

Helt. Rugonfalvy Kiss Istvan egyet. ny. f. tanár úrnak halás listeleket
 E 16/8
 Tankó Béla

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, E. Hammarsten-Stockholm, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Henri-Zürich, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, B. Kisch-Köln, A. J. Kluyver-Delft, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, S. Loewe-Mannheim, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Baltimore, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Hamburg, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Príanischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, A. Rippel-Göttingen, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Berlin, F. Verzá-Debreczen, O. Warburg-Berlin, H. J. Waterman-Delft, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Sonderabdruck aus 210. Band. 1.—3. Heft

J. Bodnár und Béla Tankó:

**Wirkungsmechanismus der Muskel-phosphatase, -cozymase
und des Insulins**



Berlin

Verlag von Julius Springer

1929

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt *M* 28.—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1\frac{1}{2}$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Kurze Mitteilungen wichtigen Inhalts können außerhalb der Reihenfolge des Einlaufdatums abgedruckt werden, wenn sie den Raum von 1—2 Druckseiten nicht überschreiten. — Abhandlungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18, zu richten.

Das Honorar beträgt *M* 40.— für den 16seitigen Druckbogen.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1\frac{1}{2}$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Der Verlag bittet, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen und, falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

210. Band.

Inhaltsverzeichnis.

1.—3. Heft.

	Seite
Okuneff, N. Eine bequeme Mikro-Chinhydronelektrode zur Messung der Wasserstoffionenkonzentration in sehr kleinen Gewebsstücken .	1
Krebs, Hans Adolf und J. F. Donegan. Manometrische Messung der Peptidspaltung	7
Fodor, A. und Chasuva Epstein. Untersuchungen über den Abbau der Gelatine mit Essigsäureanhydrid. Isolierung acetylierter Assoziate von partiell anhydrierten Polypeptiden. IV. Mitteilung über den Abbau von Proteinen und ihrer Derivate	24
Charlet, Marie. Der Gehalt des Blutes an Gallensäuren unter verschiedenen physiologischen Bedingungen	42

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

E 16/8

Wirkungsmechanismus der Muskel-phosphatase, -cozymase und des Insulins.

Von

J. Bodnár und Béla Tankó.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität in Debrecen.)

(Eingegangen am 30. April 1929.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Theoretischer Teil.

Die Erklärung jener wichtigen Rolle, welche die Phosphorsäure im Kohlehydratstoffwechsel der pflanzlichen und tierischen Organismen spielt, war in den zwei letzten Jahrzehnten ein Hauptstreben der biochemischen Forschungen.

Die Teilnahme der Phosphorsäure an den Zuckerabbauprozessen (alkoholische Gärung, Glykolyse) besteht darin, daß sie auf fermentativem Wege in organische Form übergeführt bzw. mit Zucker esterifiziert wird und verschiedene Hexose-phosphorsäure-ester entstehen; neuere Untersuchungen beweisen, daß bei dem Zuckerabbau höherer Pflanzen¹ sowie gewisser Bakterien (Propionsäure- und Milchsäuregärung²) die Phosphorsäure eine ähnliche Rolle spielt. Die Untersuchungen, welche eine Aufklärung des feineren Mechanismus verschiedener Zuckerabbauprozesse erzielten, haben bezüglich der Esterifizierung der Phosphorsäure, der „Phosphorylierung“, zur Erkennung auffallender Analogien geführt³.

Den von Iwanoff⁴, Harden und Young⁵ in gärenden Zuckerlösungen aufgedeckten Zucker-phosphorsäure-ester hat Young⁶ als einen Hexose-di-phosphorsäure-ester erkannt, ein Befund, der von Neuberg und seinen

¹ J. Bodnár, diese Zeitschr. **165**, 1, 1925.

² A. J. Virtanen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **138**, 136, 1924; **143**, 71, 1925; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **58**, 696, 2441, 1925; A. J. Virtanen und H. Karström, Zeitschr. f. physiol. Chem. **174**, 1, 1928.

³ Durch neuere, noch nicht publizierte Untersuchungen von Bodnár wurde bewiesen, daß bei der im Erbsenmehlbrei sich vollziehenden Phosphorylierung ein Hexose-phosphorsäure-ester entsteht, welcher mit jenem der Hefegärung identisch zu sein scheint.

⁴ L. Iwanoff, Travaux Soc. des Naturalistes de St. Pétersbourg 1905.

⁵ A. Harden und W. J. Young, Proc. Chem. Soc. **21**, 189, 1905.

⁶ W. J. Young, Proc. Roy. Soc. B. **81**, 528, 1909; diese Zeitschr. **32**, 188, 1911.



Mitarbeitern¹ entgegen anderen Behauptungen bestätigt wurde. Die Synthese dieses Esters wird durch das Enzym „Phosphatase“², der Abbau durch die „Phosphatase“³ katalysiert.

Bei der Einschaltung des Hexose-di-phosphorsäure-esters in den Vorgang der alkoholischen Gärung ergaben sich nun verschiedene Schwierigkeiten, auf Grund deren besonders *Neuberg*⁴ die Auffassung betont hat, daß die Ansammlung von Hexose-di-phosphorsäure-ester nicht als eine normale Erscheinung der alkoholischen Gärung betrachtet werden kann, ohne dadurch die wichtige und unentbehrliche Rolle der Phosphorsäure bei der alkoholischen Gärung bezweifelt zu haben. Die Richtigkeit dieser Annahme *Neubergs* wurde durch neuere Forschungen auf dem Gebiete der Phosphorylierung in jeder Hinsicht bewiesen.

Harden und *Robison*⁵ isolierten aus einer durch Hefepreßsaft gärenden Zuckerlösung einen Hexose-phosphorsäure-ester, welcher von *Robison*⁶ als ein Hexose-mono-phosphorsäure-ester (*Robisonscher* Ester) identifiziert wurde. Der *Neubergsche* Hexose-mono-phosphorsäure-ester, durch partielle Hydrolyse des Hexose-di-phosphorsäure-esters vermittelt Säuren hergestellt (*Neubergscher* Ester⁷), ist isomer mit dem *Robisonschen* Ester. Diese Mono-ester stellen keine einheitlichen Verbindungen dar, indem sie zweierlei Zucker, Aldose und Ketose, enthalten, und zwar überwiegt im *Robisonschen* Ester die Aldose-, im *Neubergschen* Ester die Ketosekomponente⁸; die Untersuchungen von *Meyerhof* und *Lohmann*⁹ sprechen dafür, daß ein Hexose-mono-phosphorsäure-ester schon mit mehr Recht als ein normales Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung angesehen werden kann, und daß man mit der Einschaltung des Mono-esters auch die notwendige Bildung des Hexose-di-phosphorsäure-esters erklären kann, ohne letzteren als ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung betrachten zu müssen.

Daß die Phosphorsäure auch bei der Glykolyse, d. h. bei der Milchsäurebildung in tierischen Zellen eine wichtige Rolle spielt, dafür haben Untersuchungen von *Embden* und seinen Mitarbeitern¹⁰ die ersten Angaben geliefert.

¹ *C. Neuberg, E. Färber, A. Levite und E. Schwenk*, diese Zeitschr. **83**, 244, 1917.

² *H. Euler und S. Kullberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **74**, 15, 1911.

³ *A. Harden und W. J. Young*, Proc. Roy. Soc. B. **82**, 321, 1910.

⁴ *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **103**, 320, 1920; *C. Neuberg und J. Leibowitz*, ebendasselbst **184**, 489, 1927.

⁵ *A. Harden und R. Robison*, Proc. Roy. Soc. **30**, 16, 1914.

⁶ *R. Robison*, Biochem. Journ. **16**, 809, 1922; **17**, 286, 1923.

⁷ *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **88**, 432, 1918.

⁸ *C. Neuberg und J. Leibowitz*, ebendasselbst **184**, 489, 1927; *K. Lohmann*, ebendasselbst **194**, 306, 1928.

⁹ *O. Meyerhof*, Naturwiss. **14**, 1175, 1926; *O. Meyerhof und K. Lohmann*, ebendasselbst **14**, 1277, 1926; diese Zeitschr. **185**, 111, 1927.

¹⁰ *G. Embden, W. Griesbach und E. Schmitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 1, 1914/15.

Sie fanden, daß im Muskelpreßsaft gleichzeitig mit der Milchsäure (und zwar in äquimolekularer Menge) auch Phosphorsäure entstand. Da durch zugesetzten Hexose-di-phosphorsäure-ester im Muskelpreßsaft die Menge der Milchsäure und Phosphorsäure erheblich gesteigert wurde, haben die genannten Forscher den Schluß gezogen, daß diese Säuren gemeinsamer Herkunft sind und durch die Spaltung eines im Muskelpreßsaft vorhandenen, „Lactacidogen“ genannten Zucker-phosphorsäure-esters zustande kamen. Die Milchsäure wird also in der Muskulatur aus dem Zucker nicht direkt, sondern durch Vermittlung eines Zucker-phosphorsäure-esters gebildet.

Um die Esterifizierung der Phosphorsäure nachweisen zu können, ist es notwendig, daß die Synthese von Zucker-phosphorsäure-ester schneller verläuft als seine Spaltung. Das ist bei der Hefe der Fall, aber *Embden* und seine Mitarbeiter¹ bemerkten erst dann eine Esterifizierung (Abnahme der anorganischen Phosphorsäure), als sie zu dem Muskelbrei oder Muskelpreßsaft NaF und besonders, wenn sie Glykogen + NaF zusetzten (zur Phosphorylierung lieferte das Glykogen den Zucker). Die Rolle des NaF bei der Phosphorylierung ist auf Grund der Versuche *Eulers* und seiner Mitarbeiter², ferner *Meyerhofs*³ so zu erklären, daß das NaF seine Wirkung nicht unmittelbar, also nicht durch Beschleunigung der Phosphorylierung, sondern durch die Hemmung der Spaltung des gebildeten Phosphorsäure-esters ausübt; auf die Verzuckerung des Glykogens dagegen übt das NaF keinen Einfluß aus⁴.

Bezüglich der genaueren Zusammensetzung des Lactacidogens haben jüngst *Embden* und *Zimmermann*⁵ aus frischem Muskel einen Hexose-phosphorsäure-ester dargestellt, welcher sich als ein Hexose-mono-phosphorsäure-ester erwies, der aber mit dem *Neubergschen* und mit dem *Robinsonschen* Ester nicht identisch war, weshalb *Embden* die Benennung „Lactacidogen“ für diesen aus frischem Muskel gewonnenen Hexose-mono-phosphorsäure-ester beizubehalten wünscht.

Es gelang *Meyerhof*⁶, durch isotonische KCl-Lösung oder durch destilliertes Wasser bei etwa 0° Temperatur aus der Muskulatur (Frosch, Meerschweinchen) einen kohlehydratfreien Extrakt zu gewinnen, welcher in sehr wirksamer Form den milchsäurebildenden Enzymkomplex enthielt⁷.

¹ *G. Embden* und *E. Lehnartz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **134**, 243, 1924; *G. Embden*, *A. Abraham* und *H. Lange*, ebendasselbst **136**, 308, 1924; *G. Embden* und *C. Haymann*, ebendasselbst **137**, 154, 1924; *A. Abraham* und *P. Kahn*, ebendasselbst **141**, 161, 1924.

² *H. Euler*, *K. Myrbäck* und *S. Karlsson*, ebendasselbst **143**, 243, 1925.

³ *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 462, 1926; *F. Lipmann*, ebendasselbst **196**, 3, 1928.

⁴ *K. Lohmann*, ebendasselbst **178**, 453, 1926.

⁵ *G. Embden* und *M. Zimmermann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **167**, 114, 1927.

⁶ *O. Meyerhof*, Naturwiss. **14**, 196, 1926; diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

⁷ Als erste hatten *Stoklasa* und seine Mitarbeiter aus tierischen Organen ein solches Enzympräparat dargestellt, welches aus Glucose Milchsäure — dabei auch CO₂ und Alkohol — bildete. *Euler* und seine Mitarbeiter haben aus Muskulatur mit Alkohol und Äther ein Trockenpräparat (Muskelpulver) dargestellt, welches aus Glykogen Milchsäure bildete. *Brugsch* und *Horsters* konnten in aus Muskel und Leber nach *Euler* gewonnenen Trocken-

Durch diesen Extrakt wurden Hexose-phosphorsäure-ester (Mono- und Di-ester) und Glykogen intensiv gespalten (auf Hexosen erwies sich dieser Extrakt aber nur in Gegenwart eines gewissen, aus Hefenautolysat hergestellten Aktivators wirksam), wobei sich Milchsäure in erheblicher Menge bildete und Phosphorsäure auch ohne Zusatz von NaF esterifiziert wurde.

Es erwies sich dieser keine Zellelemente enthaltende Muskelextrakt für die Zwecke der Erklärung des Chemismus der Glykolyse bzw. der Phosphorylierung besonders geeignet. Nach *Meyerhof*¹ vollzieht sich die Esterifizierung der Phosphorsäure und die Zersetzung des Esters in zwei Phasen: in der ersten Phase (I) werden zwei Moleküle Glucose mit zwei Molekülen Phosphorsäure esterifiziert, und es entstehen zwei Moleküle *aktiven* Hexose-mono-phosphorsäure-esters, von welchen das eine Molekül rasch zerfällt (Produkt der Spaltung ist Milchsäure), das andere aber die vom ersten abgespaltene Phosphorsäure aufnimmt und als Hexose-di-phosphorsäure-ester stabilisiert wird. In der zweiten Phase (II) zerfällt der Hexose-di-phosphorsäure-ester — langsamer als der Mono-ester — in Milchsäure und Phosphorsäure. Der Hexose-di-phosphorsäure-ester wäre demnach nichts anderes als eine Stabilisierungsform der labilen, rasch zerfallenden und als Zwischenprodukt zu betrachtenden Hexose-mono-phosphorsäure.

