

Über die Spaltung synthetischer Sialinsäure- α -Ketoside durch Neuraminidase

Von

P. Meindl und H. Tuppy

Aus dem chemischen Laboratorium der Arzneimittelforschung Ges. m. b. H.*
und dem Institut für Biochemie der Universität, Wien

Mit 7 Abbildungen

(Eingegangen am 29. April 1966)

Von den synthetischen Ketosiden der N-Acetyl-D-neuraminsäure werden nur die weniger stark linksdrehenden, als α -Ketoside bezeichneten Anomeren durch die Neuraminidasen von *Vibrio cholerae* und Influenzavirus hydrolysiert. Die Natur des α -ketosidisch gebundenen Restes ist für die Spaltbarkeit von untergeordneter Bedeutung. Die *Michaelis*-Konstanten für die enzymatische Hydrolyse von 2-Alkyl- und 2-Aralkyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäuren liegen ebenso wie für die des natürlich vorkommenden Trisaccharides N-Acetylneuraminyllactose in der Größenordnung von 10^{-3} m. Für quantitative Bestimmungen der enzymatischen Wirksamkeit von Neuraminidase-Präparaten ist die gut kristallisierende und rasch spaltbare 2-m-Nitrobenzyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure besonders geeignet. α -Ketoside der N-Glykolyll-D-neuraminsäure werden von *V. cholerae*-Neuraminidase ebenfalls, wenn auch langsamer, hydrolysiert. Die Methylester der α -Methylketoside von N-Acetyl- und N-Glykolyll-D-neuraminsäure sind enzymatisch nicht spaltbar.

Among the synthetic ketosides of N-acetyl-D-neuraminic acid only the less levorotatory anomers, which have been designated as the α -ketosides, are hydrolyzed by the neuraminidase of *Vibrio cholerae* and influenza virus. The α -ketosides are prone to be cleaved by the neuraminidase irrespective of the nature of their aglycon. The *Michaelis* constants have been determined for the enzymatic hydrolysis of several 2-alkyl and 2-aralkyl N-acetyl-D-

* Arzneimittelforschung Ges. m. b. H., 1120 Wien, Belghofergasse 8, Österreich.

neuraminic acids as well as for the cleavage of the naturally occurring trisaccharide, N-acetylneuraminyl-lactose, and have been found to be of the order of 10^{-3} m. The crystalline and readily hydrolyzable substrate, 2-m-nitrobenzyl-N-acetyl- α -D-neuraminic acid, has proved to be particularly suited for quantitative estimations of the enzymatic activity of neuraminidase preparations. α -Ketosides of N-glycolyl-D-neuraminic acid are also cleaved by *V. cholerae* neuraminidase, though somewhat more slowly. The methyl esters of the methyl ketosides of N-acetyl and N-glycolyl- α -D-neuraminic acid are resistant to neuraminidase.

Aus zahlreichen Glykoproteiden, Glykolipiden und Oligosacchariden werden ketosidisch gebundene Sialinsäurereste durch Neuraminidasen enzymatisch in Freiheit gesetzt^{1, 2}. Neuraminidase-Aktivität wurde zuerst als eine charakteristische Eigenschaft von Influenza- und anderen Myxoviren entdeckt^{3, 4}. Später fand man, daß Enzyme mit einer sehr ähnlichen Spezifität von Cholera-Vibrionen⁵ und einer Reihe anderer Mikroorganismen produziert werden und in geringer Menge auch in tierischen Geweben anzutreffen sind.

Die natürlich vorkommenden, durch Neuraminidasen spaltbaren Sialinsäure-Ketoside sind von *Kuhn* und *Brossmer*⁶ zunächst auf Grund eines Vergleiches der optischen Drehung der N-Acetyl-neuraminyl-lactose mit den Drehungen der N-Acetyl-D-neuraminsäure und der Lactose als α -Ketoside angesprochen worden. Eine verlässlichere Konfigurationsbestimmung hatte eine Gegenüberstellung anomerer Paare von Sialinsäure-Ketosiden zur Voraussetzung. Wir haben in einer vorhergehenden Arbeit⁷ Synthese und Eigenschaften der α, β -anomeren n-Amyl- und n-Hexyl-Ketoside der N-Acetyl-D-neuraminsäure beschrieben, während *Kuhn et al.*⁸ kürzlich über die beiden anomeren Methyl-Ketoside und deren Methylester berichteten. Von den anomeren Paaren wurde jeweils die weniger stark linksdrehende Verbindung, die somit nach der *Hudsonschen* Regel⁹ — unbeschadet der noch nicht gesicherten absoluten Konfiguration am C-Atom 2 — als das α -Ketosid zu bezeichnen war, durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase gespalten.

