

**5. Zur Metallspezifität ATP-abhängiger Enzyme  
Eine komplexchemische Deutung, belegt am Beispiel  
der Hexokinase<sup>1)</sup>**

von Hans Brintzinger und S. Fallab

(13. X. 59)

Für das Problem der Bevorzugung schwach koordinierender Metallionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  als Aktivatoren bei phosphatübertragenden Enzymen ist – wie für das Problem der Metallspezifität enzymatischer Reaktionen im allgemeinen – bis heute keine befriedigende Erklärung gefunden worden<sup>2)</sup>. Die Annahme, dass in diesen Systemen Komplexbildner auftreten, die mit maximal aktivierenden Metallionen wie  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  stabilere Komplexe als z. B. mit den stärker koordinierenden Schwermetallionen  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  bilden würden, ist nicht gerechtfertigt, da dies der generell bestätigten Regel von IRVING & WILLIAMS<sup>3)</sup> widersprechen würde, die die Metallionen nach der Stabilität ihrer Komplexe in eine Reihe einordnet, die für alle Komplexbildner fast unverändert gilt.

Neuerdings beschäftigten sich verschiedene Autoren<sup>4)5)</sup> mit der Möglichkeit, durch kinetische Untersuchungen an Metall-aktivierten «ATP-abhängigen» Enzymen die Rolle des Metallions im Mechanismus der Enzymreaktion aufzuklären. Nach diesen Autoren ist die Ausbildung eines Komplexes aus Metallion und Substrat für den Ablauf der Reaktion notwendig. Die Rolle des Metallions bestünde demnach darin, durch Neutralisierung der negativen Ladung der Phosphatgruppen und Elektronenentzug die Aktivierungsenergie der Folgereaktionen zu erniedrigen<sup>6)7)</sup>. Aber auch daraus ergibt sich keine Erklärung für die Sonderstellung z. B. des Magnesium-Ions, da die stärker koordinierenden Metallionen diese gleiche Wirkung in noch stärkerem Masse hervorbringen müssten, wie dies auch mehrfach an entsprechenden nicht-enzymatischen Modellreaktionen belegt worden ist<sup>7)</sup>.

Es wäre nun denkbar, dass die  $\text{Mg}^{2+}$ -Reaktionen durch besondere kinetische Verhältnisse ausgezeichnet sind. Diese könnten jedoch nur dann eine Rolle spielen, wenn in einem als reaktive Zwischenstufe auftretenden Komplex Substrat und Enzym

<sup>1)</sup> Vorläufige Mitteilung: *Experientia* 15, 96 (1959).

<sup>2)</sup> B. G. MALMSTRÖM & A. ROSENBERG, in *Advances in Enzymology* 21, 154 (1959).

<sup>3)</sup> H. IRVING & R. J. P. WILLIAMS, *J. chem. Soc.* 1953, 3192.

<sup>4)</sup> H. G. HERZ, *Biochim. biophysica Acta* 8, 424 (1952); C. LIÉBECQ, *Biochem. J.* 54, xxii (1953); S. KUBY, L. NODA & H. A. LARDY, *J. biol. Chemistry* 210, 65, 83 (1954); H. A. LARDY & L. R. E. PARKS in *Enzymes, Units of Biological Structure and Function*, New York 1956, p. 584; M. KERLY & D. H. LEABACK, *Biochem. J.* 67, 245 (1957).

<sup>5)</sup> N. C. MELCHIOR & J. B. MELCHIOR, *J. biol. Chemistry* 231, 609 (1958).

<sup>6)</sup> H. KROLL, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 2036 (1952); M. CALVIN, in *Mechanism of Enzyme Action*, Baltimore 1954, p. 221; I. M. KLOTZ, *ibid.*, p. 257.

<sup>7)</sup> C. LIÉBECQ & M. JACQUEMOTTE-Louis, *Bull. Soc. Chim. biol.* 40, 67, 759 (1958); vgl. auch N. RESSLER, *Enzymologia* 19, 310 (1958).

koordinativ an das gleiche Metallion gebunden wären, letzteres also die Bindung zwischen Enzym und Substrat vermitteln würde. Gerade bei ATP-abhängigen Enzymreaktionen hat sich dies jedoch auf Grund der Untersuchungen von MELCHIOR & MELCHIOR<sup>5)</sup> als nicht zutreffend erwiesen. Ein solcher Enzym-Metall-Substrat-Komplex ist auch, wie ein Kalottenmodell<sup>8)</sup> zeigt, sterisch unwahrscheinlich, da das Metallion im ATP-Komplex fast vollständig von den voluminösen Phosphatgruppen umhüllt ist.

Im folgenden soll versucht werden, eine einfache **Erklärung für die Metallionen-Spezifität** zu finden, die mit allen komplexchemischen Gegebenheiten, insbesondere mit der erwähnten Regel von IRVING-WILLIAMS im Einklang steht.

Die Aktivierung eines Enzyms durch Metallionen beruht bekanntlich darauf, dass die Enzymreaktion nur ablaufen kann, wenn bestimmte Gruppen des Enzymsystems ein Metallion komplex gebunden enthalten<sup>9)</sup>. Daneben gibt es jedoch in enzymatischen Systemen immer auch funktionelle Gruppen, welche für den Ablauf der Reaktion frei bleiben müssen. Werden diese Gruppen ebenfalls durch ein Metallion besetzt, so wird die Reaktion blockiert<sup>10)</sup>. Den weiteren Ausführungen soll also folgendes schematisches Bild des enzymatischen Systems zugrunde gelegt werden: Es sollen im Enzym-Substrat-System zwei Arten von Koordinationszentren Z existieren, von denen die eine,  $Z_B$ , besetzt sein, die andere,  $Z_F$ , hingegen frei sein muss, damit die Enzymreaktion ablaufen kann<sup>11)</sup>. Ferner soll hierzu vorläufig die extreme Unterstellung gemacht werden, dass es für die Mechanismen von Aktivierung und Hemmung belanglos ist, durch welches der einleitend genannten Metallionen  $Z_B$  bzw.  $Z_F$  besetzt wird. Für die ATP-spaltenden Enzymreaktionen bedeutet dies: Verschiedene Metall-ATP-Komplexe, wie z. B. MgATP, ZnATP und CuATP, sollen von dem Enzym gleich gut verarbeitet werden können, und die Besetzung einer bestimmten funktionellen Gruppe des Enzyms<sup>12)</sup> durch z. B.  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  soll zur gleichen vollständigen Blockierung der Enzymreaktion führen.

Unter den genannten Voraussetzungen lassen sich über den Zusammenhang zwischen koordinativer Besetzung der beiden Zentren  $Z_B$  und  $Z_F$  und der Enzymaktivität quantitative Aussagen machen. Die Besetzung der Zentren durch Metallionen beruht auf den Gleichgewichtsreaktionen ( $M$  = zweiwertiges Metallion)



<sup>8)</sup> N. C. MELCHIOR, J. biol. Chemistry 208, 615 (1954).

<sup>9)</sup> S. z. B. A. E. MARTELL & M. CALVIN, Chemistry of the Metal Chelate Compounds, New York 1952, p. 401.

<sup>10)</sup> Vgl. z. B. E. S. G. BARRON & G. KALNITSKY, Biochem. J. 41, 346 (1947); C. YANOWSKI & J. L. REISSIG, J. biol. Chemistry 202, 567 (1953); I. A. OLSON & C. B. ANFINSEN, *ibid.* 202, 844 (1953); J. R. LEHMANN & A. NASON, *ibid.* 222, 497 (1956).

<sup>11)</sup> Ist – im allgerneinen Fall – mehr als ein Koordinationszentrum zu besetzen bzw. unbesetzt zu lassen, so müssen nur die jeweils limitierenden Glieder des Systems berücksichtigt werden.  $Z_B$  ist dann also die zu besetzende Ligandenkonfiguration mit der geringsten Komplexbildungstendenz,  $Z_F$  die freizulassende mit der stärksten Komplexbildungstendenz. Die übrigen Koordinationszentren des Systems brauchen dann bei der quantitativen Behandlung nicht berücksichtigt zu werden.

