

Eine neue Methode zur Bestimmung der Phenolsulfatase.

Von

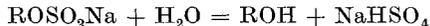
M. Pantlitschko und E. Kaiser.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 7. Juni 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 19. Juni 1952.)

Enzyme, die imstande sind, die verschiedensten Schwefelsäureester entsprechend der Gleichung



zu spalten, werden als Sulfatasen bezeichnet. Nach *Fromageot*^{1, 2} können die Sulfatasen nach ihrer Substratspezifität folgendermaßen eingeteilt werden:

1. *Phenolsulfatase* (spaltet Phenolschwefelsäureester).
2. *Glucosulfatase* (spaltet Kohlenhydratschwefelsäureester).
3. *Chondrosulfatase* (spaltet Chondroitin- und Mucoitinschwefelsäure).
4. *Myrosulfatase* (spaltet Sinigrin).

Entsprechend der oben angeführten Reaktionsgleichung sind folgende Möglichkeiten der Bestimmung der Phenolsulfatase gegeben:

1. Bestimmung des abgespaltenen NaHSO_4 .
2. Bestimmung des abgespaltenen ROH.
3. Indirekte Bestimmung des abgespaltenen NaHSO_4 durch Bestimmung des zurückgebliebenen ROSO_3Na .

Nach unseren Erfahrungen ergibt vor allem die Methode der Bestimmung der abgespaltenen ROH-Komponente die verlässlichsten Ergebnisse. Bereits 1911 hat *Derrien*³ eine qualitative Methode zur Bestimmung der Phenolsulfatase ausgearbeitet, die auf der Messung des freigesetzten Indoxyls aus Indoxylschwefelsäure beruht. Diese Methode wurde von *Neuberg* und *Wagner*⁴ für die quantitative Bestimmung der Phenolsulfatase umgearbeitet. 1937

¹ *C. Fromageot*, *Ergebn. Enzymforsch.* 7, 53 (1938).

² *C. Fromageot*, Sulfatasen in "The Enzymes" von *Sumner, Myrback*, Academic Press Inc. New York (1950).

³ *M. Derrien*, *Bull. Soc. chim. France* 9, 110 (1911).

⁴ *C. Neuberg* und *J. Wagner*, *Biochem. Z.* 161, 492 (1925).

hat *Morimoto*⁵ p-Nitrophenylsulfat als Substrat vorgeschlagen und eine derartige Bestimmungsmethode ausgearbeitet, die von *Huggins* und *Smyth*⁶ 1947 neuerlich beschrieben wurde. In neuester Zeit haben *Robinson* und Mitarbeiter⁷ das 2-oxy-4-nitrophenyl-schwefelsaure Kalium als Substrat verwendet.

Im Jahre 1945 haben *Huggins* und *Talalay*⁸ eine Methode zur Bestimmung der Phosphataseaktivität unter Verwendung von Phenolphthaleinphosphat als Substrat angegeben. Die gleichen Autoren⁹ verwendeten etwas später Phenolphthalein-glucuronid als Substrat für die Bestimmung der Glucuronidaseaktivität. Es lag nun nahe, das Natriumsalz des Phenolphthalein-dischwefelsäureesters als Substrat für die Bestimmung der Phenolsulfataseaktivität zu verwenden. Die Verwendung von Phenolphthalein-schwefelsaurem Natrium bietet unseres Erachtens den Vorteil eines höheren molaren Extinktionskoeffizienten des abgespaltenen Phenolphthaleins (Phenolphthalein: $\lambda = 5500 \text{ \AA}^\circ$; $E = 3,25 \cdot 10^4$ — p-Nitrophenol: $\lambda = 4000 \text{ \AA}^\circ$; $E = 1,44 \cdot 10^4$), wodurch eine größere Empfindlichkeit der Methode erreicht wird. Voraussetzung dafür ist allerdings die gleiche Angreifbarkeit des Substrates durch das Ferment. Diese konnte, wie später ausgeführt wird, auch tatsächlich nachgewiesen werden. Da unseres Wissens eine derartige Methode nicht beschrieben ist und auch die Darstellung des Substrates in der chemischen Literatur nicht bekannt ist, bringen wir eine kurze Darstellung unserer Versuchsergebnisse.