¹ *A. Gottschalk*, Advanc. Enzymol. **20**, 135 (1958); „Chem. and Biol. of Sialic Acids and Related Substances“, Cambridge Univ. Press, 1960; Perspectives of Biol. and Med. **5**, 327 (1962).

² *M. E. Rafelson*, Exposés Ann. Biochim. Med. **24**, 121 (1963).

³ *G. K. Hirst*, J. Exper. Med. **75**, 195 (1942).

⁴ *G. L. Ada* und *J. D. Stone*, Brit. J. Exper. Pathol. **31**, 263 (1950); *J. D. Stone* und *G. L. Ada*, *ibid.*, 275.

⁵ *F. M. Burnet*, *J. F. McCrea* und *J. D. Stone*, Brit. J. Exper. Pathol. **27**, 228 (1946).

⁶ *R. Kuhn* und *R. Brossmer*, Angew. Chem. **70**, 25 (1958); Chem. Ber. **92**, 1667 (1959).

⁷ *P. Meindl* und *H. Tuppy*, Mh. Chem. **96**, 816 (1965).

⁸ *R. Kuhn*, *P. Lutz* und *D. L. MacDonald*, Chem. Ber. **99**, 611 (1966).

⁹ *C. S. Hudson*, J. Amer. Chem. Soc. **31**, 66 (1909); Adv. Carbohydr. Chem. **3**, 15 (1948).

Außer den schon genannten Amyl- und Hexyl-Ketosiden haben wir noch eine Reihe weiterer α -Ketoside der N-Acetyl- und auch der N-Glykolyld-neuraminsäure^{10, 11} synthetisch gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wird darüber berichtet, wie sich diese α -Ketoside als Substrate der *V. cholerae*- und der Influenzavirus-Neuraminidase verhalten. In den Kreis der enzymatisch untersuchten Verbindungen sind auch die Methylester der Methyl- α -ketoside der N-Acetyl- und N-Glykolyld-neuraminsäure einbezogen worden.

Material und Methoden

N-Acetylneuraminyl-lactose wurde nach Angaben von *Schneir et al.*¹² aus Frauenmilch in einer Menge von ungefähr 0,30 g je Liter gewonnen. Da das Natriumsalz des Trisaccharides beständiger als die freie Säure ist, wurde deren wäßrige Lösung mit 0,1 *n*-NaOH auf pH 7 gebracht und sodann lyophilisiert. Der nach *Svennerholm*¹³ bestimmte N-Acetylneuraminsäure-Gehalt unserer Präparate betrug im Mittel 45% (ber. 47,1%).

2-Benzyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure, früher¹⁰ nicht kristallin erhalten, konnte nunmehr zur Kristallisation gebracht werden. Das durch Verseifung der 2-Benzyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure gewonnene, zu einem Harz erstarrte Öl (780 mg) wurde in einer Mischung von 10 ml absol. Methanol und 0,5 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 50 ml Äther versetzt und filtriert. Wenn zum Filtrat insgesamt 100 ml Petroläther (*PÄ*, 40 bis 60°) portionenweise zugegeben wurden, kristallisierten 703 mg α -Benzylketosid (Schmp. 155—162° [Zers.]) aus. Zur Analyse wurde nochmals aus Methanol, Wasser und Äther umkristallisiert. Schmp. 162—164° (Zers.). $[\alpha]_D^{21}$: — 16° (*c* = 2,4; H₂O).

C₁₈H₂₅O₉N. Ber. C 54,13, H 6,31, N 3,51.
Gef. C 53,77, H 6,42, N 3,71.

