

## 225. Untersuchungen über das L-Kynurenin-spaltende Enzym „Kynureninase“<sup>1)</sup>

von O. Wiss.

(20. VI. 49.)

In einer früheren Arbeit<sup>2)</sup> haben wir einen neuen biologischen Abbauweg des Kynurenins beschrieben: Es konnte gezeigt werden, dass aus Kynurenin, das zu homogenisierter Leber zugesetzt wird, Alanin und Anthranilsäure entstehen. Diese Reaktion ist vom Sauerstoff unabhängig. Es ist somit anzunehmen, dass die Kohlenstoffkette zwischen dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kohlenstoffatom hydrolytisch aufgespalten wird. Es erhebt sich die Frage, ob ausschliesslich das Kynurenin in dieser Weise abgebaut wird oder ob dieser Reaktion insofern allgemeine Bedeutung zukommt, als auch Abbauprodukte anderer Aminosäuren angegriffen werden. Bevor solche Probleme angegangen werden können, müssen die Reaktionsbedingungen genau bekannt sein. Im folgenden werden einige Eigenschaften des für die Spaltung verantwortlichen Enzyms beschrieben.

### Herstellung des Enzyms.

Die schon mitgeteilten Versuche wurden mit homogener Ratten- oder Meerschweinchenleber durchgeführt. Es hat sich nun gezeigt, dass sich das Enzym leicht extrahieren lässt und dass es auch nach mehrtägiger Dialyse seine Aktivität behält. Die Wirksamkeit bleibt auch nach Trocknung der Leber durch Acetonextraktion bestehen. Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen des Trockenpulverextraktes ist eine Anreicherung des wirksamen Enzymes möglich.

### Abhängigkeit der Aktivität von Phosphationen und von der Wasserstoffionenkonzentration.

Die bisher beschriebenen Versuche wurden in Gegenwart von Phosphatpuffer durchgeführt. Wird an Stelle von Phosphatpuffer Boratpuffer der gleichen Wasserstoffionenkonzentration verwendet, so wird die Spaltungsgrösse auf einen Bruchteil herabgesetzt. Zusatz von relativ geringen Phosphat- oder Pyrophosphatmengen hat eine Aktivierung zur Folge.

Die Enzymaktivität ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Die Spaltung verläuft optimal zwischen  $p_H$  7,3—8,0.

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der *Emil-Barell-Stiftung zur Förderung der medizinisch-wissenschaftlichen Forschung*.

<sup>2)</sup> O. Wiss und F. Hatz, *Helv.* **32**, 532 (1949).

## Vergleichende Untersuchungen über den Abbau von DL- und L-Kynurenin.

Abbauversuche mit DL-Kynurenin zeigen, dass höchstens diejenige Menge Alanin entsteht, welche der Hälfte des zugesetzten Kynurenins entspricht, während zugesetztes L-Kynurenin vollständig gespalten wird. Daraus geht hervor, dass D-Kynurenin nicht abgebaut wird. Werden die Abbaugrößen von Kynurenin, einerseits als L-, andererseits als DL-Kynurenin zugesetzt, verglichen, so zeigt sich, dass bei Zusatz von gleichen molaren Mengen von L-Kynurenin der Abbau des DL-Kynurenins geringer ist. D-Kynurenin hat somit eine hemmende Wirkung auf den L-Kynureninabbau.

### Experimenteller Teil.

#### Enzympräparate.

a) Extrakte: Im Mörser mit feinem Quarzsand homogenisierte Leber von Ratten, Meerschweinchen, Kälbern oder Schweinen wird mit dem doppelten Volumen Pufferpuffer versetzt und während ca. 15 Minuten bei 3500 Touren zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird entweder direkt verwendet oder während 1–3 Tagen gegen Puffer dialysiert. Die Dialyse erweist sich insofern als vorteilhaft, als der relativ hohe Alaningehalt des Leberextraktes dadurch stark herabgesetzt wird. An Stelle von nativer Leber kann auch Acetonrockenpulver von Kalbs- oder Schweinelebern als Ausgangsmaterial dienen. Das Pulver wird mit dem 10fachen Puffer- oder Wasservolumen während 5 Minuten bei 38° extrahiert.

b) Trockenpulver: Aus Acetonrockenpulver wird wie oben beschrieben der Extrakt hergestellt; pro 1000 cm<sup>3</sup> Enzymlösung werden 670 cm<sup>3</sup> gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben, der Niederschlag durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen; nach Zusatz von 130 cm<sup>3</sup> gesättigter Ammoniumsulfatlösung zur überstehenden Flüssigkeit fällt das wirksame Fermentprotein aus, das wiederum durch Zentrifugieren abgetrennt wird. Der Niederschlag wird durch scharfes Abnutschen vom überschüssigen Ammoniumsulfat befreit und der so gewonnene Rückstand im Hochvakuum bei tiefer Temperatur getrocknet. Die Ammoniakbestimmung ergibt, dass das Trockenpulver zu 30% aus Ammoniumsulfat besteht.

