

Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.

XIII. Mitteilung: Durch Chinone nicht beeinflussbare Esterasen.

Von

O. Hoffmann-Ostenhof, Elisabeth Biach, S. Gierer und O. Kraupp.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 20. April 1948. Vorgelegt in der Sitzung am 29. April 1948.)

Im Rahmen unserer Arbeiten über die Beeinflussbarkeit der Aktivität einzelner Enzymsysteme durch Chinone und andere redoxaktive Substanzen haben wir nunmehr den Einfluß solcher Stoffe auf das katalytische Verhalten von Pankreaslipase und Serumcholinesterase untersucht. Diese beiden Fermente enthalten nach Angabe verschiedener Autoren¹ Sulfhydrylgruppen, welche für die enzymatische Wirkung wesentlich sein sollen; als Beweis wird die Hemmbarkeit der Fermente durch bestimmte Thioleagenzien angeführt. Da es nun wahrscheinlich ist, daß die Hemmung verschiedener von uns² wie auch von anderen Autoren³ untersuchter Enzymsysteme durch Chinone einer Reaktion freier Sulfhydrylgruppen im Fermentmolekül mit diesen Substanzen zuzuschreiben ist, erschien es uns interessant, auch die Pankreaslipase und die Serumcholinesterase auf analoge Erscheinungen zu prüfen.

Zu unserer Überraschung erwiesen sich aber Pankreaslipase ebenso wie Serumcholinesterase gegenüber Chinonen, Indophenolen und auch sogar gegen die freien Radikale Porphyrexid und Porphyrindin, die sehr starke Oxydationsmittel darstellen, völlig unempfindlich.

¹ T. P. Singer und E. S. G. Barron, J. biol. Chemistry **157**, 241 (1945). — D. Nachmansohn und E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. **21**, 797 (1939).

² Mh. Chem. **76**, 180 (1946); **78**, 53, 273 (1948); vgl. auch die vorstehende Mitteilung.

³ Vgl. z. B. L. Hellerman und M. E. Perkins, J. biol. Chemistry **107**, 241 (1934).

Methodik.

Die Bestimmung der Aktivität der Pankreaslipase wurde nach *Willstätter* und *Memmen*⁴ durchgeführt. Als Ferment fand ein käufliches gereinigtes Präparat von *Witte* Verwendung, als Substrat diente Methylbutyrat, das wir selbst herstellten und durch fraktionierte Destillation reinigten. Der Fermentansatz wurde durch Calciumoleat aktiviert, welches in der Lösung durch Zugabe äquivalenter Mengen von Natriumoleat und Calciumchlorid erzeugt wurde. Die Reaktionslösungen wurden durch einen Ammoniak-Ammonchlorid-Puffer nach *Michaelis* auf $p_H = 8$ gehalten.

Für einen Ansatz wurden 0,3 ccm Methylbutyrat, 5 ccm Pufferlösung, 5 ccm der zu untersuchenden Lösung des Effektors bzw. bei Blindversuchen 5 ccm Wasser in einen Kolben gebracht und im Thermostaten auf die Versuchstemperatur (30°) gebracht. Die Fermentlösung wurde durch Auflösen von 0,1 g des oben erwähnten Präparats in 10 ccm Glycerin, Aufwärmen dieser Lösung auf 30° und darauffolgendem Zusetzen von 10 ccm Wasser hergestellt. Nach Abfiltrieren durch Watte wurden davon 10 ccm zu der gepufferten Substrat-Hemmstofflösung zugesetzt und dann durch Zugabe von 1 ccm n-CaCl₂-Lösung in Wasser und 2 ccm gleichmolarer Natriumoleatlösung aktiviert. Von der so erzeugten Mischung wurden sofort 10 ccm entnommen und in 20 ccm n/50 HCl pipettiert und gegen Bromkresolpurpur (0,5 g pro 100 ccm Wasser) mit n/50 KOH titriert. Die restliche Reaktionsmischung wurde 2 Stunden im Thermostaten belassen, darauf wieder 10 ccm entnommen und in gleicher Weise titriert. Die Berechnung der Spaltwerte und einer eventuellen Aktivitätsbeeinflussung geschah in üblicher Weise. Die Bestimmung der Aktivität der Serumcholinesterase erfolgte in Anlehnung an eine Methode von *Delavmois* und *Casier*,⁵ wobei sehr zuverlässige, gut reproduzierbare Werte erhalten wurden. Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf einer potentiometrischen p_H -Messung; die durch fermentative Hydrolyse des Acetylcholins in Freiheit gesetzte Essigsäure verändert das p_H der Lösung. Die Messung wurde in einem doppelwandigen, zweifach durchlochten Glasgefäß von zirka 200 ccm Inhalt durchgeführt. Eine Öffnung trug eine Antimonelektrode, die vor jeder Messungsreihe frisch geschmirgelt wurde, die andere Öffnung einen porösen Tonstift, der die Verbindung zur Bezugslektrode, einer gesättigten Kalomelektrode, herstellte. Während der Messung diente ein zentral über dem Reaktionsgefäß angebrachter kleiner Elektromotor für gleichbleibende Rührung sowie ein Ultrathermostat mit Umlaufpumpe für Temperaturkonstanz (20°). Die beiden Elektroden waren durch kurze Kupferdrähte mit den Klemmen eines Jonometers nach *Lautenschläger* verbunden, dem nach dem Prinzip der *Poggendorfschen* Kompensationschaltung die abgegriffene EMK der Spannung eines 4-Volt-Akkumulators entgegengeschaltet war. Vor jeder Messung wurde die Spannung des Akkumulators gegenüber einem *Weston*-Element nachgeeicht.

