

Hemmwirkungen verschiedener Chinone auf einige Phosphomonoesterasen tierischen Ursprungs.

(XVIII. Mitteilung über bakteriostatische Chinone und andere
Antibiotica.)

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und Elisabeth Putz.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 9. Febr. 1950. Vorgelegt in der Sitzung am 23. Febr. 1950.)

In der XI. Mitteilung dieser Reihe¹ haben wir über die Hemmwirkungen verschiedener Chinone auf einige Phosphomonoesterasen der Hefe berichtet. Es erschien uns nun von Interesse zu untersuchen, ob sich auch tierische Phosphomonoesterasen in ähnlicher Weise verhalten wie die entsprechenden Enzyme der Hefe.

Ein Hinweis auf eine Hemmwirkung von Chinonen auf tierische Phosphatasen findet sich bereits bei *Sizer*², welcher berichtet, daß eine Anzahl oxydierender Substanzen, darunter auch *p*-Benzochinon, vier verschiedene Phosphomonoesterasen tierischen Ursprungs zu hemmen imstande sind. Die von *Sizer* untersuchten Fermente waren drei Phosphomonoesterasen mit alkalischem Wirkungsoptimum, und zwar das Ferment der Rinderniere, dasjenige der Rinderlunge und die Milchphosphatase, sowie das im sauren Bereich optimal wirkende Enzym der Rinderniere.

Für unsere Versuche haben wir nun die folgenden Fermente ausgewählt: die alkalische Phosphomonoesterase der Pferdeniere, die Serumphosphatase, sowie die Phosphatase des männlichen Harns. Diese Auswahl wurde deshalb getroffen, weil uns die Ausgangsmaterialien für die genannten Fermente zur Verfügung standen und auch, weil wir hofften, auf diese Art Aufschluß über das Verhalten aller isodynamer Gruppen der Phosphomonoesterasen³ zu erhalten, von welchen wir bei unseren früheren Versuchen¹ bereits die Typen A_{III} und A_{IV} in bezug auf ihre Hemmbarkeit durch Chinone untersucht hatten.

¹ Mh. Chem. 79, 421 (1948).

² J. biol. Chemistry 145, 405 (1942).

³ Vgl. *S. J. Folley* und *H. D. Kay*, *Ergebn. Enzymforsch.* 5, 159 (1936).

Methodik.

Gewinnung der Fermentpräparate. Die Darstellung der alkalischen Nierenphosphatase erfolgte genau nach den Angaben von *Albers* und *Albers*⁴. Als Ausgangsmaterial diente frische Pferdeniere. Für die Versuche mit der Serumphosphatase wurde frisches Pferdeserum, für diejenigen mit der Harnphosphatase männlicher Normalharn verwendet.

Substrate. Als Substrate fanden Phenolphthaleinphosphat, Phenolphosphat und β -Glycerophosphat Verwendung. Diese Präparate wurden sämtlich im hiesigen Laboratorium synthetisiert.

Durchführung der Hemmungsversuche. Diese erfolgte in gleicher Weise, wie in unserer früheren Mitteilung beschrieben¹, nur wurde für die alkalischen Fermente auch die Meßmethodik von *Huggins* und *Talalay*⁵ (Substrat: Phenolphthaleinphosphat) angewandt.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Hemmungsversuche mit den drei verschiedenen Fermenten sind in den Tabellen 1, 2 und 3 wiedergegeben.

Tabelle 1. Prozentuelle Hemmung der Aktivität der alkalischen Phosphomonoesterase aus Pferdenieren durch Chinone. pH 8,5 (Ammonchlorid-Ammoniak nach *Michaelis*); 30°, Versuchsdauer 30 Min.; Substrat: Phenolphthaleinphosphat (Kontrollversuche mit Phenolphosphat und β -Glycerophosphat).