<sup>12)</sup> Es wäre auch denkbar, dass die Blockierung der Reaktion durch die Koordinierung von zwei Metallionen an der ATP-Molekel zustande kommt. Die Ausbildung von  $M_2$ ATP-Komplexen konnte jedoch auch bei erheblichem Metallionenüberschuss nicht festgestellt werden<sup>26)</sup><sup>27)</sup>.

Der Zusammenhang zwischen dem Ausmass der Besetzung und der Metallionen-Konzentration ist hierbei gemäss Beziehungen (1) und (2) für jedes Metallion durch zwei Gleichgewichtskonstanten  $K_B$  und  $K_F$  charakterisiert:

$$K_B = [M] [Z_B]/[M \cdot Z_B] \quad (1) \qquad K_F = [M] [Z_F]/[M \cdot Z_F] \quad (2)$$

Aus der Annahme dieses einfachen Systems mit den beiden Koordinationszentren  $Z_B$  und  $Z_F$ , deren Besetzung durch ein beliebiges Metallion das Enzym aktiviert bzw. hemmt, folgt somit zwingend, dass die Wirkung jedes beliebigen Metallions als ein Zusammenwirken von Aktivierung und Hemmung betrachtet werden muss.

Hemmungen durch Überschuss an aktivierendem Metallion sind in grosser Zahl



Fig. 1. Zu beobachtende relative Aktivität  $A_{\text{rel}}$  (—) in Abhängigkeit von verschiedener gegenseitiger Lage von Aktivierung (···) und Hemmung (----)

beobachtet<sup>13)</sup><sup>14)</sup> und auch theoretisch-enzymkinetisch behandelt worden<sup>14)</sup>. Die relative Aktivität  $A_{\text{rel}}$ <sup>15)</sup> des Enzyms hängt dabei derart von der freien Metallionen-Konzentration  $[M]$  ab, dass  $A_{\text{rel}}$ , gegen  $pM$ <sup>15)</sup> aufgetragen, glockenförmige Aktivität-pM-Kurven ergibt (s. Fig. 1), wie sie ähnlich z. B. auch für die Aktivität-pH-Beziehung der meisten Enzyme gefunden werden. Die Form dieser Kurven erklärt sich bekanntlich durch multiplikatives Zusammenwirken einer S-förmig ansteigenden Aktivierungsfunktion und einer spiegelsymmetrisch dazu abfallenden Hemmungsfunktion, wobei die Gesamtheit der möglichen Glockenkurven durch verschiedene gegenseitige Lage dieser beiden Funktionen zustande kommt (s. Fig. 1)<sup>14)</sup>. Von der gegenseitigen Lage der beiden S-Kurven hängt insbesondere auch die Höhe ab, die das Maximum der Glockenkurve erreicht: Setzt mit zunehmender Metallionen-Konzentration die Hemmung schon vor der Aktivierung ein, so kann die beobachtbare Aktivität unmessbar klein sein. Je höher der Wert von  $[M]$  ist, bei dem sich die Hemmung

<sup>13)</sup> S. z. B. N. VAN THOAI, J. ROCHE & M. ROGER, Biochim. biophysica Acta 1, 61 (1947); J. F. SPECK, J. biol. Chemistry 178, 315 (1948); L. H. STIKLAND, Biochem. J. 44, 190 (1949); C. S. VAIDYANATHAN & K. V. GIRI, Enzymologia 16, 167 (1953).

<sup>14)</sup> B. G. MALMSTRÖM, Arch. Biochemistry Biophys. 58, 381, 398 (1955).

<sup>15)</sup> Es werden im weiteren folgende Symbole verwendet:

A Beobachtete Aktivität.

$A_{\text{rel}} = A/A_{\text{max}}$  Verhältnis zwischen beobachteter und mit dem betreffenden Metallion maximal möglicher Aktivität.

$pM$  Negativer Logarithmus der Metallionen-Konzentration.

$K_M$  MICHAELIS-MENTEN-Konstante des Enzym-Substrat-Komplexes.

$[S]_t$  Totale Substrat-Konzentration.

$A'_{\text{max}} = (A_{\text{max}})_M/(A_{\text{max}})_{Mg}$  Verhältnis der Maximal-Aktivität für ein Metallion zu der für Magnesium.

$K_{ML}^M$  Dissoziations-Konstante des ML-Komplexes.

$K_{ko}$  Dissoziations-Konstante eines Enzym-Inhibitor-Komplexes (kompetitive Hemmung).

$[ ]_{EV}$  Konzentration im Endvolumen.

bemerkbar macht, desto näher wird die maximal zu beobachtende Aktivität der maximal möglichen kommen.

Nimmt man die verschiedenen Fälle der Fig. 1 nun als Bild für die Wirkungsweise verschiedener Metallionen, so ist ohne weiteres ersichtlich, dass die Grösse der mit einem bestimmten Metallion erzielbaren relativen Aktivität davon abhängt, ob die Hemmung des Enzyms durch das betreffende Metallion bei kleinerer, gleicher oder erst bei grösserer Metallionenkonzentration wirksam wird als seine Aktivierung. Dies bedeutet mit anderen Worten: Selbst wenn – wie wir oben unterstellten – die Aktivierung mit allen Metallionen an sich zum gleichen  $A_{\max}$  führen würde, so kommt doch eine Metallspezifität durch die unterschiedliche gegenseitige Lage von Aktivierung und Hemmung zustande. Optimaler Aktivator ist dasjenige Metallion, für welches der pM-Bereich zwischen 50-proz. Aktivierung und 50-proz. Hemmung am breitesten ist. Nennt man, wie allgemein üblich, den pM-Wert für 50-proz. Aktivierung  $pK_A$ , den für 50-proz. Hemmung  $pK_I$ , so soll dieser wirksame Aktivierungsbereich  $W$  eines Metallions definiert sein als

$$W = pK_A - pK_I. \quad (3)$$

Die Grösse von  $W$  für die verschiedenen Metallionen ist also das für die Metallspezifität entscheidende Kriterium. Wie hängt nun dieses  $W$  bei einem bestimmten Metallion mit den Komplexbildungs-Konstanten  $K_B$  und  $K_F$  zusammen, die der Hemmung bzw. Aktivierung zugrunde liegen?

Die Grössen  $K_A$  und  $K_I$  bestimmen durch die Gleichung

$$A_{\text{rel}} = \frac{[M]K_I}{[M]^2 + [M](K_A + K_I) + K_A K_I} \quad (4)$$

den Verlauf der Aktivität-pM-Kurve<sup>14)</sup>. Eine Gleichung mit gleichen Funktionen von  $[M]$ , jedoch mit den thermodynamischen Komplexbildungskonstanten  $K_B$  und  $K_F$  als Parametern, erhält man aus der enzymkinetischen Betrachtung der zugrundeliegenden Reaktionsschritte und Gleichgewichte<sup>16)</sup>. Unter der Annahme eines einfachen Aktivierungsmechanismus, bei welchem ein Substrat-Metall-Komplex das wirkliche Substrat der enzymatischen Reaktion ist, sowie einer nichtkompetitiven Hemmung, ergibt sich dann  $A_{\text{rel}}$  zu

$$A_{\text{rel}} = \frac{[M]K_F}{[M]^2 + [M]\left(\frac{K_M K_B}{K_M + [S]_t}\right) + \frac{K_M K_B K_F}{K_M + [S]_t}}. \quad (5)$$

Durch Parameter-Vergleich der Gleichungen (4) und (5) erhält man:

$$K_A = K_B K_M / (K_M + [S]_t) \quad (6) \quad \text{und} \quad K_I = K_F. \quad (7)$$

Auf ähnliche Weise ergibt sich für eine kompetitive Hemmung

$$K_I = K_F \cdot (K_M + [S]_t) / K_M \quad (8)$$

Für die betrachteten, ebenso wie für weitere zu diskutierende Mechanismen kann man also

$$K_A = K_B q_A \quad (9) \quad \text{und} \quad K_I = K_F q_I \quad (10)$$

$$\text{oder} \quad pK_A = pK_B + \log \frac{1}{q_A} \quad (9a) \quad \text{und} \quad pK_I = pK_F - \log q_I \quad (10a)$$

setzen. Es sind hierbei die Glieder

$$\log \frac{1}{q_A} \quad \text{und} \quad \log q_I \text{ stets } \geq 0. \quad (11)$$

<sup>16)</sup> Zur Ableitung der Gleichungen (4) und (5) sowie der entsprechenden Gleichungen für kompetitive Hemmung usw. s. z. B. J. S. FRIEDENWALD & G. D. MAENGWYN-DAVIES, in Mechanism of Enzyme Action, Baltimore 1954, p. 180.

