

## DIE ISOLIERUNG VON $\beta$ -<sup>4</sup>N-GLUKOSIDASE AUS KANINCHENPLASMA UND DIE UNTERSUCHUNG IHRER EIGENSCHAFTEN MIT SULFONAMID- $\beta$ -<sup>4</sup>N-GLUKOSIDEN

B. TÓTH, B. KELENTEI, K. CZINDER und T. VÁLYI-NAGY.

Biochemischen und Pharmakologischen Institut der Medizinischen Universität, Debrecen, Hungary.

(Received 5 December 1963; accepted 21 January 1964)

**Abstract**—Six different sulphonamide- $\beta$ -<sup>4</sup>N-glucosides were studied by a hydrolysing enzyme, the  $\beta$ -<sup>4</sup>N-glucosidase, prepared from rabbit blood plasma. On purification, the specific activity rises 200-250 times in preparation and 75-80 per cent of original activity can be obtained.

The hydrolysis is reversible. The velocity of the enzymic reaction is influenced by the different substituents group on the NH<sub>2</sub>. The reaction has zero-rate in the initial stages of the hydrolysis changing to first-rate and, finally, polymolecular effects dominate on reaching the equilibrium state. The dependence of enzyme activity on substrate concentration has been examined and the K<sub>M</sub>'s for each sulphonamide- $\beta$ -<sup>4</sup>N-glucoside have been calculated. The temperature and pH optimum are 40° and pH 7 respectively. The  $\beta$ -<sup>4</sup>N-glucosidase can be strongly activated by K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> and slightly by Ca<sup>2+</sup>. The NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ion has a negligible effect but Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> inhibit. The enzyme is competitively inhibited by sulphonamide molecules liberated from  $\beta$ -<sup>4</sup>N-glucosides.

BOGNÁR and NÁNÁSI<sup>1</sup> stellten zahlreiche Nitrogenglukoside her, unter ihnen auch die  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside der Sulfonamide (SA). Wir haben bereits in mehreren Publikationen über manche pharmakologischen Eigenschaften dieser Verbindungen berichtet.<sup>2-6</sup> Tóth *et al.*<sup>7</sup> haben in kurzen periodischen Experimentalen (15 Minuten) die Kinetik der *in-vivo* Hydrolisen von sechs  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosiden (SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-G) untersucht. Es ergab sich, dass in den Geweben von Säugetiere auf Wirkung einer sehr aktiven Hydrolase der  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosidase dieser Derivate sich rasch auf Sulfonamide und Glukose zersetzen. Die so frei gewordenen 'nascens' Grundverbindungen sichern eine viel höhere Blutkonzentration, als die—in äquivalenten Mengen—direkt eingeführten Grundverbindungen. Es liess sich des weiteren feststellen, dass die Ursache der höheren Blutkonzentration in Fällen der 'nascens' Grundverbindungen nicht in der intensiveren Bindung an Eiweisse zu suchen ist. Bei der Untersuchung, worauf diese Erscheinung zurückzuführen sei, ergibt sich die Möglichkeit dessen, dass der energetische Zustand der während der hydrolitischen Zersetzung der Glukoside auftretenden 'nascens' SA-Moleküle, von denen der unmittelbar eingeführten Grundverbindungen abweicht. So ist das *in-vitro* Studium der  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosidase notwendig geworden. Es wurden die optimalen Umstände der Enzymherstellung

untersucht, unter den die Aktivität beeinflussenden Faktoren haben wir die Substratkonzentration, die Temperatur, das pH, weiters den Einfluss verschiedener Ione geprüft, in dem wir die optimale Konzentration einiger aktivierenden Ionarten und die Möglichkeit einer gegenseitigen Ersetzung dieser Ionarten detailliert kontrollierten. Schliesslich prüften wir den Einfluss des Enzym-Substrat-Verhältnisses und die optimalen Voraussetzungen der Lagerung.

#### STOFFE UND METHODEN

*SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside.* Die in unseren Experimenten verwendeten SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-G haben wir durch oben erwähnten Autoren aus dem Organisch-Chemischen Institut der Lajos Kossuth Universität erhalten.<sup>1</sup> Diese waren: Sulfanilamid- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside (D-<sup>4</sup>N-G), Sulfadimetilpirimidin- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside (S-<sup>4</sup>N-G), Sulfametiltiasol- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside (U-<sup>4</sup>N-G), Sulfaguanidin- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside (Sg-<sup>4</sup>N-G), Sulfametoxipiridasin- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside (Q-<sup>4</sup>N-G) und das <sup>1</sup>N-Sulfamil-<sup>4</sup>N-Butilkarbamid- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside (B-<sup>4</sup>N-G).

#### Die Herstellung der $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosidase

Die Herstellung des Enzyms geschah durch eine kalte Fraktionierung (zwischen  $-8^\circ$  und  $-10^\circ$ ) mit Azeton und mit einer Absonderung durch eine Watmann N° = 3 Filtrierpapier-Kolonne, bezw. eine weitere Reinigung des Enzyms beendet wurden.