Substanz	Prozentuelle Hemmung der Spaltung bei verschiedenen molarer Konzentration der Hemmstoffe			
	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-6}$
p-Benzochinon	25	10	4	—
Toluchinon	32	10	4	—
m-Xylochinon	—	30	18	—
p-Xylochinon	—	28	13	—
5-Methoxytoluchinon	—	2	0	—
Thymochinon	—	4	0	—
p-Dichlorbenzochinon	—	—	2	—
1,4-Naphthochinon	—	—	10	—
1,2-Naphthochinon	—	—	—	23
2-Chlor-1,4-naphthochinon	—	—	16	—
2-Methyl-1,4-naphthochinon	—	—	6	—
2-Oxy-3-chlor-1,4-naphthochinon ...	—	16	12	—
Lawson	—	—	4	—
Naphthazarin	—	—	—	0

Anmerkung zu Tabelle 1. Das verhältnismäßig niedrige pH der Versuche, welches vom für die Wirkung des Fermentes optimalen Wert 9,2 abweicht, wurde wegen der großen Empfindlichkeit der Chinone gegenüber alkalischen Lösungen gewählt. Trotzdem müssen wir annehmen, daß die zersetzlicheren unserer Substanzen (besonders p-Benzochinon und Toluchinon) auch unter den gewählten Bedingungen teilweise während des Versuches zerstört werden, so daß hier eine gewisse Ungenauigkeit der Messungen anzunehmen ist.

⁴ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **232**, 165, 189 (1935).

⁵ J. biol. Chemistry **159**, 399 (1945).

Tabelle 2. Prozentuelle Hemmung der phosphatatischen Wirkung von Pferdeserum durch Chinone. pH 9,2 (Ammonchlorid-Ammoniak); sonstige Bedingungen wie in Tabelle 1.

Substanz	Prozentuelle Hemmung der Spaltung bei verschieden molarer Konzentration der Hemmstoffe		
	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-6}$
p-Benzochinon.....	22	10	—
Toluchinon.....	22	9	—
m-Xylochinon.....	21	11	—
p-Xylochinon.....	22	10	—
5-Methoxytoluchinon.....	4	0	—
Thymochinon.....	3	0	—
p-Dichlorbenzochinon.....	—	4	—
1,4-Naphthochinon.....	—	7	—
1,2-Naphthochinon.....	—	—	16
2-Chlor-1,4-naphthochinon.....	—	9	—
2-Methyl-1,4-naphthochinon.....	—	6	—
2-Oxy-3-chlor-1,4-naphthochinon.....	19	10	—
Lawson.....	—	3	—
Naphthazarin.....	—	—	0

Anmerkung zu Tabelle 2. Bei den hier berichteten Versuchen wurde zur Vermeidung der Chinonzersetzung nach einer von der bei Tabelle 1 beschriebenen verschiedenen Technik gearbeitet. Der Hemmstoff wurde vor Zugabe des Substrats und der Pufferlösung 30 Min. auf die Fermentlösung einwirken gelassen. Kontrollversuche mit der oben beschriebenen Methodik ergaben weitgehende Übereinstimmung.

Tabelle 3. Prozentuelle Hemmung der im sauren Gebiet vorhandenen phosphatatischen Wirkung männlichen Normalharns durch Chinone. pH 5,5 (Citrat-HCl-Puffer nach Sørensen); sonstige Bedingungen wie in Tabelle 1.

Substanz	Prozentuelle Hemmung der Spaltung bei verschieden molarer Konzentration der Hemmstoffe		
	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-6}$
p-Benzochinon.....	29	15	—
Toluchinon.....	23	13	—
m-Xylochinon.....	20	8	—
p-Xylochinon.....	21	9	—
5-Methoxytoluchinon.....	5	0	—
Thymochinon.....	4	0	—
p-Dichlorbenzochinon.....	—	9	—
1,4-Naphthochinon.....	—	9	—
1,2-Naphthochinon.....	—	—	15
2-Chlor-1,4-naphthochinon.....	—	6	—
2-Methyl-1,4-naphthochinon.....	—	2	—
2-Oxy-3-chlor-1,4-naphthochinon.....	12	8	—
Lawson.....	—	8	—
Naphthazarin.....	—	—	0

Diskussion.

