

**Riassunto.** Una soluzione di pirofosfato sodico 0,1 M a pH 7 estrae da un podzol, rispetto ad altre soluzioni impiegate la maggiore quantità di ureasi, sostanza organica ed azoto aminoacidico. Né l'uso degli ultrasuoni né la tecnica «in doppia fase», in presenza di una soluzione di acetilacetone al 5% in benzene, migliorano la resa di estrazione. I risultati sembrano confermare l'ipotesi che occorra una completa rimozione della sostanza organica

non attiva, prima che possa iniziare l'estrazione dei complessi enzimaticamente attivi.

P. NANNIPIERI, S. CERVELLI and F. PEDRAZZINI

*Laboratorio per la Chimica del Terreno del C.N.R.,  
Via Corridoni 78, I-56100 Pisa (Italy), 6 January 1975.*

## Über die Hemmung bakterieller Neuraminidasen durch verschiedene Anionen

### Inhibition of Bacterial Neuraminidases by Different Anions

Neuraminidasen (EC 3.2.1.18) vieler pathogener Mikroorganismen spielen im Pathomechanismus von Infektionskrankheiten eine wichtige Rolle<sup>1</sup>. Ihre Aktivität lässt sich in vitro durch verschiedene Faktoren beeinflussen. So aktivieren etwa Ca-Ionen manche Neuraminidasen<sup>2,3</sup> und Ca-Komplexbildner wie EDTA inaktivieren sie<sup>4</sup>. Die Enzymhemmung durch strukturanaloge, niedermolekulare N-Acylneuraminsäure-Verbindungen, wie sie besonders von TUPPY et al.<sup>5-8</sup> studiert wurden, erfolgt teils als kompetitive, teils aber auch als nicht-kompetitive Hemmung. Eigene Untersuchungen an *Clostridium perfringens*-, *Pasteurella multocida*- und *Vibrio comma*-Neuraminidase zeigten, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in sehr niederen Konzentrationen zu einer Erhöhung der Enzymaktivität führt<sup>9</sup> und auch mit Thioglykol liess sich *Pasteurella multocida*-Neuraminidase aktivieren<sup>10</sup>. Schliesslich beschrieb auch DRZENIEK<sup>11</sup> eine Hemmung einiger Neuraminidasen durch Polyanionen.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Beeinflussung der Neuraminidase-Aktivität durch einige

Anionen, die z.T. physiologische Bedeutung besitzen. In Figur 1 ist die Enzymaktivität der schon etwas intensiver untersuchten Cholera-Neuraminidase verglichen mit den erst kürzlich neu beschriebenen Neuraminidasen von *Streptococcus viridans*, *Erysipelothrix insidiosa* und *Pasteurella multocida*<sup>3</sup> in Abhängigkeit der Konzentrationen-

<sup>1</sup> H. E. MÜLLER, Dt. med. Wschr. 99, 1933 (1974).

<sup>2</sup> R. DRZENIEK, Curr. Topics Microbiol. Immun. 59, 35 (1972).

<sup>3</sup> H. E. MÜLLER, Behring Inst. Mitt. 55, 34 (1974).

<sup>4</sup> T. A. C. BOSCHMAN und J. JACOBS, Biochem. Z. 342, 532 (1965).

<sup>5</sup> P. MEINDL und H. TUPPY, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 350, 1088 (1969).

<sup>6</sup> P. MEINDL und H. TUPPY, Monatsh. Chem. 104, 402 (1973).

<sup>7</sup> P. MEINDL, G. BODO, P. PALESE, J. SCHULMAN und H. TUPPY, Virology 58, 457 (1974).

<sup>8</sup> A. YA. KHOGLIN, I. M. PRIVALOVA, L. YA. ZAKSTELSKAYA, E. V. MOLIBOG und N. A. EVSTIGNEEVA, FEBS-Lett. 8, 17 (1970).

<sup>9</sup> H. E. MÜLLER und K. K. SETHI, Experientia 28, 397 (1972).

<sup>10</sup> H. H. MÜLLER, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 217, 326 (1971).

<sup>11</sup> R. DRZENIEK, Nature, Lond. 211, 1205 (1966).

