

## Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.

XI. Mitteilung: Hemmwirkungen verschiedener Chinone auf einige Phosphomonoesterasen der Hefe.

Von

**O. Hoffmann-Ostenhof und Elisabeth Putz.**

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 14. Febr. 1948. Vorgelegt in der Sitzung am 19. Febr. 1948.)

Obwohl über die Bedeutung der Phosphomonoesterasen für den Stoffwechsel der lebenden Zelle noch nicht sehr viel bekannt ist, scheint diese Enzymgruppe, deren Vertreter in verschiedensten tierischen und pflanzlichen Geweben, wie auch in Mikroorganismen oft in großer Konzentration vorkommen, doch eine bedeutende Rolle im chemischen Geschehen der lebenden Zelle zu spielen. Nach *Roche*<sup>1</sup> können wir vier verschiedene Typen sogenannter isodynamer Phosphomonoesterasen unterscheiden, die sich voneinander durch verschiedene pH-Optima, Substratspezifität und Verhalten gegen Aktivatoren und Effektoren streng voneinander trennen lassen.

Bei unseren Untersuchungen über die Biochemie der Chinone schien es uns nun wünschenswert, den Einfluß unserer Wirkstoffe auf die Aktivität dieser Fermentsysteme zu prüfen. In der vorliegenden Mitteilung wollen wir über Hemmungerscheinung an Phosphomonoesterasen der Hefe berichten. In der Hefe kommen nach den eingehenden Forschungen von *Schäffner* und *Krumey*<sup>2</sup> von den vier erwähnten isodynamen Phosphomonoesterasen wahrscheinlich drei vor, von denen allerdings eine, und zwar diejenige, welche in ihrer Spezifität und in ihrem pH-Optimum der Nierenphosphatase entspricht, nicht ausreichend charakterisiert zu sein scheint. Die Verteilung dieser Phosphatasen ist bei verschiedenen Heferassen wechselnd. Wir haben uns hier auf die

<sup>1</sup> *Helv. chim. Acta* **29**, 1253 (1946).

<sup>2</sup> *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **255**, 145 (1938).

Untersuchung zweier Fermentsysteme beschränkt, die in ihrer Spezifität und ihrem pH-Optimum merkliche Unterschiede zeigen, nämlich der sogenannten Oberhefenphosphatase nach *H. und E. Albers*,<sup>3</sup> welche ein pH-Optimum zwischen 3,8 und 4,2 zeigt und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycerophosphat etwa im Verhältnis von 4 zu 10 angreift, und die  $\alpha$ -Glycerophosphatase nach *Schäffner* und *Bauer*,<sup>4</sup> deren pH-Optimum etwa bei 6,4 liegt und welche  $\beta$ -Glycerophosphat kaum angreift.

### Methodik.

*Darstellung der Fermentpräparate:* Die  $\alpha$ -Glycerophosphatase wurde genau nach den Angaben von *Schäffner* und *Krumey*<sup>2</sup> hergestellt. Zu den Glycerinextrakten aus getrockneter Unterhefe, die wir der *Schwechater Brauerei*, Wien-Schwechat, verdanken, wurde 1/100-molares Magnesiumsulfat als Aktivator hinzugesetzt.

Die Darstellung der Oberhefenphosphatase wurde zuerst nach der Vorschrift von *H. und E. Albers*<sup>3</sup> durch fermentative Freilegung mit Hilfe eines Extrakts von Grünmalz versucht. Die erhaltene Fermentlösung war aber nur in sehr geringem Ausmaß phosphataseaktiv, was wir der Tatsache zuschreiben, daß die von uns verwendete Preßhefe (aus den *Mautner-Markhoffschen* Preßhefefabriken, Wien XI) sich von dem Ausgangsprodukt der genannten Autoren stark unterschied.

Wir versuchten darauf, das Ferment mittels gereinigten Dioxans zu extrahieren. Dies gelang uns, aber mit ziemlich wechselndem Erfolg, da sich jede einzelne Hefelieferung von den vorangehenden in ihren Eigenschaften unterschied.

Es mag hier erwähnt werden, daß es uns zweimal gelang, durch 90 Minuten dauernde Extraktion mit Dioxan hochaktive Fermentextrakte zu erhalten, die bei langsamer Zugabe von Ammoniak-Ammonchloridpuffer (pH = 8) Kristalle ausschieden; nach Filtration zeigte sich, daß die gesamte Phosphataseaktivität in den Kristallen enthalten war. Diese Kristalle denaturierten jedoch sehr rasch und verloren in Kürze ihre Aktivität. Da wir diese Kristalle mit späteren Hefesendungen nicht mehr reproduzieren konnten, sind wir nicht in der Lage, genaue Aussagen darüber zu machen, ob es sich hier um kristallisierte Oberhefenphosphatase gehandelt hat, oder ob die Phosphatase an irgendwelche kristalline Begleitstoffe adsorbiert war. Die Kristallisierung der Oberhefenphosphatase ist unseres Wissens noch niemals in der Literatur beschrieben worden.