Im Zusammenhang mit den Studien über Glykolyse wandte sich *Meyerhof* auch dem Problem der Phosphorylierung bei der alkoholischen Gärung zu und gelangte zu der überraschenden Annahme, daß die Einschaltung der Phosphorsäure in den Gärungsprozeß in derselben Weise wie bei der Glykolyse erfolgt, so daß der Hexose-mono-phosphorsäure-ester als ein wichtiges Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung in Betracht gezogen werden kann. Auf interessante und originelle Weise, doch etwas von *Meyerhof* abweichend, wird von *Euler* und *Myrbäck*² die Phosphorylierung und ihre Stelle im Gärungsprozeß erklärt, worauf wir später noch zurückkommen werden.

Zur Erkennung des Mechanismus der alkoholischen Gärung war *Harden* und *Youngs*³ Entdeckung des Coenzym (Co-Zymase)⁴, der Zymase bzw. Apo-Zymase (*Neuberg*⁵), ein sehr bedeutender Fortschritt.

Bezüglich der Reindarstellung der Hefencozymase und der Erklärung ihrer näheren chemischen Eigenschaften haben sich *Euler* und *Myrbäck*⁶ große

präparaten die Anwesenheit eines glykolytischen Enzyms nicht sicher nachweisen, sie untersuchten aber die Wirkung des Präparats — mit Ausnahme eines einzigen Falles — nur auf Glucose und nicht auf Glykogen (Literatur in *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., S. 1530, 1531, 1926; und *J. Stoklasa*, diese Zeitschr. 183, 461, 1927).

¹ *O. Meyerhof*, Naturwiss. 14, 757, 1175, 1926; diese Zeitschr. 178, 462, 1926; 183, 176, 1927; *O. Meyerhof* und *K. Lohmann*, l. c.

² *H. Euler* und *K. Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 167, 236, 1927; Ann. d. Chem. 464, 56, 1928.

³ *A. Harden* und *W. J. Young*, Proc. Roy. Soc. 77, 405, 1906.

⁴ *Dieckman*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 134, 149, 1923.

⁵ *C. Neuberg*, Handbuch d. Biochemie. 2. Aufl. Band IX, 456, 1924; *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. 161, 244, 1925.

⁶ *H. Euler* und *K. Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 181 bis 177, 1923 bis 1927; *H. Euler*, *K. Myrbäck* und *R. Nilsson*, Ergebn. d. Physiol. 26, 557, 1928.

H. Euler und K. Myrbäck

Verdienste erworben. *Euler* und *Gard*¹ haben mit Hilfe des Reinigungsverfahrens für die Hefencozymase auch aus der Muskulatur ein Cozymasepräparat in sehr reinem Zustande ($A_{Co} = 23000$) dargestellt.

Es besitzt aber nicht nur die alkoholische Gärung eine thermostabile Cozymase, denn *Meyerhof*² wies das Vorhandensein einer solchen auch bei der Glykolyse nach, als er beobachtete, daß der mit Wasser ausgewaschene Muskel keine Milchsäure bildet, nach Hinzufügen von Muskelkochsaft aber die Milchsäurebildung im ausgewaschenen Muskel wieder eintritt. *Meyerhof*³ beobachtete beim Extrahieren des glykolytischen Enzyms mit KCl-Lösung aus der Muskulatur, daß sich der Muskel mehrmals extrahieren läßt, ohne dabei eine merkliche Abnahme des Enzymgehalts der Extrakte zu finden; dagegen kann aber die Cozymase durch zweimaliges Extrahieren aus dem Muskel vollkommen herausgelöst werden. Dieser dritte cozymasefreie Extrakt bildete mit Glykogen allein keine Milchsäure, nach Zugabe von Glykogen und Muskelkochsaft wurde aber die Milchsäurebildung wieder in Gang gesetzt. Jüngst bewies *Meyer*⁴, daß der aus Muskel gewonnene Extrakt auch durch Dialyse von der Cozymase befreit werden kann, und daß man die milchsäurebildende Fähigkeit des dialysierten Extrakts nicht nur durch Muskelkochsaft, sondern auch durch eingegengtes Dialysat wieder herstellen kann.

Euler und seine Mitarbeiter⁵ fanden, daß ein aus bei 0°C aufbewahrter, frischer Muskulatur hergestelltes Trockenpräparat das Glykogen kaum spaltete, nachdem in der Muskulatur die Cozymase während des Stehens größtenteils vernichtet wurde. Es ist sehr interessant, daß eine gereinigte Cozymase, aus Muskulatur dargestellt, sich auf das so gewonnene cozymasefreie Trockenpräparat als wirkungslos erwies⁶. Wie der Hefenkochsaft in diesem Falle wirkte, werden wir später erwähnen.

Die Versuche von *Virtanen* (l. c.) sprechen dafür, daß sich die Propionsäure- und Milchsäuregärung ohne Cozymase auch nicht vollziehen kann. Ein gewaschenes Trockenpräparat aus Milchsäurebakterien (*Bacterium casei* ε) spaltete keinen Zucker, es wurde aber durch Zugabe von Waschwasser oder Kochsaft (aus dem wirksamen Bakterientrockenpräparat) eine Aktivierung erreicht.

Bodnár und *Hoffner*⁷ gewannen aus Erbsenmehl durch Dialyse ein solches Mehl, welches sich als inaktiv erwies, aber durch die Wirkung des Erbsenmehlkochsafts aktiviert wurde und erhebliche Mengen von CO₂ und Alkohol bildete. Dieser Befund wurde jüngst auch durch die Versuche von *Zaleski* und *Pissarjewski*⁸ bestätigt.

¹ *H. Euler* und *S. Gard*, Svensk. Kem. Tidskr. **40**, 99, 1928.

² *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **188**, 114, 1921.

³ *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

⁴ *K. Meyer*, ebendasselbst **183**, 216, 1927.

⁵ *H. Euler* und *S. Proffe*, Svensk. Kem. Tidskr. **39**, 295, 1927;
H. Euler, *E. Brunius* und *S. Proffe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **177**, 170, 1928.

⁶ *H. Euler* und *S. Gard*, l. c.

⁷ *J. Bodnár* und *P. Hoffner*, diese Zeitschr. **165**, 145, 1925.

⁸ *W. Zaleski* und *O. Pissarjewski*, ebendasselbst **189**, 39, 1927.

Bezüglich der großen Ähnlichkeit des Chemismus der alkoholischen Gärung und der Glykolyse ist ein wichtiger Beweis, daß die Hefen-cozymase und die tierische Cozymase in ihren Eigenschaften übereinstimmen und sich gegenseitig ersetzen können.

Zuerst wies *Meyerhof*¹ nach, daß durch Kochsäfte (= tierische Cozymase) aus verschiedenen tierischen Organen (Muskel, Leber, Milz, Lungen) ein von dem Cozymasegehalt durch Ultrafiltration und Auswaschen befreiter Mazerationssaft (= Hefen-Apoczymase) aktiviert wurde; die tierische Cozymase wirkte also als Hefencozymase auf die Hefenapoczymase ein. Jüngst haben *Euler* und *Runehjelm*² mit geeigneter feiner Methodik (Mikro-gärmethode) Untersuchungen über den Cozymasegehalt in Organen verschiedener Tiere durchgeführt; den höchsten Gehalt an Cozymase haben sie in den Nieren und in der Leber gefunden. *Euler* und *Nilsson*³ bewiesen, daß die roten Blutkörperchen auch Cozymase enthalten, daß es davon aber im Blute der Säugetiere weniger gibt als im Blute der Taube, zwischen dem Cozymasegehalt diabetischen und gesunden Menschenblutes aber kein Unterschied besteht. Nach *Meyers* (l. c.) Untersuchungen gewinnt die gewaschene Acetonhefe ihre Aktivität (CO₂-Produktion) nicht nur durch einen rohen Muskelkochsaft zurück, sondern auch durch ein aus Muskelkochsaft gewonnenes phosphatfreies, gereinigtes Cozymasepräparat. *Meyerhof*⁴ bewies die Reversion dieser Erscheinung auch, als er den cozymasefreien Enzymextrakt aus Muskel (III. Extrakt) nach Zusatz von Kochsaft aus Acetonhefe und Glykogen zur Milchsäurebildung veranlassen konnte. *Euler* und *Gard* (l. c.) wiesen nach, daß gewaschene Hefe durch gereinigte Muskelcozymase stark aktiviert wird. *Euler* und seine Mitarbeiter (l. c.) machten die Beobachtung, daß im cozymasefreien Trockenmuskel (hergestellt aus bei 0° 4 Tage lang aufbewahrtm frischen Muskel) durch hinzugefügten Hefenkochsaft und Glykogen Milchsäure in erheblicher Menge erzeugt wurde, was beim Zusatz von Glykogen allein nicht der Fall war. Wurde statt des Hefenkochsafts gereinigte Hefen-cozymase gebraucht, so bildete sich in einzelnen Fällen keine Milchsäure, woraus folgt, daß die Milchsäurebildung im Trockenmuskel außer der Cozymase auch noch eines anderen Aktivators bedarf, welcher in gewissen Fällen aus dem Trockenmuskel fehlen kann; dieser Aktivator ist mit dem von *Meyerhof* aus Hefenautolysat dargestellten Aktivator identisch, da ein mit gereinigter Hefen-cozymase nicht reagierendes cozymasefreies Trockenpräparat nach Zugabe von *Meyerhofschem* Aktivator aus Glykogen — oder noch besser aus Glucose — Milchsäure produziert.

Nach den Versuchen von *Virtanen*⁵ kann auch die Cozymase der Milchsäuregärung durch Hefen- oder Muskelcozymase ersetzt werden.

In den letzten Jahren bildete öfters den Gegenstand der Untersuchungen, die nähere Aufgabe der Cozymase zu erforschen, bzw.

¹ O. Meyerhof, Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 165, 1918; **102**, 1, 1918.

² H. Euler und D. Runehjelm, ebendasselbst **165**, 306, 1927.

³ H. Euler und R. Nilsson, ebendasselbst **162**, 63, 1926.

⁴ O. Meyerhof, diese Zeitschr. **178**, 395, 1926.

⁵ A. J. Virtanen, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **58**, 2441, 1925.

in welcher Phase des Zuckerabbaues die Cozymase ihre Wirkung ausübt.

Seit den Versuchen von *Neuberg* und *Rosenthal*¹ ist es bekannt, daß Brenztraubensäure durch Carboxylase auch ohne Cozymase gespalten wird, die Rolle der Cozymase ist also in der Phase Zucker → Brenztraubensäure zu suchen. Ferner wurde bereits aus den Versuchen von *Harden* und *Young*² klar, daß die Esterifizierung der Phosphorsäure ohne Cozymase nicht vor sich gehen kann. Zuerst wurde von *Euler* und *Myrbäck*³ bewiesen, daß die Bildung des Phosphorsäure-esters aus Zucker, oder eine der Esterifizierung vorangehende Umwandlung des Zuckers als jene Phase der alkoholischen Gärung zu betrachten ist, die die Anwesenheit der Cozymase nicht entbehren kann. Nach den Versuchen von *Neuberg* und *Gottschalk*⁴ verlor die stark phosphorylierende *Aceton-Unterhefe* durch Auswaschen ihre esterifizierende Eigenschaft, gewann sie aber nach Zusatz von Hefenkochsaft (= Cozymase) wieder zurück. Die *Aceton-Oberhefe* hat ursprünglich keine Phosphorsäure esterifiziert (auch hat sie keinen Zucker vergoren), was auf Mangel an Cozymase zurückzuführen war, da sie nach Zugabe von Hefenkochsaft eine starke Esterifizierung zeigte⁴. Alle diese Versuche beweisen, daß „die Phosphorylierung bzw. die sie einleitende Umwandlung des Zuckermoleküls an die Anwesenheit von Coferment gebunden ist“, die Cozymase also die Rolle einer Co-Phosphatase⁵ einnimmt.

Betreffs der Aufgabe der Cozymase in der Hefegärung führten die neueren Untersuchungen von *Euler* und seinen Mitarbeitern zu originellen und höchst interessanten Feststellungen.

Myrbäck und *Jacobi*⁶ fanden, daß die Dismutation des Acetaldehyds durch Trockenhefe eines aus der Trockenhefe auswaschbaren, thermostabilen, „*Comutase*“ genannten Aktivators bedarf; nach Untersuchungen von *Euler* und *Myrbäck*⁷ ist die *Comutase* mit der Cozymase in jeder Hinsicht identisch, und die Cozymase wirkt bei der Gärung in einer der Acetaldehyddismutation ähnlichen Reaktion, also als eine *Comutase*. Nach den genannten Forschern⁸ vollzieht sich die Anfangsperiode der Gärung in der Weise, daß der Zucker mit der Phosphorsäure esterifiziert wird und ein Hexose-mono-phosphorsäure-ester (*Robison*scher Ester) entsteht, wozu

¹ *C. Neuberg* und *P. Rosenthal*, diese Zeitschr. **51**, 128, 1913; **61**, 171, 1914; **88**, 202, 1918.

² *A. Harden* und *W. J. Young*, Proc. Chem. Soc. **21**, 189, 1905.

³ *H. Euler* und *K. Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **139**, 15, 1924.

⁴ *A. Gottschalk* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **154**, 492, 1924; *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, ebendasselbst **161**, 244, 1925.

⁵ *A. Gottschalk*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **170**, 264, 1927.