10 ml Kaninchenplasma wird bei  $0^\circ$  mit gleicher Menge von sterilem NaCl verdünnt und das pH mit 0,5 Mol.-er Essigsäure auf 5 eingestellt (1,1 ml). Nach Abtrennung der Isoelektrischen Fällung wird 15 Min lang geschleudert in einer kühlbaren Zentrifuge, Marke 'Zugló' mit 1800 g. Das pH des Supernatans wird demnach mit N NaOH (0,47 ml) auf 7 eingestellt, Darauf kühlt man die Lösung bis  $-8^\circ$  bis  $-10^\circ$  ab (19,5 ml) in einer Kühlmischung von Azeton und Trockeneis. Mit Hilfe von Azeton welches in einem separaten Gefäss gleicherweise abgekühlt wird, werden folgende Fraktionen angefertigt, und abgesondert, durch Schleudern bei  $-10^\circ$ :

1. und 2. 6,5 ml Azeton zu 10 ml Supernatans gebend, wird vorsichtig umgerührt. Es ergibt sich eine reiche Eiweissfällung welche zentrifugiert wird. Auf Grund der Vorversuche ist es nicht Wert diese Fraktion in zwei Partien abzusondern, da die auf einmal erfolgte Absonderung nur einen 2 — 3 %-gen Aktivitätsverlust verursacht, mit der in zwei Fraktionen ausgeführten Fraktionierung (10 ml Supernatans + 3,5 ml Azeton und der Fraktionierung das so gewonnenen Supernatans mit 3 ml Azeton vergleichend.).

3. Zum Supernatans, gewonnen nach der Fraktionierung 4,5 ml Azeton zugebend scheidet sich eine neue Eiweissfraktion aus.

4. Nach Schleudern (wie früher) gibt man 8 ml Azeton zum Supernatans wodurch wir eine letzte Eiweissfraktion ausscheiden.

Man verdünnt die Ausfälle 1. und 2. mit 0,05 Mol Trispuffer vom pH 7 auf 5 ml, die übrigen Fraktionen auf 2 ml.

Laut den Kontroll-Aktivitätsmessungen ist 5% der originalen Aktivität der  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosidase in den Fraktionen 1. und 2., 80—85 % in der 3. Fraktion (die spezifische Aktivität wächst 100—120-mal) und der Rest in der 4. Fraktion. Der Umschlag der Fraktion 3. entfernt verhältnismässig wenig Eiweissbalast, zugleich wird ein

Drittel der gewonnenen Aktivität bereits verloren. Die weitere Reinigung führen wir daher auf Watmann 3 Filtrierpapier Kolonne aus.

Aus Watmann 3 Filtrierpapier fertigt man eine Kolonne in der Grösse von  $5 \text{ cm}^2 \times 10 \text{ cm}$  an. Die zu reinigende Enzymfraktion wurde mit zwei Volumen Wasser durchgewaschen und aufgegossen. Mit den folgen den Lösungsmitteln haben wir nacheinander bei einer Geschwindigkeit von  $0,2 \text{ ml/Min}$  eluiert:

I. Eluation mit dest. Wasser, solange bis das  $E_{280}$  wächst. Nachher 4–5 Fraktionen zu  $5 \text{ ml}$  abnehmend sinkt das  $E_{280} \times \text{Vol. ml} = \text{cca. } 150\text{--}160$ .

II. Eluation mit Varigrad<sup>8</sup> lineargradiente Eluation an mit  $\text{NaCl}$ , zwischen  $0,1\text{--}0,2 \text{ Mol}$ . Das Enzym ist bei einer  $\text{NaCl}$ -Konzentration von  $0,1$  und  $0,15 \text{ Mol}$  eluirbar, nachher senkt das  $E_{280} \times \text{Vol. ml} = \text{cca. } 110\text{--}125$ .

III. Eluation mit  $0,5 \text{ Mol. NaCl}$  unmittelbar eluirend, löst sich eine inaktive Fraktion ab.  $E_{280} \times \text{Vol. ml} = 20\text{--}25$ .

Die bei der II. Eluation gewonnene Hauptenzymfraktion wird auf  $0^\circ$  abgekühlt, mit dest. Wasser auf  $0,05 \text{ Mol.}$  verdünnt, und mit  $1,5 \text{ Vol. Azeton}$  (abgekühlt auf  $-15^\circ$ ) ausgeschlagen. Die so erhaltene Fällung lösen wir mit  $2\text{--}2,5 \text{ ml Trispuffer von } 0,05 \text{ Mol. pH 7}$  und schleudern, um sie von den sich nicht lösenden Teile zu befreien. Die Zunehmender spezifischen Aktivität eines mit Azeton angefertigten Enzyms ist weitere  $2\text{--}2,5$ -fach. Das mit Vorfraktionierung aus der orig. Aktivität gewonnene Enzym weist nach Reinigung durch die Watmann 3 Kolonne einen Aktivitätsverlust von  $3\text{--}3,5 \%$  auf, was hauptsächlich bei der Anteicherung des Eluats verwendeten kalten Azetonfällung zuzuschreiben ist.

