

## 68. Zur Kenntnis der Mono- und Diamin-oxydase

10. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Polyaminen<sup>1)</sup>

von E. Albert Zeller.

(2. IV. 41.)

Zur Deutung einiger besonderer Verhältnisse beim enzymatischen Abbau von Di- und Polyaminen durch die Diamin-oxydase (DO) (Eigenhemmung durch überoptimale Substratkonzentration, Hemmung durch Monoamine und Summationseffekt) wurde in der 7. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe<sup>2)</sup> ein Modell dieses Ferments entwickelt. Dabei wurden einige Ergebnisse vorweggenommen, die damals nicht ausführlicher dargestellt werden konnten, weil die entsprechenden Versuche nicht in den Rahmen jener Veröffentlichung hineinpassten. Es handelte sich hauptsächlich um Zusammenhänge zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit bei der enzymatischen Oxydation von asymmetrischen Molekülen wie Agmatin ( $\delta$ -Aminobutyl-guanidin) und um Hemmungsversuche mit verschiedenen Imidazolen. Dieses Versäumnis wird nun hier nachgeholt.

In der ersten ausführlichen Mitteilung über die Oxydation von Diaminen<sup>3)</sup> wurde gezeigt, dass der Sauerstoffverbrauch über 1 Atom Sauerstoff pro Moleköl Substrat hinausgeht. In einer späteren<sup>4)</sup> wurde die Frage der Beteiligung der Aldehyd-dehydrase (= Xanthinoxidase) bei dieser Weiteroxydation des primären Reaktionsproduktes der DO diskutiert. Da Harnsäure einen hemmenden Einfluss auf die Xanthinoxidase ausübt, untersuchte ich den Einfluss dieser Verbindung auf die Oxydationsgeschwindigkeit von Diaminen bei Anwesenheit der DO. Die schon früher von F. J. Philpot<sup>5)</sup> mit der Monoamin-oxydase und Harnsäure durchgeföhrten Hemmungsversuche wurden wiederholt und erweitert. Die dabei gewonnenen Resultate erlaubten, einen Einblick in den Mechanismus der beobachteten Reaktionen zu gewinnen.

### 1. Substratkonzentration und Abbaugeschwindigkeit des Agmatins.

Wenn die Substratkonzentration der DO stetig erhöht wird, so nimmt vorerst auch die Abbaugeschwindigkeit zu. Von einer be-

<sup>1)</sup> 9. Mitteilung: E. A. Zeller, Helv. **24**, 117 (1941).

<sup>2)</sup> 7. Mitteilung: E. A. Zeller, Helv. **23**, 1418 (1940).

<sup>3)</sup> 2. Mitteilung: E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938).

<sup>4)</sup> 6. Mitteilung: E. A. Zeller, R. Stern und M. Wenk, Helv. **23**, 3 (1940).

<sup>5)</sup> Biochem. J. **31**, 856 (1937).

stimmen Konzentration an aber wird sie wieder kleiner. Diese Erscheinung der Hemmung der DO durch überoptimale Substratkonzentration, im Folgenden der Einfachheit halber als Eigenhemmung bezeichnet, findet sich kaum angedeutet beim Putrescin, etwas stärker beim Cadaverin, noch deutlicher beim Spermin und sehr stark beim Histamin<sup>1)</sup>. Sie kann noch dadurch verstärkt werden, wenn ein Teil des Ferments durch Hemmungsstoffe blockiert wird: Summationseffekt (7. Mitteilung, l. c.). Wenn die Vorstellungen über den enzymatischen Abbau von asymmetrischen Molekülen durch die DO, wie sie weiter unten entwickelt werden, richtig sind, dann muss Agmatin wie das schon geprüfte Histamin eine sehr ausgeprägte Eigenhemmung erkennen lassen.

Es gelangten die üblichen Fermentlösungen aus Schweinenieren-Trockenpulver zur Verwendung. Als Mass für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde der Sauerstoffverbrauch des Fermentssystems manometrisch in der mehrfach beschriebenen Weise bestimmt (2. und 3. Mitteilung, l. c.). Agmatin wurde als Sulfat (*Hoffmann-La Roche & Co., Basel*) den Lösungen zugesetzt. Da die Sulfate einen hemmenden Einfluss auf die Histaminase (= Diamin-oxydase) ausüben<sup>2)</sup>, wurde mit Hilfe von Natriumsulfat die molare Sulfatkonzentration in allen Ansätzen gleich gross gemacht.

