befunde wird der Tatsache Rechnung zu tragen sein, dass es sich um ein durch fraktionierte Alkoholfällung (ca. 65%) bei 0–5° C dargestelltes Enzympräparat handelt, das also nicht mehr in nativem Zustand vorliegt. Durch den Reinigungsprozess ist zwar eine gewisse Anreicherung des Fermentes erzielt worden, doch konnte dadurch keine völlige Abtrennung der begleitenden inaktiven Eiweisskörper erzielt werden.

Diskussion.

Bei Betrachtung des gesamten Verlaufs der p_{H} -Aktivitätskurve der alkalischen Nierenphosphatase zeigt die aktivierende oder hemmende Wirkung der Effektoren dieses Fermentes neue Aspekte. Während bei der einen Gruppe von Effektoren das Ausmass der Aktivierung oder Hemmung keine Abhängigkeit vom p_{H} , somit keine Verschiebung des p_{H} -Optimums der resultierenden Kurve erkennen lässt, gibt es andererseits Effektoren, deren Wirkung sich grösstenteils nur auf einen bestimmten Bereich der p_{H} -Wirkungskurve erstreckt. Die Wirkung dieser Gruppe von Effektoren äussert sich in der Weise, dass nur der eine Schenkel der p_{H} -Aktivitätskurve beeinflusst zu werden scheint, während der andere mehr oder weniger konstant bleibt. Dies hat eine Verschiebung des resultierenden p_{H} -Optimums zur Folge.

Bei der Deutung der hierbei beobachteten Wirkungsunterschiede ist Zurückhaltung geboten und es ist zu berücksichtigen, dass die p_{H} -Aktivitätskurven, wie sie hier verfolgt worden sind, Resultanten vieler — einzeln schwer erfassbarer — fördernder und hemmender Faktoren sind. Der jeweilige Verlauf der p_{H} -Aktivitätskurve hängt nun nicht nur von den willkürlich gewählten Reaktionsbedingungen, vor allem Zeit, Temperatur und Substrat, ab, sondern wird auch beeinflusst durch die Konzentration der schon im Rohextrakt vorhandenen Aktivatoren (Magnesium und andere Metalle) und Hemmkörper (Aminosäuren u. a.), worüber z. T. schon berichtet worden ist (loc. cit.). Werden nun diese Einflüsse durch Normierung der Versuchsbedingungen und Verwendung derselben Extraktportion möglichst ausgeschaltet, so lassen sich die oben erwähnten Effektorwirkungen deutlich feststellen; diese stellen jeweilen aber nur eine weitere zusätzliche — allerdings bekannte — Komponente der vielen

bereits vorhandenen Effektoren dar. In diesem Sinne deuten wir die mit ungereinigtem Gewebehomogenat von Rattennieren erhaltenen p_H -Aktivitätskurven der alkalischen Phosphatase und deren Beeinflussbarkeit in der folgenden Weise:

Nach den von *Michaelis*¹⁾ und *Myrbäck*²⁾ auf Grund ihrer Saccharasestudien entwickelten Anschauungen stellt die p_H -Aktivitätskurve eines Ferments die Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten (Eiweiss) dar, und zwar diejenige der Enzym-Substratverbindung, wobei man sich diese Kurve als Resultante zweier sich schneidender Dissoziationsrestkurven vorzustellen hat. *H. Albers*³⁾ hat auf Grund seiner bei der Nierenphosphatase erhaltenen Resultate diese Hypothese auf die alkalische Phosphatase übertragen. Danach ist diese Enzym-Substrat-Verbindung bei p_H 9 maximal undissoziiert; der linke, saure Schenkel der Aktivitätskurve stellt den Dissoziationsgrad dieser Verbindung als Base, der rechte, alkalische Schenkel denjenigen als Säure dar. Mit dieser Anschauung deckt sich wenigstens teilweise die von *Kay*⁴⁾, sowie *Delory* und *King*⁵⁾ angedeutete Vorstellung, wonach die p_H -Wirkungskurve die Resultante der nach der alkalischen Seite ansteigenden „Aktivitätskurve im engeren Sinne“ und der nach dieser Seite fallenden „Stabilitätskurve“ sei. Ohne uns in bezug auf das Zustandekommen dieser beiden Kurvenschenkel festlegen zu wollen, stellen wir fest, dass die p_H -Wirkungskurve bei beiden Anschauungen die Resultante zweier Kurven darstellt, die — eine jede für sich — durch verschiedene Faktoren (z. B. Aktivität und Stabilität) bedingt sind.