Um nun zu einem zuverlässigen und haltbaren Fermentpräparat zu kommen, legten wir schließlich die Oberhefenphosphatase durch Kryolyse frei. Die frische Hefe wurde nach ein- bis zweitägigem Aufbewahren im Eisschrank mit fester Kohlensäure (oder flüssiger Luft) eingefroren und

<sup>3</sup> Ark. Kem. Mineral. Geol. **12** (B), Nr. 3 (1935); Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **235**, 47 (1935).

<sup>4</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **232**, 66 (1935).

so einen Tag lang stehen gelassen. Sie wurde dann eine Woche lang bei 5° aufbewahrt, wobei Verflüssigung und langsame Autolyse unter geringer Gasentwicklung eintrat. Dann wurde mit der fünffachen Menge 25%igen Dioxans 1 $\frac{1}{2}$  Stunden bei 10° extrahiert und die Hefereste abzentrifugiert. Dieser Extrakt hatte zwar keine sehr hohe Phosphataseaktivität, war aber vergleichsweise recht stabil.

Außerdem wurden noch Hemmungsversuche gegenüber der Phosphataseaktivität von Oberhefensuspensionen durchgeführt.

*Durchführung der Hemmungsversuche:* Die Versuchsansätze bestanden aus 2 ccm Fermentlösung, 2 ccm 0,5-normaler Pufferlösung (bei  $\alpha$ -Glycero phosphatase Citrat-NaOH-Puffer von pH 6,4, bei Oberhefenzitrophosphatase Citrat-HCl-Puffer von pH 4,0), 1 ccm Substratlösung (in den meisten Fällen Natrium- $\alpha$ -glycerophosphat entsprechend 7,5 mg organisch gebundenem Phosphor), 4 ccm Chinonlösung der zu untersuchenden Konzentration sowie 1 ccm Magnesiumsulfatlösung bzw. bei Oberhefenzitrophosphatase, wo Magnesiumionen keine aktiverende Wirkung zeigen, Wasser. Gesamtmenge des Versuchsansatzes 10 ccm.

Die auf 30° vorgewärmten Lösungen wurden nach der Mischung 20 Minuten im Schüttelthermostaten bei 30° geschüttelt und dann in 2 ccm der überstehenden Lösung die Menge freigesetzten anorganischen Phosphats nach der Methode von *Fiske* und *Subharow* bestimmt. Bei Verwendung von Oberhefensuspensionen mußte vor der Phosphorsäurebestimmung die Hefe abzentrifugiert werden.

#### Ergebnisse.

Die unter den geschilderten Bedingungen erhaltenen Hemmwerte sind für den Fall der  $\alpha$ -Glycerophosphatase in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die untersuchte  $\alpha$ -Glycerophosphatase zeigte praktisch keine Wirkung auf  $\beta$ -Glycerophosphat.

Die Wirkung der Chinone auf Oberhefenzitrophosphatase war allgemein eine weitgehend ähnliche. Die perzentuellen Hemmwerte sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die untersuchte Oberhefenzitrophosphatase zeigte eine etwas stärkere Wirkung auf  $\beta$ -Glycerophosphat als auf  $\alpha$ -Glycerophosphat; Hemmwerte unter Verwendung des  $\beta$ -Isomeren waren innerhalb der Versuchsfehlergrenzen völlig gleich mit den angeführten Werten.

Wie erwähnt, wurden auch Versuche mit Oberhefensuspensionen durchgeführt. Die Chinone zeigten auch in diesen Fällen ähnliche Hemmungserscheinungen gegenüber der Phosphataseaktivität; bemerkenswert ist es, daß die erhaltenen Hemmwerte im allgemeinen gut mit den in Tabelle 2 angeführten übereinstimmen und nur Benzochinon und Tolu-

chinon aus der Reihe fallen. Diese beiden einfachsten Substanzen der Reihe hemmten die Phosphatasewirkung der Hefesuspension in bedeutend geringerem Ausmaß als die Aktivität des mittels Kryolyse und Dioxan-extraktion gewonnenen Fermentpräparates.

Tabelle 1. Perzentuelle Hemmung der Aktivität der  $\alpha$ -Glycerophosphatase durch Chinone.  $\text{pH} = 6,4$ ,  $30^\circ$ , Versuchsdauer 30 Minuten.