Tabelle 1.

(Nr. W 268)

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Agmatins. Trockenpulver mit der sechsfachen Menge 2½-proz. Kochsalzlösung extrahiert, die Lösung 2 Tage gegen Phosphatpuffer pH 7,2 dialysiert. Pro Ansatz wurden 3,4 cm<sup>3</sup> dieser Lösung verwendet und das Volumen auf 4,0 cm<sup>3</sup> ergänzt. Zusatz von 1 Tropfen Octylalkohol, Sauerstoffatmosphäre. Molare Konzentration des Sulfations 0,016-m.

Molare Konzentration von Agmatin	Zahl der verbrauchten mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach		
	11 Minuten	21 Minuten	31 Minuten
0,00025	5,6	8,4	10,3
0,0005	7,1	15,6	23,0
0,001	8,3	14,2	22,8
0,002	8,1	12,1	18,7
0,008	5,1	8,8	15,7
0,016	3,6	7,5	12,9

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass eine Konzentration von 0,0005 bis 0,001-m. schon optimal ist. Für Histamin fand sich seinerzeit mit einer gleichartigen Versuchsanordnung eine optimale Konzentration von 0,001-m. (4. Mitteilung, l. c.). Mehrere Wiederholungen mit

<sup>1)</sup> 3. Mitteilung: *E. A. Zeller, Helv.* **21**, 1645 (1938). 4. Mitteilung: *E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin, Helv.* **22**, 837 (1939).

<sup>2)</sup> *C. H. Best und E. W. McHenry, J. Physiol.* **70**, 349 (1930).

stärkerer Unterteilung des entscheidenden Konzentrationsbereiches führten zum gleichen Ergebnis, ebenfalls der Ersatz des Extraktes aus getrockneter durch einen aus frischer Schweineniere (Nieren-Rinde), dessen Herstellung früher beschrieben worden ist<sup>1).</sup>

Tabelle 2.

(Nr. W 276)

Agmatinkonzentration und Abbaugeschwindigkeit bei Anwesenheit frischer Schweineniere. Frische Schweinenierenrinde mit der fünffachen Menge 2½-proz. Kochsalzlösung verrieben und extrahiert, molare Konzentration des Sulfations 0,008-m. Die Ansätze im übrigen sonst gleich wie beim Versuch Tabelle 1. Die (sehr geringen) Leerwerte subtrahiert.

Molare Konzentration von Agmatin	Zahl der verbrauchten mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach	
	7 Minuten	15 Minuten
0,0005	11,8	21,6
0,001	7,9	17,9
0,002	5,9	15,7
0,004	5,1	10,7

Die Resultate der eben beschriebenen Experimente geben die Erklärung, warum nach *K. Felix* und *K. Zorn*<sup>2)</sup> das Ferment, das Putrescin und Cadaverin „leicht oxydiert“, Agmatin aber nur „sehr schwer“ abbaut, während in der 2. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe (l. c.) für Agmatin eine grössere oder ungefähr gleich grosse Desaminierungsgeschwindigkeit wie für Cadaverin gefunden wurde. Beide Versuchsanordnungen stimmen weitgehend miteinander überein. Im ersten Fall aber wurde eine Substratkonzentration von ungefähr 0,01-m. verwendet, bei der die Eigenhemmung beim Agmatin im Gegensatz zu Putrescin und Cadaverin schon sehr stark ausgeprägt ist, im letztern eine Konzentration von 0,001—0,002-m., die nicht weit vom Optimum entfernt liegt.

Es sei hier auf eine Schwierigkeit hingewiesen, die bei solchen Versuchen auftritt, bei denen mit derart geringen Substratkonzentrationen gearbeitet werden muss. Da die ersten Ablesungen erst einige Minuten nach Beginn gemacht werden können, so ist bei den kleinsten Konzentrationen schon ein wesentlicher Teil des Substrats verbraucht und damit die Umsatzgeschwindigkeit verringert worden. Bei den Substratmengen, die über dem Optimum liegen, bewirkt die Konzentrationsabnahme umgekehrt eine Reaktionsbeschleunigung. Die oben festgestellte optimale Agmatinkonzentration ist somit als oberer Grenzwert zu betrachten. Diese Ungenauigkeit kann im allgemeinen auch nicht dadurch verbessert werden, dass man die Oxydation einer

<sup>1)</sup> 5. Mitteilung: *E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. Mislin und M. Wenk*, Helv. **22**, 1381 (1939).      <sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **258**, 16 (1939).