Unsere Versuche zeigen, daß sich alle drei untersuchten Fermente in ziemlich gleichartiger Weise durch Chinone hemmen lassen. Dies ist insoweit erstaunlich, als wir in der Nierenphosphatase nach *Albers* ein verhältnismäßig hoch gereinigtes Enzympräparat vor uns haben, während die Serumphosphatase und die Harnphosphatase in völlig ungereinigtem Zustand verwendet wurden. Außerdem ist die Harnphosphatase von den anderen beiden Enzymen durch ihr pH-Optimum im sauren Gebiet unterschieden, so daß auch hier ein Unterschied zu erwarten gewesen wäre. Ein Vergleich mit den seinerzeit¹ bei den Hefephosphatase erhaltenen Werten zeigt, daß auch die Oberhefenphosphatase mit dem pH-Optimum von 4,0 sich in ganz ähnlicher Weise wie die drei hier beschriebenen Fermente verhält. Die recht geringen Unterschiede sind nur quantitativer Natur; bemerkenswert ist, daß in allen Fällen das 1,2-Naphthochinon in sehr hoher Verdünnung noch einen starken Effekt ergibt und daß allgemein die Reihung der einzelnen Hemmstoffe nach ihrer Wirksamkeit bei allen vier Fermenten eine ziemlich gleichartige ist. Wie wir schon in der früheren Mitteilung¹ erwähnt haben, scheint die α -Glycerophosphatase der Hefe ein gegenüber Chinonen empfindlicheres System darzustellen als die anderen beschriebenen Fermente, aber auch hier dürften die Unterschiede mehr quantitativer als qualitativer Natur sein.

Wir haben nunmehr Phosphomonoesterasen aller vier bisher bekannten Klassen untersucht. Von den hier besprochenen Fermenten gehören dem Typus A_I nach *Folley* und *Kay*³ die alkalische Nierenphosphatase und die Serumphosphatase an. Von der ebenfalls zu dieser Klasse gehörenden alkalischen Phosphatase der Oberhefe, welche wir kürzlich isolieren und konzentrieren konnten⁶, sei hier nur kurz erwähnt, daß ihre Chinonempfindlichkeit derjenigen der Nierenphosphatase sehr ähnlich ist. Dem Typus A_{II} gehört die Harnphosphatase mit dem pH-Optimum 5,5 an; Typus A_{III} und Typus A_{IV} werden durch die seinerzeit¹ untersuchten Hefefermente repräsentiert. Die Übereinstimmungen der Chinonhemmungen lassen darauf schließen, daß bei allen Typen der Phosphomonoesterasen die durch Chinone bewirkten Hemmungen in gleicher Weise zustande kommen, wobei allerdings über den Mechanismus dieser Erscheinungen noch nichts ausgesagt werden kann. Festzustehen scheint aber jedenfalls, daß es sich hier nicht um eine Reaktion mit Sulfhydrylgruppen handelt, da die für Sulfhydrylgruppen spezifischen Reagenzien, wie Jodessigsäure und Porphyrexin, auf die vier verschiedenen isodynamen Typen der Phosphomonoesterasen keine derartigen Wirkungen ausüben, daß man annehmen könnte, daß die SH-Gruppen für die Aktivität der Fermente eine wesentliche Rolle spielen.

⁶ Exper. 4, 352 (1948); Festschr. für *P. Karrer*, S. 11, Zürich 1949.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung verschiedener Chinone auf drei Phosphomonoesterasen tierischen Ursprungs, die alkalische Nierenphosphatase, die Serumphosphatase und die Harnphosphatase, untersucht. Die Ergebnisse zeigen gemeinsam mit den Resultaten einer früheren Untersuchung, daß die Chinone in weitgehend gleichartiger Weise auf alle Typen der Phosphomonoesterasen einwirken, was den Schluß zuläßt, daß der Mechanismus dieser Hemmungen identisch ist. Über die Art dieses Mechanismus kann noch nichts ausgesagt werden.