⁶ *K. Myrbäck* und *W. Jacobi*, ebendasselbst **161**, 245, 1926.

⁷ *H. Euler* und *K. Myrbäck*, ebendasselbst **165**, 28, 1927.

⁸ *Dieselben*, ebendasselbst **167**, 236, 1927; Ann. d. Chem. **464**, 56, 1928.

die Anwesenheit der Cozymase nicht notwendig ist¹; dann werden 2 Moleküle Hexose-mono-phosphorsäure-ester unter dem Einfluß der im Zymasekomplex vorhandenen *Mutase* dismutiert. Die Mutation findet in der Mitte der 2 Moleküle Hexose-mono-phosphorsäure-ester statt, und es entstehen 2 Moleküle 3-Kohlenstoffkörper, die vergären, ferner 2 Moleküle Triose-phosphorsäure-ester, welche sich zu einem Hexose-di-phosphorsäure-ester vereinigen. Diese *Dismutation* kann nur in Anwesenheit von Cozymase vor sich gehen, die Cozymase übt also ihre Wirkung als *Comutase* aus. Die Bildung von Hexose-di-phosphorsäure-ester hängt demgemäß mit der Gärung eng zusammen, d. h. dieser Ester kann nur dann entstehen, wenn der als Zwischenprodukt auftretende Hexose-mono-phosphorsäure-ester gespalten wird.

Wollen wir uns den Gang der Phosphorylierung und die Rolle der Cozymase auch bei der Glykolyse nach der Theorie von *Euler* und *Myrbäck* vorstellen, so müßte der sich im Muskel unter NaF-Zusatz anhäufende Phosphorsäure-ester — wenigstens zum großen Teile — ein Mono-ester sein (durch NaF wird die Spaltung des Mono-esters gehemmt und damit auch die Bildung von Di-ester); nach Untersuchungen von *Embden* und *Laquer*² entsteht aber in der, mit NaF aufbewahrten Muskulatur eine Hexose-di-phosphorsäure. Da *Euler* und seine Mitarbeiter (l. c.) fanden, daß das NaF auch in der Trockenhefe die Anhäufung des Phosphorsäure-esters bewirkt, wäre es von hohem Interesse, in der Richtung Untersuchungen durchzuführen, was für eine Zusammensetzung der bei Trockenhefe durch NaF-Wirkung gebildete Phosphorsäure-ester hat.

Im Zusammenhang mit der Rolle der Cozymase galt es als eine lang diskutierte Frage, ob der aus dem Hexose-di-phosphorsäure-ester durch Phosphorsäureabspaltung entstandene Zucker unmittelbar (ohne Cozymase) oder durch eine vorangehende Phosphorylierung (unter Mitwirkung der Cozymase) abgebaut wird.

Nach Untersuchungen von *Harden* und *Young* (l. c.), *Euler* und *Myrbäck* (l. c.) sowie *Gottschalk* (l. c. vergärt der Hexose-di-phosphorsäure-ester nur in Anwesenheit von Cozymase. Nach *Meyerhof*³ wird der Hexose-di-phosphorsäure-ester bei der Hefegärung sowie bei der Glykolyse auch ohne Cozymase [durch „cofermentfreien Muskelextrakt“ und „annähernd cofermentfreie Zymase (mehrfach gewaschene Acetonhefe“)“] vergoren; jüngst wird die Anwesenheit einer kleinen Cozymasemenge auch von *Meyerhof*⁴ für notwendig gehalten („nicht völlig cofermentfrei“).

Nach den Befunden von *Neuberg* und *Gottschalk*⁵ gewinnt die nicht phosphorylierende Aceton-Oberhefe ihre Phosphorylierungsfähigkeit

¹ *H. Euler* und *S. Kullberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **74**, 15, 1914; diese Zeitschr. **37**, 313, 1911; *H. Euler*, ebendaselbst **41**, 215, 1912; *Nilsson*, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **9**, 1928, zit. nach *H. Euler* und *K. Myrbäck*, l. c.

² *G. Embden* und *F. Laquer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 94, 1914; **98**, 181, 1917; **113**, 1, 1921.

³ *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **178**, 395, 1926; **183**, 176, 1927.

⁴ *F. Lipmann*, ebendaselbst **196**, 3, 1928 (s. Bemerkung von *Meyerhof*, S. 5 der Mitteilung).

⁵ *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, l. c.

nicht nur durch hinzugefügte Hefecozymase, sondern auch durch tierische Cozymase zurück, die Hefecozymase kann also auch bei der Phosphorylierung durch tierische Cozymase ersetzt werden.

Bezüglich der Rolle, welche die Cozymase bei der Phosphorylierung in tierischen Zellen (in der Muskulatur) einnimmt, wurden bisher keine Untersuchungen durchgeführt¹, weshalb wir uns das eingehende Studium dieses Problems zur Aufgabe stellten.

Für unsere Versuche gebrauchten wir Muskelbrei aus der Brustmuskulatur entbluteter Tauben. Unsere ersten Versuche führten wir mit frischem Muskelbrei durch, überzeugten uns aber bald, daß der frische Muskelbrei für die Untersuchung der Phosphorylierung nicht das geeignetste Versuchsmaterial bietet, denn die Esterifizierungsfähigkeit der frischen Muskulatur wird beim Stehen rasch herabgesetzt², was besonders beim Anstellen von Versuchen mit mehreren Proben bedeutende Fehler verursachen kann; außerdem ist die Arbeit mit frischem Muskelbrei (das Abwiegen der Proben) ziemlich unbequem und braucht zu viele Versuchstiere. Das schon erwähnte *Eulersche* Trockenpräparat (Muskelpulver), welches *Euler* und seine Mitarbeiter (l. c.) aus frischer Muskulatur (Kaninchen, Ratte) mit Alkohol und Äther herstellten, konnte nach Zugabe von NaF + Glykogen auch Phosphorsäure esterifizieren. Nach unseren Versuchen erwies sich das mit dem *Eulerschen* Verfahren aus Taubenmuskulatur gewonnene Muskelpulver zum Studium der Phosphorylierung als besonders geeignet; das Muskelpulver bewahrt seine Aktivität lange Zeit, und die Arbeit ist damit rasch und bequem.

Die Phosphorylierungsfähigkeit des Muskelpulvers haben wir nach der im experimentellen Teil ausführlich beschriebenen Methode bestimmt; die Differenz zwischen der anorganischen Phosphatmenge der mit Na₂HPO₄-Lösung + Glykogen + NaF angesetzten Muskelpulver beim Beginn und nach der Versuchszeit ergab die durch das Pulver esterifizierte Phosphorsäure, ausgedrückt in P₂O₅; die P₂O₅ (in Milligrammen) *in den Tabellen sind auf 0,25 g Muskelpulver (= 1 g frischer Muskel) bezogen*. Die Phosphorylierung kann man bei der frischen Muskulatur nur in Anwesenheit von NaF beobachten, das Muskelpulver esterifiziert — wie es aus der Tabelle I hervorgeht — auch ohne NaF, und die Phosphorylierung wird durch NaF beträchtlich

¹ *G. Shinoda* (diese Zeitschr. **149**, 1, 1924) fand, daß der Taubenleberbrei auf die Wirkung von Hefeextrakt und Muskelkochsaft (in einem Falle) die Phosphorsäure (10 g Leberbrei maximal 12,7 mg H₃PO₄ = 9,2 mg P₂O₅) stark esterifizierte; der Verfasser führt diese Wirkung auf den Vitamin-gehalt des Extrakts bzw. Kochsaftes zurück.

² Über ähnliche Erfahrungen wird von *A. Abraham* und *P. Kahn* berichtet (Zeitschr. f. physiol. Chem. **141**, 161, 1924).

gesteigert. *Euler* und seine Mitarbeiter fanden, daß der Zuckerabbau und die Milchsäurebildung im Muskelpulver durch eine Erhöhung der Phosphatkonzentration gesteigert werden. Aus unseren in der Tabelle II mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß durch die Erhöhung der Phosphatkonzentration auch die Menge der esterifizierten Phosphorsäure vermehrt wird: 0,25 g Muskelpulver (= 1 g frischer Muskel) esterifizierten unter den angegebenen Bedingungen maximal 11,42 mg P_2O_5 , also eine sehr bedeutende Menge; eine Phosphorylierung so hohen Grades unter Wirkung der tierischen Phosphatase hat noch niemand bisher nachgewiesen. Wie es die Daten der Tabelle II zeigen, wurde die Phosphorylierung durch zugesetzten Muskelkochsaft nur bei höheren Phosphatkonzentrationen etwas gesteigert, was so erklärt werden kann, daß das Pulver die Cozymase in optimaler Menge enthielt; ähnliche Befunde wurden von *Euler* und *Nordlund*¹ über die Hefe mitgeteilt, indem die zugesetzte Cozymase die Phosphorylierungsfähigkeit der Trockenhefe nur in geringem Maße steigerte. Wenn wir die esterifizierte P_2O_5 -Menge unserer in verschiedenen Phosphatkonzentrationen angestellten Versuche und die zugehörigen Phosphatkonzentrationen, d. h. die P_2O_5 -Mengen der 0 Stunden, in einem rechtwinkligen Koordinatensystem darstellen, wird durch die so erhaltenen Phosphatkurven (Abb. 1) gezeigt, daß die Esterifizierungsfähigkeit des Muskelpulvers bis zu einer gewissen Grenze beinahe proportional mit der Phosphatkonzentration wächst. In Abb. 1 ist anschaulich die Wirkung des Muskelkochsaftes auf die Phosphorylierung des Muskelpulvers dargestellt.

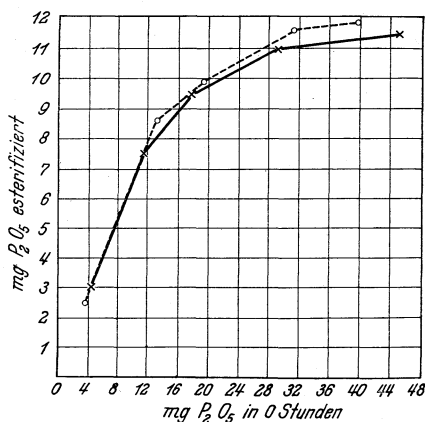


Abb. 1.

×——× Muskelpulver. ○·····○ Muskelpulver + Muskelkochsaft.

¹ H. Euler und F. Nordlund, Zeitschr. f. physiol. Chem. 116, 229, 1921.

Schon *Euler* und seine Mitarbeiter (l. c.) warfen die Frage auf, ob beim Muskelpulver eine lösliche Cozymase bei der Phosphorylierung mitwirkt. Vor dem Studium dieses Problems mußten wir uns zuerst darüber orientieren, ob beim Auswaschen der Cozymase aus dem Pulver die Glykogenase nicht völlig in Lösung gehe; denn würde das ausgewaschene Muskelpulver keine Glykogenase enthalten, so könnte aus dem vorhandenen Glykogen kein Zucker entstehen und wegen Mangel an Zucker die Phosphorsäure nicht esterifiziert werden. Wie es unsere Versuche zeigen, bleibt im gewaschenen Muskelpulver dazu noch genug Glykogenase zurück (vielleicht ein wasserunlösliches Zymogen der Glykogenase, aus welchem dann aktive Glykogenase entsteht¹), daß aus Glykogen Zucker entstehe. Zur Entfernung der Cozymase haben wir das Muskelpulver dreimal mit destilliertem Wasser extrahiert, wie es im experimentellen Teile näher beschrieben wird. Aus den Daten der Tabelle III geht hervor, daß die Fähigkeit des Muskelpulvers, Phosphorsäure zu esterifizieren, durch Auswaschen stark herabgesetzt wird; 0,25 g gewaschenes Muskelpulver esterifizierten maximal nur 1,58 mg P_2O_5 (= 0,63 %), dagegen war das Maximum beim nativen Muskelpulver (Tabelle II) 11,42 mg P_2O_5 (= 4,57 %). Wenn das nach Auswaschen beobachtete starke Herabsetzen der Phosphorylierung im Muskelpulver auf den Mangel an Cozymase zurückgeführt werden könnte, so müßte durch Zugabe von cozymasehaltigem Muskelkochsaft wenigstens eine partielle Aktivierung erreicht werden. Als wir anfangs noch mit geringen Phosphatkonzentrationen arbeiteten (es war die P_2O_5 -Menge in den 0 Stunden etwa 2 bis 6 mg), ist es uns nicht gelungen, die Reaktivierung des gewaschenen Muskelpulvers nachweisen zu können; bald wurde es aber klar, daß die Wirkung des Muskelkochsaftes von der gebrauchten Phosphatkonzentration abhängig ist. Aus den Versuchsergebnissen der Tabelle III geht hervor, daß Muskelkochsaft erst bei höheren Phosphatkonzentrationen das gewaschene Muskelpulver reaktiviert; während das gewaschene Muskelpulver maximal 1,58 mg P_2O_5 (= 0,63 %) esterifizieren konnte, war das Maximum beim gewaschenen Muskel + Kochsaft bei hoher Phosphatkonzentration (36,3 mg P_2O_5 in den 0 Stunden) 5,08 mg P_2O_5 (= 2,03 %), d. h. der Muskelkochsaft hat also die Phosphorylierungsfähigkeit des äußerst schwach phosphorylierenden gewaschenen Muskelpulvers erheblich gesteigert; trotzdem war die Phosphorylierungsfähigkeit des gewaschenen Muskelpulvers + Muskelkochsaft schwächer als die des nativen Muskelpulvers. Dieser Umstand kann — wie wir es später noch ausführlich behandeln werden — auf eine gewisse, mit der Entfernung der Cozymase verknüpfte Schädigung der Phosphatase zurück-

¹ J. Bodnár und I. Villányi, diese Zeitschr. 169, 1, 1926.

geführt werden. Es wird gleichfalls aus der Tabelle III klar, daß nicht nur der Muskelkochsaft, sondern auch der Hefenkochsaft (= Hefencozymase) die Phosphorylierung im gewaschenen Muskelpulver stark aktiviert [durch gewaschenes Muskelpulver + Hefenkochsaft wurden maximal 4,89 mg P_2O_5 (= 1,96%) verestert].

