

lich ist, sollen die hier mitgeteilten Endgruppenbestimmungen durch solche an dieser neu aufgefundenen Fraktion ergänzt werden.

Wir danken der Verwaltungskommission des *Theodor Kocher Instituts* in Bern, dass sie es dem einen von uns (*H. W.*) mit Mitteln der *Rockefeller Foundation* ermöglicht hat, während einiger Monate als Gast am genannten Institut zu arbeiten.

SUMMARY.

Quantitative determinations of the terminal amino groups of α -casein before and after treatment with crystalline rennin were carried out using *Sanger's* method of labeling the free amino groups with dinitrophenyl residues. In native α -casein the terminal amino acids were found to be lysine and arginine. In rennin treated α -casein the same endgroups can still be detected, though lysine in smaller quantities. In addition a new terminal amino acid namely phenylalanine appears in the α -paracasein.

In addition to chromatography a new method of determining N-terminal arginine has been successfully used during this work. Thereby DNP-arginine is determined directly in the mixture of DNP-amino acids by means of an optical method, using the colour reaction of *Sakaguchi*.

The results suggest, that the primary reaction in the rennet curdling of milk is a specific limited proteolysis. They further lead to the conclusion that α -casein cannot be a homogeneous protein and that only a fraction of it is altered in this enzymatic reaction.

Theodor-Kocher-Institut
und Institut für organische Chemie der Universität, Bern.

44. Metallionen-Gleichgewichte und biologische Aktivität

von S. Fallab und H. Erlenmeyer.

(23. I. 57.)

Ausgehend von der Hypothese, dass zahlreiche biologische Wirkungen chemischer Verbindungen auf eine Beeinflussung von Fermentsystemen zurückzuführen sind¹⁾, seien im folgenden einige mögliche Wirkungsmechanismen biologisch aktiver Stoffe diskutiert. Im Anschluss an diese allgemeinen Betrachtungen soll über das Komplexbildungsvermögen von strukturverwandten Verbindungen, von denen eine biologisch aktiv, die andere in den gleichen Testen inaktiv ist, berichtet werden.

¹⁾ *H. Erlenmeyer, J. Bäumler & W. Roth, Helv. 36, 941 (1953); s. auch S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. 36, 6 (1953).*

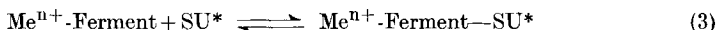
Die Möglichkeit, die Wechselwirkung biologisch aktiver Verbindungen mit Fermenten experimentell zu erforschen, ist insbesondere gegeben durch die Tatsachen, dass einmal zahlreiche Fermente Metallionen als wirksamen Bestandteil enthalten, und andererseits, dass zahlreiche aktive Verbindungen starke Komplexbildner sind, d. h. Strukturen aufweisen, die Metallionen zu binden vermögen^{1a)}. Im folgenden skizzieren wir kurz die verschiedenartigen Reaktionsmechanismen, mit denen ein Komplexbildner ein Metallfermentsystem beeinflussen kann. (1) und (2) sind grundlegende Gleichgewichte, die solche Angriffsmöglichkeiten bieten.



Für die Deutung biochemischen Geschehens ist es sodann wichtig, zwischen den zwei prinzipiell verschiedenen Arten der Störung, die über die Kinetik oder über die Lage des Gleichgewichts erfolgen kann, zu unterscheiden. Ein Modell für eine *kinetisch* zu deutende Wirkung ergab das Verhalten von Fe^{2+} und Cu^{2+} gegenüber α, α' -Dipyridyl (Dipy)²⁾. Obgleich der Cu-Komplex des Dipy stabiler ist als der Fe-Komplex, wird doch infolge grösserer Reaktionsgeschwindigkeit beim Zusammengeben der Komponenten zuerst der Eisenkomplex ausgebildet, der dann erst im Verlaufe von Stunden in den stabilen Kupferkomplex umgeformt wird.