#### Abbauversuche.

Die Enzymaktivität wird durch Bestimmung des gebildeten Alanins ermittelt<sup>1)</sup>. Als Versuchsgefäße dienen gewöhnliche Reagenzgläser; die Gesamtflüssigkeitsmenge beträgt 3–5 cm<sup>3</sup>, die Temperatur 38°, die Versuchsdauer 5–24 Stunden. Wenn die Versuchsdauer 8 Stunden überschreitet, wird pro Ansatz 1 Tropfen Oktylalkohol als Desinfektionsmittel zugesetzt.

a) Native Extrakte: In der folgenden Tabelle (S. 1696) sind einige Versuchsergebnisse aufgeführt.

b) Ammoniumsulfatfällungen des Acetonrockenpulvers: 10 g Pulver werden mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser extrahiert, 80 cm<sup>3</sup> des Filtrates mit 45 cm<sup>3</sup> gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt; der Niederschlag wird durch Zentrifugieren abgetrennt, mit Ammoniumsulfatlösung derselben Konzentration einmal nachgewaschen und in 10 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer  $p_H = 7,73$  gelöst (Enzymlösung I). Die überstehende Flüssigkeit wird mit 20 cm<sup>3</sup> gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, der Niederschlag wie oben beschrieben abgetrennt, nachgewaschen und in 20 cm<sup>3</sup> Puffer gelöst (Enzymlösung II). Zu der nach der zweiten Fällung erhaltenen überstehenden Flüssigkeit werden 30 cm<sup>3</sup> gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugegeben; der Niederschlag wird abgetrennt, ausgewaschen und in 10 cm<sup>3</sup> Puffer gelöst (Enzymlösung III). Aus der Restlösung wird durch Zugabe von

<sup>1)</sup> O. Wiss, Helv. 31, 22 (1948).

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm <sup>3</sup>						
Tierart	Versuchsdauer	Dauer der Dialyse	p <sub>H</sub>	Enzym cm <sup>3</sup>	DL-Kynurenin zugesezt	Alanin gebildet
Ratte . . . . .	5 ½ h	20 h	7,4	1,0 1,0	0 m/200	m/2280 m/690
Ratte . . . . .	6 h	44 h	7,4	2,0 2,0	0 m/200	m/2020 m/523
Meerschweinchen .	6 h	48 h	7,73	1,0 1,0	0 m/150	m/4690 m/497
Schwein . . . . .	6 h	17 h	7,73	2,0 2,0	0 m/200	m/824 m/412
Schwein . . . . .	5 ½ h	65 h	7,73	2,0 2,0	0 m/200	m/2280 m/754
Ratte . . . . .	14 h	24 h	7,73	1,0 1,0	0 m/200	m/1348 m/440

festem Ammoniumsulfat bis zur Ganzsättigung eine vierte Fraktion gewonnen. Sie wird in der beschriebenen Weise isoliert und in 10 cm<sup>3</sup> Puffer gelöst (Enzymlösung IV). Die Nachprüfung ergibt, dass alle vier Enzymlösungen ungefähr denselben Eiweißgehalt aufweisen.

Aus der folgenden Tabelle ist ersichtlich, dass Fraktion II den Hauptanteil des wirksamen Fermentes enthält.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 5 cm <sup>3</sup>								
Enzymlösung	I		II		III		IV	
	5 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>	5 cm <sup>3</sup>
DL-Kynurenin zuge- setzt . . . . .	0	m/200	0	m/200	0	m/200	0	m/200
Alanin gebildet . .	m/610	m/610	m/900	m/316	m/900	m/447	m/1170	m/1170

c) p<sub>H</sub>-Optimum: Die Vergleichsansätze enthalten je 30 mg des Trockenpulvers, 3,12 mg DL-Kynurenin und 3 cm<sup>3</sup> einer Puffermischung von folgender Zusammensetzung.

p <sub>H</sub>	6,47	6,95	7,3	7,8	7,98	8,83	10,12	10,83
Kaliumphosphat prim. m/15 cm <sup>3</sup> . . . . .	2,1	1,75	1,54	1,4	0,15	0	0	0
Natriumphosphat sec. m/15 cm <sup>3</sup> . . . . .	0,9	0,75	0,66	0,6	2,85	3,0	2,85	2,0
Natriumphosphat tertiär m/15 cm <sup>3</sup> . . . . .	0	0,5	0,8	1,0	0	0	0,15	1,0

Das  $p_H$  wird mit der Glaselektrode festgestellt. Für jeden  $p_H$ -Wert wird ein Enzym-leerwert ohne Kynureninzusatz mitgeführt.