Ihr Wert kann abhängen vom Mechanismus der enzymatischen Reaktion, ihrer MICHAELIS-MENTEN-Konstante  $K_M$  und der totalen Substrat-Konzentration  $[S]_t$ , also von Gegebenheiten des vorliegenden enzymatischen Systems. Es ist jedoch

$$\left( \log \frac{1}{q_A}, \log q_I \right)_I \text{ invariabel mit } M_I^{17)} \quad (12)$$

Man kann die spezifitätsbestimmende Grösse W formal zerlegen nach Gleichung (13)

$$W = D + A, \quad (13)$$

wobei nach Gleichungen (3), (9a) und (10a) D bzw. A folgende Bedeutung haben:

$$D = pK_B - pK_F \quad (14), \quad A = \log \frac{1}{q_A} + \log q_I. \quad (15)$$

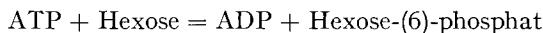
D stellt eine für jedes Metallion charakteristische komplexchemische Grösse dar, während A wegen (11) und (12) stets  $\geq 0$ , vor allem aber bei einer gegebenen enzymatischen Reaktion für alle Metallionen identisch ist. Der optimale Aktivator ist nunmehr dadurch bestimmt, dass innerhalb der Reihe der Metallionen der Ausdruck D für ihn am grössten ist.

Zur Frage, für welches oder für welche der Metallionen  $D \equiv \log (K_F/K_B)$  am grössten wird, lassen sich Aussagen machen, wenn man das Komplexbildungsvermögen der verschiedenen Metallionen mit  $Z_B$  einerseits und mit  $Z_F$  andererseits betrachtet. Wie oben ausgeführt, ist für die Aktivierung ATP-abhängiger Enzymreaktionen die Ausbildung eines Metall-ATP-Komplexes verantwortlich, und  $Z_B$  stellt somit die Haftstelle des Metallions am ATP dar.  $Z_F$  hingegen würde einer basischen Haftstelle am Proteinteil des Enzyms entsprechen. Zwar sind für die Reihe der Metallionen die entsprechenden Konstanten nicht bekannt, doch kommt es für eine Abschätzung von D nicht auf deren absolute Grösse, sondern nur auf die Veränderungen der entsprechenden pK-Werte innerhalb der Metallionen-Reihe an. Wir machen die Annahme, dass diese sog. «Spreitungskoeffizienten» sich abschätzen lassen, wenn man – etwas vergröbernd – an Stelle von  $K_B$  die entsprechenden Konstanten von Polyphosphat-Komplexen der verschiedenen Metallionen<sup>18)</sup> und für  $K_F$  die der Histidin- oder Cystein-Komplexe zum Vergleich heranzieht. Ein so erhaltenes schematisches Diagramm für  $pK_B$  und  $pK_F$  in Abhängigkeit vom Ionenpotential der verschiedenen Metallionen ist in Fig. 2 dargestellt. Es zeigt sich, dass zwar beide pK-Reihen – entsprechend der Regel von IRVING-WILLIAMS – monoton ansteigen,  $pK_F$  jedoch wesentlich steiler als  $pK_B$ . Wie aus Fig. 2 ersichtlich ist, bewirkt dieser unterschiedliche Anstieg, dass für die schwach koordinierenden Metallionen, insbesondere für  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ , die Grösse D maximale Werte annimmt. Auf diese Weise lässt sich zwanglos und in voller Übereinstimmung mit der Regel von IRVING-WILLIAMS die Sonderstellung dieser beiden Metallionen bei ATP-abhängigen Reaktionen erklären.

<sup>17)</sup> Es sind auch Mechanismen denkbar, bei denen die Ausbildungsgeschwindigkeit von E-S-M-Komplexen nach  $E-S+M \rightarrow E-S-M$  in  $q_A$  eingeht, ein Fall, der nach den Untersuchungen von MELCHIOR & MELCHIOR<sup>5)</sup> gerade bei der Hexokinase denkbar ist. Da jedoch die Stabilität der ATP-Komplexe mit verschiedenen Metallionen schon von gleicher Größenordnung ist, ist die Aufbaugeschwindigkeit von S-M- und mithin auch von E-S-M-Komplexen höchstwahrscheinlich erst recht von gleicher Größenordnung. Da die genannte Aufbaugeschwindigkeit in weniger als linearer Stärke in  $q_A$  eingeht, ist auch in diesem Fall eine Abhängigkeit des  $q_A$  von  $M_I$  wenig wahrscheinlich.

Die Mg-Spezifität kommt also nicht etwa dadurch zustande, dass sich eine Ligandenkonfiguration des enzymatischen Systems stärker mit  $Mg^{2+}$  als z. B. mit  $Cu^{2+}$  koordinieren würde, sondern vielmehr dadurch, dass sich das  $Mg^{2+}$  vorzugsweise mit ATP koordiniert, während das Enzym frei bleibt, wohingegen sich  $Cu^{2+}$  vorzugsweise mit dem Enzym verbindet.

Die in den Fig. 1 und 2 schematisch dargestellten Verhältnisse treffen nun für die **Hexokinase-Reaktion**, wie unsere im folgenden beschriebenen Versuche ergaben, tatsächlich in guter Näherung zu. Die Hexokinase katalysiert die Reaktion



und wird, wie viele andere ATP-abhängige Enzyme, durch  $Mg^{2+}$  aktiviert. Nach den obigen Ausführungen sollte jedoch auch mit den dem  $Mg^{2+}$  in der IRVING-WILLIAMS-Reihe benachbarten Metallionen eine gewisse Aktivierung zu beobachten sein. Wir

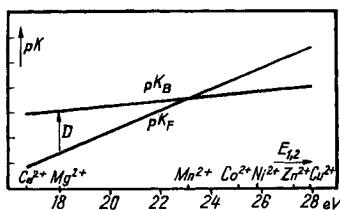


Fig. 2. Abhängigkeit der spezifitätsbestimmenden Grösse  $D = pK_B - pK_F$  für ein Metallion von der Stellung desselben in der IRVING-WILLIAMS-Reihe (schematisch)

untersuchten also zunächst die Aktivierung der Hexokinase durch eine Reihe verschiedener Metallionen.

Die Aktivität A der Hexokinase<sup>19)</sup> wurde manometrisch gemessen und hieraus die relative Aktivität  $A'_{\text{rel}} = A/(A_{\text{max}})_{Mg}$  berechnet.  $A'_{\text{rel}}$  und  $A_{\text{rel}}$  aus Gleichung (4) hängen somit nach Beziehungen (16) und (17) zusammen:

$$A'_{\text{rel}} = A_{\text{rel}} \cdot A'_{\text{max}}, \quad (16)$$

wobei

$$A'_{\text{max}} = A_{\text{max}} / (A_{\text{max}})_{Mg} \quad (17)$$

ist. ATP und zugegebenes Metallion bilden ein Metall-Puffersystem<sup>20)</sup>. Das sich dabei einstellende pH kann nach der von RAAFLAUB<sup>21)</sup> angegebenen Methode berechnet werden, wenn die entsprechende Konstante  $K_{\text{MATP}}^M$  bekannt ist<sup>22)</sup>.

<sup>18)</sup> Zur schematischen Charakterisierung des Verlaufs von  $K_F$  und  $K_B$  verwendeten wir Komplexbildungskonstanten von verschiedenen Polyphosphaten, Histidin, Histamin, Cystein und Cysteamin nach J. BJERRUM, G. SCHWARZENBACH & L. G. SILLÉN, Stability Constants, London 1958.

<sup>19)</sup> Wir verwendeten folgende Hefe-Hexokinase-Präparationen der SIGMA CHEM. CO.: Zur Bestimmung von Aktivitäten Typ IV, für spektrophotometrische Untersuchungen Typ V. Aktivierungskurven mit einer rohen Präparation (Typ II) wiesen keine Abweichungen gegenüber den mit Typ IV erhaltenen auf. Der Reinheitsgrad des Enzyms spielt offensichtlich für die Gültigkeit unserer Ergebnisse keine Rolle.