#### Enzymspeicherung

Zweckdienlich ist das gereinigte Enzym in liofilisiertem Zustande bei  $-10^\circ$  zu speichern. So wird es  $5\text{--}6$  Monate lang ohne Aktivitätsverlust erhaltbar. In gefrorenem Zustand kann die Lösung, ohne Abnahme ihrer Aktivität cca. 1 Monat lang gehalten werden.

#### Bestimmung der Sulfonamide

Zur Bestimmung der aus der  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside frei gewordenen Verbindungen haben wir unsere spektrophotometrische Methode<sup>9</sup> angewendet, welche wir bereits mehrere Jahre hindurch zur Bestimmung der SA erfolgreich angewendet haben.

#### Ergebnisse und Besprechung

Aus Kaninchenplasma haben wir ein Enzym isoliert, welches mit wechselnder Geschwindigkeit SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosiden abbaut. Manche Eigenschaften dieses Enzyms wurden im Laufe untenstehenden Untersuchungen aufgeklärt.

##### (a) Enzymaktivität in der Funktion der Abspaltungszeit

Auf Abb. 1 können wir sehen, mit welcher Geschwindigkeit das Enzym verschiedene Substrate in der Funktion der Zeit abspaltet. Die Spaltungsgeschwindigkeit und der Gleichgewichtszustand (siehe Tabelle 1) weichen bei den verschiedenen SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosiden sehr voneinander ab. Daraus ist zu folgern dass die Ursache des sich in der in vivo Hydrolise der Glukosiden meldenden Unterschiede (besonders in den kurzen Anfangsperioden—15 Min—der Kaninchenversuche) in der abweichen den Affinität dieser Substrate und der  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosidasen zu suchen ist, und das auch unter in vivo Umständen dieses Enzym, und nicht ein verwickelter Mechanismus die Hydrolise Der SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosiden regelt.<sup>7</sup>

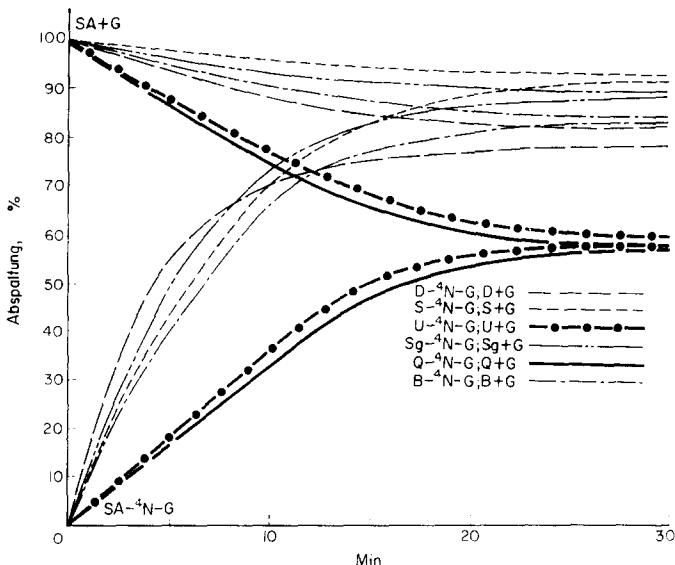


ABB. 1. Enzymaktivität in der Funktion der Abspaltungszeit. Der Abbau der verschiedenen SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosiden und ihr Bildungsprozess aus den Grundverbindungen und Glukose (G).

Im Inkubationsgemisch waren im 0,05 Mol. Trispuffer von pH 7 in 1 ml Endvolumen 10  $\mu$ M SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-G, 50  $\mu$  equ. K<sup>+</sup>, 10  $\mu$ l Enzym. Temperatur 40°.

TABELLE 1. DER GLEICHGEWICHTSZUSTAND DER ENZYMATISCHE REAKTION

Name <sup>7</sup>	SA- $\beta$ - <sup>4</sup> N-G $\rightarrow$ SA + Glukose		SA + Glukose $\rightarrow$ SA- $\beta$ - <sup>4</sup> N-G	
	Hydrolise %		Name	Kondens %
	Entst. SA	Unveränd. G		
D- <sup>4</sup> N-G	77	23	D	82
S- <sup>4</sup> N-G	57	43	S	59
U- <sup>4</sup> N-G	90	10	U	93,2
Sg- <sup>4</sup> N-G	86,6	13,4	Sg	87,3
Q- <sup>4</sup> N-G	56	44	Q	57,6
B- <sup>4</sup> N-G	82	18	B	83,5

(b) Die Ordnungsgrösse der Reaktion

Im Zusammenhang mit der Ordnungsgrösse der Hydrolise haben wir den Abbau des Q-<sup>4</sup>N-G eingehend geprüft. (Siehe Abb. 2). Der erste 12 Minutenlange Abschnitt des Abbaus eine Reaktion von 0-er Grösse ist, da zu dieser Zeit der Substrat im grossen Überfluss ist. Die Situation ändert sich jedoch von der 12. Min ab. Die Reaktion wird graduell von Ordnungsgrösse 1. Im Abschnitt 'E' der Abbildung nähert sich die Reaktion zum Gleichgewicht. Da hier über ein Aktivator beanspruchendes Enzym die Rede ist, und die effektive Konzentration des Enzyms durch die komplexe Bildung des Q-Enzyms noch vermindert wird dessen Stabilität im allgemeinen von verschiedenen 'nascens' SA abhängt, und es kommen polimolekuläre Wirkungen zur Geltung.