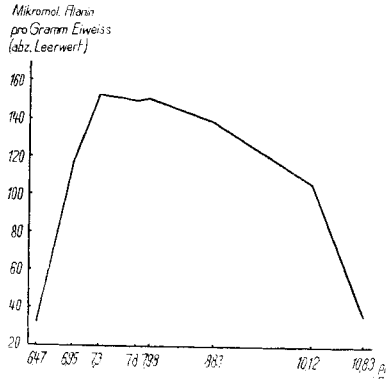


Fig. 1.

Aus Fig. 1 geht hervor, dass das  $p_H$ -Optimum zwischen  $p_H$  7,3—8,0 liegt.

d) Hemmung durch D-Kynurenin: Der Abbau von L-Kynureninsulfat<sup>1)</sup> wird verglichen mit demjenigen von DL-Kynureninsulfat, wobei dem L-Kynureninsulfat die doppelte Konzentration von DL-Kynureninsulfat gegenübergestellt wird. Aus folgender Gegenüberstellung geht hervor, dass der Abbau der DL-Form immer etwas geringer ist, was nur durch einen hemmenden Einfluss der D-Form erklärt werden kann. Solche sogenannten antipodischen Hemmungen wurden von *Edlbacher* und Mitarbeitern<sup>2)</sup> für die Histidase, von *Edlbacher* und *Wiss*<sup>3)</sup> für die D-Aminosäureoxydase beschrieben.

Enzym: Rattenerleberextrakt; Dauer der Dialyse = 18 h; Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm <sup>3</sup> ; Versuchsdauer = 5½ h									
Enzym cm <sup>3</sup> . . .	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
L-Kynurenin zugesetzt . . .	0	m/100	0	m/200	0	m/400	0	m/800	0
DL-Kynurenin zugesetzt . . .	0	0	m/50	0	m/100	0	m/200	0	m/400
Alanin gebildet	m/1894	m/460	m/567	m/402	m/500	m/483	m/590	m/605	m/736

e) Aktivierung durch Phosphationen: An Stelle von Phosphatpuffer wird Boratpuffer von  $p_H = 7,92$  verwendet. Im übrigen wird unter gleichen Versuchsbedingungen untersucht. In Abwesenheit von Phosphat wird Kynurenin nicht oder nur in ganz geringem Ausmass gespalten; nach Zusatz von Phosphat- oder Pyrophosphationen kommt der Abbau zustande, so dass eine Hemmung durch den Boratzusatz ausgeschlossen werden kann.

<sup>1)</sup> Dargestellt nach Angaben von *A. Butenandt, W. Weidel, R. Weichert* und *W. von Derjugin*, *Z. physiol. Ch.* **279**, 27 (1943).

<sup>2)</sup> *S. Edlbacher, H. Baur* und *M. Becker*, *Z. physiol. Ch.* **265**, 61 (1940).

<sup>3)</sup> *S. Edlbacher* und *O. Wiss*, *Helv.* **27**, 1831 (1944).

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm <sup>3</sup> . Versuchsdauer = a) 14 h; b) 20 h					
Versuch	Enzym (Trocken- pulver)	DL-Kynure- nin zugesetzt	Phosphat zugesetzt	Pyrophos- phat zugesetzt	Alanin: Mikromol. pro Gramm Eiweiss (abz. Enzymleer- wert)
a)	30 mg	m/200	0	0	8
	30 mg	m/200	m/200	0	61
	30 mg	m/200	0	m/200	110
b)	25 mg	m/200	0	0	0
	25 mg	m/200	m/100	0	103
	25 mg	m/200	0	m/100	120
	50 mg	m/200	0	0	37
	50 mg	m/200	m/100	0	130
	50 mg	m/200	0	m/100	144
	50 mg	m/200	0	m/100	144

### Zusammenfassung.

1. Das in der Leber enthaltene Kynurenin-spaltende Enzym „Kynureninase“ ist durch Wasser extrahierbar. Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des Acetontrockenpulver-Extraktes ist eine Anreicherung des Enzymes möglich.

2. Das  $p_H$ -Optimum liegt zwischen  $p_H$  7,3 und 8,0.

3. Durch das Enzym wird nur die L-Form abgebaut, D-Kynurenin hat einen hemmenden Einfluss.

4. Phosphat- und Pyrophosphationen aktivieren das Enzym.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

## 226. L'acidité de la cellulose

par A. J. A. van der Wyk et M. Studer.

(20 VI 49)

Un grand nombre de recherches ont déjà été effectuées pour déterminer le caractère acide de la cellulose. On s'est servi soit de l'alcalimétrie dont la marche est suivie par colorimétrie, conductibilité ou potentiométrie, soit de la formation de sels avec des colorants basiques tels que le bleu de méthylène. Le tableau 1 donne les résultats, trouvés par quelques auteurs pour le coton et exprimés en nombre de restes de glucose pour un groupe carboxyle («nombre de glucose»).