Von besonderer Bedeutung sind aber die im folgenden kurz zusammengestellten verschiedenen Möglichkeiten I–IV, die *Lage des Dissoziationsgleichgewichts* eines solchen Metallferments zu beeinflussen.

I. Eine mit dem Substrat komplexchemisch ähnliche³⁾ Verbindung (SU^*) kann in das Gleichgewicht (2) eingreifen, wenn ihr Komplexbildungsvermögen mit demjenigen des Substrats vergleichbar ist.



Durch die Reaktion (3) wird die Ausbildung des Enzym-Substratkomplexes entsprechend dem Verhältnis der Gleichgewichtskonstanten von (2) und (3) verhindert^{3a)}. Bekannte Beispiele dieses Reaktionssystems sind:

1. Die Besetzung der am Fe^{2+} des Hämoglobins freien Koordinationsstelle durch CO an Stelle von O_2 .

^{1a)} Zu berücksichtigen ist, dass modellmässig bisher fast ausschliesslich Systeme mit solchen Liganden untersucht worden sind, die stärkere Komplexbildner sind als Wasser.

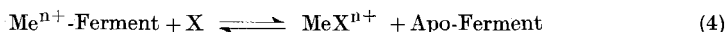
²⁾ P. Länger, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. **37**, 1050 (1954).

³⁾ Über Ähnlichkeit bei Komplexverbindungen s. H. Erlenmeyer & H. Rey-Bellet, Helv. **37**, 234 (1954); s. a. H. Erlenmeyer, Bull. Soc. Chim. biol. **30**, 792 (1948).

^{3a)} Die Ähnlichkeit mit dem Substrat kann soweit gehen, dass der „Antimetabolit“ enzymatisch eingebaut wird, und dass dann Störungen erst in einer späteren Stufe des Stoffwechsels auftreten.

2. Die von *J. H. Quastel & W. R. Wooldridge*⁴⁾ schon 1928 untersuchte Hemmung der Bernsteinsäuredehydrase durch eine substrat-ähnliche Verbindung, die Malonsäure.

II. Ein starker Komplexbildner kann das Gleichgewicht (1) nach links verschieben, indem er das für den Aufbau des Fermentes notwendige und mit diesem im Gleichgewicht stehende Metallion abfängt (4). Bekannt geworden ist eine derartige Inaktivierung eines Ferments durch die grundlegenden Versuche von *O. Warburg*⁵⁾, der z. B. durch

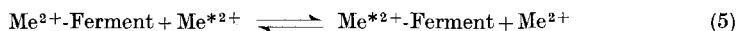


eine CN' enthaltende Lösung – auch wenn diese vom Ferment durch eine Membran getrennt war – dem Metallenzym die Ionen entziehen konnte. Auch die bakteriostatische Wirkung des Fe^{2+} bindenden Conalbumins kann durch eine Membran erfolgen⁶⁾.

Ein weiteres Beispiel bildet die Wirkung des Toxins des Gasgangrän-Erregers (*Clostridium perfringens*, Typ A), von dem vermutet wird⁷⁾, dass es eine durch zweiwertige Metallionen aktivierte Lecithinase ist, und dass die Toxizität eine enzymatische Wirkung ist. Äthylendiamin-tetraessigsäure (Komplexon) hebt nun die Giftwirkung auf, die aber durch Zusatz von Zn^{2+} , Co^{2+} oder Mn^{2+} wieder hergestellt wird.

III. Eine Steuerung des Gleichgewichts (2) kann durch ein zweites Metallion auch erfolgen, wenn dieses das Substrat komplexchemisch stärker bindet als das Metall-Enzym. So ergeben Untersuchungen über eine Tyrosinasehemmung durch Titanverbindungen, dass diese Hemmung durch Blockierung des Substrats erfolgt⁸⁾.