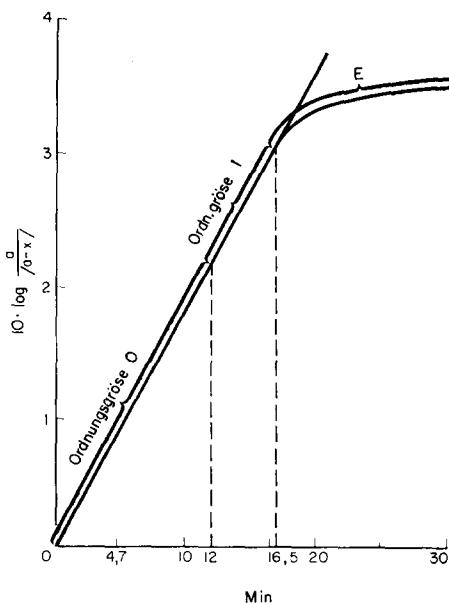


ABB. 2. Die Ordnungsgrösse der Reaktion.

Zusammensetzung des Inkubationsgemisches: 0,05 Mol. Trispuffer von pH 7 zu 1 ml Endvolumen 10  $\mu$ M Q-<sup>4</sup>N-G, 50  $\mu$  equ. K<sup>+</sup>, 10  $\mu$ l Enzym. Temperatur 40°.

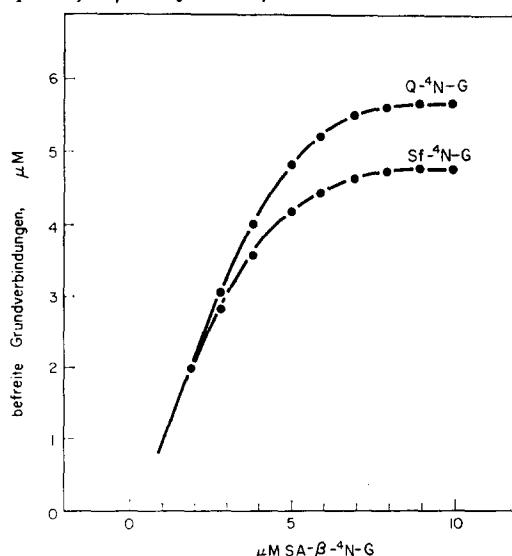


ABB. 3. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration.

Zusammensetzung des Inkubationsgemisches: 0,05 Mol. Trispuffer von pH 7 zu 1 ml Endvolumen 10  $\mu$ M Q-<sup>4</sup>N-G, oder 10  $\mu$ M Sulfafenylpyrazol-<sup>4</sup>N-G (Sf-<sup>4</sup>N-G), 50  $\mu$  equ. K<sup>+</sup>, 10  $\mu$ l Enzym. Temperatur 40°. Zeit 30 Min.

(c) *Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration*

Diese wurde auf der Abb. 3 verzeichnet. Da ist es ersichtlich, dass die zunehmende Konzentration einzelner  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukoside das Enzym abweichend beeinflusst. Die durch die Berechnung der Michaelis-Menten-schen Konstanten gewonnenen Daten haben wir in Tabelle 2 zusammengefasst.

## (d) Die Wirkung der Temperatur auf Die Enzymaktivität

Das Optimum der Temperatur meldete sich bei 40°. Das Enzym reagierte auf die Temperaturerhöhung empfindlicher als auf die Temperatursenkung.

TABELLE 2. DER MICHAELIS-MENTENSCHEN KONSTANTEN

SA- <sup>4</sup> N-G	KM.10 <sup>-5</sup>
D- <sup>4</sup> N-G	3,28
S- <sup>4</sup> N-G	10,3
U- <sup>4</sup> N-G	6,96
Sg- <sup>4</sup> N-G	4,83
Q- <sup>4</sup> N-G	13,82
B- <sup>4</sup> N-G	8,64

## (e) Die Wirkung des pH auf die Enzymaktivität

Das Optimum des pH ist um 7. Im sauren Sektor haben wir eine minder sinkende Aktivität verzeichnet, gegenüber der intensiven Verminderung des alkalischen Sektors.

