

Über die Beeinflussung der Aktivität der Desoxyribonucleinase aus Rinderpankreas durch Chinone und Phenole.

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

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und **W. Frisch-Niggemeyer.**

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 21. Juni 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 16. Okt. 1952.)

Wie wir bereits in den früheren Mitteilungen dieser Reihe mehrfach gezeigt haben, sind Chinone wirksame Effektoren verschiedener Fermente. In den meisten Fällen haben die Chinone eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Enzyme; bisher wurde nur über einen einzigen Fall einer Aktivierung eines Fermentes, nämlich der α -Amylase, durch diese Substanzen berichtet¹.

Verschiedene Befunde über die Wirksamkeit von Chinonen gegenüber lebenden Zellen veranlaßten uns, die Wirksamkeit dieser Stoffe gegenüber der Desoxyribonuclease zu untersuchen. Wir konnten dabei feststellen, daß einkernige Chinone imstande sind, in verschiedenen Konzentrationsbereichen Aktivierungen des Fermentes zu verursachen, während zwei- und dreikernige Chinone meist die Enzymaktivität hemmten.

Methodik.

Das Fermentpräparat wurde nach der Vorschrift von *McCarty*² hergestellt und zeigte etwa dieselbe Aktivität, wie sie von diesem Verfasser angegeben wurde. Als Substrat gelangte Desoxyribonucleinsäure aus Kalbs-

¹ *O. Hoffmann-Ostenhof* und *E. Biach*, Mh. Chem. **79**, 248 (1948); bezüglich weiterer Wirkungen der Chinone auf Enzyme vgl. das Sammelreferat: *O. Hoffmann-Ostenhof*, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **6**, 154 (1950).

² *M. J. McCarty*, J. gen. Physiol. **29**, 123 (1946).

thymus in Form ihres Natriumsalzes zur Verwendung. Sie wurde nach *Marko* und *Butler*³ mit einem synthetischen Mersolat („Teepol“ von *Shell*) entweißt.

Das Substrat wurde gemeinsam mit einem Schutzkolloid und mit Magnesiumsulfat in Wasser gelöst (1,86 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 50 mg lösliche Stärke, 0,5 mg Enzym, 100 ml H_2O). Als Schutzkolloid wurde deshalb lösliche Stärke verwendet, weil wir eine unerwünschte Wechselwirkung zwischen den Chinonen und der von *McCarty* vorgeschlagenen Gelatine ausschließen wollten. Die Aktivitätsmessung erfolgte durch Beobachtung der Viskositätsabnahme in *Ostwald*-Viskosimetern mit einer Durchlaufzeit für Wasser von etwa 100 Sek. Als Versuchsansatz kamen ins Viskosimeter zuerst 2,5 ml einer 0,15%igen Lösung des Natriumnucleats in 0,1 m Veronalnatrium-Salzsäurepuffer von pH 7,5, dann 2,3 ml einer Lösung des zu untersuchenden Effektors und schließlich 0,2 ml der beschriebenen Fermentlösung. Der Versuchsansatz war demnach in Bezug auf den Puffer 0,05 molar; er enthielt 3,65 mg des Substrats, 0,1 mg lösliche Stärke und war an Mg^{++} 0,003 molar, d. h. er enthielt die für die Fermentwirksamkeit optimale Konzentration an Magnesiumionen. Die Messungen wurden bei 30° durchgeführt.

Bei manchen in Wasser schwer löslichen Effektoren wurde Methanol als Lösungsvermittler in einer endgültigen Konzentration von 5% im Versuchsansatz verwendet. Methanol hat in dieser Konzentration keinerlei Einfluß auf die Enzymwirksamkeit, es erhöht aber die relative Viskosität der Substratlösung um etwa 10%.

Ergebnisse.

