

Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.

XII. Mitteilung: Hemmungswirkungen verschiedener Chinone
auf die Eiweißspaltung durch Hefeproteinasen.

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und H. Moser.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 20. April 1948. Vorgelegt in der Sitzung am 29. April 1948.)

In einer früheren Mitteilung dieser Reihe¹ haben wir die Wirkung einer Anzahl von Benzochinon- und Naphthochinonabkömmlingen auf die Aktivität eines Papainpräparats gegenüber Gelatine berichtet. Wir hatten damals auch einige Vorversuche über die Einwirkung derselben Wirkstoffe auf eine nach *Graßmann* und Mitarbeitern² dargestellte Hefeproteinase durchgeführt und eine auffallende Ähnlichkeit des Verhaltens dieses Ferments und des Papains gegenüber den Chinonen in einem Übersichtsreferat³ erwähnt. Da wir nun zur Zeit aus anderen Gründen eine eingehendere Untersuchung über verschiedene Hefeproteinasen durchführen, erschien es uns nützlich und interessant, die damals erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen und zu vervollständigen.

Methodik.

Darstellung der Fermentpräparate. Als Ausgangsstoffe wurden für das Präparat aus Unterhefe Bierhefe aus der Ottakringer Brauerei und Preßhefefabrik, Wien XVI., für das Präparat aus Oberhefe eine spezielle Anstellhefe, die wir ebenfalls dem Entgegenkommen der genannten Firma verdanken, verwendet. Die Enzymkonzentrate wurden nach der Methode von *Graßmann*² hergestellt, nur führten wir die von diesem Autor vorgeschlagene Adsorption an Tonerde nicht durch. An deren Stelle engten wir die Extrakte an einer Ölpumpe bei Zimmertemperatur auf etwa 75% ein, wobei größere Mengen inerter Proteine koagulierten, welche abzentrifugiert wurden. Anscheinend wirken diese Eiweißstoffe als Hemmkörper, denn die durch diesen

¹ Mh. Chem. 78, 53 (1948).

² Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 179, 41 (1928).

³ Exper. 3, 137, 176 (1947).

Prozeß erhaltene Aktivitätssteigerung war eine viel größere als nach der Volumsverringerung zu erwarten wäre. So konnten wir insbesondere bei Oberhefepräparaten hier eine Erhöhung der Aktivität bis auf das Fünffache beobachten, womit unsere Präparate in ihrer Aktivität den von Graßmann mit Hilfe der Adsorptionsmethode erhaltenen sehr nahe kommen. Weitere Versuche über eine Reinigung der Hefeproteininasen sind zur Zeit im Gange.

Bestimmung der Fermentaktivität und deren Hemmung. Die Eiweißspaltung durch die Hefeproteininasen wurde unter Verwendung einer Modifikation der klassischen Methode von Willstätter und Graßmann⁴ gemessen. Es wurde also der Zuwachs der COOH-Gruppen im Versuchsansatz durch Titration mit alkoholischer KOH in alkoholischer Lösung bestimmt, wobei aber an Stelle des von den Autoren und auch früher von uns¹ verwendeten Thymolphthaleins ein Mischindikator Phenolphthalein—Thymolphthalein im Verhältnis 1 : 1 zur Anwendung gelangte; die Vorteile dieser Abänderung liegen in einer leichteren Erkennbarkeit des Titrationsendpunktes und einer damit verbundenen erheblich größeren Genauigkeit der Bestimmung. Eine Untersuchung über die Anwendbarkeit dieser Modifikation bei der Bestimmung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen soll zu gegebener Zeit an anderer Stelle veröffentlicht werden. Als Substrat wurde reinste Gelatine verwendet, die Spaltungsversuche wurden bei pH = 5 und 40°, also unter den für das Ferment optimalen Bedingungen vorgenommen. Die Hemmstoffe wurden sämtlich in destilliertem Wasser gelöst bei Versuchsbeginn zugegeben.