## (f) Die Wirkung der Ionen auf die Enzymaktivität

Die Abb. 4. zeigt die Wirkung verschiedener einwertigen und zweiwertigen Kationen auf die Enzymaktivität. Das K<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> vergleichend mit den Untersuchungen mit Tris haben eine maximale und gleichbleibende Aktivität gesichert. Die aktivierende Wirkung des Mg<sup>2+</sup> ist ebenfalls erheblich. Die des Ca<sup>2+</sup> ist kleingradig, doch signifikant. Das NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ion beeinflusst praktisch die Enzymaktivität nicht, die Zn<sup>2+</sup> und

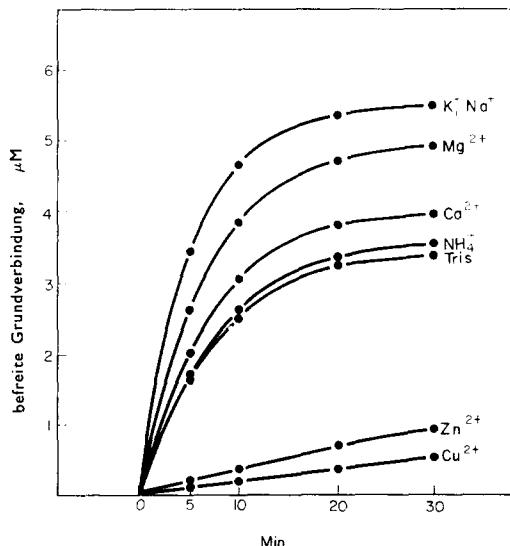


ABB. 4. Die Wirkung der aktivierenden und hemmenden Ionen auf die Enzymaktivität.  
Zusammensetzung des Inkubationsgemisches: 0,05 Mol. Trispuffer von pH 7 zu 1 ml Endvolumen 10  $\mu$ M Q-<sup>4</sup>N-G, 10  $\mu$ l Enzym. Temperatur 40°. Aus jeder Ionsorte wurden 50  $\mu$  equ. Mengen verwendet.

$\text{Cu}^{2+}$ -Ionen entwickelten nebst der angewandten Konzentration eine entschieden hemmende Wirkung. Aus den aktivierenden Ionen haben wir beim  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  die optimale Ionkonzentration ausgesucht, worüber wir in den Abb. 5, 6 und 7 berichten. Für die untersuchten drei Ionen haben wir  $50 \mu \text{ equ./ml}$  als optimal aktivierend wirkend gefunden.

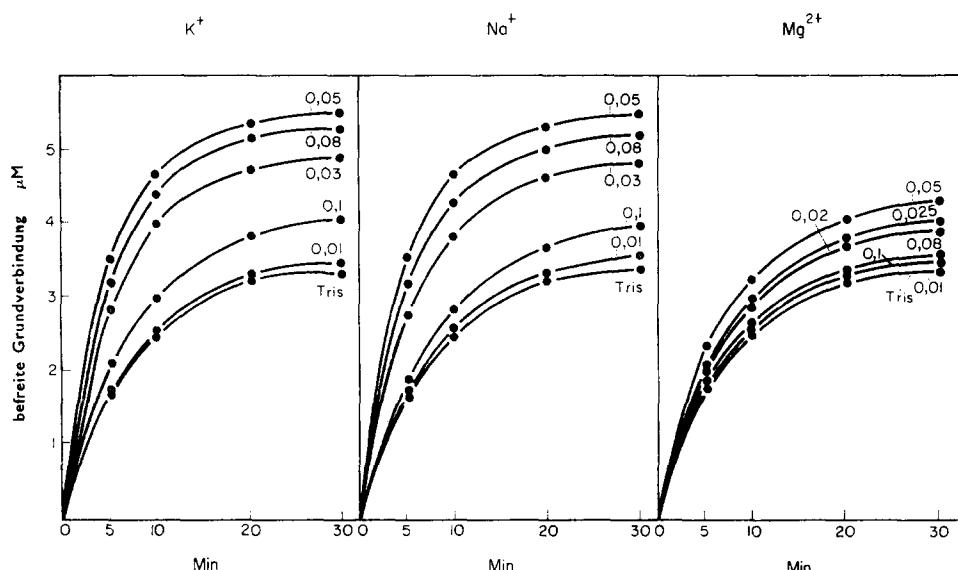


ABB. 5, 6 und 7. Die Bestimmung der optimalen Konzentration einiger aktivierenden Ionsorten. Zusammensetzung des Inkubationsgemisches: 0,05 Mol. Trispuffer von pH 7 zu 1 ml Endvolumen  $10 \mu\text{M}$   $\text{Q}^4\text{N-G}$ ,  $10 \mu\text{l}$  Enzym. Temperatur  $40^\circ$ . Die sichtbaren Zahlen an den Kurven bedeuten die Ionkonzentrationen in  $\mu\text{ equ./ml}$  Einheiten.