überoptimalen Substratmenge verfolgt, wobei die Tangente der Kurve des Sauerstoffverzehrs die Reaktionsgeschwindigkeit bei der jeweilig noch vorhandenen Substratkonzentration angeben würde. Hier macht sich schon nach wenigen Minuten der zusätzliche Sauerstoffverbrauch, der mit der 2. Oxydationsstufe verbunden ist, bemerkbar (4. und 7. Mitteilung, i. e.).

## 2. Hemmung der Diamin-oxydase durch Imidazol und Imidazol-Körper.

So wie das DO-Modell eine Voraussage von der grossen Affinität zwischen DO und Guanidinkörper<sup>1)</sup> auf eine stark ausgeprägte Eigenhemmung erlaubte, so sollte umgekehrt aus der Grösse der Eigenhemmung des Histamins auf eine grosse Affinität zwischen der DO und dem Imidazol geschlossen werden können. Zur Verifizierung dieser Annahme wurden Versuche in der Weise durchgeführt, dass dem System DO + Cadaverin Imidazol zugesetzt wurde. Je höher die Affinität DO-Imidazol ist, umso stärker verdrängt das letztere das Cadaverin vom Ferment, ohne natürlich selber durch die DO abgebaut werden zu können, und desto grösser wird demnach die Hemmung des Cadaverinabbaues sein. Ausser dem Grundkörper Imidazol wurden noch weitere Imidazolderivate in dieser Hinsicht geprüft, darunter vor allem Imidazolyl-essigsäure, die das wahrscheinliche Reaktionsprodukt der 2. Oxydationsstufe des enzymatischen Histaminabbaus darstellt, und schliesslich als ein Sechsring mit 2 Stickstoffatomen Piperazin.

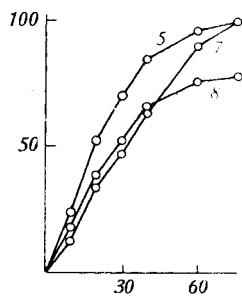


Fig. 1.

(Nr. W 319)

Beeinflussung des enzymatischen Cadaverinabbaus durch Imidazolkörper und Piperazin.  $2 \text{ cm}^3$  Fermentlösung, die wie in Versuch Tabelle 1 und 2 hergestellt wurde, auf  $3 \text{ cm}^3$  mit Phosphatpuffer  $\text{pH}$  7,2 aufgefüllt. Alle Substrate in dem gleichen Puffer gelöst, allenfalls auftretende  $\text{pH}$ -Verschiebungen mit primärem resp. sekundärem Phosphat korrigiert. Cadaverin-dichlorhydrat 0,0033-m., Imidazol, Imidazolyl-essigsäure und Piperazin 0,01-m. Übrige Versuchsbedingungen wie bei den Versuchen Tabelle 1 und 2. Versuchsanordnung: 1: Fermentlösung (FL) allein, 2: FL+ Imidazol, 3: FL+ Imidazolyl-

<sup>1)</sup> E. A. Zeller, Naturwiss. **26**, 578 (1938); 3. Mitteilung, i. e.; H. Blaschko, J. Physiol. **95**, 3P (1939).

essigsäure, 4: FL + Piperazin, 5: FL + Cadaverin (Cd), 6: FL + Cd + Imidazol, 7: FL + Cd + Imidazolyl-essigsäure, 8: FL + Cd + Piperazin. Der Sauerstoffverbrauch der Ansätze 1—4 und 6 ist so gering, dass die Kurven mit der Abszisse zusammenfallen.

Bei einem Verhältnis der Konzentrationen des Cadaverins zu der des Imidazols von 1:3 vermag das letztere den Abbau des Cadaverins in der angegebenen Zeit vollständig zu unterdrücken, desgleichen bei einem Verhältnis von 1:1, bei dem nach 1 Stunde nur eine Spur Abbau gefunden wurde (Nr. W 318). Erst bei dem Verhältnis von 3:1 wird der Sauerstoffverbrauch deutlich und beträgt nach 1 Stunde 15 % des Ansatzes ohne Imidazol (Nr. W 319).