2-Methyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure-methylester. Zu einer Lösung von 402 mg 2-Methyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure¹⁰ in 7,5 ml absol. Methanol wurde eine äther. Lösung von Diazomethan (50 ml) zugefügt. Nachdem eine flockige Fällung abfiltriert und das Filtrat portionenweise mit 50 ml *PÄ* (40 bis 60°) versetzt worden war, kristallisierte der Ester aus (279 mg) und wurde aus Methanol (8,5 ml), Äther (40 ml) und *PÄ* (35 ml) umgelöst. Ausb. 201 mg (48% d. Th.), Schmp. 167—169°. $[\alpha]_D^{23}$: — 12° (*c* = 4,7; H₂O).

C₁₃H₂₉O₉N. Ber. C 46,29, H 6,87, N 4,15.
Gef. C 46,24, H 6,93, N 3,99.

2-Methyl-N-glykolyld- α -D-neuraminsäure-methylester. Auf analoge Weise erhielten wir aus 300 mg 2-Methyl-N-glykolyld- α -D-neuraminsäure¹¹ mit CH₂N₂

¹⁰ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 802 (1965).

¹¹ P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **97**, 654 (1966).

¹² M. Schneir, R. J. Winzler und M. E. Rafelson, Biochem. Prepar. **9**, 1 (1962).

¹³ L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

110 mg des entsprechenden Methylsters, der aus Methanol (8 ml), Äther (50 ml) und *P* \bar{A} (50 ml) umgelöst wurde. Ausb. 103 mg (34% d. Th.), Schmp. 165—168°. $[\alpha]_D^{24}$: — 13° ($c = 4,0$; H₂O).

C₁₃H₂₃O₁₀N. Ber. C 44,19, H 6,56, N 3,97.
Gef. C 44,04, H 6,56, N 4,30.

Die übrigen α -Ketoside der *N*-Acetyl- und *N*-Glykolyld-neuraminsäure, die in dieser Arbeit als Neuraminidase-Substrate dienten, wurden nach^{10, 11} dargestellt.

Neuraminidase aus Vibrio cholerae wurde von den Behringwerken A.G., Marburg/Lahn, bezogen. Das Enzym war in einem 0,05 *m*-Acetatpuffer (pH 5,5), der 9 mg/ml NaCl und 1 mg/ml CaCl₂ enthielt, gelöst und besaß laut Angabe der Erzeugerfirma eine Aktivität von 100 Einheiten/ml. 0,30 ml Enzymlösung setzte aus 1 ml 10⁻³ *m*-N-Acetylneuraminyl-lactose in 1 Stde. bei pH 6,4 und 37° 0,128 μ Mol N-Acetyl-D-neuraminsäure in Freiheit.

Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, stammte vom World Influenza Center, London. Es wurde in Hühnereiern vermehrt und durch Adsorption an Hühnererythrocyten und nachfolgende Desorption gereinigt. Durch Zentrifugieren bei 100 000 g wurde das Virus in Form eines „Pellet“ erhalten. Nach Suspendieren in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung wurde der Hämagglutinationstiter nach *Salk*¹⁴ bestimmt; er betrug 2¹² Einheiten/ml. 0,30 ml Virussuspension setzte aus 1 ml 10⁻³ *m*-N-Acetylneuraminyl-lactose in 1 Stde. bei pH 6,5 und 37° 0,162 μ Mole N-Acetyl-D-neuraminsäure frei.

Spaltung der Sialinsäure-Ketoside durch Vibrio-cholerae-Neuraminidase. Die chromatographisch einheitlichen Ketoside wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem 0,1 *m*-Maleat-Puffer¹⁵, der 0,02 *m*-CaCl₂ enthielt, gelöst. Kristallisierende und nicht hygroskopische Ketoside wurden eingewogen, die Konzentrationen der übrigen Ketoside wurden in der Pufferlösung durch quantitative Sialinsäure-Bestimmungen nach der Resorcin-Methode¹³ ermittelt. — Die Inkubationsansätze enthielten in der Regel 0,70 ml gepufferte Ketosid-Lösung und 0,30 ml (ca. 30 Einh.) Neuraminidase-Lösung. Die Inkubation wurde bei 37° vorgenommen. Jeder Versuch wurde als Doppelbestimmung ausgeführt und von einem gleich behandelten Kontrollansatz, der kein Enzym enthielt, begleitet.