Die den Versuchen der Tabelle III entsprechenden Phosphatkurven sind in der Abb. 2 dargestellt. Es erhellt daraus, wie die reaktivierende Wirkung des Muskel- und Hefenkochsaftes mit der Phosphatkonzentration (P_2O_5 -Menge in den 0 Stunden) wächst; die Phosphatkurven des gewaschenen Muskelpulvers und der gewaschenen Muskelpulver + Kochsäfte fallen bei kleinen Phosphatkonzentrationen fast zusammen, verzweigen sich aber mit wachsenden Phosphatkonzentrationen immer mehr.

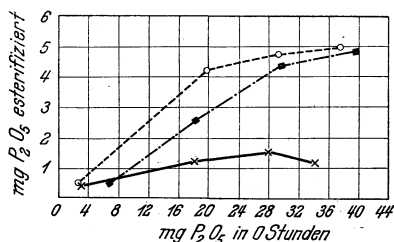


Abb. 2.

- × — × Gewaschenes Muskelpulver.
 ○ — ○ Gewaschenes Muskelpulver + Muskelkochsaft.
 ■ — ■ Gewaschenes Muskelpulver + Hefenkochsaft.

Durch die mitgeteilten Versuchsergebnisse wird die Feststellung begründet, daß die Esterifizierung der Phosphorsäure (die Überführung des zugesetzten Phosphats in organische Form) im Muskel Cozymase bedarf und die tierische Cozymase bei der Phosphorylierung durch Hefencozymase ersetzbar ist.

Euler und seine Mitarbeiter (l. c.) befreiten die Muskulatur auf die schon erwähnte Weise von der Cozymase, indem sie die frische Muskulatur (Muskelbrei) 4 Tage lang bei 0° Temperatur stehen ließen. Es wird durch die Versuche — welche wir mit einem aus so aufbewahrttem Muskelbrei hergestellten Muskelpulver durchführten (Tabelle IV) — bewiesen, daß man mit diesem Verfahren die Muskulatur nicht in so hohem Maße von der Cozymase befreien kann, wie dies durch Auswaschen des Muskelpulvers gelingt. Daß die Cozymase auch in diesem Falle an der Aktivitätsverminderung beteiligt ist, wird durch unsere Versuche bewiesen, indem Muskelkochsaft beträchtlich die Phosphorylierung auch in einem solchen Muskelpulver steigerte. Bezüglich des Cozymasegehaltes des Muskelpulvers — hergestellt einerseits aus frischem Muskel, andererseits aus dem bei 0° aufbewahrten Muskel — geht aus unseren

vergleichenden Untersuchungen (Tabelle IVa) hervor (wir haben studiert, wie die Kochsäfte aus Muskelpulvern auf gewaschene Trockenhefe einwirken), daß das Pulver des frischen Muskels entgegen dem Pulver des bei 0° aufbewahrten Muskels mehr Cozymase enthält.

Das aufbewahrte Muskelpulver bewahrt seine Phosphorylierungsfähigkeit ziemlich gut, denn ein Vergleich zwischen einem in einer Stöpselflasche bei Zimmertemperatur 5 Wochen lang aufbewahrten Muskelpulver mit einem frischen Muskelpulver (Tabelle V und II) ergab, daß das abgestandene Muskelpulver beinahe identischer Phosphatkonzentrationen im Durchschnitt nur um 20% weniger phosphoryliert als das frische Muskelpulver. Diese Verminderung — da die Phosphorylierungsfähigkeit des aufbewahrten Muskelpulvers durch Zugabe von Muskelkochsaft merklich zunimmt — dürfte teils auf die Abnahme des Cozymasegehaltes zurückgeführt (beim Stehenbleiben zersetzt sich die Cozymase, was bei der Trockenhefe gleichfalls zu beobachten ist), teils aber mit einer Schädigung der Phosphatase in Verknüpfung gebracht werden. Die Phosphatkurven der Phosphorylierungsversuche mit aufbewahrtem Muskelpulver sind in der Abb. 3 dargestellt, woraus gut ersichtlich ist, daß die Steilheit der Kurven zum großen Teile identisch mit der des frischen Muskelpulvers ist, und daß der Muskelkochsaft auch dabei nur in höheren Phosphatkonzentrationen die Phosphorylierung steigert.

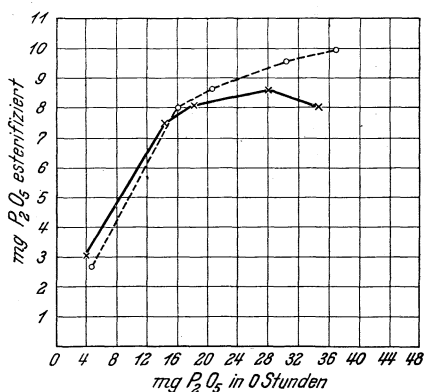


Abb. 3.

×——× Muskelpulver, 5 Wochen lang aufbewahrt. ○.....○ Dasselbe + Muskelkochsaft.

Bei den Phosphatkurven des gewaschenen und 5 Wochen lang aufbewahrten Muskelpulvers ist es auffallend, daß die Phosphorylierung bei einer geringeren Phosphatkonzentration ihr Optimum erreicht als im Falle des nativen Muskelpulvers. Dieser Umstand darf einer gewissen Schädigung der Phosphatase zugeschrieben werden, welche Schädigung

mit dem Auswaschen der Cozymase bzw. beim aufbewahrten Muskelpulver mit der Abnahme des Cozymasegehaltes verbunden ist; die Anwesenheit von Cozymase wirkt nämlich schützend auf die Phosphatase. Die Zugabe von Cozymase zum gewaschenen bzw. aufbewahrten Muskelpulver steigert nicht nur die Phosphorylierung, sondern es wird auch das Maximum der Phosphorylierung in der Richtung höherer Phosphatkonzentrationen verschoben, d. h. die Cozymase ist fähig, auch der durch die Schädigung der Phosphatase verursachten Verschiebung der optimalen Phosphatkonzentration entgegenzuwirken.

Emlden und Haymann¹ benutzten zu ihren Phosphorylierungsversuchen einen mit einer durch Kühlgemisch abgekühlten Fleischhackmaschine verfertigten Muskelbrei und fanden, daß die Lactacidogensynthese (= Phosphatesewirkung) bei einer niederen Temperatur intensiver vor sich geht. Die erwähnte Schädigung der Phosphatase darf auf ihre Temperaturempfindlichkeit zurückgeführt werden, was durch unseren folgenden Versuch bewiesen wird. Wir entfernten in unserem vorherigen Versuche die Cozymase aus dem Muskelpulver durch mehrfaches Extrahieren mit Wasser von Zimmertemperatur (20 bis 23°); wird dies so durchgeführt, daß wir den frischen Brei mit eiskaltem Wasser rasch auswaschen und erst dann das Muskelpulver daraus darstellen, so erhalten wir ein Präparat, welches die Phosphatase zum Vergleich mit dem gewaschenen Muskelpulver in einem minder beschädigten Zustande enthält. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsversuche (Tabelle VI, Abb. 4) mit dem derartig gewonnenen Muskel-

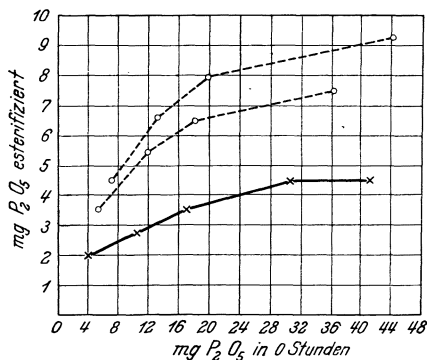


Abb. 4.

×——× Muskelpulver, bei 0° gewaschen. ○.....○ Dasselbe + Muskelkochsaft.

pulver zeigen nämlich, daß das Optimum der Phosphorylierung bei der Phosphatkurve des Muskelpulvers selbst nicht nach geringeren Phosphatkonzentrationen verschoben ist; wohl ist es weiterhin merklich,

¹ G. Emlden und C. Haymann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **137**, 154, 1924.

daß die Zugabe von Muskelkochsaft die flache Phosphatkurve in eine dem normalen Muskelpulver (Abb. 1) annähernd ähnliche steile Kurve verwandelt und die erreichte Phosphorylierung (9,2 mg P_2O_5) jenem Maximum naheliegt, welches bei normalem Muskelpulver (11,4 mg P_2O_5) beobachtet wurde.

Nach der Entdeckung des Insulins (*Banting* und *Best* 1922) wurden sofort Versuche vorgenommen, welche den Mechanismus der blutzuckervermindernden Wirkung des Insulins durch Versuche in vitro zu erklären suchten¹. Die bisher durchgeführten Untersuchungen sprechen dafür, daß die zuckervermindernde Wirkung des Insulins im Organismus wenigstens zum Teil darauf zurückgeführt werden kann, daß es auf irgend eine Weise den Zuckerabbau steigert. Die Frage, welche demnach beantwortet werden soll, lautet: In welcher Phase des Zuckerabbauprozesses und auf welche Weise übt das Insulin seine Wirkung aus?

Den Einfluß des Insulins auf die alkoholische Gärung, auf diesen auch in seinen einzelnen Teilen bekanntesten Zuckerabbauprozess, studierten *Fürth*², *Euler* und *Myrbäck*³ und *Abderhalden*⁴ und fanden, daß das Insulin ohne merklichen Einfluß auf den Zuckerabbau der Hefezellen war. *Euler* und *Myrbäck* prüften die Wirkung des Insulins auch auf gewaschene Trockenhefe, aber mit keinem positiven Erfolg, woraus sich ergibt, „daß die Cozymase bei der alkoholischen Gärung nicht durch Insulin ersetzt werden kann“; ähnliche Befunde wurden auch von *Virtanen*⁵ mitgeteilt. *Euler* und seine Mitarbeiter⁶ haben durch Tierversuche gezeigt, daß die gereinigte, sehr aktive Hefenozymase kein Insulin enthält.

Bei Versuchen mit Insulin in vivo beobachteten mehrere Forscher⁷, daß auf Insulinwirkung der Phosphatgehalt des Blutes, des Harns und der Muskulatur sich vermindert, dagegen die Menge des organisch

¹ Jüngst wurde von *Loewi* eine sehr interessante Theorie zur Erklärung der Insulinwirkung aufgestellt, nach welcher das Insulin die Glykoseabsorption der Blutkörperchen erhöhe. Da aber die neuesten Versuche infolge unerklärlicher Ursachen negativ ausfielen, gab *Loewi* (Klin. Wochenschrift 8, 391, 1929) seine Hypothese auf.

² *O. Fürth*, diese Zeitschr. 150, 265, 1924.

³ *H. Euler* und *K. Myrbäck*, Chem. d. Zelle u. Gewebe 12, 57, 1924; Zeitschr. f. physiol. Chem. 150, 1, 1925.

⁴ *E. Abderhalden*, Fermentforschung 8, 227, 1925; Zeitschr. f. physiol. Chem. 151, 165, 1926.

⁵ *A. J. Virtanen*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 58, 2441, 1925.

⁶ *H. Euler*, *C. Yorpes*, *K. Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 149, 60, 1925.

⁷ Die einschlägige Literatur s. *A. Grevenstuck* und *E. Laqueur*, Insulin, S. 102, München 1925; *J. J. R. Macleod*, Kohlehydratstoffwechsel und Insulin, S. 328, Berlin 1927; *H. K. Barrenscheen*, *F. Doleschall* und *L. Popper*, diese Zeitschr. 177, 50, 1926; *A. J. Virtanen* und *H. Karström*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 161, 218, 1926.

gebundenen Phosphats sich vermehrt¹. Nachdem die wichtige Rolle der Phosphorsäure beim Zuckerabbau bekannt ist, liegt der Gedanke nahe, daß die Phosphorylierung jene Phase des Zuckerabbauprozesses sein kann, an welcher das Insulin irgendwie teilnimmt. Wir bemerken aber, daß bei Versuchen in vivo die auf Insulinwirkung beobachtete Abnahme anorganischen Phosphats auch erfolgen kann, ohne dem Insulin eine besondere Rolle bei der Phosphorylierung zuschreiben zu müssen; denn z. B. *Barrenscheen* und seine Mitarbeiter² fanden, daß der anorganische Phosphatgehalt des Blutes bei gesunden Personen nach peroraler oder intravenaler Darreichung von Glucose sinkt; diese Erscheinung kommt dadurch zustande, daß die Zersetzung der eingeführten Glucose durch Beanspruchung von Phosphat vor sich geht; es ist also selbstverständlich, daß auch die auf die Insulinwirkung erfolgende Zuckerzersetzung mit der Abnahme des anorganischen Phosphats des Blutes usw. verknüpft ist. Nur allein die entsprechenden Versuche in vitro sind berufen zu entscheiden, ob das Insulin irgend eine unmittelbare Wirkung auf die Phosphorylierung ausübt.