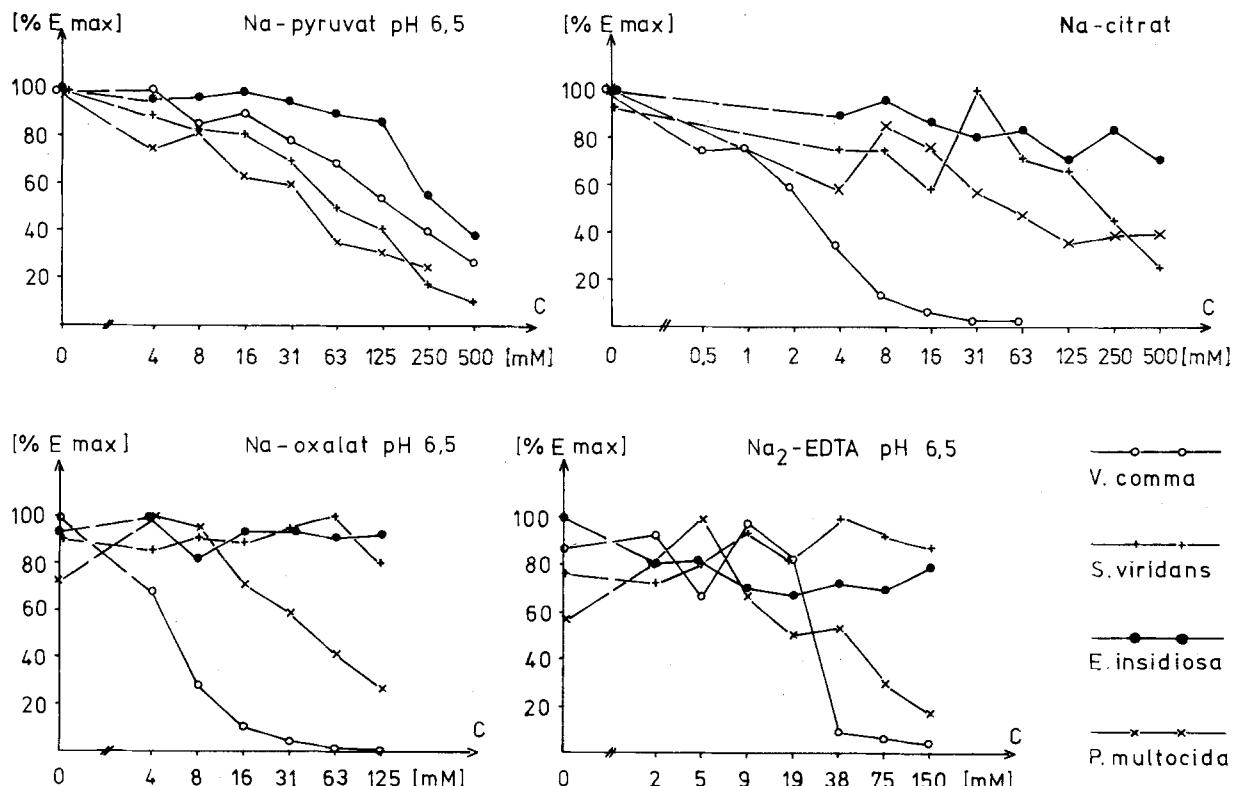


Fig. 1. Der Einfluss von Natrium-Pyruvat, -Citrat, -Oxalat und -EDTA in verschiedenen Konzentrationen auf die Neuraminidase-Aktivität von *Vibrio comma*, *Streptococcus viridans*, *Erysipelothrix insidiosa* und *Pasteurella multocida*.

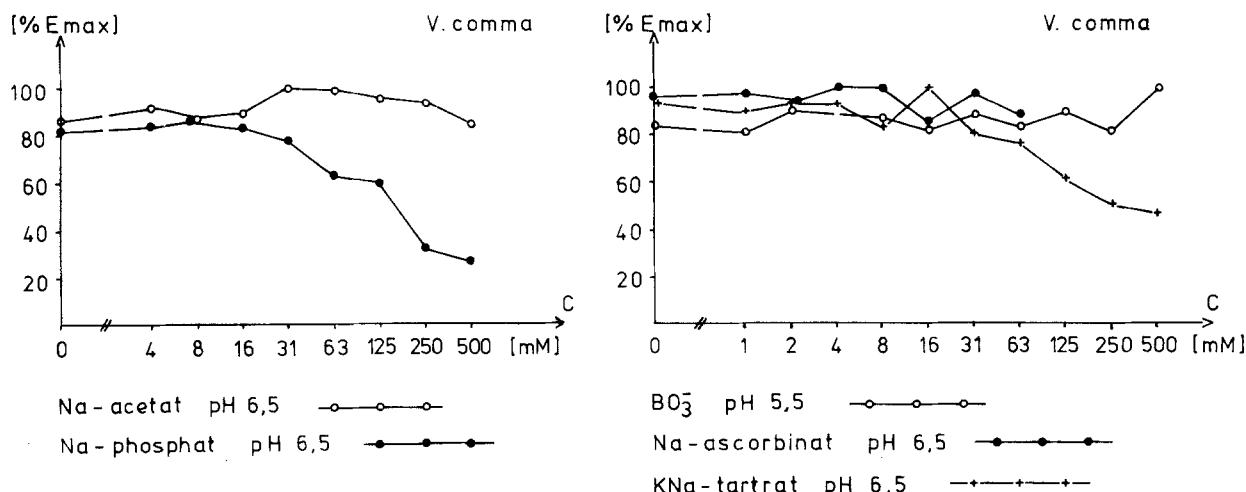


Fig. 2. Der Einfluss von Natrium-Acetat, -Phosphat, -Borat, -Ascorbinat und Kalium-Natrium-Tartrat auf die Aktivität der Cholera-Neuraminidase.

gradienzen von Na-Pyruvat, Na-Citrat, Na-Oxalat und Na-EDTA. Ausserdem ist in Figur 2 der Einfluss von Acetat, Phosphat (linkes Bild), Borat, Ascorbinat und Tartrat (rechtes Bild) auf Cholera-Neuraminidase dargestellt.