Spaltung der Sialinsäure-Ketoside durch Influenzavirus-Neuraminidase. Die Ketoside wurden in 0,067 *m*-Phosphatpuffer pH 6,5 (nach *Sörensen*¹⁶) gelöst, mit Influenzavirus-Suspension (0,20 bis 0,40 ml) versetzt, mit Phosphatpuffer auf 1 ml aufgefüllt und bei 37° inkubiert.

Bestimmung der freigesetzten Sialinsäure. Die Thiobarbitursäure-Methode¹⁷ wurde folgendermaßen unseren Erfordernissen angepaßt: 0,2855 g *Acidum periodicum* (Merek, p. a.) wurden in 50 ml 0,2 *m*-H₂SO₄ gelöst. Zu jedem Versuchsansatz (1 ml) wurde am Ende der Inkubationszeit 0,5 ml saures Perjodsäurereagens zugegeben. Die Mischung blieb 30 Min. bei 37° und wurde dann mit 0,50 ml Natriumarsenitlösung¹⁷ versetzt. Wenn nach einigen Min. die durch ausgeschiedenes Jod verursachte Braunfärbung verschwunden war,

¹⁴ *J. E. Salk*, *J. Immunol.* **49**, 87 (1944).

¹⁵ „Meth. in Enzymol.“ (Hrsg.: *S. P. Colowick* und *N. O. Kaplan*), Vol. I, S. 142. Acad. Press, New York 1955.

¹⁶ „Biochem. Taschenbuch“, S. 652; Springer Verlag 1956.

¹⁷ *D. Aminoff*, *Biochem. J.* **81**, 384 (1961).

wurden 4,0 ml Thiobarbitursäure-Lösung¹⁷ hinzugefügt. Nach 7,5 Min. Erhitzen im siedenden Wasserbad wurde in Eiswasser abgekühlt, mit 10,0 ml 1-Butanol/HCl¹⁷ ausgeschüttelt und zur Trennung der Phasen kurz zentrifugiert. Zur Messung des rosaroten Farbstoffes in der Butanolschicht diente ein Photometer Eppendorf (1 cm Schichtdicke, Filter Hg 546 m μ). Es wurden Eichkurven für die Farbreaktion von N-Acetyl- und N-Glykolyld-neuraminsäure sowohl im Maleat- als auch im Phosphat-Puffer hergestellt. Sie verlaufen etwas steiler als die nach der ursprünglichen Methode¹⁷ erhaltenen Kurven. Die Methylester der N-Acetyl- und N-Glykolyld-neuraminsäure geben im Thiobarbitursäure-Test eine ähnliche Farbausbeute wie die nicht veresterten Säuren.

Ergebnisse und Diskussion

Wie schon eingangs erwähnt, haben wir festgestellt, daß von den α , β -anomeren n-Amyl- und n-Hexyl-Ketosiden der N-Acetyl-d-neuraminsäure⁷ die stärker linksdrehenden Isomeren weder von *Vibrio cholerae*- noch von Influenzavirus-Neuraminidase angegriffen werden, während die schwächer linksdrehenden und darum als α -Ketoside bezeichneten Isomeren gute Neuraminidase-Substrate sind. In Übereinstimmung damit steht der von *Kuhn et al.*⁸ vor kurzem veröffentlichte Befund, daß das stärker linksdrehende Methyl-Ketosid der N-Acetyl-d-neuraminsäure gegen *V. cholerae*-Neuraminidase resistent ist, während das schwächer linksdrehende Anomere hydrolysiert wird. Die bakterielle und die virale Neuraminidase sind demnach bezüglich der Konfiguration am C-Atom 2 der ihnen als Substrate angebotenen Sialinsäure-Glykoside spezifisch und zu Recht als α -Ketosidasen bezeichnet worden^{6, 7}.