Ergebnisse.

Wir führten zwei Hauptversuchsreihen durch: eine mit einem aus Unterhefe und eine mit einem aus Oberhefe gewonnenen Proteinasepräparat. Die durch die Wirkstoffe bewirkten perzentuellen Hemmungen nach 24 bzw. 48 Stunden lassen sich aus den beiden folgenden Tabellen ersehen.

Tabelle 1. Hemmung der Aktivität der Unterhefeproteinase durch Chinone. 40°, pH = 5,0 (Citratpuffer), Werte nach 24 Stunden und 48 Stunden (Werte in Klammern).

Substanz	Perzentuelle Hemmung der Gelatinespaltung bei verschiedenen molarer Konzentration der Wirkstoffe im Versuchsansatz		
	2,5 · 10 ⁻³	2,5 · 10 ⁻⁴	2,5 · 10 ⁻⁵
p-Benzochinon	57 (43)	37 (26)	6 (4)
Toluchinon	52 (42)	34 (26)	7 (2)
p-Xylochinon	—	30 (23)	4 (2)
4-Methoxytoluchinon.....	—	17 (13)	0 (0)
2,6-Dichlorbenzochinon	—	—	10 (6)
2,5-Dichlorbenzochinon	—	—	6 (4)
1,2-Naphthochinon.....	—	—	25 (23)
1,4-Naphthochinon.....	—	—	13 (10)
Lawson.....	—	—	12 (11)
Thymochinon	—	26 (24)	5 (4)

⁴ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 138, 184 (1924).

Die Proteinase aus Oberhefe verhält sich gegenüber Chinonen weitgehend analog.

Tabelle 2. Hemmung der Aktivität der Oberhefeproteinase durch Chinone. 40° , $pH = 5$ (Citratpuffer), Werte nach 24 Stunden und nach 48 Stunden (Werte in Klammern).

Substanz	Percentuelle Hemmung der Gelatinespaltung bei verschiedenen molarer Konzentration der Wirkstoffe im Versuchsansatz		
	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
p-Benzochinon	66 (58)	38 (29)	6 (4)
Toluchinon	53 (47)	31 (25)	5 (3)
p-Xylochinon	—	30 (24)	9 (4)
Thymochinon	—	30 (26)	3 (5)
4-Methoxytoluchinon	—	20 (20)	2 (0)
2,6-Dichlorbenzochinon	—	—	11 (8)
2,5-Dichlorbenzochinon	—	—	10 (7)
1,2-Naphthochinon	—	—	30 (27)
1,4-Naphthochinon	—	—	12 (10)
Lawson	—	—	10 (9)

Naphthazarin und Methylnaphthazarin waren auch in der niedrigsten oben angeführten Konzentration im Versuchsansatz nicht in Lösung zu bringen. Sie wurden deshalb als gesättigte Lösungen dem Ansatz hinzugefügt, wodurch eine Konzentration von etwa $2,5 \cdot 10^{-6}$ erreicht wurde. Sie zeigten aber auch unter diesen Bedingungen eine bemerkenswerte Wirkung.

Tabelle 3. Hemmung der Aktivität der beiden Hefeproteinasen durch Naphthazarin und Methylnaphthazarin bei der ungefähren Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-6}$ -molar im Versuchsansatz. (Sonstige Bedingungen wie oben.)

Substanz	Percentuelle Hemmung der Gelatinespaltung durch Hefeproteinasen	
	Unterhefe	Oberhefe
Naphthazarin	17 (17)	17 (15)
Methylnaphthazarin	8 (6)	11 (11)

Außer den besprochenen Substanzen aus der Chinongruppe haben wir auch unter der Annahme, daß es sich bei den Hefeproteinasen wie beim Papain um Fermente handle, die für das Zustandekommen ihrer Wirkung die Anwesenheit freier Sulfhydrylgruppen benötigen, Thiolreagentien, und zwar Porphyrexid, Jodessigsäure und Natriumarsenat in analoger Weise auf die Gelatinespaltung einwirken lassen. Porphyrexid zeigte

keine Wirkung auf die Aktivität der Fermente; hingegen konnte unter Anwendung vergleichsweise hoher Konzentrationen von Jodessigsäure und Arsenat eine beträchtliche Hemmung festgestellt werden.