Als Anfangswert des p_H wurde 6,8 gewählt, welches mit Hilfe eines Boratpuffers eingestellt wurde. Das weit im Alkalischen liegende Wirkungsoptimum der Serumcholinesterase konnte wegen der Zersetzlichkeit unserer Wirkstoffe in diesem Bereich nicht eingehalten werden. Als Fermentpräparat diente Pferdeserum; die Substratlösung wurde durch Auflösen von 1 g Acetylcholin in 10 ccm destilliertem Wasser täglich frisch hergestellt. Beide Lösungen wurden stets im Dunkeln unter Eiskühlung aufbewahrt. Fermentlösungen,

⁴ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **133**, 229 (1924).

⁵ Exper. **2**, 67 (1946).

die längere Zeit einer stärkeren Belichtung ausgesetzt waren, zeigten deutliche Aktivitätssteigerungen.

Die Messungen wurden durchgeführt, indem das Reaktionsgefäß zuerst mit 1 ccm der beschriebenen Substratlösung und 57 ccm destilliertem Wasser beschickt wurde. Nach Angleichung der Temperatur wurde die Spontanhydrolyse des Substrats verfolgt, wobei jeweils ein abgemessener kleiner Überschuß von $n/100$ NaOH über die zur Neutralisation der freigesetzten Essigsäure notwendigen Menge hinzugefügt wurde. Dann wurde gewartet, bis das ursprüngliche p_H wieder erreicht war. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Aus den hinzugefügten Laugenmengen und den entsprechenden Neutralisationszeiten läßt sich die Hydrolyse des Acetylcholins leicht berechnen. Nach etwa 15 Minuten Beobachtung der Spontanhydrolyse wurde 1 ccm Pferdeserum hinzugesetzt, die Hydrolyse unter Einfluß des Fermentes in gleicher Weise gemessen und schließlich darauf der zu untersuchende Wirkstoff in entsprechender Konzentration zugegeben und die Hydrolyse unter dessen Einfluß in analoger Art beobachtet. Zum Schluß wurde die Enzymwirkung durch Zusatz von Eserinlösung völlig gehemmt und noch einmal die Spontanhydrolyse gemessen, welche infolge der Abnahme der Substratkonzentration im Verlaufe des Versuches merklich geringer geworden war.

Die Werte für die Spontanhydrolyse vor und nach der Bestimmung wurden arithmetisch gemittelt und der erhaltene Mittelwert von der Gesamthydrolyse abgezogen, wodurch die Werte für reine Fermenthydrolyse bzw. durch Wirkstoffe beeinflusste Fermenthydrolyse erhalten wurden.

Die Wirkstoffe wurden allgemein in Wasser oder in Äthylalkohol gelöst; in der Hauptversuchsreihe war die Konzentration der untersuchten Chinone durchwegs 10^{-4} -molar.

Ergebnisse und Diskussion.

Sowohl an der Pankreaslipase als auch an der Serumcholinesterase wurde die Wirkung einer größeren Reihe von Benzochinonderivaten und Abkömmlingen der Naphthochinone (vgl. unsere früheren Mitteilungen), weiters einige Vertreter aus der Klasse der Indophenole sowie schließlich die freien Radikale Porphyrexid und Porphyrindin auf die Aktivität dieser Enzyme geprüft. Bei Einhaltung der geschilderten Versuchsbedingungen erwiesen sich sämtliche genannten Verbindungen als völlig wirkungslos. Beim Porphyrexid, der untersuchten Substanz mit dem höchsten Redoxpotential, gelang es unter Einschaltung einer mehrstündigen Inkubation dieser Verbindung mit dem Pankreaslipasepräparat vor Zugabe des Substrates bei der darauffolgenden Aktivitätsmessung eine schwache Hemmung (16%) nachzuweisen. Alle übrigen geprüften Stoffe zeigten auch unter diesen Bedingungen keine Beeinflussung der Lipase. Auch nichtaktivierte Pankreaslipase konnte bei Versuchen ohne Zusatz von Calciumoleat zum Ansatz in ihrer schwachen Aktivität nicht gehemmt werden.