Über Versuche in jener Richtung, daß man durch Versuche in vitro irgend eine Wirkung des Insulins bei der Phosphorylierung nachweisen kann, gaben zuerst *Collazo* und seine Mitarbeiter³ Rechenschaft ab, aber mit negativem Resultat (der Lactacidogenabbau im Muskelbrei wird durch Insulin vermehrt); eingehender beschäftigten sich mit diesem Problem *Brugsch* und seine Mitarbeiter⁴.

Sie haben ihre Versuche mit der Leber von normalen, gehungerten, vorher gehungerten und dann mit Insulin behandelten Versuchstieren (Meerschweinchen und Kaninchen) durchgeführt. Die Leber wurde zerrieben, der so gewonnene Brei in glucosehaltiger Ringerlösung suspendiert und die anorganische Phosphorsäure (nebstbei auch die Glucose und Milchsäure) in der aus dem Gemisch entnommenen Probe sofort und nach gewisser Zeit bestimmt; die Differenz der beiden Werte bedeutete die esterifizierte Phosphorsäuremenge. Aus den mitgeteilten Daten geht hervor, daß die Leber der normalen und gehungerten Tiere keine Phosphorsäure esterifizierte, dagegen war die Phosphorylierung in den Versuchen mit der Leber von insulinbehandelten Tieren ganz bestimmt bemerkbar (10 g Leber veresterten in $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde 1 bis 13 mg H_3PO_4 (= 0,7 bis 9,4 mg P_2O_5). In gleicher Weise haben sie einige Versuche auch mit Muskulatur angestellt,

¹ Es gibt allerdings auch Beobachtungen, welche die Erhöhung des organischen Phosphatgehalts (Lactacidogen) durch Insulin nicht bestätigen, ja sogar die Verminderung dessen beobachteten. (*J. A. Collazo, M. Haendel* und *P. Rubino*, *Klin. Wochenschr.* **3**, 323, 1924; *A. Grevenstuck* und *E. Laqueur*, *Insulin*, S. 93, München 1925; *J. J. R. Macleod*, *Kohlehydratstoffwechsel und Insulin*, S. 339, Berlin 1927.)

² *H. K. Barrenscheen* und Mitarbeiter, l. c.

³ *J. A. Collazo, M. Haendel* und *P. Rubino*, l. c.

⁴ *Th. Brugsch, H. Benatt, H. Horsters* und *R. Katz*, diese Zeitschr. **147**, 117, 1924.

ohne jedoch eine Phosphorylierung beobachtet zu haben. In einer späteren Mitteilung wird von *Brugsch* und *Horsters*¹ über solche Untersuchungen berichtet, wobei das Insulin nicht in das Tier injiziert, sondern direkt dem Leberbrei zugesetzt wurde; bei dem einen der so durchgeführten beiden Versuche haben sie in der Probe ohne Insulin zuerst die Zunahme (vor Beginn 1,3 mg-%, nach 15 Minuten 20 mg-% H_3PO_4), dann die Abnahme (nach 30 Minuten 11 mg-% H_3PO_4) nachgewiesen; bei der Probe mit Insulin war die Menge der H_3PO_4 vor Beginn 1,3 mg-%, welche beim weiteren Verlauf des Versuchs keine erhebliche Abnahme zeigte. Bei einem anderen Versuch war die Abnahme der anorganischen Phosphorsäure in der Probe ohne Insulin etwas deutlicher (1,4, 1,1, 0,6, 0,4 mg-% H_3PO_4) als in der Probe mit Insulin (1,4, 1,4, 0,9, 0,7, 0,7, 1,0 mg-% H_3PO_4). Aus den ähnlich durchgeführten neueren Versuchen, wobei das Insulin ins Versuchstier injiziert wurde, geht ein Einfluß des Insulins auf die Phosphorylierung ebensowenig hervor (ohne Insulin 1, 0,4, 0,6, 0,9, 0,6 mg-%, mit Insulin 0,5, 0,2, 0,4, 0,4, 1, 1,2 mg-% H_3PO_4). Sie haben ferner auch solche Versuche ebenfalls mit Leber von insulinbehandelten Tieren vorgenommen, bei welchen zu der einen Probe phosphathaltige Ringerlösung gebraucht wurde, „um deutlicher den Einfluß des Insulins auf die Phosphatase studieren zu können“. Die Versuche ergaben folgende Resultate: 10 g insulinierter Leberbrei esterifizierte ohne Phosphatzusatz 0, 0,3, 1,5 mg, mit Phosphatzusatz 7,9, 10, 12, 14 mg Phosphorsäure. *Auf Grund unserer Versuche kann nicht behauptet werden, daß Phosphatzusatz die Wirkung des Insulins auf die Phosphatase erhöhe, denn eine Erhöhung der Phosphatkonzentration steigert ja auch selbst allein (ohne Zusatz von Insulin) die Phosphorylierung.* Bei Wiederholung dieses Versuchs zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Phosphat (ohne Phosphat wurden 2, —, 5, 15, 9 mg, mit Phosphat —, 6, 7, 11, 5 mg Phosphorsäure verestert); bei diesem Versuch ist es auffallend, daß in der phosphathaltigen (1% Na_2HPO_4 , $\frac{2}{3}$ Na_2HPO_4 , $\frac{1}{3}$ NaH_2PO_4) Probe weniger Phosphat (27 mg-%) vor Beginn bestimmt wurde als in der Probe ohne Phosphatzusatz derselben Leberbreisuspension (32 mg-%).

Brugsch und *Horsters*² kamen auf Grund ihrer angeführten Versuche zu folgendem Ergebnis: „Unsere Versuche haben nun mit aller Eindeutlichkeit ergeben, daß sowohl in vivo wie in vitro *das Insulin das thermostabile Coenzym der Phosphatase ist, d. h. der Aktivator oder die Kinase der thermolabilen Phosphatase.*“ Das Insulin ist weder mit Cozymase der Hefe noch mit derselben des Muskels identisch; über das Insulin meinen sie: „Das Insulin ist vielmehr spezifisch, und zwar anscheinend für die ganze Reihe der Warmblüter.“ Da *Brugsch* und *Horsters*³ das im Muskel entstehende Hexose-di-phosphat nicht identisch mit dem Hefen-Hexose-di-phosphat fanden, empfehlen sie, den Unterschied zwischen den beiden Phosphorsäure-estern auch in der Benennung auszudrücken, (Muskel-Hexose-di-phosphat = Myophosphat; Hefen-

¹ *Th. Brugsch* und *H. Horsters*, diese Zeitschr. **155**, 459, 1925.

² *Dieselben*, Klin. Wochenschr. **4**, 436, 1925.

³ *Dieselben*, diese Zeitschr. **175**, 115, 1926; Zeitschr. f. physiol. Chem. **157**, 186, 1926.

Hexose-di-phosphat = Zymophosphat), dementsprechend sagen sie: „Die Phosphatase der Hefegärung und die Phosphatase der Muskulatur (bei Warmblütern!) sind verschieden“¹. Darin liegt eine Erklärung dafür, warum Euler und Myrbäck (l. c.) das Insulin wirkungslos auf die gewaschene Trockenhefe fanden (CO₂-Bildung, Phosphorylierung); bei ihren Versuchen mit frischem Muskelbrei war die Phosphorylierung in Gegenwart von Insulin größer als ohne Insulin, welche Beobachtung mit folgender Bemerkung begleitet wird: „Daraus können wir indessen nicht unbedingt schließen, daß die genannten Stoffe² die Phosphorylierung aktiviert haben, denn wir müssen bedenken, daß der ursprüngliche Gehalt an freiem Phosphat durch die zugesetzten Präparate etwa verdoppelt wurde.“ Nach unseren dargelegten Versuchen wird die Phosphorylierung durch die Erhöhung der Phosphatkonzentration stark gesteigert; auf diesen Umstand werden wir in Verbindung mit dem Insulin noch später zurückkommen.

Gleichzeitig mit den Untersuchungen von Brugsch und Horsters teilte Virtanen³ mit, daß der Zuckerumsatz und die Phosphorylierung in einem gewaschenen Trockenpräparat aus Milchsäurebakterien (*Bacterium casei* ε) nach Insulinzusatz wieder vor sich gehe, daß also bei der Milchsäuregärung das Insulin die Cozymase ersetzen kann. Auf Grund dieser Beobachtung findet dann Virtanen die Rolle des Insulins im Organismus darin, „daß das Insulin den Zuckerabbau im Organismus fördert, indem es die Zymophosphatbildung aktiviert“. Nach Versuchen von Meyerhof⁴ wurde durch den glykolytisches Ferment enthaltenden Extrakt Glucose kaum gespalten, aber ein aus Hefenautolysat durch Alkoholfällung gewonnener Aktivator, dem Extrakt zugesetzt, zeigte eine intensive Milchsäurebildung, der Aktivator war aber nicht durch Insulin ersetzbar. Freudenberg und Dirscherl⁵ haben bei der Wiederholung der Versuche von Virtanen (l. c.) gefunden, daß Insulin (sie haben sieben Insulinsorten geprüft) cozymasefreie Milchsäurebakterien nicht aktivierte (es wurde kein Zucker gespalten), aber der Zusatz von Extrakt aus Bakterien eine starke Aktivierung (Zuckerspaltung) hervorrief. Die von Virtanen beobachtete Aktivierung erklärten sie derartig, daß nach ihren Versuchen der rohe Pankreasextrakt aktivierte, der gereinigte Pankreasextrakt aber nicht, was darauf zurückgeführt werden kann, daß der rohe Extrakt durch die Reinigung vom Cozymasegehalt befreit wurde; es kann demnach die aktivierende Wirkung des von Virtanen angewandten Insulins (Wellcome) auf den Cozymasegehalt zurückgeführt werden. Jüngst wiederholte Virtanen⁶ selbst die Versuche mit

¹ Th. Brugsch und H. Horsters, diese Zeitschr. 175, 115, 1926.

² Insulin und Hefencozymase.

³ A. J. Virtanen, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 58, 696, 1925; diese Zeitschr. 171, 76, 1926.

⁴ O. Meyerhof, Naturwiss. 14, 1175, 1926.

⁵ K. Freudenberg und W. Dirscherl, Zeitschr. f. physiol. Chem. 157, 64, 1926.

⁶ A. J. Virtanen und H. Karström, Zeitschr. f. physiol. Chem. 174, 1, 1928.

verschiedenen Insulinarten auch mit dem Erfolg: „daß die jetzt angewandten Insulinpräparate die gewaschenen Trockenbakterien nicht aktivieren können“. Die bei den vorangehenden Versuchen beobachtete positive Wirkung erklärt auch *Virtanen* mit dem Cozymasegehalt des Insulinpräparats, fügt aber hinzu: „doch steht auch diese Erklärung nicht im Einklang mit der Unwirksamkeit der Präparate bei der gewaschenen Hefe“. Summarisch erklärt er: „wie es sich auch mit dieser Frage verhält, in jedem Falle ist die Beobachtung von der Wirksamkeit des Insulins bei der Milchsäuregärung aus der Literatur zu streichen“.

Brugsch und *Horsters*¹ führten auch Muskulaturversuche in größerer Anzahl durch, um beweisen zu können, daß das Insulin die Rolle einer Cophosphatase spielt. Sie haben festgestellt, daß „die Glykometamorphose (= Phosphorylierung) keine regelmäßig nachweisbare Erscheinung bei den Versuchen mit Muskeln ist“. Nach Zugabe von Insulin zum Muskelbrei haben sie in mehreren Fällen die Abnahme der anorganischen Phosphorsäure bestätigt. „Jedenfalls kann hiernach schon die aktivierende Eigenschaft des Insulins auch für die Muskelphosphatase als bewiesen angesehen werden.“ Sie haben weiterhin Versuche mit gewaschenem — dadurch von der Cozymase befreitem — Muskel durchgeführt; nimmt nämlich das Insulin tatsächlich die Rolle der Cozymase der Muskelphosphatase ein, so muß sich zwischen der Phosphorylierungsfähigkeit des gewaschenen Muskels und des gewaschenen Muskels + Insulin ein bedeutender Unterschied zeigen; aus den mitgeteilten Versuchsergebnissen geht hervor, daß ein solcher Unterschied nicht besteht (esterifizierte Phosphorsäure in $Mg_2P_2O_7$ ausgedrückt: gewaschener Muskel 0,15, 0,31, 0,51, —*, 0,49 %; gewaschener Muskel + Insulin 0,18, 0,02, 0,28, —** %), phosphorylierte sogar der gewaschene Muskel allein stärker als mittels Insulins; auch ein zweiter ähnlicher Versuch gab kein bestimmt positives Resultat.

*Chaikoff*² wiederholte die Leberversuche von *Brugsch* und seinen Mitarbeitern, ohne einen wesentlichen Unterschied zwischen den Versuchen mit und ohne Insulin gefunden zu haben. Jüngst wiederholten *Brugsch* und *Horsters*³ auch selbst auf einer breiten Grundlage diese Versuche und fanden bezüglich der Phosphorylierung, daß zwischen der phosphorylierenden Fähigkeit der Leberbreie mit und ohne Insulin — im Durchschnittswert mehrerer Versuche — kein Unterschied besteht.

*Laquer*⁴ sagt über die Verknüpfung des Insulins mit der Phosphorylierung folgendes: „Wenn sich auch ... eine Mitwirkung des Insulins bei den verschiedenen Stufen des Veresterungsprozesses zwischen Zucker und Phosphorsäure in vitro noch nicht nachweisen ließ, so muß man das einer zukünftigen, noch eingehenderen Analyse dieser recht verwickelten Reaktionsabläufe überlassen. Denn daß tatsächlich die Phosphorsäure auch bei der Insulinwirkung eine wichtige Rolle spielt, dafür sprechen doch zu viele Befunde...“

¹ *Th. Brugsch* und *H. Horsters*, diese Zeitschr. 178, 90, 1926.