I. Experimenteller Teil.

1. *Darstellung des Natriumsalzes des Substrates*: 100 ccm Pyridin und 500 ccm Chloroform werden unter gutem Rühren und Eiskühlung vorsichtig mit 30 ccm frisch destillierter Chlorsulfonsäure versetzt. Unter weiterem Kühlen und Rühren werden 63,6 g Phenolphthalein, das in wenig Pyridin gelöst ist, zutropfen gelassen. Dabei soll die Temperatur nicht über 45° steigen. Man läßt über Nacht unter Rühren bei Zimmertemp. stehen, bis eine Probe beim Versetzen mit Puffer (pH 10,4) nicht mehr oder nur mehr ganz wenig gefärbt wird. Es wird unter Kühlung vorsichtig mit Wasser versetzt und vom Chloroform im Scheidetrichter getrennt. Das Chloroform wird nochmals mit Wasser ausgeschüttelt und die vereinigten wäßr. Auszüge i. Vak. bei Zimmertemp. eingedampft. Die Kristallmasse, die das Pyridinsalz des Phenolphthalein-dischwefelsäureesters darstellt, wird in Alkohol gelöst und mit alkohol. Natronlauge neutralisiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wird vom abgeschiedenen Natriumsulfat getrennt und das Natriumsalz des Phenol-

⁵ *K. Morimoto*, *J. Biochem. Japan* **26**, 259 (1937).

⁶ *C. Huggins* und *D. R. Smyth*, *J. biol. Chem.* **170**, 391 (1947).

⁷ *D. Robinson*, *J. N. Smith* und *R. T. Williams*, *Biochem. J. Proc.* **49**, Lxxiv. (1951).

⁸ *C. Huggins* und *P. Talalay*, *J. biol. Chem.* **159**, 399 (1945).

⁹ *P. Talalay*, *W. H. Fishman* und *Ch. Huggins*, *J. biol. Chem.* **166**, 757 (1946).

phthalein-dischwefelsäureesters durch Eindampfen gewonnen. Das Natriumsalz wird durch mehrmaliges Aufschwemmen in Äther vom freien Phenolphthalein befreit. Die Analyse ergab, daß es sich um das Natriumsalz des Dischwefelsäureesters des Phenolphthaleins handelt, das 2 Moleküle Kristallwasser enthält.

Analyse: Ber. 43,05, 2,86, 11,45. Gef. C 43,32, H 2,77, S 11,32.

Das Natriumsalz des Phenolphthalein-dischwefelsäureesters ist bei Zimmertemp. in brauner Flasche aufbewahrt ohne Zersetzung praktisch unbegrenzt haltbar. Auch Lösungen der Substanz in destilliertem Wasser bzw. Acetatpuffer von pH 5,8 erleiden keine Spaltung.

2. *Reagentien:* a) 0,1 m Acetatpuffer von pH 5,8. (63,97 g Natriumacetat werden in destilliertem Wasser gelöst, 1,7 ccm Eisessig zugefügt und auf 1000 ccm aufgefüllt. Diese Stammlösung muß 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt werden.)

b) 0,4 m Glycinpuffer von pH 10,45. (Dieser Puffer, der von *Talalay* und Mitarbeitern⁹ für die Glucuronidasebestimmung angegeben wurde, unterbricht die Fermentreaktion und entwickelt gleichzeitig die Farbe des in Freiheit gesetzten Phenolphthaleins. — 16,3 g Glykokoll und 12,65 g NaCl werden in destilliertem Wasser gelöst und mit 10,9 ccm konz. Natronlauge [100 g NaOH in 100 ccm H₂O] versetzt und auf 1000 ccm aufgefüllt.)

c) Substratlösung.

d) Fermentlösung (Takadiastase, Filtragol, Filtrazym [Dr. Sattler AG., Wien], Pektinex flüssig [Schweizerische

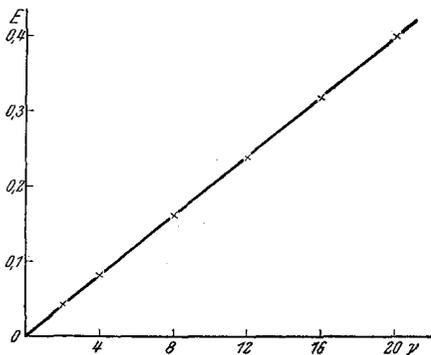


Abb. 1. Phenolphthalein-Eichkurve für die Bestimmung der Phenolsulfatase (Hilger-Non-recording Spectrophotometer 5500 Å — 2 cm Schichtdicke).