Hinsichtlich dessen, dass die hier gefundenen  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  Ionkonzentrationen beträchtlich abweichen, taucht die Frage auf, welcher Zuzammenhang besteht zwischen der hohen *in vitro* Enzymaktivität, und der bei optimalen *in vitro* Umständen optimalen Enzymaktivität. Aus der Aktivierenden Wirkung des  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  (*in vitro* separat gemessen) ist zu folgern, dass diese Ionen ihre aktivierende Wirkung gegenseitig ergänzen können, bzw. einander ergänzen können (Substituierung). Zur Unterzuchung der substituierenden Fähigkeit stellten wir solche Inkubate her, in welchen die Verteilung des  $50 \mu\text{ equ./ml}$  gesamt Alkali-Ionkonzentration die Folgende war:  $\mu\text{ equ. K}^+ : \mu\text{ equ. Na}^+ = 1/40:10; 2/25:25; 3/10:40$ . Innerhalb der Fehlergrenze keine Abweichung vorhanden ist zwischen den, in den Inkubaten von verschiedenen Zusammensetzung. Dieser Umstand weist auch unter *in vivo* Verhältnissen auf die Substitution hin. Mit Rücksicht darauf, dass die Substitution auch bei den Ionkombinationen  $\mu\text{ equ. Mg}^{2+} : \mu\text{ equ. K}^+ = 20:30$  und  $\mu\text{ equ. Mg}^{2+} : \mu\text{ equ. Na}^+ = 20:30$  besteht kann man voraussetzen, dass unter *in vivo* Verhältnissen die Ionaktivität bloss auf Wirkung des Ionmilieus nur in cca.  $1/2-1/2,5$  Teil zur Geltung kommen kann, da das auf Grund der Substitution summierte gesamt  $\text{K}^+ + \text{Na}^+ + \text{Mg}^{2+} \mu\text{ equ./l} = 148,1$  auf Grund der Standardwerte für Kaninchen ist.<sup>10</sup> Dagegen nach den *in vitro* Messungen  $150 \mu\text{ equ./l}$  Alkali zum Tris vergleichend nur mässig hemmt. Die

Ionwirkung wird durch ein, etwas höhers pH gestärkt, als das in vitro gemessene optimale pH. Laut den *in-vitro* Experimenten, die ausschlieslich in Anwesenheit von tris feststellbare Aktivität, welche selbst bei Anwesenheit von aktivierenden Ionen mit nur cca. 95 % erhönt wird auf Wirkung von 50 m equ./1 K<sup>+</sup> resp. Na<sup>+</sup> und nur cca. 40 % auf 50 m equ./1 Mg<sup>2+</sup>. Diese Tatsache weist darauf hin, dass das Enzymeiweiss entweder adsorptive ein gewisse Menge Na<sup>+</sup> -Ionen enthält, welche sich anlässlich der Fraktionierung auf der Watmann 3 Kolonne nachträglich beigemischt haben könnten, oder, dass es während der Fraktionierungsmanipulationen gewisse Mengen dieser Ionen behalten könnte, mit denen es im Plasma zusammen war. Auf die Untersuchung dieser Voraussetzung sind wir in dieser Arbeit nicht eingegangen, obwohl die Ionen bindende Kapazität vieler Eiweisse kennend, das Problem bei der Bestimmung spezif. Aktivität als eine nicht vernachlässigende Aufgabe zu erachten ist. Aus unserem Fall kann die *in-vivo* Aktivität aus den *in vitro* Angaben schon deshalb nicht genau bestimmt werden, da sich die 'nascens' Grundverbindungen *in vivo* sofort azetilisieren, resp. entleeren. Ein Teil absorbiert sich in das Gewebe. Auf diese Weise spielt sich in vollem Masse die Hydrolise jeder SA- $\beta$ -<sup>4</sup>N-G Moleküle ab, welche der Organismus mit dem Harn in unveränderter Form nicht verlassen. Nach unseren Vorversuchen kann man nicht nur im Blute, sondern auch in Gewebe  $\beta$ -<sup>4</sup>N-Glukosidase vorfinden.

(g) *Der Einfluss des Enzym—Substrat Verhältnisses auf die Enzymaktivität*

Die Wirkung der Aenderung des Enzym—Substrat Verhältnisses ist auf der Abb. 8 ersichtlich. Die Proportionierung der Geschwindigkeit der enzymatischer Reaktion