Imidazolyl-essigsäure hemmt sehr viel weniger als die gleiche molare Konzentration von Imidazol. Die Hemmung nimmt im Verlaufe von einer Stunde ab, um schliesslich in eine Förderung der Sauerstoffaufnahme überzugehen. Piperazin dagegen zeigt während 22 Stunden eine ständig gleich bleibende Hemmung von rund 25 %. Piperazin selber wird nicht oder in nicht messbarer Weise oxydiert, womit neben dem Vitamin B<sub>1</sub> (4. Mitteilung, I. c.) ein zweites Diamin bekannt geworden ist, das wohl von der DO gebunden, aber von dieser nicht abgebaut werden kann.

Diese Versuche wurden mit der neuen, in der 8. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe beschriebenen Methode der oxydativen Entfärbung von Indigo-disulfonat<sup>1)</sup> wiederholt und erweitert. Das Prinzip der Methode ist das Folgende: Im System Diamin + DO + Sauerstoff wird ein Peroxyd gebildet, das mittels eines peroxydatisch wirkenden Stoffes verschiedene leicht oxydable Körper wie Äthanol, Brenztraubensäure<sup>2)</sup>, Hämoglobin (2. Mitteilung, I. c.), Harnsäure (vgl. Abschnitt 3) und schliesslich auch Indigo-disulfonat oxydiert.

Ausser den schon genannten Imidazolkörpern wurden noch Imidazolyl-milchsäure und Imidazolyl-alanin (Histidin) verwendet. Auch bei dieser Versuchsanordnung zeigte es sich, dass das Imidazol eine Sonderstellung einnimmt. Wenn in den Ansätzen mit Imidazolkörpern trotz der Anwesenheit dieser letztern schon alles Indigo-disulfonat entfärbt worden war, blieb die blaue Farbe des Ansatzes Cadaverin + Imidazol noch fast völlig erhalten, selbst bei einem Konzentrationsverhältnis Cadaverin/Imidazol von 2:1 (Nr. J 147). Die Menge des noch übrig bleibenden Indigo-disulfonats kann nach Enteiweißung der Fermentlösungen mit dem gleichen Volumen 10-proz. Trichloressigsäure in einfacher Weise im Stufenphotometer ermittelt werden. Das Resultat eines solchen Versuches ist in der Tabelle 3 dargestellt worden.

<sup>1)</sup> 8. Mitteilung: E. A. Zeller, Helv. **23**, 1502 (1940); vorläufige Mitteilung: Naturwiss. **28**, 712 (1940).

<sup>2)</sup> Unveröffentlichte Versuche.

Tabelle 3.

(Nr. J 146)

Beeinflussung des enzymatischen Cadaverinabbaues durch Imidazolkörper. 2 cm<sup>3</sup> Fermentlösung, die wie in den Versuchen Tabelle 1 und 2 hergestellt worden war, auf 3 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. 0,2 mg Indigo-disulfonat, 1 Tropfen prim. Octylalkohol, Durchleiten von Sauerstoff durch die Reagensgläser, die bei 38° 2½ Stunden inkubiert werden. Enteisierung mit Trichloressigsäure. Filtrat mit Küvette 1 cm Schichtdicke und Filter S 61 im Stufenphotometer gemessen. Konzentration des Cadaverins 0,0033-m., die der Imidazolkörper 0,0067-m.

Ansätze	Extinktion	Entfärbung des Indigo in %
FL . . . . . . . . . . . .	0,387	
FL + Imidazol . . . . . . . . . . . .	0,387	
FL + I-essigsäure . . . . . . . . . . . .	0,387	
FL + I-milchsäure . . . . . . . . . . . .	0,387	
FL + Histidin . . . . . . . . . . . .	0,377	
FL + Cadaverin . . . . . . . . . . . .	0,208	90
FL + Cd + Imidazol . . . . . . . . . . . .	0,372	8
FL + Cd + I-essigsäure . . . . . . . . . . . .	0,187	100
FL + Cd + I-milchsäure . . . . . . . . . . . .	0,244	72
FL + Cd + Histidin . . . . . . . . . . . .	0,215	86

Aus der vorstehenden Tabelle geht hervor, dass alle aufgezählten Imidazolkörper auch durch eine sehr aktive DO nicht oxydiert werden. Damit sind die Resultate von *E. Gebauer-Fuelnegg* und *H. L. Alt*<sup>1)</sup>, die mit Histaminase (= Diamin-oxydase) keine Oxydation von Imidazolyl-aldehyd, -propionsäure, -milchsäure und Histidin erzielten, bestätigt und durch Imidazol und Imidazolyl-essigsäure ergänzt worden.