<sup>20)</sup> J. RAAFLAUB & I. LEUPIN, Helv. 39, 653 (1956).

<sup>21)</sup> J. RAAFLAUB, in Methods in Biochemical Analysis, Vol. 3, New York 1956, p. 301.

<sup>22)</sup> Bestimmung der Konstanten s. unten.

Wir fanden so, dass das Enzym ausser durch  $Mg^{2+}$  auch durch  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  aktiviert wird. Mit  $Cu^{2+}$  und  $Be^{2+}$  sowie mit  $Ca^{2+}$  konnte hingegen keine signifikante Aktivierung beobachtet werden. Die auf die angegebene Weise für die Metallionen  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  erhaltenen  $A'_{rel}$ -pM-Kurven sind in Fig. 3 dargestellt. Diese zeigt für jedes Metallion experimentell

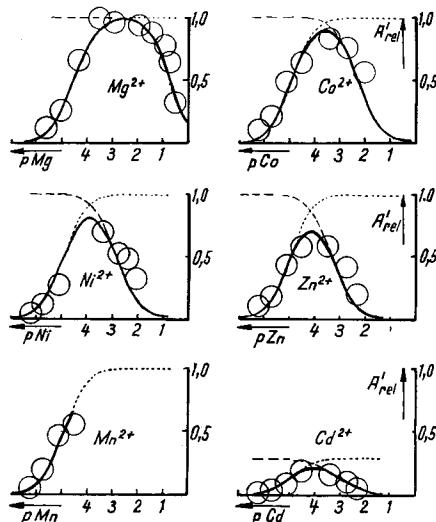


Fig. 3. Aktivierung der Hexokinase durch verschiedene Metallionen bei  $pH = 7,7$  und  $25,0^\circ$   
Gefundene Werte mit Fehlergrenzen (○) und theoretischer Verlauf der Aktivität-pM-Kurve (—) als Resultante aus Aktivierung (.....) und Hemmung (----) nach Gleichungen (4), (16) und (17)

gefundene Aktivierungen und eine nach Gleichungen (4), (16) und (17) berechnete theoretische Aktivierungskurve. Es ist ersichtlich, dass die gefundenen Werte innerhalb der Fehlergrenzen mit der theoretischen Kurve übereinstimmen, wenn für deren Berechnung die in Tab. 1 angegebenen Parameter gewählt werden.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, können also, entsprechend unserer eingangs gemachten Unterstellung,  $Mg$ -ATP,  $Co$ -ATP,  $Ni$ -ATP,  $Zn$ -ATP und möglicherweise<sup>23)</sup> auch  $Mn$ -ATP dem Enzym gleich gut als Substrat dienen<sup>24)</sup>. Eine Abstufung der Wirksamkeit dieser Metallionen kommt jedoch, wie Fig. 3 zeigt, durch die unterschiedliche Breite des wirksamen Aktivierungsbereichs  $W$  (s. oben) zustande.

Überraschend und vom Gesichtspunkt der eingangs entwickelten Überlegungen aus nicht zu erklären ist das geringe  $A'_{max}$  für  $Cd^{2+}$  und die völlige Unwirksamkeit des  $Ca^{2+}$ . Hierauf wollen wir später noch zurückkommen.

<sup>23)</sup> Bei der Aktivierung mit  $Mn^{2+}$  traten bei höheren  $[Mn]$  Niederschläge auf, so dass wir  $A'_{max}$  nicht mit Sicherheit,  $K_1$  überhaupt nicht bestimmen konnten.

<sup>24)</sup> Würde man bei der Berechnung der pM die Hydrolyse der Metallionen berücksichtigen, welche bei  $pH 7,7$  z. T. nicht unbeträchtlich ist, so würden bei allen  $M^{2+}$  ausser  $Mg^{2+}$  die Messpunkte der Fig. 3 einmal näher zusammenrücken und sodann insgesamt nach links verschoben. Dadurch würde die Übereinstimmung von Messpunkten und theoretischer Kurve noch besser, und ausserdem würden die Unterschiede der  $\log(1/q_A)$  in Tab. 1 weitgehend ausgeglichen.

Wir versuchten nun weiterhin, die Gleichgewichts-Konstanten  $pK_B$  und  $pK_F$  zu bestimmen, um sie mit den Aktivierungs- und Hemmungs-Konstanten  $pK_A$  und  $pK_I$  aus Tab. 1 zu vergleichen. Wie oben ausgeführt, ist  $pK_B = pK_{M\text{ATP}}^M$ . Die Konstanten  $pK_{M\text{ATP}}^M$  sind für eine Anzahl Metallionen bekannt, nicht jedoch für  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ . Wir bestimmten die Konstanten der ATP-Komplexe der genannten Metallionen und – zur Kontrolle der angewandten Methode – die für  $\text{Co}^{2+}$  durch

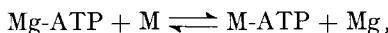
Tabelle 1. Parameter zu Figur 3

Metallion	$A'_{\max}$	$pK_I$	$pK_A$	$pK_B$	$\log(1/q_A)$
$\text{Mg}^{2+}$	1,0	0,7	4,6	$4,0^{26})^{27})$	0,6
$\text{Co}^{2+}$	1,0	2,3	5,0	4,6	0,4
$\text{Ni}^{2+}$	1,0	2,8	5,0	4,6	0,4
$\text{Zn}^{2+}$	1,0	3,3	5,0	$4,7^{28})^{29})$	0,3
$\text{Mn}^{2+}$	– <sup>23)</sup>	– <sup>23)</sup>	5,0	$4,7^{27})$	0,3
$\text{Cd}^{2+}$	0,28	3,0	5,0	4,7	0,3

Titration des ATP für sich und in Anwesenheit des jeweiligen Metallions. Wir erhielten mit dieser Methode, deren Einzelheiten wir im experimentellen Teil beschreiben, die in den Tab. 1 und 4 aufgeführten Konstanten<sup>25)</sup>. Für die Konstanten der anderen Metallionen benützten wir die in Tab. 1, Spalte 5 angegebenen, der Literatur entnommenen Werte.

Ein Vergleich zwischen  $pK_A$  und  $pK_B$  zeigt (Tab. 1), dass  $\log(1/q_A) = pK_A - pK_B$  für die untersuchten Metallionen von gleicher Größenordnung ist<sup>24)</sup>.

Um die Hemmwirkung der verschiedenen Metallionen unabhängig von gleichzeitig auftretender Aktivierung zu beobachten, untersuchten wir die Hemmung der  $\text{Mg}^{2+}$ -aktivierten Hexokinase-Reaktion durch verschiedene Metallionen. Als Schwermetall-Puffer diente hierbei das Mg-ATP-System entsprechend dem Gleichgewicht



wobei

$$\frac{[\text{M}]}{[\text{M-ATP}]} = \frac{[\text{Mg}]}{[\text{Mg-ATP}]} \cdot \frac{K_{\text{M}\text{ATP}}^M}{K_{\text{Mg}\text{ATP}}^{\text{Mg}}}. \quad (18)$$

Die Verteilung der totalen Schwermetallionen-Konzentration auf die Partikeln  $\text{M}^{2+}$  und  $\text{M-ATP}^{2-}$  ist gemäss Gleichung (18) ausser durch die zwei Gleichgewichts-Konstanten vor allem durch die Variable  $[\text{Mg}]$  bestimmt. Durch Anwendung eines verschieden grossen Mg-Überschusses lässt sich somit kontrollieren, welche der Partikeln,  $\text{M}^{2+}$  oder  $\text{M-ATP}^{2-}$ , für die Hemmung des Enzyms verantwortlich ist.

<sup>25)</sup> Unser Wert für  $pK_{\text{CoATP}}^{\text{Co}}$  = 4,53 stimmt mit dem von WALAAS<sup>27)</sup> zu 4,62 ermittelten befriedigend überein.

<sup>26)</sup> A. E. MARTELL & G. SCHWARZENBACH, Helv. 39, 653 (1956).

<sup>27)</sup> E. WALAAS, Acta chem. scand. 12, 528 (1958).

<sup>28)</sup> G. WEITZEL & T. SPEER, Z. physiol. Chem. 313, 212 (1958).