Von diesem Standpunkt aus ist es nun gut zu verstehen, dass es Effektoren gibt, die mehr oder weniger selektiv nur auf die eine Gruppe dieser Faktoren einwirken, d. h. die Phosphatase-Aktivität nur im Bereiche des einen Schenkels beeinflussen. Fig. 8 gibt eine schematische Darstellung dieser Verhältnisse wieder. Es ist daraus zu ersehen, dass ein Effektor, welcher vor allem nur auf den rechten (alkalischen) Schenkel (A) der Aktivitätskurve einwirkt, ein solcher ist, der auf Grund des oben Gesagten die Dissoziation der Enzym-Substratverbindung als Säure (Anion) beeinflusst bzw. nur auf die Stabilitätskurve (A) des Enzyms einwirkt; dabei erfolgt eine Parallelverschiebung der Kurve A nach A'. Für den gegenteiligen Fall gilt das Analoge (B \leftarrow B').

Wirkt dagegen ein Effektor gleichmässig auf beide Kurven ein, so erfolgt keine seitliche Verschiebung der Kurve, sondern die Aktivierung bzw. Hemmung erstreckt sich gleichmässig auf den gesamten

1) Bioch. Z. **49**, 333 (1913); **60**, 91 (1914); **110**, 217 (1920).

2) Z. physiol. Ch. **158**, 160 (1926).

3) Z. physiol. Ch. **232**, 165 (1935); B. **71**, 1913 (1938).

4) Physiol. Reviews **12**, 384 (1932).

5) Biochem. J. **33**, 1185 (1939); **37**, 547 (1943).

Kurvenbereich. Die bis jetzt untersuchten Effektoren lassen sich auf Grund ihrer Wirkungsweise in folgender Weise gruppieren:

I. Wirkung in jedem Kurventeil gleich gross, unabhängig vom p_H : Magnesium (als $MgCl_2$) aktivierend, Veronal-Na hemmend.

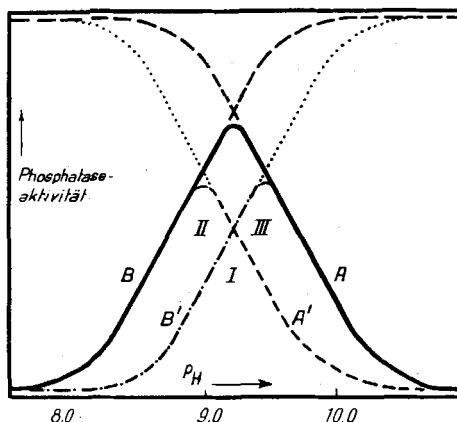


Fig. 8.

Schematische Darstellung des Aufbaues der p_H -Wirkungskurve aus 2 Dissoziationskurven. Zustandekommen der verschiedenen Effektorenwirkungen (I, II und III) durch Parallelverschiebung einer oder beider Kurven.

II. Wirkung vor allem auf den alkalischen (rechten) Schenkel der Aktivitätskurve (Beeinflussung der Dissoziation als Anion bzw. der Stabilitätskurve): Mangan (II)-ion aktivierend (ebenso inaktiviertes Serum); Carbonat-Hydrogencarbonat-ionen und Carboxylgruppe hemmend.

III. Wirkung vor allem auf den sauren (linken) Schenkel der Aktivitätskurve (Beeinflussung der Dissoziation als Kation bzw. der Aktivitätskurve im engeren Sinne): Ammonium-ion und Aminogruppe hemmend.

Dass es sich bei I um eine Summation der bei II und III beobachteten Wirkungen handeln kann, geht schon aus der Definition hervor und lässt sich auch aus dem Verhalten der Aminosäuren (Fig. 5) ersehen. Unsere Annahme, dass es hier zu einer Addition der durch die Carboxylgruppe bedingten Hemmung (nach II) und derjenigen durch die Aminogruppe (nach III) kommt, wird durch das Experiment bestätigt. Allerdings sind hier Übergänge festzustellen, je nach der Relation der in der Aminosäure vorkommenden Zahl von $COOH$ - und NH_2 -Gruppen.

Die von uns beobachtete Hemmung der Phosphatase-Aktivität durch $CO_3^{''}/HCO_3'$ und NH_4' -Ionen ist in sehr guter Übereinstimmung

mit der von *O. Bodansky*¹⁾ mitgeteilten Tatsache, wonach die bei Aminosäuren zu beobachtende Hemmung aus 2 Komponenten bestehen soll, dass es sich also bei dieser Hemmung um eine Summation zweier verschiedener Faktoren handelt. Nach diesem Autor hemmen z. B. sowohl Glykokoll-äthylester (COOH blockiert) als auch Dimethylglykokoll (NH₂-Gruppe blockiert), jedoch sind beide für sich nur etwa halb so wirksam wie freies Glykokoll. Aus diesen Gründen schreibt *O. Bodansky* der COOH-Gruppe wie auch der NH₂-Gruppe eine hemmende Wirkung zu, was unsere Versuche bestätigen. Da dieser Autor die Phosphatase-Aktivität jeweils lediglich bei „optimalem p_H“ gemessen hat, konnte er nicht feststellen, dass es sich hierbei nicht nur um 2 verschiedene, hemmende Gruppen handelt, sondern dass sie die Vertreter von 2 verschiedenen Hemmungstypen darstellen.