Alle von uns untersuchten und nachstehend angeführten α -Ketoside der N-Acetyl- und der N-Glykolyld-neuraminsäure haben sich als durch *V. cholerae*-Neuraminidase spaltbar erwiesen: 2-Methyl-, 2-n-Amyl-, 2-n-Hexyl-, 2-n-Decyl-, 2-Benzyl-, 2-m-Nitrobenzyl-, 2-m-Chlorbenzyl-, 2-m-Brombenzyl-, 2-m-Jodbenzyl-, 2-p-Methoxybenzyl-, 2-(3'-Hydroxypropyl)- und 2-(5'-Hydroxypentyl)-N-acetyl- α -d-neuraminsäure¹⁰ sowie 2-Methyl-, 2-n-Amyl-, 2-n-Decyl-, 2-Benzyl- und 2-m-Nitrobenzyl-N-glykolyld- α -d-neuraminsäure¹¹. Eine Auswahl von α -Ketosiden der N-Acetyl-d-neuraminsäure, nämlich deren 2-n-Amyl-, 2-n-Decyl-, 2-Benzyl- und 2-m-Nitrobenzyl-Derivate, wurden auch der Einwirkung der Influenzavirus-Neuraminidase ausgesetzt und ausnahmslos als spaltbar befunden. Für die Angreifbarkeit der Sialinsäure-Ketoside durch die bakterielle und die virale Neuraminidase ist demnach die Natur des glykosidisch gebundenen Restes von geringer Bedeutung; dieser Rest muß keineswegs so wie in N-Acetylneuraminyllactose und anderen natürlichen Neuraminidase-Substraten ein Kohlenhydrat, sondern kann auch ein einfacher Alkyl- oder Aralkylrest sein. Wie man schon von der Einwirkung der Neuraminidasen auf natürliche Substrate weiß^{1, 2}, ist es für die enzymatische Spalt-

barkeit auch nicht belangvoll, ob die Sialinsäure-Komponente der Verbindungen eine N-Glykoly-Gruppe trägt.

Die in kristallisierter, analysenreiner Form dargestellten Methylester der 2-Methyl-N-acetyl- und der 2-Methyl-N-glykoly- α -D-neuraminsäure erlitten weder bei pH 6,4 (Maleatpuffer mit 0,02 *m*-CaCl₂) noch bei pH 5,5 (Acetatpuffer mit 0,1% CaCl₂) eine Spaltung durch *V. cholerae*.

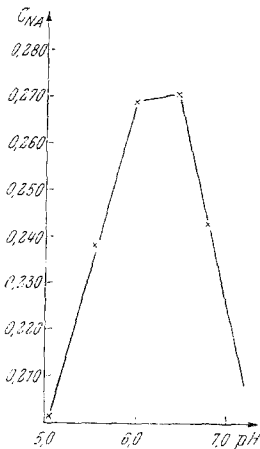


Abb. 1.

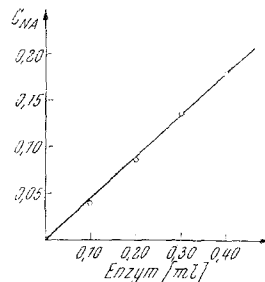


Abb. 2.

Abb. 1. pH-Abhängigkeit der durch *V. cholerae*-Neuraminidase katalysierten Hydrolyse des *m*-Nitrobenzyl- α -Ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure. Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 1,0 μ Mol α -Ketosid, 30 Einheiten Neuraminidase und 70 μ Mole Maleat-Puffer. Es wurde 30 Min. bei 37° inkubiert. c_{NA} : μ Mole/ml enzymatisch freigesetzter N-Acetyl-D-neuraminsäure

Abb. 2. Spaltung des *m*-Nitrobenzyl- α -Ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase als Funktion der zugesetzten Enzymmenge. Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 0,68 μ Mole α -Ketosid, eine variable Menge *V. cholerae*-Neuraminidase und Maleat-Puffer, pH 6,4; es wurde 30 Min. bei 37° inkubiert. c_{NA} : μ Mole/ml enzymatisch freigesetzter N-Acetyl-D-neuraminsäure

Neuraminidase, selbst wenn sie 24 Stdn. bei 37° mit 30 Enzym-Einheiten inkubiert wurden. Dieser Befund steht in Widerspruch zu der von Kuhn *et al.*⁸ beschriebenen quantitativen Spaltung des von ihnen analysenrein, aber nicht kristallin erhaltenen 2-Methyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure-methylesters.