Substanz	Perzentuelle Hemmung der Spaltung von Natrium- $\alpha$ -glycerophosphat bei verschiedenen molarer Konzentration der Hemmstoffe.			
	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	höhere Verdünn.
Benzochinon .....	84	25	10	
Toluchinon .....	100	63	38	
m-Xylochinon .....	—	18	0	
p-Xylochinon .....	—	15	0	
Thymochinon .....	—	—	18	
4-Methoxytoluchinon .....	—	3	0	
Chlorbenzochinon .....	—	17	4	
m-Dichlorbenzochinon .....	—	5	0	
p-Dichlorbenzochinon .....	—	—	0	
1,2-Naphthochinon .....	—	—	—	15 ( $4 \cdot 10^{-6}$ )
Chlor-1,4-naphthochinon .....	—	—	20	
Methyl-1,4-naphthochinon .....	—	—	16	
2,3-Dichlornaphthochinon .....	—	—	22	
2-Chlor-3-oxynaphthochinon .....	—	40	17	
Lawson .....	—	—	28	
Naphthazarin .....	—	—	—	16 ( $1 \cdot 10^{-6}$ )

Tabelle 2. Perzentuelle Hemmung der Aktivität der Oberhefenphosphatase durch Chinone.  $\text{pH} = 4,0$ ,  $30^\circ$ , Versuchsdauer 30 Minuten. Keine Aktivierung.

Substanz	Perzentuelle Hemmung der Spaltung von Natrium- $\alpha$ -glycerophosphat bei verschiedenen molarer Konzentration der Hemmstoffe.			
	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	höhere Verdünn.
Benzochinon .....	32	15	0	
Toluchinon .....	36	18	7	
m-Xylochinon .....	—	15	4	
p-Xylochinon .....	—	17	8	
p-Dichlorbenzochinon .....	—	—	4	
4-Methoxytoluchinon .....	—	11	0	
1,2-Naphthochinon .....	—	—	—	15 ( $4 \cdot 10^{-6}$ )
2-Methyl-1,4-naphthochinon .....	—	—	0	
2-Chlornaphthochinon .....	—	—	7	
2-Chlor-3-oxynaphthochinon .....	—	18	5	
Naphthazarin .....	—	—	—	0 ( $1 \cdot 10^{-6}$ )

### Diskussion.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Phosphomonoesterasen der Hefe, ebenso wie die alkalische Monophosphoesterase, welche von Sizer<sup>5</sup> in dieser Richtung untersucht wurde, von Chinonen in ihren Aktivitäten gehemmt werden können. Die gemessenen Effekte sind von Substanz zu Substanz verschieden, aber in manchen Fällen durchaus beträchtlich.

Die Reihung der Chinone gibt bei beiden untersuchten Monophosphoesterasen der Hefe ein ziemlich gleichartiges Bild; in beiden Fällen scheint bemerkenswerterweise das Toluchinon der stärkste Inhibitor zu sein, darauf folgt das Benzochinon und von den Derivaten der Naphthochinone ist das 2-Chlor-3-oxy-1,4-naphthochinon der aktivste Hemmstoff. Es scheint im allgemeinen, daß die  $\alpha$ -Glycerophosphatase ein empfindlicheres System darstellt als die Oberhefenphosphatase; insbesondere Naphthochinonderivate zeigen gegenüber dem letzteren System nur recht geringe Hemmwirkung. Ein Vergleich der erhaltenen Reihungen mit denjenigen, die wir in früheren Versuchen mit anderen Fermentsystemen (Urease,<sup>6</sup> Katalase,<sup>7</sup> Papain,<sup>8</sup> Amylasen<sup>9</sup>) gefunden wurden, läßt keinerlei Gemeinsamkeiten erkennen. Daraus läßt sich annehmen, daß der Hemmungsmechanismus der Chinone gegenüber der Phosphataseaktivität ein anderer sein muß als der bei den genannten Enzymsystemen. Über die Art dieses Mechanismus kann zur Zeit noch keine Aussage gemacht werden.

Auch eine Übereinstimmung der erhaltenen Wirkungsreihen mit derjenigen, die bei unseren seinerzeitigen Versuchen über die Beeinflussung des Hefewachstums durch Chinone gefunden wurde,<sup>10</sup> ist nicht festzustellen. Es ist deshalb zu schließen, daß die Hemmung der untersuchten Monophosphoesterasen nicht einen für die Wachstumshemmung dominanten Effekt darstellt.

### Zusammenfassung.

Es wurde die Hemmung der Aktivität zweier Monophosphoesterasen der Hefe durch verschiedene Chinone gemessen. Die gefundenen Hemmungswerte sind teilweise recht beträchtlich. Übereinstimmungen der erhaltenen Wirkungsreihen mit den in früheren Versuchen mit anderen Fermentsystemen erhaltenen Reihungen konnten ebensowenig gefunden werden, wie eine Übereinstimmung der antibiotischen Wirkung der einzelnen Chinone gegenüber der Hefezelle.

<sup>5</sup> J. Biol. Chem. **145**, 405 (1942).

<sup>6</sup> Mh. Chem. **76**, 180 (1946).

<sup>7</sup> Mh. Chem. **76**, 319 (1947).

<sup>8</sup> Mh. Chem. **78**, 53 (1948).

<sup>9</sup> Mh. Chem. **79**, 248 (1948).

<sup>10</sup> Exper. **3**, 327 (1947).