* Wurde nicht bestimmt.

** Keine Abnahme, sondern Zunahme der Phosphorsäure.

² *I. L. Chaikoff*, Trans. soc. Can. 20, 27, 1926, zit. nach *Fritz Laquer*, Hormone und innere Sekretion, S. 21, 1928, Dresden u. Leipzig.

³ *Th. Brugsch* und *H. Horsters*, diese Zeitschr. 188, 147, 1927.

⁴ *F. Laquer*, l. c. S. 23.

Unsere sich auf die Phosphorylierung und auf den Zusammenhang zwischen der Phosphatase und Cozymase des Muskels beziehenden Versuche können zur Entscheidung der Frage, ob das Insulin als die spezifische Cozymase der Muskelposphatase zu betrachten ist oder nicht, als besonders geeigneter Grund dienen. Der NaF enthaltende Muskelbrei oder das Muskelpulver bieten sich als ganz entsprechendes Versuchsmaterial an, insofern in diesen nur die Bildung des Hexosediphosphorsäure-esters ungestört vor sich geht, die weitere Spaltung derselben durch NaF stark verhindert wird; die Wirkung des Insulins kann sich demnach nur auf den Vorgang allein beschränken, in welchem man ihm eine Rolle zuzuschreiben meint.

Die ersten Versuche wurden mit frischem Muskelbrei und mit zwei festen Insulinpräparaten (*Chemosan S 17*, *Leo*) durchgeführt. Aus den Versuchsergebnissen der Tabelle VII kann zuerst festgestellt werden, daß das in den Versuchen Nr. 1 und 2 angewandte *Chemosan-insulin* zum Vergleich mit dem Kontrollversuch (Nr. 3) die Phosphorsäureesterifizierung mit 40 bzw. 108% steigerte. Dieser Versuch kann als besonders gutes Beispiel dafür dienen, wie umsichtig man bei der Bewertung der gewonnenen Resultate verfahren muß; betrachten wir nämlich die P_2O_5 -Werte in 0 Stunden, fällt es sogleich auf, daß diese bei den Insulin *Chemosan S 17* enthaltenden Proben viel höher sind (9,66 und 16,61 mg P_2O_5) als bei der Kontrolle. Nach unseren Versuchen ist es aber bekannt, daß die Erhöhung der Phosphatkonzentration die Phosphorylierungsfähigkeit des Muskels beträchtlich steigert, es ist also klar, daß in diesem Falle nicht das angewandte Insulin, sondern das in dem Insulin vorhandene anorganische Phosphat (durch direkte Bestimmung fanden wir in zwei Tabletten Insulin *Chemosan* 22,46 mg P_2O_5) die Zunahme der Phosphorylierung hervorrief. Zum Beweis dessen dienen die Versuche Nr. 4 und 5, wo uns allein durch die Erhöhung des Na_2HPO_4 auf die in den Insulinproben vorhandenen Phosphatmengen, also *ohne Insulin*, die Phosphorylierung zu steigern gelang, und zwar in viel höherem Maße als durch das phosphathaltige Insulin *Chemosan*, woraus folgt, daß das angewandte Insulin als solches oder irgend ein darin vorhandener Stoff hindernd auf die Phosphorylierung einwirkte. Aus den 0-stündigen Proben der Versuche Nr. 6 und 7 und ferner der Kontrolle (Nr. 8) — welche mit einem aus einer anderen Packung entnommenen, *Chemosan R 3* bezeichneten Insulin angestellt wurde — ist es ersichtlich, daß das hier angewandte Insulin phosphatfrei war, und dieses phosphatfreie Insulin auf die Phosphorylierung keinen steigernden Einfluß hatte, sogar dieselbe dabei verminderte. Zum Versuch Nr. 9 haben wir Insulin *Leo* gebraucht; zum Vergleich mit der Kontrolle (Versuch Nr. 10) zeigt sich auch hier kein Unterschied; zu einem gleichen Versuche führte auch der mit Muskelpulver angestellte Versuch Nr. 11.

Auch die in der Tabelle VIII dargestellten Versuche Nr. 1 und 2 mit Muskelpulver zeigen, daß unter Wirkung von Insulin *Leo* das anorganische Phosphat nicht stärker abnimmt, als bei der Kontrolle. Nach Weglassen des NaF (Versuch Nr. 3 und 4) nimmt das anorganische Phosphat zuerst ab, dann zu (Phosphatasewirkung), ohne jedoch einen etwaigen Unterschied zugunsten des Insulins zu zeigen; diese Versuche bestätigen zugleich die Angabe von *Forrai*¹, daß das Insulin keinen Einfluß auf die Phosphatase ausübt. Nach unseren bekanntgegebenen Versuchen (Tabelle II) übte der Muskelkochsaft (= Muskelcozymase) auf das Muskelpulver nur eine geringfügige Aktivierung aus, was wir so gedeutet haben, daß das normale Muskelpulver die Cozymase in optimaler Konzentration enthält. Dasselbe kann auch auf das Insulin bezogen werden; deshalb haben wir auch Versuche mit gewaschenem Muskelpulver vorgenommen; soll das Insulin in der Tat die Rolle einer Cophosphatase spielen, so muß es die Phosphorylierung im gewaschenen Muskelpulver stark steigern. Die in dieser Richtung durchgeführten Versuche Nr. 5 und 6 zeigen ein völlig negatives Resultat.

Als wir die bekanntgegebenen Insulinversuche durchführten, sind wir über den Wirkungsmechanismus der höheren Phosphatkonzentration auf die Phosphatase und Cozymase noch nicht im klaren gewesen; da sich aber die reaktivierende Wirkung der Cozymase auf das gewaschene Muskelpulver nach unseren Untersuchungen nur bei höheren Phosphatkonzentrationen zeigte, darf man annehmen, daß bei den bisherigen Versuchen der reaktivierende Einfluß des Insulins wegen der niedrigen Phosphatkonzentration nicht beobachtet werden konnte; deshalb schien es notwendig, Versuche mit gewaschenem Muskelpulver und Insulin auch bei höherer Konzentration anzustellen. Das Muskelpulver für diese Versuche haben wir aus einem solchen frischen Muskelbrei bereitet, aus welchem vorher bei 0° die Cozymase ausgewaschen wurde, wodurch wir dann die Wirkung des Insulins auf ein sehr aktives, nur wenig geschädigte Phosphatase enthaltendes gewaschenes Muskelpulver zu studieren vermochten. Zu diesen Versuchen haben wir die folgenden Insulinarten angewendet: *Leo* (1 Tablette = 5 klinische Einheiten), *Kahlbaum* (40 mg = 500 klinische Einheiten), *Lilly* (1 ccm = 40 klinische Einheiten), *Insulgerman* (1 ccm = 20 klinische Einheiten). Da die in Handel gebrachten Insulinlösungen zwecks Desinfizierung auch noch Trikresol enthalten (ungefähr 0,3%), haben wir uns durch besondere Versuche (Nr. 8, Tabelle IX) überzeugt, daß Trikresol die Phosphorylierung des gewaschenen Muskelpulvers nicht beeinflusst.

Aus den in der Tabelle IX zusammengestellten Ergebnissen geht hervor, daß im Endresultat keine der angewendeten Insulinarten

¹ *E. Forrai*, diese Zeitschr. 189, 150, 1927.

aktivierend auf die Phosphorylierung des gewaschenen Pulvers einwirkte; denn aus den mitgeteilten 14 Insulinversuchen war die Phosphorylierung in 7 Fällen kleiner als in der Kontrolle; diese gelten also als negative Ergebnisse, in den anderen 7 Fällen steigerte das Insulin die Phosphorylierung im Verhältnis zur Kontrolle ($= 100\%$) um 1,5 bis 5,4%; aber auch der größte gewonnene Wert (5,4%) liegt innerhalb der Versuchsfehlergrenzen, denn auch zwischen parallelen Bestimmungen ist eine der 5,4%-Steigerung entsprechende Differenz von 0,24 mg P_2O_5 zu finden. Im Gegenteil zum Insulin steigerte auch hier Muskel- und Hefenkochsaft stark, im gewaschenen Muskelpulver um 94,8 bzw. 49,3% die Phosphorylierung. Vergleichen wir die Wirkung verschiedener Insulinmengen miteinander, so fällt es auf, daß sich die kleinste Insulinmenge (0,25 klinische Einheiten) verhältnismäßig noch als wirksamer erwies, als die größere Insulindose. Aus diesem Grunde haben wir auch Versuche mit kleineren Insulindosen als 0,25 klinische Einheiten durchgeführt, ohne aber eine Aktivierung der Phosphorylierung beobachtet zu haben.

Experimenteller Teil.

Darstellung des Muskelpulvers.

Gesunde Tauben wurden sofort nach der Entblutung seziert und die herausgenommene Brustmuskulatur sofort rasch durch eine Fleischhackmaschine getrieben. Aus dem erhaltenen Muskelbrei gewannen wir das Muskelpulver laut dem Verfahren von Euler und seinen Mitarbeitern folgendermaßen: Auf einmal wurden gewöhnlich zwei Tauben getötet, der erhaltene frische Muskelbrei von etwa 80 g mit $\frac{1}{2}$ Liter eiskaltem Alkohol verrührt, in den Eisschrank gestellt, nach 5 Minuten der Alkohol abgossen, der Brei mit der Hand ausgepreßt, eiskalter Alkohol (etwa $\frac{1}{4}$ Liter) wieder zugesetzt und 10 Minuten lang im Eisschrank unter mehrmaligem Durchschütteln stehengelassen. Nachdem wurde der Alkohol auf einem Büchnerschen Trichter abgesaugt, der Rückstand 2 Minuten lang mit 140 cm Äther in einer Porzellanschale gut durchgeknetet, der Äther scharf abgesaugt und diese Operation noch einmal wiederholt; die gewonnene Masse wurde auf Filtrierpapier ausgebreitet, bei Zimmertemperatur getrocknet, nach vollkommenem Austrocknen fein pulverisiert und das gewonnene Muskelpulver in gut schließenden Flaschen aufbewahrt. Mit diesem Verfahren wurden aus 80 g frischem Muskel etwa 20 g Muskelpulver gewonnen. Es zeigten sich in der Aktivität der zu verschiedenen Zeiten verfertigten Muskelpulver mehr oder weniger Unterschiede, welche man mit der verschiedenen Konstitution der Versuchstiere, mit der langsameren oder schnelleren Arbeit erklären kann; deshalb trugen wir besondere Sorge dafür, daß das Anstellen der Versuche innerhalb einer Versuchsserie mit einem homogenen Muskelpulver erfolge.

Darstellung des Muskel- und Hefenkochsafts.

Das Muskelpulver wurde mit der fünffachen heißen Wassermenge vermischt, 10 bis 15 Minuten lang auf dem Wasserbad unter beständigem

Rühren erhitzt, der gewonnene dicke Brei noch heiß zwischen Filtrierpapier und Leinwand ausgepreßt und das gelbliche, opaleszierende Filtrat (Muskelkochsaft) — dessen 4 ccm etwa 1 g Muskelpulver entsprach — zu den Versuchen gebraucht. Der Hefenkochsaft wurde aus der von Herrn Prof. Euler freundlichst überlassenen Trockenhefe verfertigt: die pulverisierte Hefe wurde mit dem sechsfachen Wasser verrührt, 2 Stunden lang stehengelassen, sodann $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf dem Wasserbad erwärmt und heiß durch Faltenfilter filtriert; das gelbliche, opalisierende Filtrat wurde zu den Versuchen gebraucht. Darüber, ob die Kochsäfte wirksam waren, d. h. Cozymase enthielten, überzeugten wir uns mittels Gärungsversuchen. Zu diesem Zwecke gebrauchten wir die von Euler und Myrbäck¹ ausgearbeitete schnelle, genaue und elegante Mikrogärmethode: in das Gärungsgefäß wurden 1 ccm Phosphatlösung ($p_H = 6,3$), 1 ccm 10 % Hexose-diphosphorsäure-natriumlösung (aus Candiölin mit $Na_2C_2O_4$ dargestellt), 0,3 g Glucose, 0,2 g gewaschene, cozymasefreie Trockenhefe (von Herrn Prof. Euler) und 2 ccm Muskel- oder Hefenkochsaft (bei der Kontrolle 2 ccm Wasser) eingewogen.

Darstellung cozymasefreien Muskelpulvers.

a) Durch Auswaschen.

1. 0,5 g Muskelpulver wurden im Zentrifugenrohr mit 25 ccm Wasser unter mehrmaligem Rühren bei Zimmertemperatur (20 bis 23°) 45 Minuten lang extrahiert, dann zentrifugiert (6 bis 7 Minuten lang bei einer Tourenzahl von 2500), die Flüssigkeit abgossen, der Rückstand mit 25 ccm Wasser verrührt, zentrifugiert und diese letztere Operation nochmals wiederholt. Das im Rohr zurückgebliebene, gewaschene Muskelpulver wurde nicht herausgenommen, sondern der Phosphorylierungsversuch im Rohre selbst angestellt. Mit diesem Verfahren kann man das Muskelpulver sehr gründlich von der Cozymase befreien (Tabelle III).

2. Der frische Muskelbrei wurde etwa mit der zehnfachen Menge eiskalten Wassers 5 Minuten lang im Eisschrank extrahiert, der Saft durch ein Tuch filtriert, der Rückstand im Tuche gut ausgepreßt; diese Operation wurde zweimal wiederholt und aus dem dreimal gewaschenen Muskel auf die bekannte Weise das Muskelpulver hergestellt. Nach dieser Methode kann man die Cozymase nicht so völlig entfernen wie nach der früheren Methode, sie hat aber den Vorteil, daß sie die Darstellung einer größeren Menge gewaschenen Muskelpulvers auf einmal ermöglicht, ferner daß die Phosphatase durch das Waschen bei 0° weniger beschädigt wird.

b) Nach der Methode von Euler.

