

Untersuchungen über die Hemmung der Ureaseaktivität durch sulfonierte Polygalacturonsäuren

Von

E. Kaiser und **L. Herbst**

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 8. November 1956)

Die Ureaseaktivität wird durch sulfonierte Polygalacturonsäuren kompetitiv gehemmt, während nichtsulfo­nierte Polygalacturonsäuren wirkungslos sind. Die Hemmung zeigt eine weitgehende Abhängigkeit vom pH des Versuchsansatzes. Auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes der Urease (etwa pH 5,0) ist die Hemmung deutlich ausgeprägt und verschwindet selbst bei hohen Konzentrationen des Inhibitors, wenn das pH des isoelektrischen Punktes überschritten wird. Ein Einfluß des Molekulargewichtes war nicht festzustellen.

Taubmann und *Winkler*¹ haben seinerzeit auf die blutgerinnungs­hemmende Wirkung von sulfonierten Polygalacturonsäuren hingewiesen. Die Stärke der Wirkung war vom Molekulargewicht der Substanz abhängig, und zwar nimmt die Antikoagulanswirkung bis zu einem Durchschnittsmolekulargewicht von etwa 50000 zu, um sich dann nur mehr wenig zu ändern. *Kaiser* und *Winkler*² haben auf Grund verschiedener früherer Untersuchungen^{3, 4} den Einfluß der genannten Substanzen auf das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System untersucht und sind zu dem Ergebnis gekommen, daß die sulfonierten Polysaccharide (Polygalacturonsäuren) ebenso wie Heparin oder sulfonierte Hyaluronsäure das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System kompetitiv hemmen, das heißt, es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Substrat-

¹ *G. Taubmann* und *G. Winkler*, *Klin. Wschr.* **29**, 196 (1951).

² *E. Kaiser* und *G. Winkler*, *Arzneimittelforsch.* **5**, 322 (1955).

³ *M. Pavlitschko* und *E. Kaiser*, *Biochem. Z.* **322**, 137 (1951).

⁴ *E. Kaiser*, *Mem. Inst. Butantan* **25**, 35 (1953).

konzentration, und zwar derart, daß die Hemmung bei steigender Substratkonzentration abnimmt. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir auch bei Untersuchung des Einflusses der genannten Substanzen auf die Amylaseaktivität⁵.

Wills und *Wormall*⁶ haben vor einiger Zeit den Einfluß von Suramin auf die Ureaseaktivität untersucht und sind hierbei auf interessante reaktionskinetische Phänomene gestoßen. Es zeigte sich, daß die Ureaseaktivität durch Suramin⁷, einer negativ geladenen Substanz, deutlich gehemmt wird. Die Hemmung war weitgehend vom pH des Reaktionsmilieus abhängig, und zwar in dem Sinne, daß der saure Inhibitor nur bei pH-Werten auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes der Urease wirksam war, wo das Ferment als Kation vorliegt und der Inhibitor mit dem kationisch geladenen Eiweißkörper reagiert. Auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes ließ sich, selbst bei Verwendung hoher Inhibitorkonzentrationen keine Wirkung feststellen.

Wir haben nun auch unsere sulfonierten Polygalacturonsäuren auf ihre Hemmwirkung gegen die Urease untersucht, um festzustellen:

- a) ob eine Hemmwirkung der sulfonierten Polygalacturonsäuren auf die Ureaseaktivität feststellbar ist, und welcher Natur diese Hemmung ist;
- b) ob die Hemmwirkung ebenfalls vom pH des Mediums abhängt;
- c) ob ein Einfluß des Durchschnittsmolekulargewichtes des Inhibitors festzustellen ist.

Versuchsordnung

Die Ureaseaktivität wurde in der *Warburg*-Apparatur nach der üblichen Methode bestimmt⁸. Auf eine einfachere Methode mußten wir verzichten, da die kolorimetrische Ureasebestimmung mit Nesslerisation des freigesetzten Ammoniaks unverlässliche Resultate ergab.

Als Ureasepräparate wurden mit Aceton gefällte Extrakte aus Sojabohnenmehl bzw. eine aus Schwertbohnen hergestellte kristallisierte Urease verwendet. Infolge der Schwierigkeiten bei der Beschaffung genügender Mengen von Schwertbohnen wurde dieses Präparat nur bei einigen Versuchsansätzen verwendet, die übrigen Versuche wurden mit dem Acetonpräparat durchgeführt. Dies erscheint gerechtfertigt, da wir mit beiden Präparationen annähernd identische Ergebnisse erhalten konnten.

Als Inhibitoren fanden sulfonierte Polygalacturonsäuren von verschiedenem Durchschnittsmolekulargewicht Verwendung, über deren Herstellung bereits kurz an anderer Stelle berichtet wurde².

⁵ *E. Kaiser* und *E. Weigert*, unveröffentlicht.

⁶ *E. D. Wills* und *A. Wormall*, *Biochemie*. J. **47**, 158 (1950).

⁷ „Bayer 205“, Germanin (m-Aminobenzoyl-m-amino-p-toluol-1-naphthylamin-4,6,8-trisulfonsaures Natrium).

⁸ *H. A. Krebs* und *K. Henseleit*, *Z. physiol. Chem.* **210**, 33 (1932).