Tabelle 4. Hemmung der Aktivität der beiden Hefeproteininasen durch Jodessigsäure und Natriumarsenat. 40°, pH = 5 (Citratpuffer), Werte nach 24 Stunden und nach 48 Stunden (Werte in Klammern).

Substanz	Percentuelle Hemmung der Gelatinespaltung bei verschiedener molarer Konzentration der Wirkstoffe im Versuchsanansatz			
	Unterhefeproteinase		Oberhefeproteinase	
	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
Jodessigsäure	56 (57)	7 (5)	62 (60)	8 (6)
Natriumarsenat	52 (50)	8 (9)	39 (41)	3 (3)

Wir haben schließlich noch Versuche darüber unternommen, ob die von uns beobachteten Hemmungen durch Zusatz irgend welcher Reduktionsmittel aufgehoben werden können. Zu diesem Zweck änderten wir die Versuchsbedingungen insoweit ab, als wir zuerst die Hemmstoffe mit einer gepufferten Fermentlösung ohne Substratzusatz inkubierten und erst dann das Reduktionsmittel in großem Überschuß gemeinsam mit dem Substrat zusetzten. Unter Verwendung dieser Versuchsanordnung konnte festgestellt werden, daß der Zusatz von Natriumthiosulfat, Schwefelwasserstoffwasser und Cysteinchlorhydrat in zehnfachem Überschuß gegenüber dem Hemmstoff die Wirkung völlig aufhebt, während mit Natriumsulfit nur eine partielle Aufhebung der Hemmung beobachtet werden konnte.

Diskussion.

Es wurde von mehreren Autoren festgestellt, daß die Hefeproteininasen eine große Ähnlichkeit mit dem Papain zeigen. So werden in verschiedenen Lehrbüchern diese Fermente gemeinsam mit Papain, Bromelin, Ficin und ähnlichen Wirkstoffen zur Klasse der papainartigen Enzyme zusammenge stellt. Allerdings ist über die Substratspezifität der Hefeproteininasen gegenüber niedrigeren Peptiden, welche ja heute geradezu das Kriterium der Klassifikation der Proteininasen darstellt, noch nichts bekannt; wir sind zur Zeit damit beschäftigt, diese Frage zu klären. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Papain und den Hefeproteininasen muß jedoch festgestellt werden; die Hefeproteininasen lassen sich nur unter besonderen Umständen durch Blausäure aktivieren, wohingegen das Papain gegenüber dieser Aktivierung sehr empfänglich ist.

In der vorliegenden Versuchsreihe wurde nun im Anschluß an unsere seinerzeitige analoge Arbeit über das Papain¹ die Einwirkung derselben Chinone auf zwei verschiedene Hefeproteininasen untersucht, und eine zwar

nicht quantitativ, aber qualitativ weitgehende Übereinstimmung zwischen Papain und den Hefeproteininasen vorgefunden, nur scheint das Papain allgemein das empfindlichere Ferment darzustellen. Auch zwischen den beiden untersuchten Hefeproteininasen bestehen in ihrem Verhalten gegenüber den verschiedenen Hemmstoffen gewisse Unterschiede, die besonders bei Jodessigsäure und Natriumarsenat stark hervortreten. Wie weit die beiden Proteininasen als chemisch verschiedene Individuen angesprochen werden müssen, kann bei den noch unreinen Präparaten nicht entschieden werden.