Der frische Muskelbrei wurde in dünner Schicht auf einer flachen, eisgekühlten Glasschale aufgestrichen und nach zwei- bzw. viertägigem Aufbewahren im Eisschrank zur Herstellung des Muskelpulvers benutzt. Das so gewonnene Muskelpulver verhält sich ähnlich dem, aus dem auf 0° gewaschenen frischen Muskel verfertigten Muskelpulver (Tabelle IV).

Einstellung der Versuche.

Die Versuche wurden in 50 ccm-Pulvergläsern angestellt; zuerst wurde in das Glas eine gewisse Menge Na_2HPO_4 -Lösung von gewisser

¹ Nach brieflicher Mitteilung von Prof. Euler.

Konzentration und die zur Erreichung des gleichen Volumens nötige Wassermenge eingewogen (bei den Insulinversuchen wurde das Insulin in diesem Wasser aufgelöst), dann 1 ccm NaF-Lösung zugesetzt (in allen Fällen wurde eine 3,5 %ige NaF-Lösung gebraucht), 25 mg Glykogen in der Flüssigkeit aufgelöst und zuletzt 0,50 g Muskelpulver oder die äquivalenten 2 g frischen Muskelbreis zugesetzt. Der Inhalt der Gefäße wurde schnell vermisch (zu diesem Zwecke diente ein 4 cm langes Glasstäbchen, das so in einem passenden Metallrohr befestigt war, daß man es nach dem Vermischen in das Gefäß fallen lassen konnte, um die Verluste zu vermeiden¹); in ein bis zwei Gefäßen der Serie haben wir sofort die anorganische Phosphorsäure bestimmt (P_2O_5 mg in 0 Stunden); die anderen haben wir bei Zimmertemperatur stehengelassen und nach der Versuchszeit die Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure durchgeführt. Wir überzeugten uns mit besonderen Versuchen davon, daß die Anwendung von mehr als 25 mg Glykogen überflüssig und der Gebrauch von 1 ccm 3,5 %iger NaF-Lösung am geeignetsten ist. Die Konzentration und Menge der zu den Versuchen angewendeten Na_2HPO_4 -Lösung ist aus den Tabellen ersichtlich.

Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure.

Nach der Versuchszeit wurden in die Gefäße 20 ccm einer *Schenckschen* Lösung (2,5 % HCl und 4 % $HgCl_2$ enthaltend) eingewogen, gut geschüttelt und die Gefäße wenigstens 12 Stunden lang stehengelassen. Nach dem Stehen wurde die Flüssigkeit in ein trockenes Reagenzglas filtriert, durch Einleiten von H_2S -Gase das Quecksilber gefällt, aus der vom HgS abfiltrierten Lösung das H_2S mit Luftstrom ausgetrieben und in dem von der völlig geruchlosen, klaren Lösung abpipettierten Teile — der entsprechend der Konzentration zwischen 0,9 bis 9 ccm wechselte (wir trugen auch dafür Sorge, daß die Untersuchungslösung nicht mehr als 4 mg P_2O_5 enthält) — die anorganische Phosphorsäure nach der *Embdenschen*² Mikromethode bestimmt. Bei der Berechnung der Resultate haben wir stets auch die durch das in der Lösung suspendierte Muskelpulver verursachte Volumenänderung in Betracht gezogen, die wir zu 0,3 ccm fanden. Sämtliche in den Tabellen aufgezeichneten P_2O_5 -Werte sind auf 0,25 g Muskelpulver (= 1 g frischer Muskel) bezogen.

Tabelle I.

Wirkung des NaF auf die Phosphorylierung des Muskelpulvers.

Nr.	Versuchszeit	Zusammensetzung:		Esterifiziertes P_2O_5 in mg	
		1 ccm 1 %ige Na_2HPO_4 -Lösung + 2,5 ccm H_2O + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulver			
	Std.	+ 1 ccm H_2O P_2O_5 mg	+ 1 ccm NaF-Lösung P_2O_5 mg	H_2O	NaF
1	0	4,31	4,36	—	—
2	1	2,67	2,21	1,64	2,15
3	2	2,84	1,87	1,47	2,49
4	3	2,94	1,81	1,37	2,55
5	6	3,24	1,69	1,07	2,67
6	14	4,18	1,69	0,13	2,67

¹ J. Bodnár, diese Zeitschr. 165, 1, 1925.

² G. Embden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 113, 138, 1921.

Tabelle II.

Einfluß verschiedener Phosphatkonzentrationen und des Muskelkochsafts auf die Phosphorylierung des Muskelpulvers.

Nr.	Zusammensetzung				In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 6 Std. P ₂ O ₅ mg	Esterifi- ziertes P ₂ O ₅ mg
	Na ₂ HPO ₄ -Lösung		H ₂ O	+ 1 ccm NaF-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulver			
	o/o	ccm	ccm				
1	1	1	3	+ 4 ccm H ₂ O	3,86	0,85	3,01
2	1	4	—		11,00	3,41	7,59
3	2	3,5	0,5		17,58	7,92	9,66
4	4	3	1		28,80	17,85	10,95
5	5	4	—		44,75	33,33	11,42
6	—	—	4	+ 4 ccm Muskel- kochsaft	3,57	1,14	2,43
7	1	4	—		12,83	4,18	8,65
8	2	3,5	0,5		19,23	9,33	9,90
9	4	3	1		30,70	19,00	11,70
10	4	4	—		38,59	26,67	11,92

Tabelle IIa.

Gärungsversuche zur Kontrolle der Wirksamkeit des Muskelkochsafts.

Zusammensetzung: 1 ccm Phosphatlösung + 1 ccm Hexose- phosphat-Na-Lösung + 0,3 g Glucose + 0,2 g gewaschene Trockenhefe	ccm CO ₂ nach			
	45'	90'	150'	240'
+ 2 ccm H ₂ O	0,3	0,4	0,5	0,5
+ 2 ccm Muskelkochsaft	3,7	4,5	5,2	6,0

Tabelle III.

Wirkung des Muskel- und Hefenkochsafts bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen auf die Phosphorylierung des gewaschenen (bei Zimmertemperatur) Muskelpulvers.

Nr.	Zusammensetzung				In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 6 Std. P ₂ O ₅ mg	Esterifi- ziertes P ₂ O ₅ mg
	Na ₂ HPO ₄ -Lösung		H ₂ O	+ 1 ccm Na F-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulver			
	o/o	ccm	ccm				
1	1	1	3	+ 4 ccm ^o H ₂ O	2,74	2,35	0,39
2	2	4	—		18,00	16,74	1,26
3	4	3	1		27,44	25,86	1,58
4	4	4	—		34,85	33,59	1,26
5	—	—	4	+ 4 ccm Muskel- kochsaft	2,44	1,90	0,54
6	2	4	—		19,66	15,43	4,23
7	4	3	1		29,20	24,39	4,81
8	4	4	—		36,35	31,27	5,08
9	—	—	4	+ 4 ccm Hefen- kochsaft	6,61	6,14	0,47
10	2	3	1		17,89	15,32	2,57
11	4	2,5	1,5		29,60	25,18	4,42
12	4	3,75	0,25		39,55	34,66	4,89

Tabelle IIIa.

Gärungsversuche zur Kontrolle der Wirksamkeit des Muskel- und Hefenkochsafts.

Zusammensetzung: 1 ccm Phosphatlösung + 1 ccm Hexose- phosphat-Na-Lösung + 0,3 g Glucose + 0,2 g gewaschene Trockenhefe	ccm CO ₂ nach				
	30'	60'	120'	180'	240'
+ 2 ccm H ₂ O	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
+ 2 „ Muskelkochsaft	3,0	3,6	4,5	5,1	5,6
+ 2 „ Hefenkochsaft	3,7	5,0	6,4	7,3	8,4

Tabelle IV.

Phosphorylierung des von der Cozymase nach *Euler* befreiten Muskelpulvers bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen und beim Zusatz von Muskelkochsaft. A = Muskelpulver, hergestellt aus dem 2 Tage lang auf Eis aufbewahrten Muskelbrei; B = Muskelpulver, hergestellt aus dem 4 Tage lang auf Eis aufbewahrten Muskelbrei.

Nr.	Zusammensetzung				In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 6 Std. P ₂ O ₅ mg	Esterifi- ziertes P ₂ O ₅ mg
	Na ₂ HPO ₄ -Lösung		H ₂ O ccm	+ 1 ccm NaF-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulv. A			
	o/o	ccm					
1	1	2	—	+ 2 ccm H ₂ O	7,62	6,17	1,45
2	4	1,5	0,5		16,85	14,68	2,17
3	4	2	—		21,40	18,81	2,59
4	5	2	—		26,71	23,60	3,11
5	6	2	—		32,34	28,85	3,49
6	8	2	—		38,62	36,06	2,56
7	1	2	—	+ 2 ccm Muskel- kochsaft	8,94	6,50	2,44
8	4	1,5	0,5		18,09	14,17	3,92
9	5	2	—		28,23	23,60	4,63
10	8	2	—		39,82	35,15	4,67
				+ 1 ccm NaF-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulv. B			
11	6	2	—	+ 2 ccm H ₂ O	32,42	29,57	2,85
12	8	2	—		38,70	36,20	2,50
13	6	2	—	+ 2 ccm Muskel- kochsaft	33,68	29,27	4,41

Tabelle IVa.

Gärungsversuch zum Vergleich des Cozymasegehalts von Muskelpulvern.

Zusammensetzung: 1 ccm Phosphatlösung + 1 ccm Hexose- phosphat-Na-Lösung + 0,3 g Glucose + 0,2 g gewaschene Trockenhefe	ccm CO ₂ in			
	45'	90'	120'	420'
+ 2 ccm Kochsaft normalen Muskel- pulvers	3,8	4,7	5,5	8,3
+ 2 ccm Kochsaft d. Muskelpulvers A	3,9	4,5	4,8	6,0
+ 2 „ „ „ „ B	3,5	4,1	4,4	5,5

Tabelle V.

Phosphorylierung des 5 Wochen lang aufbewahrten Muskelpulvers bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen und beim Zusatz von Muskelkochsaft.

Nr.	Zusammensetzung				In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 6 Std. P ₂ O ₅ mg	Esterifi- ziertes P ₂ O ₅ mg
	Na ₂ H P O ₄ -Lösung		H ₂ O	+ 1 ccm Na F ₂ -Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulver			
	‰	ccm	ccm				
1	1	1	3	+ 4 ccm H ₂ O	4,02	0,96	3,06
2	2	3	1		13,95	6,54	7,41
3	2	4	—		18,00	9,90	8,10
4	4	3	1		27,40	18,75	8,65
5	4	4	—		34,70	26,66	8,04
6	—	—	4	+ 4 ccm Muskel- kochsaft	4,46	1,68	2,78
7	2	3	1		16,54	8,46	8,08
8	2	4	—		20,60	11,85	8,75
9	4	3	1		29,77	20,05	9,72
10	4	4	—		37,00	26,96	10,04

Tabelle VI.

Phosphorylierung des aus bei 0° C dreimal gewaschenem frischen Muskelbrei dargestellten Muskelpulvers bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen und beim Zusatz von Muskelkochsaft.

Nr.	Zusammensetzung				In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 6 Std. P ₂ O ₅ mg	Esterifi- ziertes P ₂ O ₅ mg	
	Na ₂ HPO ₄ -Lösung		H ₂ O ccm	+ 1 ccm NaF-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulver				
	o/o	ccm						
1	1	1,5	2,5		3,95	1,82	2,13	
2	1	4	—		10,27	7,50	2,77	
3	2	3,5	0,5		+ 4 ccm H ₂ O	16,72	13,08	3,64
4	4	4	—		35,10	30,52	4,58	
5	5	4	—		41,46	36,87	4,59	
6	1	1,5	4,5	+ 2 ccm Muskel- kochsaft	5,35	1,91	3,44	
7	1	4	2		11,70	6,31	5,39	
8	2	3,5	2,5		18,15	11,64	6,51	
9	4	4	2		36,53	29,00	7,53	
10	1	1,5	2,5	+ 4 ccm Muskel- kochsaft	6,90	2,48	4,42	
11	1	4	—		13,13	6,52	6,61	
12	2	3,5	0,5		19,58	11,64	7,94	
13	5	4	—		44,32	35,10	9,22	

Tabelle VII.
Wirkung des Insulins auf die Phosphorylierung des frischen Muskelbreis und des Muskelpulvers.

Nr	Zusammensetzung					In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 6 Std. P ₂ O ₅ mg	Esterifi- ziertes P ₂ O ₅ mg
	Na ₂ HPO ₄ -Lösung		H ₂ O ccm	+ 1 ccm Na F-Lösung + 25 mg Glykogen + 2 g frischer Muskelbrei				
	%	ccm						
1	1	0,5	1,5	+ 2) Einh. Insulin	9,66	7,74	1,92	
2	1	0,5	1,5	+ 5) <i>Chemosan S 17</i>	16,61	13,76	2,85	
3	1	0,5	1,5	Kontrolle	4,07	2,70	1,37	
4	2	1,5	0,5	—	9,97	5,85	4,12	
5	4	1,5	0,5	—	17,20	11,30	5,92	
6	—	—	2	+ 2) Einh. Insulin	3,07	1,91	1,16	
7	—	—	2	+ 5) <i>Chemosan R 3</i>	2,88	1,94	0,94	
8	—	—	2	Kontrolle	3,15	1,89	1,26	
9	1	0,5	1,5	+ 2 Einh. Insulin <i>Leo</i>	4,50	3,07	1,43	
10	1	0,5	1,5	Kontrolle	4,51	3,07	1,44	
				+ 1 ccm Na F-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulver				
11	—	—	3,5	+ 2 Einh. Insulin <i>Leo</i>	1,87	0,81	1,06	
12	—	—	3,5	Kontrolle	1,99	0,86	1,13	

Tabelle VIII.