IV. Die *Irving-Williams-Reihe*⁹⁾ ordnet die Me^{2+} -Ionen nach der Stärke ihres Komplexbildungsvermögens, und die Experimente ergeben, dass ein Komplex mit einem „schwächeren“ Metallion, z. B. ein Mn^{2+} -Enzym, durch ein „stärkeres“ Metallion, z. B. Cu^{2+} , nach der Gleichung (5) angegriffen wird¹⁰⁾.



⁴⁾ Biochem. J. **22**, 689 (1928).

⁵⁾ *O. Warburg*, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten, Berlin 1946.

⁶⁾ *R. E. Feeney*, Arch. Biochemistry Biophysics **34**, 196 (1951); *R. E. Feeney & D. A. Nagy*, J. Bacteriol. **64**, 629 (1952).

⁷⁾ *M. Moskowitz, M. W. Doverell & R. McKinnay*, Science **123**, 1077 (1956).

⁸⁾ *D. J. Cavanagh, J. Harris & J. Z. Hearon*, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1591 (1955).

⁹⁾ *H. Irving & R. J. P. Williams*, J. chem. Soc. **1953**, 3192; *D. P. Mellor & L. Maley*, Nature **159**, 370 (1947); **161**, 436; *P. Pfeiffer, H. Thielert & H. Glaser*, J. prakt. Chem. **152**, 145 (1939).

¹⁰⁾ Solche Austauschreaktionen können über die normalen Dissoziationsgleichgewichte laufen. Bei gewissen Komplexen aber konnte gezeigt werden (*K. Bernauer, S. Fallab & H. Erlenmeyer*, Helv. **39**, 1993 (1956)), dass auch eine andere Kinetik, d. h. eine direkte Verdrängung für solche Reaktionen möglich ist.

Man darf mit *S. M. Altmann & E. M. Crook*¹¹⁾ vermuten, dass die aktivierende Wirkung gewisser Komplexbildner, insbesondere der Äthylendiamintetraessigsäure, auf die *Keilin'sche* Pferdeherz-Succinoxidase „is due to the ability to remove heavy metals from the system“. Bereits mit einem sorgfältig gereinigten, d. h. an Schwermetallionen ärmeren bernsteinsäuren Natrium ist die Aktivität grösser, während andererseits ein Zusatz von $2 \cdot 10^{-3}$ -m. Cu^{2+} bzw. Zn^{2+} das Ferment vollständig hemmt.

Berücksichtigt man die komplexchemische Wirkung von zwei oder mehreren Metallionen, so ist noch folgender Gesichtspunkt von Bedeutung: Aus Gleichung (5) ist zu entnehmen, dass Fermentsysteme abhängig sind vom Konzentrationsverhältnis mehrerer, im einfachsten Fall zweier, Metallionen (6). Wird dieses Konzentrationsverhältnis gestört, so werden die Fermentsysteme verändert.

$$[\text{Me}^{2+}][\text{Me}^{*2+}\text{-Ferment}]/[\text{Me}^{*2+}][\text{Me}^{2+}\text{-Ferment}] = K \quad (6)$$

Aus der Beobachtung, dass bei gewissen Erkrankungen das pCu erhöht ist¹²⁾, lässt sich ableiten, dass der „Spiegel“ der biologisch wichtigen Metallionen, d. h. ihr pMe im biologischen Geschehen von Bedeutung ist. Man muss annehmen, dass für jedes Metallion in einem biologischen System ein bestimmtes normales pMe aufrecht erhalten wird.

Das, wie Gleichung (6) zeigt, wichtige Verhältnis der Metallionenkonzentrationen ist festgelegt durch das Verhältnis des Komplexbildungsvermögens der gesamten in einem System vorhandenen Komplexbildner gegenüber den verschiedenen Metallionen.

Es hat sich gezeigt, dass für alle Liganden wohl die *Irving-Williams*-Reihe ein gewisses Ordnungsprinzip der Metallionen in bezug auf die Bindungsstärke darstellt, dass aber bei gewissen Liganden der Quotient der Stabilitätskonstanten k für verschiedene Metalle sehr verschieden sein kann. So ist z. B. für α -Aminosäuren wie auch für Dipy $k_{\text{Cu}} > k_{\text{Fe}}$, wobei aber im Vergleich zu den Aminosäuren der Wert $k_{\text{Cu}}/k_{\text{Fe}}$ für Dipy wesentlich kleiner ist.