Von einer gewissen Bedeutung für die Kenntnis der Reaktion zwischen der DO und ihren Substraten und für die Frage der Reversibilität der DO (vgl. 7. Mitteilung, l. c.) ist der Einfluss der Seitenkettenständigen Carboxylgruppe auf die Hemmung des Cadaverinabbaues durch Imidazolkörper. Offenbar vermindert die negative Gruppe die Affinität zwischen der DO und dem Imidazolring. Imidazolyl-essigsäure, die wahrscheinlich ein Produkt des enzymatischen Abbaues von Histamin durch die DO darstellt, in dem der primär gebildete Aldehyd durch die weitere Oxydation in die entsprechende Säure übergeht, kann nur einen sehr kleinen Teil des Ferments durch Blockierung ausschalten.

In ähnlicher Weise, wie die DO, wird auch die Histidase durch Imidazolkörper gehemmt<sup>2)</sup>. Auch bei diesem Ferment besitzt Imidazol den stärksten Einfluss, wenn auch der Unterschied zu den übrigen Imidazonen nicht so gross ist wie der bei DO.

<sup>1)</sup> Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **29**, 531 (1932).

<sup>2)</sup> S. Edlbacher, H. Baur und M. Becker, Z. physiol. Ch. **265**, 61 (1940).

### 3. Einfluss der Harnsäure auf den enzymatischen Abbau von Diaminen.

Da Harnsäure als Imidazolderivat aufgefasst werden kann, sollte sie die DO hemmend beeinflussen. Das ist, wie der Versuch Tabelle 4 zeigt, auch wirklich der Fall. Die Hemmung nimmt im Verlaufe der Reaktion ab, um bei grösseren Substratkonzentrationen bald in eine Beschleunigung des Sauerstoffverzehrs umzuschlagen. Erwartungsgemäss ist Ausschaltung der DO nicht sehr stark, weil auch hier negativ geladene Gruppen die Affinität der Harnsäure zur DO herabsetzen. Harnsäure wird durch die angewandte Fermentlösung höchstens spurenweise oxydiert, so dass der Mehrverbrauch von Sauerstoff bei der höhern Histaminkonzentration auf eine sekundäre Oxydation der Harnsäure durch das bei der Reaktion sich bildende Peroxyd (vgl. vorangehender Abschnitt) zurückzuführen ist. Als ein Ergebnis dieses *in vitro*-Versuches erhebt sich die Möglichkeit, dass auch ein Organismus, der keine spezielle Uric-o-oxydase besitzt, wie es für den Menschen allgemein bekannt ist, trotzdem Harnsäure abbauen kann.

Tabelle 4.

(Nr. W 282)

Beeinflussung des enzymatischen Histaminabbaues durch Harnsäure.

Nierentrockenpulver mit der fünffachen Menge Kochsalzlösung extrahiert. 3 cm<sup>3</sup> Fermentlösung auf das Volumen 4 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Pro Ansatz 5,2 mg Harnsäure (HS). Die übrigen Versuchsbedingungen dieselben wie bei den vorangehenden Versuchen.

Minuten nach Versuchs- beginn	Verbrauchte mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>					
	Leerversuche		Hist. 0,0005-m.		Hist. 0,001-m.	
	ohne HS	mit HS	ohne HS	mit HS	ohne HS	mit HS
10	1	0,5	22,5	14,5	30,5	25
20	1,5	4,5	26,5	23,5	45	66
30	+ 2*)	6,5	29	26	47	80,5
40	+ 1,5*)	7	30,5	26,5	48,5	91

\*) Das Pluszeichen bedeutet entsprechende Druckzunahme anstatt der üblichen Druckabnahme.

Beim enzymatischen Abbau von Cadaverin traten die gleichen Erscheinungen auf, dass bei kleinerer Substratkonzentration eine Hemmung, bei grösserer eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs durch Harnsäurezusatz bewirkt wurde.