Diese Ergebnisse erscheinen uns besonders deshalb als bemerkenswert, weil in der Literatur mehrere Hinweise zu finden sind, daß es sich bei

den beiden untersuchten Enzymen um sogenannte „Thiofermente“ handelt, also Fermente, die zur Ausübung ihrer Wirkung die Anwesenheit freier SH-Gruppen im Molekül brauchen. So gelang es *Barron* und *Singer*,¹ Pankreaslipase mit p-Chlormercuribenzoat, p-Aminophenyldichlorarsinhydrochlorid und 3-Amino-4-oxypyphenyldichlorarsinhydrochlorid zu hemmen; schon früher hatten *Weinstein* und *Wynne*⁶ über eine Hemmwirkung von Halogenessigsäuren auf dieses Ferment sowie über eine Reaktivierung durch Cystein und Thioglykolsäure berichtet; alle diese Befunde sprechen klar für die Thiolnatur des Fermentes. Eher könnte im Falle der Serumcholinesterase über die Existenz von für die Wirkung essentiellen SH-Gruppen ein Zweifel bestehen; immerhin wird aber über Hemmungen durch Jodessigsäure, Maleinsäure, Alloxan und oxydiertes Glutathion berichtet, während nach denselben Angaben SH-Glutathion reaktivierend auf derart gehemmte Cholinesterase wirken soll.⁷

Andererseits ist es kaum zu bezweifeln, daß die Hemmwirkung der Chinone auf eine Anzahl von Fermenten — es seien hier nur die Urease und das Papain genannt — auf eine Reaktion der Hemmstoffe mit für die Wirkung der Enzyme essentiellen Sulfhydrylgruppen zurückzuführen ist.

Unter der Annahme, daß es sich bei den von uns hier untersuchten zwei Enzymen tatsächlich um Thiofermente handelt, ist es nicht einfach, für die Nichthemmbarkeit durch Chinone eine Erklärung zu finden. In einer sehr gründlichen Arbeit über Sulfhydrylenzyme unterscheiden *Barron* und *Singer*⁸ drei verschiedene Arten von Reagenzien auf SH-Gruppen: 1. milde Oxydationsmittel (Ferricyanid, Porphyrindin, 2,6-Dichlorindophenol); 2. Alkylierungsmittel, wie z. B. Halogenessigsäuren, Jodacetamid; 3. Reagenzien, wie p-Chlormercuribenzoat und die Arsenverbindungen. Die erste Gruppe würde nur auf solche SH-Gruppen wirken können, welche genügend nahe aneinander gelagert sind, um die Bildung von S—S-Komplexen zu ermöglichen; die Halogenessigsäuren würden wohl mit mehr SH-Gruppen reagieren als die erste Gruppe; immerhin blieben aber noch unbeeinflussbare Sulfhydrylgruppen nachweisbar. Nur die Gruppe der Arsenverbindungen und das p-Chlormercuribenzoat seien imstande, mit allen im ursprünglichen Eiweißstoff vorhandenen SH-Gruppen zu reagieren. Entsprechend unterscheiden dieselben Autoren in einer anderen Arbeit¹ labile, also leicht reagierende, und träge SH-Gruppen.

Die Chinone, die in der obigen Zusammenstellung nicht genannt sind, sind nun schwer in das Schema einzuordnen. Sicherlich gehören sie als

⁶ J. biol. Chemistry 112, 649 (1935/36).

⁷ Vgl. *H. Kraut* und *Ä. Weischer* in Handbuch der Katalyse, herausgegeben von *G.-M. Schwab*, Bd. III, S. 158. Wien. 1941.

⁸ J. biol. Chemistry 157, 221 (1945).

Oxydationsmittel in die erste Gruppe; anderseits sind sie, wie *Kuhn* und *Beinert*⁹ in Modellversuchen gezeigt haben, imstande, mit Sulfhydrylgruppen eine Kondensation einzugehen, was allerdings durch sterische Verhältnisse oft erschwert sein dürfte.

Die essentiellen SH-Gruppen der von uns hier untersuchten Enzyme sollten also, wenn wir der Klassifizierung von *Singer* und *Barron* folgen, sich gegenüber den Chinonen träge verhalten; einerseits sind sie so gelagert, daß die Bildung von S—S-Bindungen ausgeschlossen ist, anderseits muß eine entsprechend den Vorstellungen von *Kuhn* und *Beinert* erfolgende Kondensation mit den Chinonen aus sterischen Gründen unmöglich sein.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung von Chinonen, Indophenolen, Porphyrexid und Porphyrindin auf die Aktivität von Pankreaslipase und Serumcholinesterase geprüft. Obwohl diese beiden Fermente nach zahlreichen Literaturangaben für ihre Wirkung die Existenz freier Sulfhydrylgruppen benötigen und unter den genannten Substanzen insbesondere die Chinone imstande sind, mit freien SH-Gruppen zu reagieren, ließ sich hier keine Hemmung beobachten. Es wird versucht, eine Erklärung für dieses Verhalten zu erbringen.

⁹ Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 606 (1944).