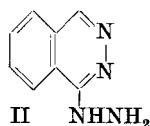
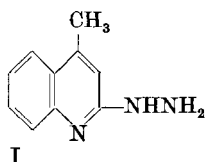
Der Quotient von zwei k -Werten kann auch als Spreitungsfaktor eines Liganden für zwei Metallionen bezeichnet werden. Diese Auslegungen zeigen sofort, dass die durch einen Liganden erzeugte Änderung im Konzentrationsverhältnis verschiedener Ionen, die sich möglicherweise auf ein Fermentsystem auswirkt, durch einen zweiten Liganden wieder aufgehoben werden kann, wenn dieser einen reziproken Spreitungsfaktor aufweist^{12a)}. Von *R. E. Feeney*⁶⁾ ist die Aufhebung der

¹¹⁾ *S. M. Altmann & E. M. Crook*, *Nature*, **171**, 76 (1953).

¹²⁾ *L. Heilmeyer, W. Keiderling & G. Stüwe*, Kupfer und Eisen als körpereigene Wirkstoffe und ihre Bedeutung beim Krankheitsgeschehen, G. Fischer, Jena 1941; *S. Fallab & H. Erlenmeyer*, *Experientia* **11**, 174 (1955).

^{12a)} Möglichkeiten dieser Art sind insbesondere durch die nicht fixierte Stellung des Zn^{2+} in der *Irving-Williams*-Reihe gegeben.

bakteriostatischen Wirkung von Conalbumin durch das allein gleichfalls wirksame Oxin auf diese Weise gedeutet worden. Auch die früher von uns untersuchte antagonistische Wirkung des Thiophencarbonsäurehydrazids auf die tuberkulostatische Wirkung des Isonikotinsäurehydrazids hängt möglicherweise mit einem solchen Effekt zusammen¹³⁾. Diesen Zusammenhängen ist zu entnehmen, dass für die biologische Wirkung eines Komplexbildners neben den absoluten Komplexstabilitätskonstanten auch die Spreitungsfaktoren von Bedeutung sind. Dass solche Spreitungsfaktoren auch bei nahe verwandten chemischen Verbindungen sehr verschiedene Werte annehmen können, zeigt die im folgenden beschriebene komplexchemische Untersuchung von 2-Hydrazino-lepidin (I) und 1-Hydrazino-phthalazin (II).



I und II reagieren mit Me^{2+} -Ionen der 3d-Elemente als zweizählige Liganden unter Ausbildung von Chelaten. Wir bestimmten die sukzessiven Stabilitätskonstanten mit Fe^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} nach der üblichen Methode¹³⁾ durch pH-Titration. Den Titrationskurven entnahmen wir graphisch die pK-Werte 2,8 und 8,35 für I und 2,9 und 7,25 für II. Unter Berücksichtigung dieser pK-Werte ermittelten wir aus dem NaOH-Mehrverbrauch bei der Titration in Gegenwart der Metallsalze die Bildungsfunktion \bar{n} ¹⁴⁾, deren graphische Auswertung die in Tab. 1 zusammengestellten log k-Werte ergab.

Tabelle 1.

	Fe^{2+}			Zn^{2+}			Co^{2+}		
	log k_1	log k_2	log k_3	log k_1	log k_2	log k_3	log k_1	log k_2	log k_3
I	4,4	3,4		5,1	4,1		5,3	4,3	3,4
II	4,9	4,6	4,3	4,9	4,1		5,8	5,0	4,2

Auffallend ist einmal, dass im Vergleich mit der biologisch inaktiven¹⁵⁾ Verbindung I die aktive¹⁶⁾ Verbindung II ein wesentlich

¹³⁾ W. Roth, G. Carrara & H. Erlenmeyer, *Helv.* **36**, 1004 (1953); S. Fallab, *Experientia* **10**, 190 (1954).