Unsere Versuche über den Einfluß verschiedener Chinone auf die Wirksamkeit der Desoxyribonuclease aus Rinderpankreas sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß nur die einkernigen Chinone bei bestimmten Konzentrationen eine Aktivierung des Enzyms bewirken, während zweifach und dreifach kondensierte Systeme fast durchwegs

Tabelle 1. Prozentuelle Aktivierung oder Hemmung der Desoxyribonuclease-Aktivität durch verschiedene Chinone.

Substanz	Aktivierung (+) oder Hemmung (—) der Fermentaktivität durch verschiedene molare Konzentration der Wirkstoffe		
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
p-Benzochinon	+ 10	0	0
Toluchinon	+ 28	+ 10	0
5-Methoxytoluchinon	+ 25	—	—
Thymochinon	+ 56	0	—
α -Naphthochinon	— 20	0	—
β -Naphthochinon	— 82	— 19	— 3
2-Methyl-naphthochinon	0	0	—
Anthrachinon	—	—	— 10
Phenanthrenchinon	—	—	— 15

³ A. M. Marko und G. C. Butler, J. biol. Chem. **190**, 165 (1951).

eine Hemmwirkung verursachen. Allein das 2-Methylnaphthochinon (Vitamin K₃) erwies sich unter den untersuchten Substanzen als völlig wirkungslos.

Der Einfluß zweier Chinone, nämlich derjenige von Thymochinon und β -Naphthochinon wurde, einer genaueren Untersuchung unterworfen. β -Naphthochinon scheint über den breitesten Konzentrationsbereich und Thymochinon über den engsten Bereich wirksam zu sein. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 illustriert.

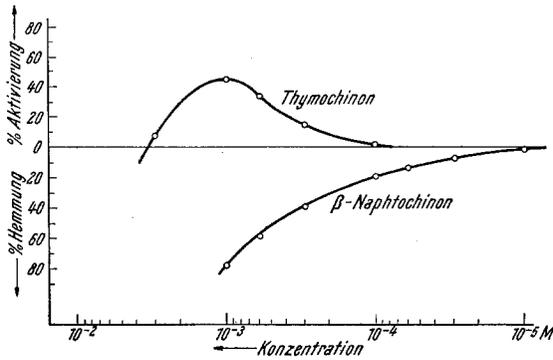


Abb. 1. Der Einfluß von Thymochinon und β -Naphthochinon auf die Wirksamkeit des Fermentes.

Manche Chinone wurden während der Versuche durch den Einfluß des schwach alkalischen Mediums zum Teil zersetzt, was sich durch das Auftreten von Verfärbungen erkennen ließ, und deshalb ist ein quantitativer Vergleich zwischen den Wirkungen der einzelnen Stoffe nur beschränkt möglich.

Tabelle 2. Prozentuelle Aktivierung der Desoxyribonuclease-Aktivität durch verschiedene Phenole.

Substanz	Aktivierung der Fermentaktivität durch verschiedene molare Konzentration der Wirkstoffe			
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Phenol	0	0	0	—
Brenzkatechin	53	89	20	0
Resorzin	0	0	0	—
Hydrochinon	69	57	36	10
Oxyhydrochinon	17	6	0	—
Phloroglucin	0	0	0	—
Pyrogallol	6	15	10	3

Aus Gründen, welche in der folgenden Diskussion noch näher erläutert werden sollen, untersuchten wir auch die Wirksamkeit ver-

schiedener Phenole gegenüber diesem Ferment. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 2 dargestellt.

Diskussion.

Obwohl die Desoxyribonuclease aus Rinderpankreas das am längsten bekannte Ferment dieses Typus ist und auch bereits in hervorragender Reinheit (*Kunitz*⁴) vorliegt, ist über die Natur der aktiven Zentren im Molekül des Enzyms bisher nur bekannt, daß Mg^{++} in irgend einer Form an diesen beteiligt ist. Aus diesem Grunde ist es wohl unmöglich, die Art des Zustandekommens der von uns beobachteten Effekte zu erklären. Es muß aber immerhin als bemerkenswert betrachtet werden, daß die Chinone, welche im allgemeinen verhältnismäßig wenig spezifische Hemmwirkungen gegenüber Enzymen entfalten, hier, zumindest zum Teil, aktivierend wirken. Ebensowenig wie für die Chinoneffekte kann eine Erklärung für die durch die Phenole hervorgerufenen Aktivierungen gegeben werden. Es ist allerdings auffallend, daß nur diejenigen Phenole eine aktivierende Wirkung zeigen, welche leicht zu Chinonen oxydiert werden.