Als bemerkenswert möchten wir auch hervorheben, daß sich eine Reihe von Parallelen zwischen den Hemmwirkungen auf die Proteininasen und den seinerzeit von uns gemessenen Hemmungseffekten auf das Wachstum von Hefe⁵ ergeben. Unter der nicht unwahrscheinlichen Annahme, daß die von uns untersuchten Proteininasen physiologisch nicht nur am Abbau, sondern auch an der Synthese der Eiweißstoffe des Hefearganismus beteiligt sind, wäre es gut vorstellbar, daß die Hemmung dieser Proteininasen einen maßgebenden Teilstoff bei der Wachstumshemmung der Hefen durch Chinone darstellt. Zur Sicherstellung dieses Mechanismus bedarf es allerdings noch weiterer genauer Untersuchungen.

Die Wirkung der Chinone auf diese Proteininasen beruht sicherlich auf einer Reaktion der Chinone mit essentiellen SH-Gruppen. Hier sind grundsätzlich zwei verschiedene mögliche Mechanismen zu unterscheiden: Oxydation zweier benachbarter SH-Gruppen zu einer S—S-Bindung oder Kondensation des Chinons mit der SH-Gruppe, wie es von *Kuhn* und *Beinert*⁶ bzw. von *Fieser* und *Fieser*⁷ beschrieben wurde. Die vollständige Aufhebung der Hemmungerscheinungen durch Reduktionsmittel spricht für die erstere Formulierung. Allerdings läßt sich eine Kondensation auch nicht völlig ausschließen, da Natriumsulfit, ein Reagens ohne SH-Gruppen, nicht imstande ist, die Hemmung völlig aufzuheben. Wenn man annimmt, daß das Ferment SH-Gruppen der Reagenzien durch eine Art Komplexbildung (Ferment...SH-Verbindung) für seine Wirkung ausnützen kann, so kann man schließen, daß der Prozentsatz der nicht durch Natriumsulfit aufhebbaren Hemmung gleichzeitig den Prozentsatz der durch Kondensation veränderten SH-Gruppen darstellt, denn Sulfit wäre durch sein Reduktionsvermögen ohne weiteres imstande, S—S-Brücken zu spalten.

In einer uns leider nur im Zentralblattauszug zugänglichen Arbeit bezeichnen *Blagoveschensky* und *Sorokina*⁸ die durch Chinone bewirkte Zerstörung einer Hefeproteinase aus *Mycoderma*-Arten als irreversibel.

⁵ Exper. **3**, 327 (1947).

⁶ Ber. dtsch. chem. Ges. **77**, 606 (1944).

⁷ L. F. Fieser und M. Fieser, Organic Chemistry. Boston. 1944.

⁸ Bull. Biol. Méd. exp. URSS **4**, 176 (1937); Chem. Zbl. **1938 II**, 869.

Dieser von unseren Beobachtungen verschiedene Befund läßt sich vielleicht mit dem unterschiedlichen Ursprung des von den Autoren untersuchten Fermentpräparats erklären.

Zusammenfassung.

Es wurde die hemmende Wirkung verschiedener Derivate von Benzochinon und Naphthochinon sowie einiger Thiolreagentien auf die Gelatinespaltung durch zwei Hefeproteinasen aus Oberhefe und Unterhefe gemessen. Die Hefeproteinasen verhalten sich sehr ähnlich und zeigen weiters große Analogien gegenüber der Hemmbarkeit des Papains durch dieselben Wirkstoffe. Es besteht weiters eine gewisse Übereinstimmung zwischen den wachstumshemmenden Effekten der Chinone gegenüber der Hefe und deren Hemmeffekte auf die Aktivität der Proteinasen; es erscheint aber noch verfrüht, aus diesen Parallelen bindende Aussagen über einen Zusammenhang zwischen den beiden Erscheinungen zu machen.

Die beschriebenen Hemmungen lassen sich durch Zugabe von Reduktionsmitteln im Überschuß ganz oder teilweise rückgängig machen.