### 4. Einfluss der Harnsäure auf den enzymatischen Abbau von Tyramin.

Die im vorangehenden Abschnitt beschriebene Hemmung der DO durch Harnsäure ist wohl am einfachsten als Konkurrenzphänomen zwischen der Harnsäure (= Imidazolderivat) und den Diaminen zu interpretieren. Der Einfluss der Harnsäure ist verhältnismässig

gering und bei weitem nicht mit der starken Hemmung der Tyraminase (Monoamin-oxydase) durch Harnsäure, wie sie von F. J. Philpot gefunden worden war (l. c.), zu vergleichen. Damit schien ein Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Amin-oxydasen gefunden worden zu sein. Aus diesem Grunde wurden die zitierten Versuche wiederholt. Die Ergebnisse bestätigten die früheren Befunde. So verbrauchte das System Rattenleberextrakt + Tyramin 89 mm<sup>3</sup> Sauerstoff, Extrakt + Harnsäure 66 mm<sup>3</sup>, Extrakt + Harnsäure + Tyramin nur 100 mm<sup>3</sup> (Nr. W 286). Bei einem derartigen Resultat ist aber keine Entscheidung möglich, ob Harnsäure den Tyraminabbau oder Tyramin den Harnsäureabbau hemmt, oder ob es gar nicht die Ausgangskörper sind, sondern erst die Abbauprodukte, die einen Einfluss ausüben. Zur Klärung dieser Frage wurde anstelle von Rattenleber Menschenleber verwendet<sup>1)</sup>, da diese bekanntlich keine Urico-oxydase enthält. Als Beispiel ist ein solcher Versuch in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5.

(Nr. W 294)

Oxydation von Tyramin durch Menschenleber in Gegenwart von Harnsäure. Menschenleber unmittelbar nach der Sektion in üblicher Weise zerkleinert, extrahiert und dialysiert (vgl. 5. Mitteilung, l. c.). 2 cm<sup>3</sup> Fermentlösung auf 3 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Tyramin 0,0083-m., Harnsäure 0,008-nr.

Minuten nach Versuchs- beginn	Verbrauchte mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>			
	FL	FL+HS	FL + Tyramin	FL+HS + Tyramin
10	0	0	40	48
20	1	0	97	104
30	2	0	148	155
50	6	4	273	289
215	18	14	406	426

Trotzdem die Harnsäurekonzentration gegenüber den DO-Versuchen erhöht worden war, fand keine merkliche Veränderung durch den Harnsäurezusatz statt. Es ist also nicht die Harnsäure selber, die für den angegebenen Effekt beim Tyraminabbau mit Rattenleber verantwortlich ist, sondern der enzymatische Harnsäureabbau.

#### Diskussion der Ergebnisse.

Die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit ermöglichen eine genauere Vorstellung von der Reaktion zwischen der DO und ihren

<sup>1)</sup> Für die Überlassung des Sektionsmaterials bin ich Herrn Prof. Dr. A. Wertheim, Direktor des pathologisch-anatomischen Institutes der Universität Basel, sehr zu Dank verpflichtet.

Substraten. Die dabei sich abspielenden Vorgänge sind kurz die folgenden:

Nach dem früher entwickelten Modell der DO (7. Mitteilung, I. c.) tritt eine doppelte Bindung zwischen dem Ferment und seinem Substrat ein. Zunehmende Substratkonzentration führt dazu, dass die beiden für die Bindung verantwortlichen Gruppen des Ferments ( $F$  und  $F'$ ) sich mit 2 entsprechenden Gruppen des Substrats ( $S$  und  $S'$ ) verknüpfen, die nicht einer, sondern 2 Substratmolekülen angehören. Eine teilweise Blockierung des Ferments durch einen Hemmungsstoff verstärkt diese Ersecheinung (Summationseffekt). Die Substrate hemmen also in zunehmendem Masse ihren eigenen Abbau. Während diese Eigenhemmung bei Substraten mit 2 einfachen Aminogruppen, wie Putrescin und Cadaverin, verhältnismässig wenig stark ausgebildet ist, ist sie besonders bei denen stark ausgeprägt, die an Stelle der einen Aminogruppe einen Imidazolring oder eine Guanidin gruppe tragen (Histamin und Agmatin).

Das kennzeichnende und unterscheidende Merkmal beider Arten von Substraten ist der Unterschied in der Grösse der Affinitäten der beiden reagierenden Gruppen. Aus der geringen hemmenden Wirkung der primären Amine Amyl- und Methylamin auf den Diaminabbau (8. Mitteilung, I. c.) kann auf eine geringe Affinität der primären Aminogruppe, aus der starken Wirkung von Imidazol und Guanidin und Guanidinderivaten auf eine grosse Affinität der betreffenden Atomgruppierungen geschlossen werden.