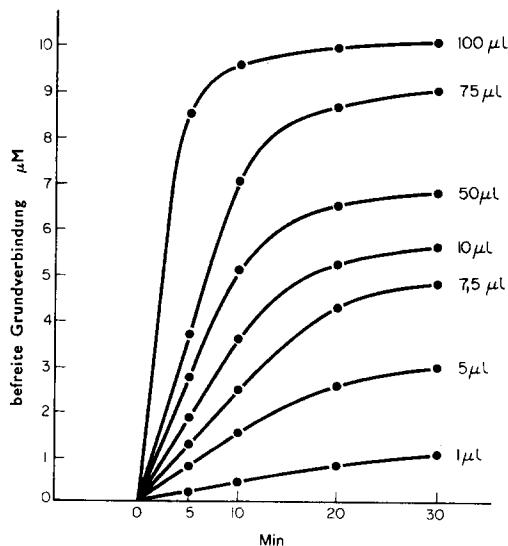
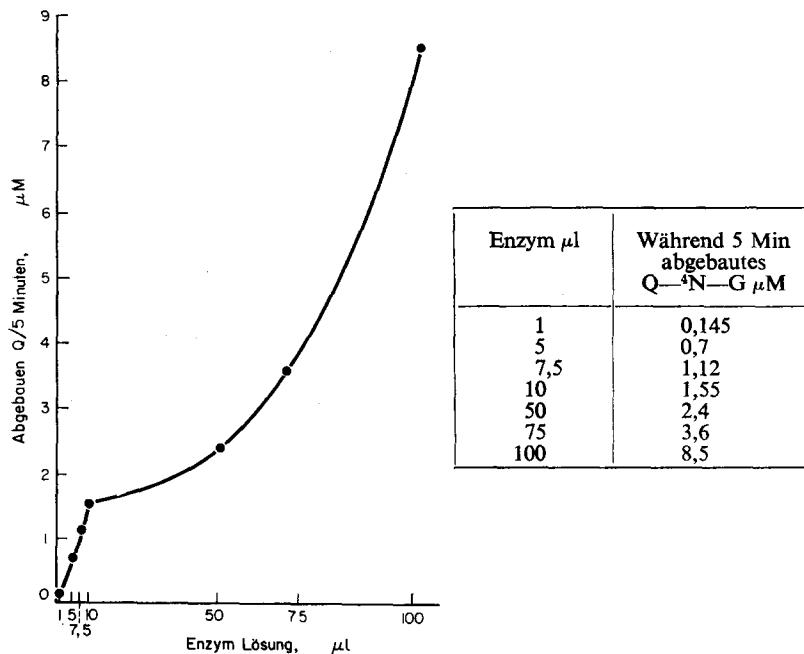
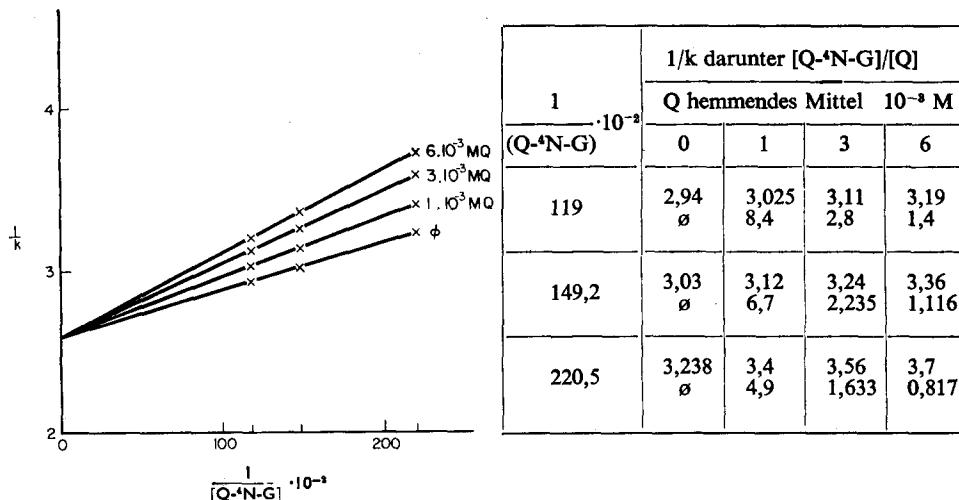


ABB. 8. Der Einfluss des Enzym—Substrat Vernältnisses auf die Enzymaktivität.

Zusammensetzung des Inkubations gemisches: 0,05Mol. Trispuffer von pH 7 zu 1 ml Endvolumen, 10 μM Q-<sup>4</sup>N-G, 50 μ equ.K<sup>+</sup>. Temperatur 40°. Die sichtbaren μl Angaben am Kurven bedeuten die Menge zum Verzuch benützten Enzymlösung.

TABELLE 3. DIE UNTERSUCHUNG DES DILUTIONSEFFEKT IN ENZYMAKTIVITÄT

TABELLE 4. DIE KOMPETITIV HEMMUNG DER  $\beta$ -<sup>4</sup>N-GLUKOSIDASE IM  $Q\text{-}^4\text{N-G-Q}$  SYSTEM

Zusammensetzung des Inkubationsgemisches: 0,05 Mol. Trispuffer von pH 7 zu 1 ml Endvolumen 50  $\mu$  equ.  $\text{K}^+$ , 10  $\mu$ l Enzym. Temperatur 40°. Zeit 30 Min. Substrat— $Q\text{-}^4\text{N-G}$ , und hemmendes Mittel— $[Q]$ -Konzentration siehe in der Tabelle.

zur Enzymkonzentration ersieht man auf der Tabelle 3. Da hierüber einen Aktivator benötigendes Enzym die Rede ist, so ist es nicht verwunderlich, dass über der  $10 \mu\text{l}$  Enzymmenge, infolge der Dilutionswirkung die Aktivitätskurve der Enzymkonzentration 'hohl' abläuft. Die Werte unter  $10 \mu\text{l}$  Enzymmengen zeigen einen, zum linearen Anwachsen näher stehenden 'hohlen' Ablauf, da hier das optimale Ionmilieu ( $50 \mu\text{ equ.}/\text{ml}$  bei  $10 \mu\text{l}$  Enzym) oder sein relativ Vielfaches ( $50 \mu\text{ equ. Ion}/\text{ml}/7,5 \mu\text{l} \rightarrow 1 \mu\text{l}$  Enzym) wirkt in Richtung der Aktivitätsminderung. Der Ionenüberschuss hemmt im allgemeinen in Fällen von  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  nicht in solchem Masse, als der aktivierende Ionomangel, wie es sich aus den Kurven der Abb. 5, 6 und 7 herausstellt.