Mit der gut kristallisierenden 2-*m*-Nitrobenzyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure als Substrat wurde die enzymatische Hydrolyse näher untersucht. Das pH-Optimum der Spaltung durch das *V. cholerae*-Enzym liegt im Bereich von 6,0 bis 6,5 (Abb. 1). Bei einer Substratkonzentration von 0,68 $\cdot 10^{-3}$ *m* war die Spaltung der eingesetzten Enzymmenge in weiten Grenzen proportional (Abb. 2). Dieses synthetische Substrat läßt sich also vorteilhaft an Stelle der üblicherweise gebrauchten natürlichen Substrate, wie z. B. N-Acetylneuraminyl-lactose, Submaxillarismucin oder Erythrocyten-

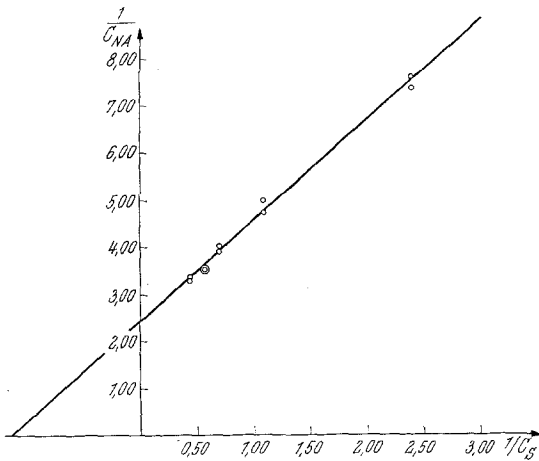


Abb. 3. Spaltung des m-Nitrobenzyl- α -Ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase als Funktion der Substratkonzentration. Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 0,30 ml Enzym. Es wurde 30 Min. bei pH 6,4 und 37° inkubiert. c_S : μ Mole/ml Ketosid; c_{NA} : μ Mole/ml enzymatisch in Freiheit gesetzter N-Acetyl-D-neuraminsäure

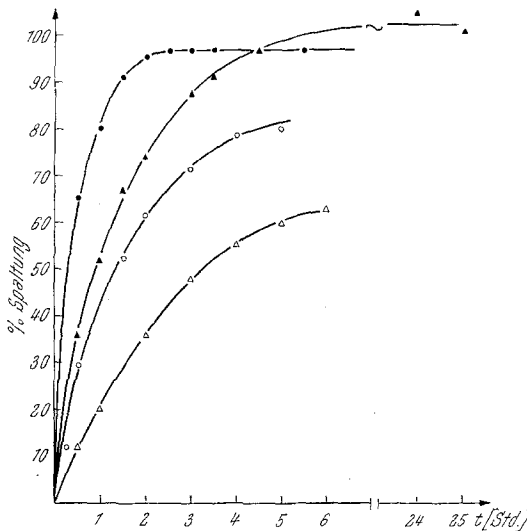


Abb. 4. Spaltung des m-Nitrobenzyl- α -Ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure und der N-Glykolyld-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase als Funktion der Inkubationsdauer. Die Ansätze enthielten im ml 0,68 μ Mole ($\circ-\circ-\circ$) bzw. 0,30 μ Mole ($\bullet-\bullet-\bullet$) α -Ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure oder 0,65 μ Mole ($\triangle-\triangle-\triangle$) bzw. 0,30 μ Mole ($\blacktriangle-\blacktriangle-\blacktriangle$) α -Ketosid der N-Glykolyld-neuraminsäure sowie 0,30 ml (für $\circ-\circ-\circ$ und $\triangle-\triangle-\triangle$) bzw. 0,60 ml Enzym (für $\bullet-\bullet-\bullet$ und $\blacktriangle-\blacktriangle-\blacktriangle$). % Spaltung = $c_{NA}/c_S \cdot 100$. c_S : μ Mole/ml Ketosid am Beginn der Inkubation; c_{NA} : μ Mole/ml N-Acetyl- bzw. N-Glykolyld-neuraminsäure, die aus dem Ketosid nach t Stdn. Inkubation bei pH 6,4 und 37° enzymatisch in Freiheit gesetzt worden sind

stromata, zur Aktivitätsbestimmung von Neuraminidasepräparaten heranziehen. Die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration entsprach der *Michaelis-Mentenschen* Kinetik; wenn nach