Die Bindung zwischen Ferment und Substrat lässt sich in zwei Phasen zerlegen. Beim Cadaverin tritt in der Phase  $a$  die eine Aminogruppe ( $S$ ) mit einer Fermentgruppe ( $F$ ) in Verbindung. In der Phase  $b$  klappt die Molekel herunter, so dass auch die 2. Aminogruppe ( $S'$ ) mit der 2. Haftstelle ( $F'$ ) verknüpft wird. Mit  $S'$  konkurriert aber die Aminogruppe einer 2. Molekel Substrat um die Gruppe  $F'$ , und das umso mehr, je grösser die Cadaverinkonzentration ist. Die beiden konkurrierenden Aminogruppen sind in bezug auf die Affinität zu der zu besetzenden Gruppe ungefähr gleichwertig. Beim Agmatin dagegen wird schon in der Phase  $a$  die eine Gruppe, der Guanidinrest, wegen seiner grösseren Affinität gegenüber der primären Aminogruppe bevorzugt an  $F$  gebunden. In der Phase  $b$  konkurriert die noch hauptsächlich freie Aminogruppe der ersten Molekel nicht nur mit Aminogruppen anderer Molekel um  $F'$ , sondern besonders auch mit den freien Guanidinresten derselben. Die Konkurrenz ist in diesem Fall wegen des Unterschiedes der Affinitäten eine sehr viel grössere als für den Fall des Cadaverins, was zur Folge hat, dass schon bei geringeren Konzentrationen von einer Fermentmolekel 2 Substratmolekel gebunden werden, und die Eigenhemmung stärker zum Ausdruck kommt. Diese Überlegungen gelten im gleichen Mass auch

für den Histaminabbau. Diesem Reaktionsschema liegt die Annahme zugrunde, dass S und S' sowohl mit F wie mit F' reagieren können.

Zur Entscheidung der Frage, ob bei dem Verbrauch des zweiten Atoms Sauerstoff pro Moleköl Substrat die Xanthin-oxydase beteiligt sei, ist der Zusatz von Harnsäure zu den DO-Ansätzen ungeeignet. Einerseits kann Harnsäure als Imidazolderivat in Konkurrenz mit dem Substrat treten, und anderseits kann sie durch das entstehende Peroxyd oxydiert werden, was einen Mehrverbrauch an Sauerstoff bedingt. Ob daneben noch eine Beeinflussung der Xanthin-oxydase mitspielt, ist unter diesen Umständen schwer zu beurteilen.

*P. J. G. Mann und J. H. Quastel*<sup>1)</sup> hatten festgestellt, dass die Hemmung der Gehirnatmung durch Tyramin nicht auf diesen Stoff zurückzuführen ist, sondern auf die enzymatischen Abbauprodukte des Tyramins. In ähnlicher Weise kann die gegenseitige Oxydationshemmung des Tyramin- und Harnsäureabbaues in der Rattenleber gedeutet werden, da aus dem Versuch mit Menschenleber eindeutig hervorgeht, dass jedenfalls Harnsäure selber nicht die von *F. J. Philpot* beschriebene Wirkung auf den Tyraminabbau bewirkt.

### Zusammenfassung.

1. Beim Agmatin tritt bei der üblichen Versuchsanordnung bei kleineren Konzentrationen als bei allen bisher untersuchten Substraten der DO eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit wegen überoptimaler Substratkonzentration auf.

2. Imidazol übt einen sehr starken, die Imidazolderivate Imidazolyl-essigsäure, -milchsäure, Histidin und Harnsäure einen wesentlich schwächeren hemmenden Einfluss auf den enzymatischen Abbau der Diamine aus.

3. Das ringförmige Diamin Piperazin wird von der DO wohl gebunden, aber nicht abgebaut.

4. Harnsäure kann durch das beim enzymatischen Abbau von Diaminen entstehende Peroxyd oxydiert werden.

5. Harnsäure hemmt den enzymatischen Abbau von Monoaminen nur dann, wenn sie gleichzeitig durch die Urico-oxydase angegriffen wird.

Ich danke Fr. *M. Gerber* und Fr. *A. Büthe* für fleissige Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

<sup>1)</sup> Biochem. J. **34**, 414 (1940).