<sup>29)</sup> Die Zn-Konstante hatten wir bei früheren, unveröffentlichten Versuchen mittels Kationenaustauscher-Untersuchungen zu  $pK_{\text{ZnATP}}^{\text{Zn}} = 4,69$  gefunden. Der von WEITZEL & SPEER<sup>28)</sup> ermittelte Wert beträgt 4,76.

In Fig. 4 ist die Hemmung durch Zn als Aktivität-pZn-Kurve für drei verschiedene Mg-Konzentrationen dargestellt. Die Figur zeigt, dass 50-proz. Hemmung jeweils bei  $pZn = 3,2 \pm 0,15$  eintritt, obgleich der Anteil der Zn-ATP<sup>2-</sup>-Ionen an der gesamten ATP-Konzentration in den verschiedenen Fällen 43, 20 und 3% beträgt. Der so ermittelte Wert von  $(pK_I)_{Zn} = 3,2$  stimmt, wie theoretisch zu erwarten, mit dem in Tab. 1 angegebenen innerhalb der Fehlergrenzen überein. Für Cu<sup>2+</sup> ergibt sich in gleicher Weise  $(pK_I)_{Cu} = 6,0$ .

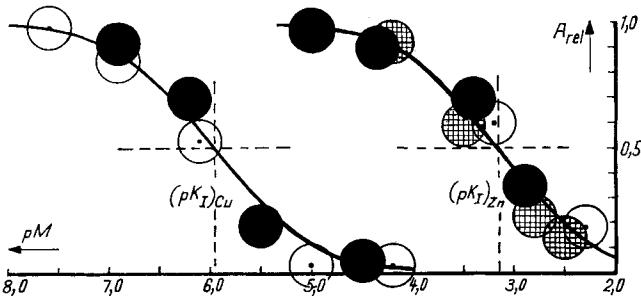


Fig. 4. Hemmung der Hexokinase durch  $Cu^{2+}$  (links) und  $Zn^{2+}$  (rechts)

Restaktivität  $A_{rel}$  in Abhängigkeit von  $pM$ , gemessen bei verschiedenem Mg-Überschuss:

$\circ [MgSO_4]_{EV} = 1,0 \cdot 10^{-2}$ ,  $\bullet [MgSO_4]_{EV} = 1,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $\oplus [MgSO_4]_{EV} = 6,0 \cdot 10^{-2}$

Andere Verhältnisse als für  $Zn^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  fanden wir, wie erwähnt, bei der Hemmung des Enzyms durch  $Ca^{2+}$ . Während dort wegen Gleichung (18) mit zunehmendem Mg-Überschuss geringere totale Inhibitor-Konzentrationen notwendig waren, um das Enzym zu 50% zu hemmen, war hier das Umgekehrte der Fall, d. h.

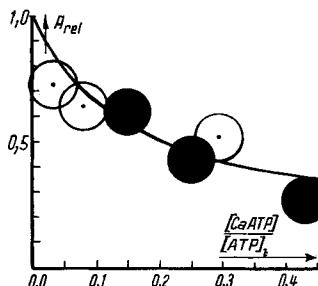


Fig. 5. Hemmung der Hexokinase durch  $Ca^{2+}$

Restaktivität  $A_{rel}$  in Abhängigkeit von  $[CaATP]/[ATP]_t$ , gemessen bei verschiedenem Mg-Überschuss:  $\circ [MgAc_2] = 1,0 \cdot 10^{-2}$ ,  $\bullet [MgAc_2] = 6,0 \cdot 10^{-2}$

verantwortlich für die Hemmung ist hier die Verdrängung des  $Mg^{2+}$  vom ATP durch  $Ca^{2+}$ . Das Ausmass der Hemmung ist hier also nicht eine Funktion von  $pCa$ , sondern des Verhältnisses  $[Ca-ATP]/[ATP]_t$ . Wie Fig. 5 zeigt, tritt 50-proz. Hemmung dann ein, wenn ca. 20–30% des gesamten ATP als Ca-ATP vorliegen, obwohl infolge verschiedenen Mg-Überschusses  $pCa$  hierbei einmal 1,7, das andere Mal 3,0 beträgt.

Der Verlauf der Hemmung in Fig. 5 wird am besten beschrieben durch die Annahme, dass Ca-ATP das Enzym in Kompetition mit Mg-ATP hemmt. Ist, wie in

unserem Fall, die Substrat-Konzentration [Mg-ATP] wesentlich grösser als die zugehörige MICHAELIS-MENTEN-Konstante  $K_M^{30)}$ , so hängt die relative Aktivität bei kompetitiver Hemmung mit [Ca-ATP] durch Beziehung (19) zusammen:

$$\frac{K_{ko}}{K_M} = \frac{[CaATP]}{[ATP]_t - [CaATP]} \cdot \frac{A_{rel}}{1 - A_{rel}}. \quad (19)$$

Für die Dissoziationskonstante  $K_{ko}$  des CaATP-Enzym-Komplexes ergibt sich so aus den Messpunkten der Fig. 5

$$K_{ko} = K_M \cdot 0,18 (\pm 20\%).$$

Diese Grössenordnung von  $K_{ko}$  im Verhältnis zu  $K_M$  deutet darauf hin, dass die Komplexe, welche Ca-ATP und Mg-ATP mit dem Enzym bilden, grössenordnungs-mässig gleiche Stabilität aufweisen, wobei jedoch der Ca-ATP-Enzym-Komplex nicht enzymatisch aktiv ist<sup>31)</sup>. Der Ca-ATP-Enzym-Komplex ist jedoch zumindest so stabil wie derjenige mit MgATP. Dies bedeutet, dass das geringe  $A'_{max}$  bei der Aktivierung mit  $Ca^{2+}$ , und wohl auch mit  $Cd^{2+}$ , seine Ursache in einer geringen «breakdown»-Geschwindigkeit des M-ATP-Enzym-Komplexes haben muss.

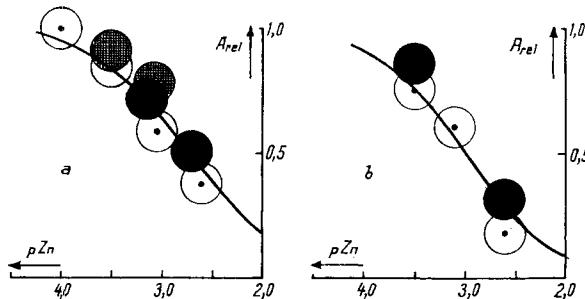


Fig. 6. Abhängigkeit der  $Zn^{2+}$ -Hemmung

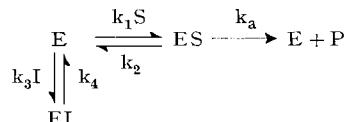
- a) von der ATP-Konzentration: ○  $[ATP] = 4 \cdot 10^{-3}$ , ⊕  $[ATP] = 1 \cdot 10^{-2}$ , ●  $[ATP] = 2,5 \cdot 10^{-2}$ <sup>32)</sup>  
 b) von der Fructose-Konzentration: ○  $[Fruct] = 1,5 \cdot 10^{-2}$ , ●  $[Fruct] = 1,0 \cdot 10^{-1}$

<sup>30)</sup> Die Abhängigkeit eines Enzyms von der Konzentration eines kompetitiven Hemmstoffs ist gegeben durch Gleichung (33)<sup>16)</sup>

$$\frac{A_{max}}{A} = 1 + \frac{K_M}{[S]_t} + \frac{[I] \cdot K_M}{[S]_t \cdot K_{ko}}. \quad (33)$$

Für  $[S]_t \gg K_M$  ergibt sich hieraus Gleichung (19).  $[S]_t$  war bei unseren Versuchen  $10^{-2} M$ .  $K_M$  ist nach M. W. SLEIN, G. T. CORI & C. F. CORI, J. biol. Chemistry 186, 763 (1950), ca.  $4 \cdot 10^{-5}$ .

<sup>31)</sup> Ist in dem Schema



$k_1 = k_3$  und  $k_2 = k_4$ , so muss

$$K_{ko} = \frac{k_2}{k_1} < K_M = \frac{k_2 + k_a}{k_1}$$

sein.