Die Aktivität der Neuraminidasen wurde über enzymatisch frei gesetztes N-Acetylneuraminat mit Hilfe der Thiobarbiturat-Methode nach WARREN bestimmt<sup>10,12</sup>. Die Neuraminidasen von *Erysipellothrix insidiosa*, *Pasteurella multocida* und *Streptococcus viridans* wurden von Bakterien-Stämmen gewonnen, die aus klinischem Material stammten. Bei der Cholera-Neuraminidase handelte es sich um ein kommerzielles Produkt.

Aus den Ergebnissen der Figuren 1 und 2 geht hervor, dass die Anionen, die mit Calcium-Ionen unlösliche Salze oder Komplexverbindungen bilden, also Citrat, EDTA, Oxalat, Phosphat und Tartrat zu gleichsinnigen Hemmeffekten bei Cholera-Neuraminidase führen. Dagegen findet sich kein Einfluss der Ca<sup>++</sup>-bindenden Anionen bei den Neuraminidasen von *Erysipellothrix insidiosa* und *Streptococcus viridans*, bei der *Pasteurella multocida*-Neuraminidase ist der Effekt nur schwach ausgeprägt.

Aber ausserhalb der Reihe von Anionen mit hoher Ca<sup>++</sup>-Affinität, die nur bei Cholera-Neuraminidase voll wirksam waren, inhibiert auch das Pyruvat in den etwas höheren Konzentrationen von etwa 60–250 mM die Aktivität aller vier untersuchter Neuraminidasen unabhängig von ihrer Inaktivierbarkeit durch Calcium-Komplexbildner. Es dürfte sich hier um einen spezifischen Hemmeffekt handeln, der keine Beziehung zu der bei Cholera-Neuraminidase beobachteten Ionenaktivierbarkeit besitzt. Eine unspezifische Hemmwirkung lässt sich zumindest ausschliessen, denn weder Acetat noch Borat noch NaCl entfalten bei gleich hohen oder höheren mola-

ren Konzentrationen derartige Hemmwirkungen. Auch Citrat scheint in ähnlicher Weise wie Pyruvat zu wirken, denn es zeigt im Gegensatz zu den übrigen Calcium-Komplex-bildenden Anionen auch eine Hemmwirkung bei *Streptococcus viridans*-Neuraminidase und in geringerem Mass auch bei *Erysipellothrix insidiosa*-Neuraminidase, die durch Ca-Ionen nicht aktiviert werden. Interessanterweise handelt es sich sowohl bei Pyruvat als auch bei Citrat um wichtige Stoffwechselprodukte des Citronensäure-Zyklus.

Das Problem der Hemmung von Neuraminidasen pathogener Mikroorganismen mag deshalb einige Bedeutung haben, weil sich vielleicht durch gezielte Steuerung des Stoffwechsels oder durch Applikation wirksamer Substanzen die Enzymaktivität senken und damit pathogene Wirkungen verringern lassen<sup>13</sup>.

**Summary.** It was shown that neuraminidase of *Vibrio comma* is inactivated by Ca<sup>++</sup>-binding anions like citrate, EDTA, oxalate, phosphate or tartrate. There is, however, no inhibition of the newly described enzymes of *Erysipellothrix insidiosa* and *Streptococcus viridans*. Pyruvate and, to a lesser extent, also citrate inactivate all the neuraminidases investigated independently of their activation by Ca<sup>++</sup> ions.

W. RAU und H. E. MÜLLER

*Staatl. Med.-Untersuchungsamt Braunschweig,  
Hallestrasse 1, D-33 Braunschweig (BRD),  
17. Dezember 1974.*

<sup>12</sup> L. WARREN, J. biol. Chem. 234, 1971 (1959).

<sup>13</sup> Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

### Purification of N-Acetyl-Hexosaminidase from Boar Epididymis by Affinity Chromatography

Of the several mammalian tissues examined, the epididymis of the adult mammalian male provides the richest source of N-acetylhexosaminidase ( $\beta$ -2 acetamido-2 deoxy-D-glucopyranoside acetylaminodeoxyglucuronidase, E.C. 3.2.1.30)<sup>1,2</sup>. From the observation, that the epididymis of the adult male contains about 10-fold the enzyme concentration of the infantile tissue, it can be derived that this glycosidase is under endocrine control.

Based on the findings by WEIL<sup>3</sup>, that *p*-aminophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-thioglycosaminid is a potent reversible inhibitor of N-acetylhexosaminidase from boar epididymis,

<sup>1</sup> J. CONCHIE and T. MANN, Nature, Lond. 179, 1190 (1957).

<sup>2</sup> J. CONCHIE, J. FINDLAY and G. A. LEVY, Biochem. J. 71, 318 (1959).

<sup>3</sup> R. WEIL, personal communication (1973).