Wirkung des Insulins auf die Phosphorylierung des normalen und des gewaschenen (bei Zimmertemperatur) Muskelpulvers.

Nr.	Zusammensetzung					In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 2 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 3 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 6 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 14 Std. P ₂ O ₅ mg
	Na ₂ HPO ₄ -Lösung		H ₂ O ccm	+ 1 ccm NaF-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g normales Muskelpulver						
	o/o	ccm								
1	1	1	2,5	+ 2 Einheiten Insulin Leo	4,86	1,85	1,77	1,78	—	
2	1	1	2,5	Kontrolle	4,84	1,86	1,84	1,83	—	
				+ 1 ccm H ₂ O + 25 mg Glykogen + 0,5 g normales Muskelpulver						
3	1	1	2,5	+ 2 Einheiten Insulin Leo	4,31	2,67	2,94	3,24	4,17	
4	1	1	2,5	Kontrolle	4,38	2,87	2,94	3,26	4,18	
				+ 1 ccm NaF-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g gewaschen. Muskelpulver						
5	2	0,8	2,2	+ 5 Einheiten Insulin Leo	4,03	3,53	3,52	3,47	—	
6	2	0,8	2,2	Kontrolle	4,01	3,74	3,65	3,58	—	

Tabelle IX.

Wirkung des Insulins auf die Phosphorylierung des gewaschenen (bei 0° C) Muskelpulvers.

Nr.	Zusammensetzung				In 0 Std. P ₂ O ₅ mg	Nach 3 Std. P ₂ O ₅ mg	Esterifiziertes P ₂ O ₅ mg	Die Phosphory- lierung wurde gesteigert um o/o
	Na ₂ HPO ₄ -Lösung		H ₂ O ccm	+ 1 ccm NaF-Lösung + 25 mg Glykogen + 0,5 g Muskelpulver				
	o/o	ccm						
1	2	4	4	+ 10 Einheiten Insulin <i>Leo</i>	18,66	14,21	4,45	0
2	2	3	1	+ 4 ccm Hefenkechsaft	20,61	13,83	6,78	49,3
3	2	4	4	Kontrolle	18,63	14,07	4,56	—
4	2	4	4	+ 50 Einheiten Insulin <i>Kahlbaum</i>	16,35	12,05	4,30	4,6
5	2	4	4	+ 100 " "	16,44	12,22	4,22	2,6
6	2	3,4	0,6	+ 4 ccm Muskelkechsaft	16,92	8,91	8,01	94,8
7	2	4	4	Kontrolle	16,44	12,33	4,11	—
8	2	4	3	+ 1 ccm 1%ige Trikeslösung	16,32	12,06	4,26	—
9	2	4	4	+ 10 Einheiten Insulin <i>Kahlbaum</i>	18,55	14,28	4,27	0
10	2	4	4	+ 5 " "	18,55	14,31	4,24	0
11	2	4	4	+ 1 " "	18,55	14,03	4,52	2,0
12	2	4	4	+ 0,25 " "	18,55	13,94	4,61	4,0
13	2	4	4	+ 10 " " Insulgerman	18,55	14,43	4,12	0
14	2	4	4	+ 2 " "	18,55	14,41	4,14	0
15	2	4	4	+ 0,25 " "	18,55	13,89	4,66	5,1
16	2	4	4	+ 10 " " <i>Lilly</i>	18,55	14,46	4,09	0
17	2	4	4	+ 2 " "	18,55	14,31	4,24	0
18	2	4	4	+ 0,25 " "	18,55	13,88	4,67	5,4
19	2	4	4	Kontrolle	18,55	14,12	4,43	—
20	4	4	4	+ 10 Einheiten Insulin <i>Kahlbaum</i>	37,00	31,69	5,31	1,5
21	4	4	4	Kontrolle	37,08	31,85	5,23	—

Zusammenfassung.

1. Zum Studium der Phosphatase erwies sich das nach dem Verfahren von *Euler* aus Taubenbrustmuskulatur gewonnene Muskelpulver als besonders geeignetes Objekt, da es in der Zusammensetzung $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaF} + \text{Glykogen} + \text{Muskelpulver}$ stark phosphorylierte.

2. Die Menge der durch das Muskelpulver esterifizierten Phosphorsäure steigt mit der Phosphatkonzentration stark an; 0,25 g Muskelpulver (1 g frischer Muskel) esterifizierte maximal 11,42 mg (= 4,57%) P_2O_5 ; Muskelkochsaft übte auf die Phosphorylierung des nativen Muskelpulvers keine erhebliche Wirkung aus, was so zu erklären ist, daß das Muskelpulver die Cozymase in optimaler Menge enthält.

3. In dem mit Wasser bei Zimmertemperatur gewaschenen Muskelpulver wird die Phosphorylierung in hohem Maße herabgesetzt, was einerseits auf den Mangel an Cozymase zurückgeführt werden kann, da Muskelkochsaft im Falle höherer Phosphatkonzentrationen die Phosphorylierung des gewaschenen Muskelpulvers bedeutend steigert (was bei niedrigen Phosphatkonzentrationen nicht zu beobachten ist); gewaschenes Muskelpulver esterifizierte 0,63%, gewaschenes Muskelpulver + Muskelkochsaft 2,03% P_2O_5 ; andererseits aber kann dieses Herabsetzen auf eine gewisse, mit dem Auswaschen der Cozymase verknüpfte Schädigung der Phosphatase zurückgeführt werden, die sich in der Verschiebung des Phosphorylierungsoptimums nach kleineren Phosphatkonzentrationen äußert. Durch Muskelkochsaft wird im gewaschenen Muskelpulver nicht nur die Phosphorylierung gesteigert, sondern es ist auch befähigt, der durch die Phosphateschädigung verursachten Optimumverschiebung entgegenzuwirken.

4. Statt Muskelkochsaft wirkt auch Hefenkochsaft reaktivierend auf die Phosphorylierung des gewaschenen Muskelpulvers ein, die tierische Cozymase kann also auch selbst bei der Phosphorylierung durch Hefencozymase ersetzt werden.

5. Wird aus dem Muskel die Cozymase nicht durch Waschen des Muskelpulver bei Zimmertemperatur, sondern nach dem Verfahren von *Euler*, oder durch Waschen des frischen Muskelbreis bei 0° entfernt, so wird die Phosphatase weniger geschädigt, das Optimum der Phosphorylierung wird nicht nach kleinerer Phosphatkonzentration verschoben; das Phosphorylierungsoptimum in dem bei 0° gewaschenen Muskelpulver liegt nach Zusatz von Muskelkochsaft nahe der bei dem nativen Muskelpulver beobachteten optimalen Phosphorylierung.

6. Das Muskelpulver bewahrt seine Phosphorylierungsfähigkeit ziemlich lange, nach fünfwöchigem Aufbewahren setzt sich seine Aktivität nur um 20% herab. Die Phosphorylierungsfähigkeit des frischen Muskelbreis sinkt dagegen äußerst rasch (nach einigen Stunden) herab.

7. Durch Insulin wird die Phosphorylierungsfähigkeit weder in frischem Muskelbrei, noch im Muskelpulver beeinflusst.

8. Das Insulin übt auch auf die Phosphorylierung des cozymase-freien Muskelpulvers — unter den günstigsten Bedingungen (hohe Phosphatkonzentration, wenig geschädigte Phosphatase) — keine beträchtliche Wirkung aus; die unter Insulinwirkung in einzelnen Fällen beobachtete Steigerung der Phosphorylierung (maximal 5,4%) liegt innerhalb der Fehlergrenzen, dagegen wurde die Phosphorylierung durch Muskelkochsaft um 94,8% und durch Hefenkochsaft um 49,0% gesteigert. Die im einzigen Falle beobachtete erheblich steigernde Wirkung des Insulins auf die Phosphorylierung kann auf den hohen anorganischen Phosphatgehalt des gebrauchten Insulins zurückgeführt werden. Demnach kann das Insulin nicht als spezifischer Aktivator (Co-Phosphatase) der tierischen Phosphatase angesehen werden.

Es ist uns eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. *Hans v. Euler* unseren verbindlichsten Dank für die Überlassung der Trockenhefepräparate und für seine Ratschläge bezüglich seiner Mikrogärmethode auszusprechen. Wir danken auch bestens den chemischen Fabriken *Schering-Kahlbaum A. G.*, Berlin, *Chr. Brunnengräber*, Schwaan, und *Lövens*, Kopenhagen, für die freundliche Überlassung von Insulinpräparaten.

Die in dieser Mitteilung publizierten Untersuchungen wurden mit Unterstützung des „*Ungarischen Naturwissenschaftlichen Landesfonds*“ ausgeführt.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses.

Seite

Karassik, W. M., Anna Petrunkina und Michail Petrunkin. Über die Verbindung von Curare mit einigen Eiweißstoffen und Farbstoffen und die Abhängigkeit dieses Prozesses vom p_H	70
Lintzel, W. Über die Wirkung des aktiven Eisenoxyds auf Blutbildung und Wachstum bei weißen Ratten	76
Magistris, Hugo. Über die hämolytische Wirkung einiger Abbau- produkte des Lecithins, der Lecithide und Phosphatide. I. Mit- teilung: Produkte der intermediären Hydrolyse	85
Tanaka, Shizuo und Masaharu Endo. Methode zur quantitativen Be- stimmung der Milchsäure in den tierischen Flüssigkeiten und Ge- weben	120
Bodnár, J. und Béla Tankó. Wirkungsmechanismus der Muskel- phosphatase, -cozymase und des Insulins	143
Bernhauer, K. Über Zuckeroxydationen und -zersetzen. III. Mit- teilung: Zur Theorie des Zuckerabbaues	175
— Über Zuckeroxydationen und -zersetzen. IV. Mitteilung: Zum Verhalten der Glucose in schwefelsaurer Lösung	186
Hinrichs, A. und L. Klemm. Erfahrungen über die titrimetrische Mikrocholesterinbestimmung	191
Henriques, V. und H. Okkels. Histochemische Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Eisenverbindungen innerhalb des Organismus	198
Niederhoff, P. Die alimentäre Blutzuckerkurve in Abhängigkeit von der Art des Zuckerpräparats	226
Pfeiffer, G. Bemerkung zu der Arbeit von E. Glimm und J. Isenbruch	231
Niel, C. B. van, A. J. Kluyver und H. G. Derx. Über das Butteraroma	234
Holtz, Friedrich. Mikro-Phosphatbestimmung	252

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN

Aus den Neuerscheinungen:

Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Von Dr. I. König, Dr.-Ing. h. c., Geh. Reg.-Rat, ord. Professor an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster i. W.

Dritter Band:

Untersuchung von Nahrungs-, Genußmitteln und Gebrauchsgegenständen. I. Teil: Allgemeine Untersuchungsverfahren. Mit 405 in den Text gedruckten Abbild. XIV, 772 Seiten. 1910. Dritter, unveränderter Neudruck. 1929. Gebunden RM 56.—

III. Teil: Die Genußmittel, Wasser, Luft, Gebrauchsgegenstände, Geheimmittel und ähnliche Mittel. Vierte, vollständig umgearbeitete Auflage. Mit 314 Abbildungen im Text und 6 lithographischen Tafeln. XX, 1120 Seiten. 1918. Unveränderter Neudruck 1929. Gebunden RM 78.—

Anleitung zur organischen qualitat. Analyse.

Von Dr. Hermann Staudinger, o. ö. Professor der Chemie, Direktor des Chemischen Universitätslaboratoriums Freiburg i. Br. Zweite, neubearbeitete Auflage. XV, 144 Seiten. 1929. RM 6.60

Chemiker-Kalender 1929. 50. Jahrgang. Ein Hilfsbuch für Chemiker, Physiker, Mineralogen, Industrielle, Pharmazeuten, Hüttenmänner usw. Begründet von Dr. Rudolf Biedermann. Fortgeführt von Prof. Dr. W. A. Roth. Herausgegeben von Prof. Dr. J. Koppel. Drei Teile in zwei Bänden. 1929. Gebunden RM 20.—

Einführung in die Elektrizitätslehre. Von Dr.-Ing. e. h., Professor R. W. Pohl (Göttingen). Zweite, verbesserte Auflage. Mit 393 Abbildungen. VII, 259 Seiten. 1929. Gebunden RM 13.80

Lehrbuch der Physik in element. Darstellung.

Von Dr.-Ing. e. h. Dr. phil. Arnold Berliner, Herausgeber der „Naturwissenschaften“. Vierte Auflage. Mit 802 Abbildungen. V, 658 Seiten. 1928. Gebunden RM 19.80

Einführung in die mathematische Behandlung naturwissenschaftlicher Fragen. Von Alwin Walther, o. Professor für Mathematik an der Technischen Hochschule Darmstadt. (Sonderausgabe aus „Methodik der wissenschaftlichen Biologie“.) Erster Teil: Funktion und graphische Darstellung. Differential- und Integralrechnung. Mit 174 Abbildungen. VIII, 220 Seiten. 1928.

RM 8.60; geb. RM 9.60

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