<sup>32)</sup> Da wir die Ionenstärke bei dieser Versuchsreihe durch Zugabe von Tetramethylammoniumbromid auf  $I = 0,2$  konstant halten mussten (bei allen anderen Versuchen:  $I = 0,08$  bis  $0,11$ ), war das pH des Hydrogencarbonat- $CO_2$ -Puffers hier auf 7,45 erniedrigt. Dadurch erscheint ( $pK_1$ )<sub>Zn</sub> zu etwas geringeren Werten verschoben.

Die Untersuchung der Zn-Hemmung bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen ergab, dass für ATP-Konzentrationen von  $4 \cdot 10^{-3}$  bis  $2,5 \cdot 10^{-2} M$  und für Fructose-Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-2}$  bis  $1 \cdot 10^{-1} M$   $pK_I$  weder von der ATP-Konzentration noch von der Fructose-Konzentration abhängt. Da die Hemmung somit nicht-kompetitiv ist (s. Fig. 6), ist nach Beziehung (7)  $K_F = K_I$ .

Es lässt sich nun, da sowohl die Werte für  $pK_B$  als auch die für  $pK_F$  ( $\equiv pK_I$  aus Tab. 1) für die verschiedenen Metallionen bekannt sind, die in Fig. 2 schematisch dargestellte Abhängigkeit der spezifitätsbestimmenden Grösse D für ein Metallion von dessen Stellung in der IRVING-WILLIAMS-Reihe genau angeben. Wie Fig. 7 zeigt, ist  $D_{Mg} = 3,3$ ,  $D_{Zn} = 1,5$  und  $D_{Cu} = -0,5$ .

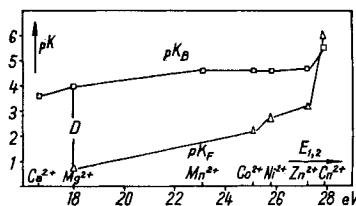


Fig. 7. Abhängigkeit der spezifitätsbestimmenden Grösse  $D = pK_B - pK_F$  für ein Metallion von der Stellung desselben in der IRVING-WILLIAMS-Reihe

Die Frage, mit welcher funktionellen Gruppe der Hexokinase das hemmende Metallion unter Blockierung der Reaktion koordiniert, ist für das Verständnis des Ablaufs der enzymatischen Reaktion von grossem Interesse. Obwohl diese Frage nicht mit Sicherheit beantwortet werden konnte, erhielten wir doch Hinweise darauf, dass – ähnlich wie bei der von SCHUBERT<sup>33)</sup> untersuchten Hemmung der «Alkalischen Phosphatase» durch  $Be^{2+}$  – auch die Schwermetallionen-Hemmung der Hexokinase auf einer Blockierung der phenolischen OH-Gruppe eines Tyrosyl-Restes beruht<sup>34)</sup>.

Nach SCHAUENSTEIN<sup>35)</sup> lässt sich die Dissoziation solcher Tyrosyl-OH-Gruppen in einem Protein durch die Beobachtung der Zunahme der Absorption bei 295 und 250  $m\mu$  in Abhängigkeit vom pH spektrophotometrisch verfolgen. Für die Säure-dissoziations-Konstante der Tyrosyl-Gruppen eines hochgereinigten Hexokinase-Präparates<sup>19)</sup> fanden wir so (s. Fig. 8) in guter Übereinstimmung mit anderweitig gefundenen  $pK_a$ -Werten<sup>35)</sup>  $pK_a = 10,5$ . Interessanterweise ist nun die durch die Dissoziation der Phenolgruppe bedingte Absorptionszunahme in Gegenwart von  $10^{-3} M$   $Mg^{2+}$  nach kleineren pH-Werten hin verschoben. Eine solche Verschiebung ist zu erwarten, wenn mit Phenol und Phenolat ein Phenolat-Mg-Komplex im Gleichgewicht steht, welcher eine ähnliche Absorption wie das freie Phenolat aufweist.

Ausserdem bestimmten wir für eine geeignete Modellsubstanz, o-Hydroxybenzylamin<sup>34)</sup>, durch pH-Titrationen im An- und Abwesenheit der Metallionen die

<sup>33)</sup> J. SCHUBERT, in Chemical Specificity in biological Interactions, New York 1954, p. 114.

<sup>34)</sup> Die Stabilität der E-M-Komplexe spricht dafür, dass diese Chelat-Komplexe sind, also ausser der Phenol-Gruppe noch eine zweite Haftstelle vorhanden ist. Über die Natur dieser zweiten Gruppe lässt sich nichts aussagen, der Chelatring ist jedoch vermutlich ein durch die Proteinstruktur bedingter Makroring. Wir wählten das o-Hydroxybenzylamin als einfachste Modellverbindung, bei der ein solcher zweiter Chelatzahn ohne Konjugation zum Phenol vorhanden ist.

<sup>35)</sup> E. SCHAUENSTEIN, Mikrochemie 1955, 481.

Stabilitätskonstanten der  $\text{Co}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ -,  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -1:1-Komplexe. Das aus den  $\text{pK}_1$ -Werten (s. Tab. 2) berechnete Metallbindungsvermögen dieser Modellsubstanz bei physiologischem pH (7,7)<sup>36)</sup> zeigt in der Reihe der Metallionen (s. Fig. 9) einen Verlauf, der demjenigen der  $\text{pK}_1$ -Werte aus Fig. 7 mit befriedigender Genauigkeit gleicht. Bei anderen Verbindungen, wie Cysteamin oder Histamin<sup>18)</sup>, ist dies nicht der Fall.

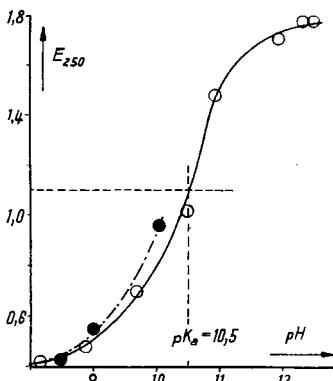


Fig. 8. Abhängigkeit der Extinktion einer Hexokinase-Lösung (0,75 mg/ml in 0,1N KCl) bei 250 mμ vom pH

○ allein, ● in Gegenwart von  $10^{-3}$  M  $\text{MgSO}_4$

Tabelle 2. Konstanten für o-Hydroxybenzylamin

$\text{pK}_{\text{CuL}}^{\text{Cu}}$	$\text{pK}_{\text{ZnL}}^{\text{Zn}}$	$\text{pK}_{\text{NiL}}^{\text{Ni}}$	$\text{pK}_{\text{CoL}}^{\text{Co}}$	$\text{pK}_{\text{HL}}^{\text{H}}$	$\text{pK}_{\text{H}_2\text{L}}^{\text{H}}$
9,3	5,9	5,4	4,6	9,9	8,4

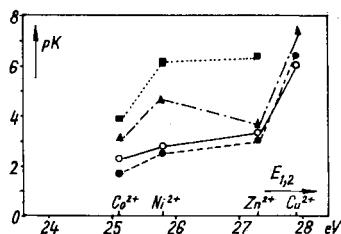


Fig. 9. Metallbindungsvermögen bei pH 7,7

○ aktives Zentrum der Hexokinase, ● o-Hydroxybenzylamin, ▲ Histamin, ■ Cysteamin

Da sich bei unseren Untersuchungen die Hemmung durch Schwermetallionen als nicht kompetitiv erwiesen hat, wäre eine solche Tyrosylgruppe somit nicht an der Fixierung der Substrate, sondern offensichtlich an der eigentlichen Enzymreaktion, der Übertragung der Phosphatgruppe beteiligt.

Die experimentellen Untersuchungen haben gezeigt, dass die eingangs entwickelten komplexchemischen Überlegungen eine brauchbare Arbeitshypothese für die

<sup>36)</sup> G. WEITZEL, J. ENGELMANN & A. M. FRETZDORFF, Z. physiol. Chem. 315, 236 (1959).

Erklärung der Metall-Spezifität ATP-abhängiger Enzyme darstellen. Weiterhin existiert jedoch, wie sich im Verlauf unserer Untersuchungen ergeben hat, eine weitere wichtige Determinante der Metall-Spezifität, nämlich die Geschwindigkeit  $A'_{\max}$ , mit der die aktiven Metall-ATP-Enzym-Komplexe der verschiedenen Metallionen enzymatisch weiterreagieren. Hierbei scheinen die Ionenradien der aktivierenden Metallionen eine Rolle zu spielen. Dafür spricht jedenfalls die Tatsache, dass  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  mit Ionenradien zwischen 0,66 und 0,74 Å ein  $A'_{\max}$  von ~1 aufweisen, während bei  $Cd^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  mit Ionenradien von 0,96 bzw. 0,99 Å nur ein  $A'_{\max}$  von 0,28 bzw. <0,05 erreicht wird<sup>37)</sup>. Welche komplexchemischen oder enzymkinetischen Gegebenheiten im einzelnen für das Zustandekommen der unterschiedlichen  $A'_{\max}$  verantwortlich sind, bedarf noch der weiteren Abklärung.