Das anders geartete Verhalten der Effektoren beim gereinigten Phosphatase-präparat ist noch unklar. Ob und inwiefern dafür Veränderungen am Enzymprotein (teilweise Denaturierung!) oder die Abtrennung eines Teils der begleitenden inaktiven Eiweisskörper verantwortlich zu machen sind, lässt sich nicht entscheiden. Immerhin weist die unterschiedliche Hemmbarkeit durch CO₃''/HCO₃' und NH₄-Ionen darauf hin, dass wir es mit 2 verschieden wirkenden Effektoren zu tun haben.

Die verschiedenartige Beeinflussbarkeit der Dissoziation der Enzym-Substrat-Verbindung durch mehrere Effektorengruppen lässt sich nun in Übereinstimmung mit den von *Myrbäck* (loc. cit.) bei der Saccharase-Inaktivierung durch Metalle und Säuren erzielten Ergebnissen am ehesten folgendermassen erklären: Die Effektoren, die nach II auf die Dissoziation der Enzym-Substrat-Verbindung als Säure (Anionenbildung) einwirken, hemmen oder fördern das Abdissoziieren jener sauren Gruppen, die die Säurenatur dieser Verbindung bedingen. Dasselbe gilt für die im Bereich des sauren (linken) Kurvenschenkels abdissoziierenden basischen Gruppen der Enzym-Substrat-Verbindung.

Es soll weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, diese Dissoziationsverhältnisse, wie auch die Art und den Sitz der beteiligten Gruppen weiter zu klären, und zu entscheiden, welche Rolle den Begleitproteinen (Bildung von Enzymsymplexen!) zukommt.

Zusammenfassung.

1. Es wird die Wirkungsweise verschiedener Effektoren auf die p_H-Aktivitätskurve der alkalischen Nieren-Phosphatase (Rohextrakt aus Rattenniere) untersucht. Wird deren gesamter Verlauf (p_H 8–10) berücksichtigt, so können drei Arten von Effektorenwirkungen unterschieden werden.

¹⁾ J. Biol. Chem. **165**, 605 (1946).

2. Während sich z. B. die aktivierende Wirkung von Magnesiumsalzen und die Hemmung durch Veronal-Na gleichmässig über den gesamten beobachteten Bereich erstrecken (I), zeigt die aktivierende Wirkung des Mangans oder die Hemmung durch Na-Carbonat-Hydrogencarbonat eine Beschränkung auf die Nähe des Optimums und auf den alkalischen Schenkel der p_H -Wirkungskurve, während der saure Schenkel kaum beeinflusst wird (II). Umgekehrt beeinflussen Ammonium-Ionen (und Aminogruppen) lediglich den sauren Schenkel der p_H -Aktivitätskurve in hemmendem Sinne, bei relativer Konstanz des alkalischen Schenkels (III).

3. Die bei Aminosäurezusatz zu beobachtende Hemmung der Phosphatase-Aktivität stellt eine Summationswirkung der auf verschiedene Weise hemmenden NH_2 - und $COOH$ -Gruppen dar. Diese ist bei den sauren Aminosäuren am schwächsten, bei den basischen am stärksten.

4. Es wird versucht, die beobachtete selektive Beeinflussbarkeit eines der beiden Schenkel der p_H -Aktivitätskurve zu deuten unter Zuhilfenahme der Anschauung, dass es sich bei der p_H -Aktivitätskurve der alkalischen Phosphatase um die Resultante zweier sich überschneidender Dissoziationskurven handelt, d. h. um die Dissoziationskurve eines Ampholyten (*H. Albers*) bzw. die Resultante aus der Aktivitäts- und der Stabilitätskurve (*Kay*). Es werden diese Zusammenhänge diskutiert.

Medizin.-chemisches Institut der Universität, Bern.

258. Preparazione di ulteriori α -cheto- γ -lattoni e scissione termica degli α -cheto- γ -lattoni con sostituenti alchilici in posizione γ

di H. Schinz e A. Rossi¹).

5. X. 48.)

A. Preparazione di ulteriori α -cheto- γ -lattoni con sostituenti alchilici in posizione γ .

In una precedente pubblicazione²) avevamo descritto la preparazione di α -cheto- β -carboetossi- γ -alchil- γ -lattoni (III), ottenuti per condensazione dell'enolato sodico dell'ossalacetato d'etile (II) con aldeidi alifatiche (I). Saponificando e decarbossilando il gruppo carboetossilico in posizione β avevamo potuto isolare gli α -cheto- γ -alchil- γ -lattoni (IV).

¹) Le ricerche descritte in questa pubblicazione costituiscono una parte della Tesi di laurea di A. Rossi presso la Scuola Politecnica Federale.

²) A. Rossi e H. Schinz, *Helv.* **31**, 473 (1948).