Lineweaver und Burk¹⁸ die Reziprokwerte der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Reziprokwerte der Substratkonzentration aufgetragen wurden, erhielt man erwartungsgemäß eine Gerade (Abb. 3). Wie

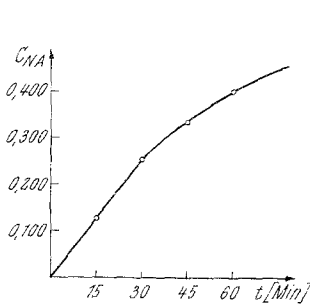


Abb. 5.

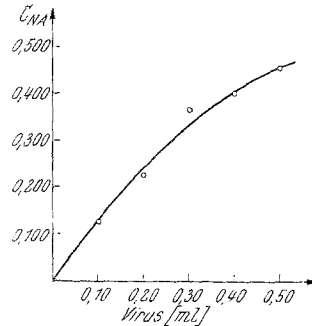


Abb. 6.

Abb. 5. Spaltung des *m*-Nitrobenzyl- α -Ketosides der *N*-Acetyl-*D*-neuraminsäure durch Influenzavirus A, Stamm *Melbourne*, als Funktion der Inkubationsdauer. Der Versuchsansatz enthielt in 1 ml 1,35 μ Mole α -Ketosid und 0,20 ml Virus-Suspension. c_{NA} : μ Mole/ml *N*-Acetyl-*D*-neuraminsäure, die in der Zeit t bei 37° und pH 6,5 enzymatisch aus dem Ketosid in Freiheit gesetzt worden sind

Abb. 6. Spaltung des *m*-Nitrobenzyl- α -Ketosides der *N*-Acetyl-*D*-neuraminsäure durch Influenzavirus A, Stamm *Melbourne*, als Funktion der zugesetzten Virusmenge. Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 1,35 μ Mole α -Ketosid. Es wurde 30 Min. bei 37° und pH 6,5 inkubiert

Tabelle 1. Spaltung einiger α -Ketoside der *N*-Acetyl-*D*-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase und Influenzavirus A, Stamm *Melbourne*: *Michaelis*-Konstanten (K_M) in Mol/l

Ketosidisch gebundener Rest	K_M	
	<i>V. cholerae</i> -Neuraminidase	Influenzavirus A
Methyl	$2 \cdot 10^{-3}$	*
n-Amyl	$4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
n-Decyl	$7 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-4}$
Benzyl	$4 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>m</i> -Nitrobenzyl	$9 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$
Lactosyl	$3 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$

* Wurde nicht bestimmt

Abb. 4 zeigt, wurden die *m*-Nitrobenzyl- α -Ketoside der *N*-Acetyl- und der *N*-Glykoly-*D*-neuraminsäure bei einer genügend langen Einwirkung der *V. cholerae*-Neuraminidase vollständig in Sialinsäure und Aglykon gespalten; die Hydrolyse der 2-*m*-Nitrobenzyl-*N*-acetyl- α -*D*-neuraminsäure verlief unter sonst gleichen Bedingungen schneller als die des entsprechenden *N*-Glykoly-*D*-neuraminsäure-Derivates.

¹⁸ H. Lineweaver und D. Burk, J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934).

Abb. 5 bis 7 stellen die Spaltung der 2-m-Nitrobenzyl-N-acetyl- α -D-neuraminsäure durch Influenzavirus A, Stamm Melbourne, als Funktion der Einwirkungsdauer, der eingesetzten Virusmenge und der Substratkonzentration dar.