¹⁴⁾ J. Bjerrum, *Metal Ammine Formation in Aqueous solution*, Copenhagen 1941; M. Calvin & J. Melchior, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 3270 (1948).

¹⁵⁾ Über einen Vergleich der biologischen Eigenschaften von I und II, insbesondere der blutdrucksenkenden Wirkung, s. W. Schuler & R. Meier, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **13**, 106 (1955).

¹⁶⁾ F. Gross, J. Druey & R. Meier, *Experientia* **6**, 19 (1950); J. Druey & B. H. Ringier, *Helv.* **34**, 195 (1951).

höheres Komplexbildungsvermögen gegenüber Fe^{2+} und Co^{2+} zeigt, trotzdem die Basizität der Hydrazinogruppe in II geringer ist. So dann liegen die 3 Bildungskonstanten k_1 , k_2 und k_3 für die Komplexe $\text{Fe}(\text{phtal})^{2+}$, $\text{Fe}(\text{phtal})_2^{2+}$ und $\text{Fe}(\text{phtal})_3^{2+}$ sehr nahe beieinander. Es lässt sich aus dieser Beobachtung entnehmen, dass, ähnlich wie im Falle des Fe^{2+} - α , α' -Dipyridyl-Systems, die 3. Stufe der Komplexbildung durch die Ausbildung eines andern Bindungstypus stabilisiert ist. Diese Vermutung wird bestätigt durch die Beobachtung einer intensiven Farbänderung. Die Titration von II in Gegenwart von Fe^{2+} ergab von pH 4 an intensiv weinrot gefärbte Lösungen. Spektrophotometrische Messungen belegen, dass es sich dabei um den $\text{Fe}(\text{phtal})_3^{2+}$ -Komplex handelt. Vergleicht man nun die Spreitungsfaktoren $\log k_1 k_2 (\text{Fe}^{2+}) / \log k_1 k_2 (\text{Zn}^{2+})$ für I und II, so findet man eine Umstellung in der Stabilitätsreihe. Es ist möglich, dass die biologische Aktivität von II mit dieser „ Fe^{2+} -Spezifität“ zusammenhängt.

Experimentelles. Für die *Calvin-Bjerrum*-Titrationen¹⁴⁾ verwendeten wir die Hydrochloride von I und II. Ca. 100 mg wurden eingewogen, in 10 cm³ 0,1-n. HCl gelöst und mit 0,1-m. KCl auf 100 cm³ aufgefüllt. Zu 20 cm³ dieser Lösung wurde 1 cm³ einer $2 \cdot 10^{-2}$ -m. Lösung von $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oder $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oder eine frische Einwaage von 7–8 mg $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ zugesetzt, das Titrationsvolumen mit 0,1-m. KCl auf 30 cm³ gebracht, und die Lösung mit 0,1-n. NaOH titriert.

Alle pH-Messungen wurden mit einem *Metrohm*-Potentiometer E 187 bei $22^\circ \pm 2^\circ$ durchgeführt.

Die aus der Bildungsfunktion errechneten Konstanten sind scheinbare Stabilitätskonstanten, da die Aktivitätskoeffizienten keine Berücksichtigung fanden.

Für die Überlassung von 1-Hydrazino-lepidin und 2-Hydrazinophthalazin danken wir Herrn Direktor Dr. J. Druey (*CIBA Aktiengesellschaft*).

Frl. Karin Rampp danken wir für die sorgfältige Ausführung einer grossen Anzahl von pH-Messungen und Titrationen.

SUMMARY.

The possible reactions of metal ions and complexing agents with metal enzymes are discussed. Complex formation between 2-hydrazino-lepidine and 1-hydrazino-phthalazine, chelating agents of similar structure, with Fe^{2+} , Zn^{2+} and Co^{2+} has been studied. There is a marked difference in the behaviour towards Fe^{2+} .

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.