In diesem Zusammenhang möchten wir auf eine interessante Parallele hinweisen. Nach Versuchen von *Levan* und *Tjio*⁵ sind Phenole, aber auch p-Benzochinon und aromatische Amine vom Typus des p-Phenylendiamins imstande, in bestimmten Konzentrationen in Mitosen in der Wurzelspitze von *Allium cepa* (Speisezwiebel) Fragmentationen und Verklebungen der Chromosomen zu bewirken. Desoxyribonucleasen haben möglicherweise, da ja ihr Substrat, die Desoxyribonucleinsäure, einen wesentlichen Bestandteil des Zellkerns darstellt, eine bedeutsame Funktion beim Mitosevorgang. Es ist nun durchaus vorstellbar, daß die Wirkungen der genannten Substanzen auf die Mitose eine Folge der Beeinflussung der Desoxyribonuclease durch diese Stoffe ist. *Levan* und *Tjio* fanden nun in ihren Versuchen ebenfalls, daß nur diejenigen Phenole eine Wirkung ausüben, welche zu Chinonen oxydiert werden können. Während einfaches Phenol, Resorcin und Phloroglucin kaum irgendwelche Chromosomenaberrationen verursachen, rufen Brenzkatechin, Hydrochinon, Pyrogallol und Oxyhydrochinon sehr starke Effekte dieser Art hervor. Der ältere der Verfasser⁶ hat es schon früher als wahrscheinlich erachtet, daß die tatsächlich wirksamen Agentien in diesem Falle die Chinone sind, welche aus manchen Phenolen entstehen.

Trotz der angeführten Parallelen muß allerdings betont werden, daß unsere Versuche noch in keiner Weise dazu ausreichen, die durch

⁴ *M. Kunitz*, Science (New York) **108**, 19 (1948).

⁵ *A. Levan* und *J. Hin Tjio*, Hereditas **34**, 250; 453 (1948).

⁶ *O. Hoffmann-Ostenhof*, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **6**, 154 (1950); besonders S. 212.

Phenole bewirkten Chromosomenaberrationen durch eine Beeinflussung der Desoxyribonuclease durch diese Substanzen, bzw. durch die aus ihnen entstehenden Chinone zu erklären. Obwohl in den hier mitgeteilten Versuchen eindeutig nur diejenigen Phenole die Desoxyribonuclease aktivieren, welche zu Chinonen oxydierbar sind, so ist es doch schwer vorstellbar, daß tatsächlich in unseren Versuchsansätzen während der Inkubation eine Oxydation der Phenole zu Chinonen stattfindet. In den Wurzelspitzen von *Allium cepa* gibt es andererseits sicherlich Fermente, welche eine derartige Umwandlung bewirken können. Trotz dieser Unstimmigkeit, welche sich vielleicht durch die Annahme einer chinoiden Grenzstruktur erklären ließe, sind aber die Übereinstimmungen zwischen den Wirkungen der Phenole und Chinone auf die Chromosomen in *Allium cepa* mit den von uns hier berichteten Wirkungen so groß, daß ein Zusammenhang vermutet werden kann.

Zusammenfassung.

Der Einfluß von verschiedenen Chinonen und Phenolen auf die Desoxyribonuclease aus Rinderpankreas wurde untersucht. Während einkernige Chinone imstande sind, das Ferment in seiner Wirksamkeit zu aktivieren, erweisen sich zwei- und dreikernige Chinone als Hemmstoffe. Unter den Phenolen haben diejenigen eine aktivierende Wirkung, welche sich leicht zu Chinonen oxydieren lassen.