Ferment AG., Basel], Pectinol 10-M [Rohm & Haas Comp., Philadelphia].)*

3. *Versuchsansatz:* 0,5 ccm Substratlösung wurden mit 4,0 ccm Acetatpuffer versetzt. Anschließend wird nach Temperaturnausgleich (Wasserbad — 37°) 0,5 ccm der vorgewärmten Fermentlösung zugesetzt und bei 37° inkubiert. Nach der Inkubierung wird 5,0 ccm Entwicklungspuffer (pH 10,4) zugesetzt, wodurch die Fermenteinwirkung unterbrochen und die Farbe des in Freiheit gesetzten Phenolphthaleins entwickelt wird. Die entwickelte Farbe kann in jedem beliebigen Kolorimeter gegen eine Leerprobe, die mit inaktiviertem Ferment angesetzt wurde, durchgeführt werden. Wir verwendeten das lichtelektrische Kolorimeter „Lumetron“ (Mod. 400-GB). Entsprechend den Angaben von *Talalay* und Mitarbeitern⁹ verwendeten wir ein hellgrünes Filter, das seine maximale Durchlässigkeit bei etwa 550 μ zeigt.

4. *Aufstellung der Eichkurve:* Wie aus der Abb. 1 zu ersehen ist, ist das *Lambert-Beersche* Gesetz im gesamten untersuchten Bereich von 5 bis 50 γ Phenolphthalein bei einer Wellenlänge von 5580 Å gültig.

* Den genannten Firmen sind wir für die Überlassung von Versuchsproben zu großem Dank verpflichtet.

II. Ergebnisse.

1. Optimale Wasserstoffionenkonzentration.

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Spaltung des Substrates durch das Ferment wurde mit Acetatpuffern zwischen pH 6,6 und 4,0 untersucht. Die Normalität des Puffers variierte zwischen

0,01 und 1,0 n. Phosphatpuffer (*McIlvaine* Standardpuffer) erwies sich als ungünstig, da wir feststellen konnten, daß das Phosphation hemmend auf die Sulfataseaktivität wirkt. Entgegen den älteren Angaben in der Literatur konnten wir jedoch keinerlei Einfluß von Sulfation auf die Aktivität der Sulfatase feststellen. Die Ionenkonzentration des Puffers wirkte sich auf die Aktivität der Sulfatase in höheren Konzentrationen hemmend aus. Aus diesem Grunde verwendeten wir

bei unseren späteren Untersuchungen ausschließlich 0,1 m Acetatpuffer. Wie Abb. 2 zeigt, konnten wir ein Optimum der Aktivität in 0,1 m Acetatpuffer bei der Sulfatase der Takadiastase bei pH 5,9 bis 6,0 feststellen. Das Optimum zeigt nur geringe Unterschiede zwischen dem Bereich pH 5,5 bis pH 6,3. Die Wasserstoffionenkonzentration der Puffer wurde vor und nach der Inkubierung elektrometrisch mit einer Glaselektrode bestimmt und es zeigte sich nach der Inkubierung keine Verschiebung der pH-Werte.

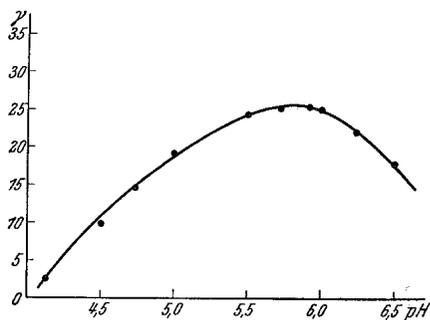


Abb. 2. Abhängigkeit der Sulfataseaktivität von der Wasserstoffionenkonzentration (Puffer: 0,1 m Acetat — Substrat: $2,5 \cdot 10^{-4}$ m, Ferment: Takadiastase 5% — Zeit: 5 Std. — 37°).

2. Optimale Substratkonzentration.

Die Tabelle 1 zeigt den Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Sulfatase der Takadiastase. Wir konnten, wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, bei einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ m eine optimale Spaltung des Phenolestere feststellen.

3. Einfluß der Fermentkonzentration auf phenolphthaleinschwefelsaures Natrium und auf p-nitrophenylschwefelsaures Kalium.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, besteht eine einfache lineare Abhängigkeit zwischen der Fermentkonzentration und der in Freiheit gesetzten Menge Phenolphthalein. Zur Verwendung kamen die Phenolsulfatase der Takadiastase, des Pectinols und des Filtrazyms. Aus Abb. 3 geht

Tabelle I. Einfluß der Substratkonzentration auf die Phenol-sulfataseaktivität.

(Puffer: 0,1 m Acetat pH 5,9, Substrat: variabel, Ferment: Takadiastase 5%, Zeit: 3 Stdn. — 37°).