Herrn Professor ERLENMEYER sei an dieser Stelle für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit bestens gedankt. Herrn Dr. B. PRIJS danken wir für seine Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts. Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für seine Unterstützung.

**Experimentelles.** – *Aktivitätsbestimmungen.* Die Aktivität der Hexokinase bestimmten wir manometrisch in  $NaHCO_3/CO_2$ -Puffer, wie mehrfach beschrieben<sup>20,38)</sup>, in geeichten WARBURG-Gefäßen. In den Hauptraum wurden eingefüllt: 0,40 ml 0,10M  $NaHCO_3$ , 0,40 ml 0,20M Fructose-Lösung,  $Na_4ATP$ , M- $Na_2ATP$  und  $MSO_4$  in den in Tab. 3 angegebenen Mengen, so dass  $[ATP]_t = 10^{-2}$ . Mit  $H_2O$  wurde auf 1,80 ml aufgefüllt. Im Seitenarm befanden sich 0,2 ml einer Lösung von Hexokinase<sup>19)</sup> (100  $\mu$ /ml) in 0,04M Fructose-Lösung. Die Lösungen wurden mit einem Gasgemisch aus 5%  $CO_2$  und 95%  $N_2$  gesättigt und 20–30 Min. auf 25° vortemperiert. Dann wurde gekippt und als Aktivität die ausgeschüttete  $CO_2$ -Menge in  $mm^3/Min.$  gemessen. Da eine Extrapolation der Ausschüttungsgeschwindigkeit auf  $t = 0$  sich nicht mit genügender Sicherheit durchführen liess, wurde die von der 5. bis zur 15. Min. gemittelte Geschwindigkeit als Anfangsgeschwindigkeit betrachtet. Der Umsatz betrug hierbei im allgemeinen < 10% der gesamten ATP-Menge. Das Verhältnis  $A_{rel} = A/A_{\max}$  war im übrigen von der Dauer, über welche die Geschwindigkeiten gemittelt wurden, nur sehr wenig abhängig. Die nach der von RAAFLAUB<sup>21)</sup> angegebenen Methode berechneten pM-Werte sind für die verschiedenen Versuche ebenfalls in Tabelle 3 aufgeführt, wobei für  $p(K_{MgATP}^{Mg} \cdot 1/\alpha)$  ein Wert von 3,9 und für die übrigen  $p(K_{MgATP}^M \cdot 1/\alpha)$  ein solcher von 4,6 angenommen wurde.

Tabelle 3. Ansätze in ml

$Na_4ATP$ 0,04 M	0,49	0,46	0,38	0,20							
$MNa_2ATP$ 0,001M	0,50										
$MNa_2ATP$ 0,01 M		0,15	0,50								
$MNa_2ATP$ 0,04 M				0,30	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
$MSO_4$ 0,025M						0,20	0,50				
$MSO_4$ 0,25 M							0,10	0,30			
$MSO_4$ 1,25 M									0,20	0,32	0,50
pMg	5,6	5,0	4,3	3,6	2,9	2,6	2,3	1,9	1,4	0,9	0,7
pCo, pNi usw.	6,2	5,7	5,1	4,4	3,4	2,7	2,3	1,9			0,5

*Bestimmung der Konstanten  $K_{MgATP}^M$ .* 10 ml einer Lösung, welche  $10^{-2}M$  an ATP und 0,1M an KCl sowie gegebenenfalls  $2 \cdot 10^{-3}M$  an  $MSO_4$  war, wurde mit 0,1N NaOH potentiometrisch titriert (Glaselektrode: METROHM E 121, Potentiometer: METROHM E 187). Es wurden so Titra-

<sup>37)</sup> Die Ionenradien sind entnommen aus <sup>3)</sup>. Über  $A'_{\max}$  für  $Cu^{2+}$  lässt sich auf Grund unserer Versuchsergebnisse nichts aussagen.

<sup>38)</sup> L. BERGER, M. W. SLEIN, S. P. COLOWICK & C. F. CORI, J. gen. Physiol. 29, 379 (1946).

tionskurven von ATP allein, sowie von ATP in Gegenwart von  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{BeSO}_4$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$  und  $\text{CdSO}_4$  aufgenommen (s. Fig. 10). Aus diesen wurde für jedes Metallion bei einer Reihe von pH-Werten der Mehrverbrauch  $\Delta H$  an NaOH gegenüber der Titration ohne Metallion bestimmt.  $K_{\text{MATP}}^{\text{M}}$  lässt sich hieraus folgendermassen bestimmen:

$\Delta H$  ist bestimmt durch Gleichung (20):

$$\Delta H = 2[\text{H}_2\text{Z}] + [\text{HZ}] - 2[\text{H}_2\text{Z}'] - [\text{HZ}'] - [\text{M-HZ}]. \quad (20)$$

Berücksichtigt man, dass

$$[\text{HZ}] = [\text{H}_2\text{Z}]/[\text{H}] K_3 \quad ^{39)} \quad (21)$$

$$[\text{HZ}'] = [\text{H}_2\text{Z}']/[\text{H}] K_3 \quad (22)$$

$$[\text{M-HZ}] = \frac{[\text{H}_2\text{Z}']}{[\text{H}] K_3} [\text{M}] \frac{1}{K_{\text{MATP}}^{\text{M}}} \quad (23)$$

und

$$[\text{M-Z}] = \frac{[\text{H}_2\text{Z}']}{[\text{H}]^2 K_3 K_4} [\text{M}] \frac{1}{K_{\text{MATP}}^{\text{M}}} \quad ^{39)} \quad (24)$$

ist und dass ferner bei einem  $\text{pH} < 5,0$ , bei welchem  $[\text{Z}]$  als Summand vernachlässigt werden kann,

$$[\text{H}_2\text{Z}] + [\text{HZ}] = [\text{Z}]_t, \quad (25)$$

$$[\text{H}_2\text{Z}'] + [\text{HZ}'] + [\text{MHZ}] + [\text{MZ}] = [\text{Z}]_t \quad (26)$$

und

$$[\text{M}] + [\text{MHZ}] + [\text{MZ}] = [\text{M}]_t \quad (27)$$

ist, so ist ersichtlich, dass die Zahl der Unbekannten um eins grösser ist als die Zahl der unabhängigen Bestimmungsgleichungen. Eine Berechnung von  $K_{\text{MATP}}^{\text{M}}$  muss deshalb mit zwei Wertepaaren von  $\Delta H$  und  $[\text{H}]$  durchgeführt werden:  $(\Delta H)_1$ ,  $[\text{H}]_1$  und  $(\Delta H)_2$ ,  $[\text{H}]_2$ . Man erhält auf

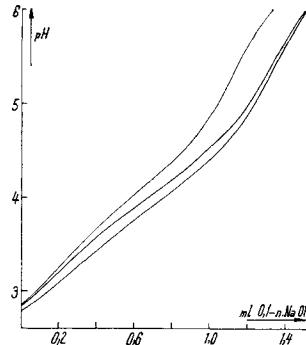


Fig. 10. Titration von 0,1 mMol ATP

allein (oben), sowie in Gegenwart von  $2 \cdot 10^{-2}$  mMol  $\text{CoSO}_4$  (Mitte) und von  $2 \cdot 10^{-2}$  mMol  $\text{CuSO}_4$  (unten)

diese Weise, unter Verwendung der Gleichungen (20)–(27) folgende Bestimmungs-Gleichung für  $K_{\text{MATP}}^{\text{M}}$ :

$$\frac{1}{K_{\text{MATP}}^{\text{M}}} = K_4 \cdot V \cdot \frac{\frac{a_1}{b_1} - \frac{a_2}{b_2}}{\frac{b_2 - [Z]_t[M]_t}{b_2[H]_2} - \frac{b_1 - [Z]_t[M]_t}{b_1[H]_1}}, \quad (28)$$

in welcher

$$a_{1,2} = (\Delta H)_{1,2} \cdot ([\text{H}]_{1,2} \cdot K_3 + 1) \quad (29)$$

und

$$b_{1,2} = ([Z]_t + [M]_t) \cdot (\Delta H)_{1,2} - [Z]_t[M]_t \cdot \frac{[\text{H}]_{1,2} K_3}{1 + [\text{H}]_{1,2} K_3} \quad (30)$$

<sup>39)</sup> In  $K_3 = 10^{4,12}$  und  $K_4 = 10^{6,50}$  sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Gegensatz zu allen anderen Gleichgewichtskonstanten Assoziationskonstanten verwendet worden.

ist und V den Faktor bedeutet, um den die Messlösung durch die zugegebene NaOH verdünnt ist. Die für die untersuchten Metallionen bei verschiedenen pH-Werten gefundenen  $\Delta H$ -Werte und die hieraus nach Gleichungen (28)–(30) berechneten Konstanten  $K_{\text{MATP}}^M$  sind in Tab. 4 zusammengestellt.