Auch im Falle der  $\beta\text{-}^4\text{N}$ -Glukosidase sprechen wir über ein solches Enzym, bei welchem die Reaktionsprodukte—in erster Linie die 'nascens' SA-Moleküle—durch Zustandekommen von inaktiven Komplexen, eine kompetitive Hemmung hervorrufen (siehe Tabelle 4) was mit der Verminderung der effektiven Enzymkonzentration verbunden ist. Die verschiedenen 'nascens' SA-Derivate, Komplexe von abweichender Stabilität bildend, können sich in abweichendem Masse zu den Enzymeiwessen binden. Solcher Art ist der Abbau der SA- $\beta\text{-}^4\text{N}$ -Glukoside auch für das Enzym keine erstrangige Reaktion, selbst bei den Enzymmengen unter  $10 \mu\text{l}$  nicht, wo wir die Substratkonzentration als in grossem Überschuss vornahmen seiend bezeichnen können.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe einer Hydrolase der  $\beta\text{-}^4\text{N}$ -Glukosidase aus Kaninchenplasma wird die *in-vitro* Hydrolise von sechs SA- $\beta\text{-}^4\text{N}$ -G untersucht. Es wird über die gewonnene Erfahrungen bei der Herstellung und Reinigung des Enzyms detailliert berichtet. Es wird zubereitet indem nach Azetonfraktionierung das Rohenzym durch die Watmann 3 Kolonne gereinigt wird, wobei die spezif. Aktivität des Rohenzyms wächst cca. 200–250 fach, und 70–80 % der orig. Aktivität erhalten bleibt.

Die kinetischen Untersuchungen werden ausführlich berichtet, über dem zeitlichen Verlauf der durch die  $\beta\text{-}^4\text{N}$ -Glukosidase katalisierte Hydrolise, und über die Größenordnung der enzymatischen Reaktion.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration wurde untersucht, und auf einzelne SA- $\beta\text{-}^4\text{N}$ -G-s wurden die  $K_m$ -e berechnet. Bei der Untersuchung der Temperaturwirkung stellten wir fest, dass das Optimum  $40^\circ$  ist. Das pH Optimum des Enzyms ist 7. Die Erhöhung des pH vermindert empfindlicher die Aktivität des Enzyms als die Ermässigung.

Die  $\beta\text{-}^4\text{N}$ -Glukosidase wird vom  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  stark, vom  $\text{Ca}^{2+}$  schwächer aktiviert. Das  $\text{NH}_4^+$  hat praktisch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität bis da  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  lamend wirken. Es besteht eine Substitution unter den stark aktivierenden Ionen. Die wahrscheinliche Wirkung des Phänomens wird beschrieben.

Aus der Untersuchung des Enzym—Substrat Verhältnisses konnten wir darauf folgern, dass das Enzym durch die von ihm befreiten SA- $\beta\text{-}^4\text{N}$ -G kompetitiv gehemmt wird.

#### LITERATUR

1. R. BOGNÁR and P. NÁNÁSI, *Magy. Kém. Foly.* (1963) im Druck.
2. P. NÁNÁSI and B. TÓTH, *Acta Univ. Debr.* III(2) 117 (1957).
3. B. TÓTH, B. KELENTY, and T. VÁLYI-NAGY, *Acta Phys. Hung. Suppl.* XX, 48 (1962).

4. B. TÓTH, B. KELENTEY and K. CZINDER, *XXII Intern. Phys. Cong. Leyden* (1962). Proc. 1247.
5. B. TÓTH, B. KELENTEY, K. CZINDER and T. VÁLYI-NAGY, *IV National Biochem. Conf. Budapest* (1962). Abstr. 7.
6. B. TÓTH, B. KELENTEY, K. CZINDER and T. VÁLYI-NAGY, *V National Biochem. Conf. Siofok* (1963). Programme: 337.
7. B. TÓTH, B. KELENTEY and K. CZINDER, *Arznei. Forsch.* (1963) im Druck.
8. E. A. PETERSON und H. A. SOBRER, *Anal. Chem.* 31, 857 (1959).
9. B. TÓTH, P. NÁNÁSI, *Acta Biologica Debrecina* (1963) im Druck.
10. E. C. ALBRITTON, *Standard Values in Blood*. Saunders Co. 1952. Philadelphia. USA.