Ergebnisse

Das pH-Optimum der Urease ist weitgehend vom verwendeten Puffer abhängig⁹. Bei Verwendung von *McIlwaine*-Puffer liegt das pH-Optimum zwischen pH 6,5 und pH 7,0. Verwendet man hingegen Acetatpuffer (0,2 m), so liegt das pH-Optimum zwischen pH 5,2 und 5,4. Die Abb. 1 zeigt die Wirkung von 2 mg Inhibitor auf die Ureaseaktivität in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration (0,2 m Acetatpuffer). Die

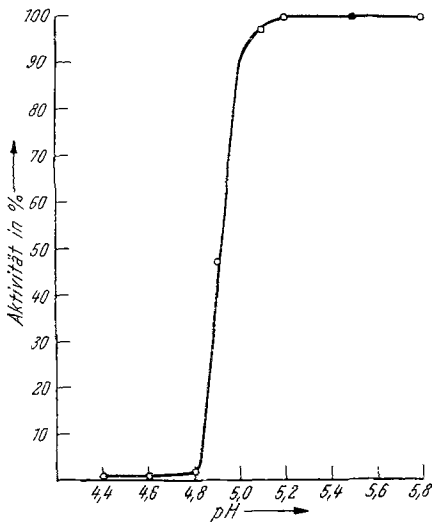


Abb. 1. Abhängigkeit der Ureasehemmung durch sulfonierte Polygalacturonsäuren von der Wasserstoffionenkonzentration. (Inhibitorkonzentration: 2 mg/cm; Substratkonzentration: 0,5 m Harnstoff; Acetatpuffer: 0,2 m; Warburg-Apparat 37°)

Werte wurden in Prozent Aktivität im Vergleich zum ungehemm-

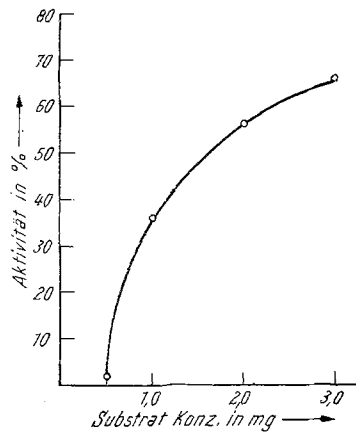


Abb. 2. Abhängigkeit der Ureasehemmung durch sulfonierte Polygalacturonsäuren von der Substratkonzentration. (Inhibitorkonzentration: 2 mg/cm; Acetatpuffer: 0,2 m, pH 4,8)

ten Ansatz berechnet. Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, ist die Wirkung des Inhibitors weitgehend vom pH des Versuchsansatzes abhängig. Bis zu einem pH von etwa 4,8 erhält man mit dieser Inhibitorkonzentration eine totale Hemmung. Im Bereich zwischen pH 4,8 und 5,0 erfolgt ein steiler Anstieg der Aktivitätskurve, bei einem pH von 4,9 ist nur mehr eine etwa 50%ige Hemmung festzustellen und bei einem pH-Wert von 5,2 üben selbst höhere Inhibitorkonzentrationen keine Hemmwirkung mehr aus, Ergebnisse, die sich in zahlreichen Versuchen stets wiederholen ließen. Die ebenfalls geprüften, nicht sulfonierten Polygalacturonsäuren waren unwirksam.

Die Hemmwirkung ist also ebenso wie bei Suramin weitgehend vom pH des Milieus abhängig. Mit dem isoelektrischen Punkt der Urease,

der gewöhnlich mit pH 5,0 angegeben wird⁹, stimmen unsere Ergebnisse relativ gut überein. Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, müßte der isoelektrische Punkt des von uns verwendeten Ureasepräparates etwa bei einem pH-Wert von 4,9 liegen⁶. Es muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß wir bei Verwendung der kristallisierten Urease bzw. der Acetontrockenpräparation identische Ergebnisse erhielten.

Es war nun noch die Frage nach der Art der Hemmung zu klären. *Wills* und *Wormall*⁶ geben an, daß die Hemmung der Ureaseaktivität kompetitiver Natur sein soll. Wir haben zur Klärung dieser Frage die Wirkung unserer Inhibitoren auf das Ureasesystem bei gleichbleibender Inhibitor- und Fermentkonzentration untersucht. Wie die Abb. 2 zeigt, scheint es sich auch in unserem Fall um eine kompetitive Hemmung zu handeln. Bei Erhöhung der Substratkonzentration nimmt die Hemmung ab, eine Tatsache, die als Charakteristikum für eine kompetitive Hemmung gilt.

Schließlich wurde noch der Einfluß sulfonierter Polygalacturonsäuren verschiedenen Molekulargewichtes untersucht. Im Gegensatz zu den Befunden beim Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System² und bei der Blutgerinnung war kein Einfluß des Durchschnittsmolekulargewichtes (20000 bis 90000) festzustellen.

Für die Überlassung von Versuchsmengen der verschiedenen sulfonierten Polygalacturonsäuren sind wir der Turon A. G. (Frankfurt/Main) zu Dank verpflichtet.

⁹ *J. B. Sumner* in *J. B. Sumner* und *K. Myrbäck*, *The Enzymes*, Bd. I/2, S. 873.