Substratkonzentration	Freigesetzte Menge Phenolphthalein in 3 Stdn. bei 37° durch 5% Takadiastase
$1 \cdot 10^{-2}$	4,0 γ
$5 \cdot 10^{-3}$	5,3 γ
$2,5 \cdot 10^{-3}$	7,5 γ
$1 \cdot 10^{-3}$	12,6 γ
$5 \cdot 10^{-4}$	17,2 γ
$2,5 \cdot 10^{-4}$	17,5 γ
$1 \cdot 10^{-4}$	12,9 γ
$5 \cdot 10^{-5}$	7,5 γ

auch hervor, daß phenolphthalein-schwefelsaures Natrium als Substrat ebenso wie p-Nitrophenyl-schwefelsaures Kalium von der Phenolsulfatase

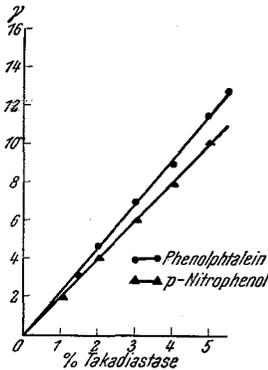


Abb. 3. Abhängigkeit von der Fermentkonzentration (Phenolphthalein: 0,1 m Acetat, pH 5,9; $2,5 \cdot 10^{-4}$ m Substrat, p-Nitrophenol: (Versuchsansatz nach HUGGINS und SMYTH). Zeit: 2 Stdn. — 37°.

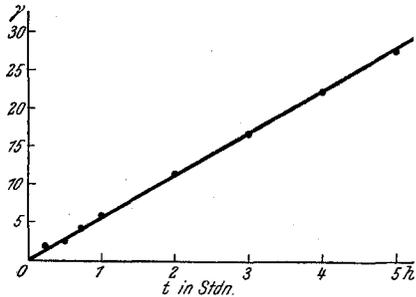


Abb. 4. Zeitabhängigkeitskurve (Puffer: 0,1 m Acetat, pH 5,9; Substrat: $2,5 \cdot 10^{-4}$ m; Ferment: Takadiastase 5%, 37°).

gespalten wird. Es werden bei gleichen Zeiten von derselben Fermentkonzentration annähernd die gleichen Mengen Substrat gespalten.

Fermentaktivität in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Abb. 4 zeigt die Beziehung zwischen der in Freiheit gesetzten Menge Phenolphthalein in Abhängigkeit von der Zeit bei einer gegebenen Fermentkonzentration. Zur Verwendung kam neben Takadiastase auch das Präparat Pektinex.

5. Phenolsulfatase im Harn.

Urin von 10 gesunden Versuchspersonen zeigte selbst bei einer Brütungsdauer von 24 Stdn. keinerlei Phenolsulfataseaktivität. Wir stehen hiermit im Gegensatz zu den Angaben von *Huggins* und *Smyth*⁶, die entsprechend ihrer Definierung der Sulfataseeinheiten 0,9 bis 19,7 Einheiten pro ccm Harn nachweisen konnten. Unsere negativen Versuche führten wir zuerst auf das Vorhandensein von Phosphationen im Harn, die, wie bereits oben erwähnt, eine Hemmwirkung auf die Sulfatase ausüben, zurück. Wie Dialyseversuche zeigten, konnte jedoch auch im dialysierten Harn keinerlei Phenolsulfataseaktivität nachgewiesen werden.

Untersuchungen über den Gehalt der verschiedenen Klärungsenzyme (Pektinasepräparate) an Phenolsulfatase bzw. über Anreicherung und Reinigung des Fermentes sollen zu gegebener Zeit ausführlich diskutiert werden.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine neue kolorimetrische Bestimmungsmethode der Phenolsulfataseaktivität beschrieben, die als Substrat das Natriumsalz des Phenolphthalein-dischwefelsäureesters verwendet.

2. Es besteht eine lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität sowohl von der Fermentkonzentration als auch von der Einwirkungsdauer.

3. Die optimale Aktivität des Enzyms liegt bei pH 5,9 in 0,1 m Acetatpuffer bei 37° und einer Substratkonzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ m.

4. Die Phenolsulfatase verschiedener Pektinasepräparate zeigte bei den oben angegebenen Bedingungen keinerlei Unterschiede gegenüber der Takadiastase.

5. Im menschlichen Harn konnten wir keinerlei Phenolsulfataseaktivität feststellen.