*Untersuchung der Enzym-Hemmung.* Ansätze: Im Hauptteil 0,5 ml 0,25M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 ml 0,143-M Fructose-Lösung, 0,5 ml einer Lösung, welche an ATP 5·10<sup>-2</sup>M. und an MgSO<sub>4</sub> 5·10<sup>-2</sup>, 7,5·10<sup>-2</sup> oder 3,0·10<sup>-1</sup>M war (eingestellt auf pH 7,6), dazu MSO<sub>4</sub> in verschiedenen Konzentra-

Tabelle 4. Bestimmung von  $K_{\text{MATP}}^M$

Metallion	pH	$\Delta H$ (mM/ml)	$pK_{\text{MATP}}^M$ n.Gl. (28)	Mittelwert	Mittl. Fehler
$\text{Cu}^{2+}$	3,00	$0,60 \cdot 10^{-3}$	5,50 5,51	5,50	$\pm 0,01$
	3,50	$1,29 \cdot 10^{-3}$			
	4,00	$1,79 \cdot 10^{-3}$			
$\text{Be}^{2+}$	3,20	$0,72 \cdot 10^{-3}$	5,00 5,04 5,00	5,01	$\pm 0,02$
	3,70	$1,10 \cdot 10^{-3}$			
	4,20	$1,44 \cdot 10^{-3}$			
	4,70	$1,61 \cdot 10^{-3}$			
$\text{Cd}^{2+}$	3,20	$0,46 \cdot 10^{-3}$	4,67 4,77 4,67	4,70	$\pm 0,05$
	3,70	$0,86 \cdot 10^{-3}$			
	4,20	$1,28 \cdot 10^{-3}$			
	4,70	$1,59 \cdot 10^{-3}$			
$\text{Ni}^{2+}$	3,20	$0,39 \cdot 10^{-3}$	4,60 4,66 4,56	4,61	$\pm 0,04$
	3,70	$0,76 \cdot 10^{-3}$			
	4,20	$1,18 \cdot 10^{-3}$			
	4,70	$1,57 \cdot 10^{-3}$			
$\text{Co}^{2+}$	3,20	$0,39 \cdot 10^{-3}$	4,49 4,59 4,50	4,53	$\pm 0,05$
	3,70	$0,72 \cdot 10^{-3}$			
	4,20	$1,12 \cdot 10^{-3}$			
	4,70	$1,55 \cdot 10^{-3}$			

tionen von  $2 \cdot 10^{-5}$  bis  $3,12 \cdot 10^{-2}$ M und H<sub>2</sub>O auf 2,3 ml. Im Seitenteil 0,2 ml einer Lösung von Hexokinase (125 γ/ml) in 0,143M Fructose-Lösung. Endvolumen 2,5 ml, pH = 7,7 nach dem Sättigen mit CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>. Bei der Hemmung durch Ca<sup>2+</sup> mussten zur Vermeidung von Niederschlägen<sup>40)</sup>

<sup>40)</sup> Es konnte so das Auftreten von Sulfat-, Carbonat- und Hydrogencarbonat-Niederschlägen vermieden werden. Bei höherer CaATP-Konzentration ( $> 0,25 \cdot 10^{-2}$ M) fiel jedoch auch dieses aus. Bei Messpunkten der Fig. 5, bei denen die Rechnung [CaATP] > 0,25 · 10<sup>-2</sup> ergab, setzten wir deshalb [CaATP] = 0,25 · 10<sup>-2</sup> und berücksichtigten die Verminderung der [MgATP] gemäss dem ausgefallenen CaATP. So ausgewertete Messpunkte ergaben gleiche K<sub>ko</sub>.

folgende Bedingungen gewählt werden: Verwendung von Magnesiumacetat statt Magnesiumsulfat und  $[NaHCO_3]_{EV} = 1,5 \cdot 10^{-2}$  M. Es war hier nach dem Sättigen mit  $CO_2/N_2$  pH = 7,45. Die Konzentrationen [M] und [M-ATP] wurden mit Hilfe der Gleichungen

$$\frac{[M-ATP]}{[MgATP]} = \frac{[M] K_{MgATP}^M}{[Mg] K_{MgATP}^M} \quad (31) \quad \text{und} \quad [M] = [M]_t \frac{1}{1 + \frac{K_{MgATP}^M \cdot [MgATP]}{K_{MgATP}^M \cdot [Mg]}} \quad (32)$$

durch Näherung ermittelt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht, eine Erklärung der Metallionen-Spezifität von ATP-abhängigen Enzymreaktionen zu geben, die mit der Regel von IRVING-WILLIAMS im Einklang steht. Es wurde theoretisch deduziert und experimentell bestätigt, dass verschiedenartige Überlagerung von Aktivierungs- und Hemmwirkung bei verschiedenen Metallionen eine solche Erklärung ermöglicht.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel

## 6. Über die Struktur des Chartreusins

(Vorläufige Mitteilung)

von E. SIMONITSCH, W. EISENHUTH, O. A. STAMM und H. SCHMID

(26. X. 59)

Chartreusin<sup>1)</sup> (Antibiotikum X-465 A<sup>2)</sup>), glycosidisches Antibiotikum von ARCAMONE *et al.*<sup>3)</sup> und wahrscheinlich Chartreusin-ähnliches Antibiotikum von ISHII *et al.*<sup>4)</sup>) aus *Streptomyces* wurde von STERNBACH, KAISER & GOLDBERG<sup>5)</sup> einer ersten eingehenden chemischen Untersuchung unterworfen. Das Antibiotikum C<sub>32</sub>H<sub>34-36</sub>O<sub>14</sub> gibt bei der säurekatalysierten Hydrolyse ein gelbes Aglykon C<sub>19</sub>H<sub>10-12</sub>O<sub>6</sub> und je eine Molekel D-Fucose und D-Digitalose. Das Aglykon selbst enthält zwei phenolische Hydroxylgruppen, einen Lactonring und zwei Sauerstoffatome unbestimmter Natur; Dehydrierung eines weitgehend aushydrierten Präparates lieferte x-Methyl-2-phenyl-

<sup>1)</sup> B. E. LEACH, K. M. CALHOUN, L. E. JOHNSON, C. M. TEETERS & W. G. JACKSON, J. Amer. chem. Soc. 75, 4011 (1953).

<sup>2)</sup> J. BERGER, L. H. STERNBACH, R. G. POLLOCK, E. R. LA SALA, S. KAISER & M. W. GOLDBERG, J. Amer. chem. Soc. 80, 1636 (1958); cf. XIV Internationaler Kongress für reine und angewandte Chemie, Zürich 1955, Referatenband, S. 233.

<sup>3)</sup> F. ARCAMONE, F. BIZIOLI & T. SCOTTI, Antibiotics & Chemotherapy 6, 283 (1956).

<sup>4)</sup> Y. ISHII, H. SAKAI, T. TANAKA, H. VI, M. UCHIYAMA, K. HIRAYAMA & H. YOUCARA, J. Antibiotics (Japan), Ser. A, 8, 96 (1955).

<sup>5)</sup> L. H. STERNBACH, S. KAISER & M. W. GOLDBERG, J. Amer. chem. Soc. 80, 1639 (1958).