In Tab. 1 sind die nach *Lineweaver* und *Burk*¹⁸ ermittelten *Michaelis*-Konstanten (K_M) für die enzymatische Hydrolyse einiger synthetischer N-Acetyl- α -D-neuraminsäure-Ketoside sowie vergleichsweise auch für die Spaltung des natürlichen Trisaccharid-Substrates N-Acetylneuraminyllactose zusammengestellt. Sie unterscheiden sich nicht stark voneinander; die Affinität der Enzyme zu den Substraten scheint durch die Natur der an die Sialinsäure ketosidisch gebundenen Reste nicht wesentlich beeinflusst zu werden.

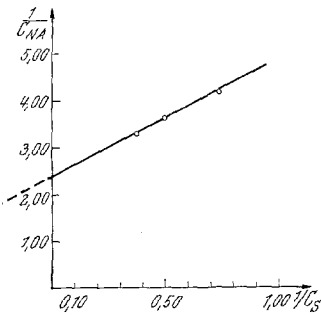


Abb. 7. Spaltung des m-Nitrobenzyl- α -Ketosides der N-Acetyl-D-neuraminsäure durch Influenzavirus A, Stamm *Melbourne*, als Funktion der Substratkonzentration. Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 0,20 ml Virus-Suspension. Es wurde 30 Min. bei pH 6,5 und 37° inkubiert. c_S : μ Mole/ml Ketosid; c_{NA} : μ Mole/ml enzymatisch in Freiheit gesetzter N-Acetyl-D-neuraminsäure

Für die Einwirkung der *V. cholerae*-Neuraminidase auf N-Acetylneuraminyllactose fanden wir (bei einem pH-Wert von 6,4) eine K_M von $3 \cdot 10^{-3} m$, während *Ada et al.*¹⁹ (bei pH 5,6) einen Wert von $1 \cdot 10^{-3} m$ bestimmten. Vom Methyl- über das n-Amyl- zum n-Decyl- α -Ketosid, also mit zunehmender Größe des in den synthetischen Substraten vorhandenen aliphatischen Aglykons, steigt K_M von $2 \cdot 10^{-3}$ auf $7 \cdot 10^{-3} m$ an. Verglichen mit allen übrigen untersuchten Ketosiden, darunter auch dem Benzyl- α -Ketosid, zeichnet sich das m-Nitrobenzyl- α -

Ketosid durch eine besonders niedrige *Michaelis*-Konstante ($9 \cdot 10^{-4} m$) aus; es zeigte sich, daß bei einer Substratkonzentration von $1 \cdot 10^{-3} m$ das m-Nitrobenzyl- α -Ketosid vom *V. cholerae*-Enzym etwa 5mal so rasch wie die N-Acetylneuraminyllactose und 8,5mal so rasch wie das Benzyl- α -Ketosid der N-Acetyl-D-neuraminsäure gespalten wird.

Für die Wechselwirkung der Influenzavirus-Neuraminidase mit ihren synthetischen Substraten fanden wir K_M -Werte, die ausnahmslos in der Größenordnung von $10^{-3} m$ und in der Regel etwas niedriger als die entsprechenden Werte für die *V. cholerae*-Neuraminidase lagen. Mit N-Acetylneuraminyllactose als Substrat erhielten wir $K_M = 2 \cdot 10^{-3} m$. Die in der Tab. 1 angeführten Werte gelten für den uns zur Verfügung stehenden Stamm *Melbourne* des Influenzavirus A. In der Literatur² sind für ver-

¹⁹ G. L. Ada, E. L. French und P. E. Lind, J. Gen. Microbiol. **24**, 409 (1961).

schiedene Influenzavirus-Stämme mit N-Acetylneuraminyllactose als Substrat K_M -Werte zwischen $2 \cdot 10^{-4}$ und $3 \cdot 10^{-3}$ m zu finden.

Über die Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung von Neuraminsäure-Ketosiden von der Art ihres N-Acyl-Restes soll in einer folgenden Arbeit berichtet werden.

Herrn Dr. *H. G. Pereira*, World Influenza Center, London, sind wir für die Überlassung, Herrn Dr. *G. Bodo*, Arzneimittelforschung Ges. m. b. H., Wien, für die Vermehrung und Reinigung von Influenzavirus A, Stamm *Melbourne*, aufrichtig verbunden. Frau *A. Edelmann* danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit.