

226. Über eine neue *l*-Aminosäure-oxydase¹⁾

(1. Mitteilung)

von E. A. Zeller und A. Maritz.

(27. X. 44.)

In Schlangengiften lassen sich zahlreiche Fermente nachweisen, die zu einem beträchtlichen Teil die Ursache der Giftigkeit bilden. Bis jetzt wurden nur Enzyme der Gruppe der Hydrolasen, wie Proteasen, Peptidasen, Phosphatidasen, Phosphatasen, Cholinesterase usw.²⁾, bekannt. Eine Ausnahme bildet ein Hämoglobin zu Met-hämoglobin oxydierendes Enzym³⁾. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung aber wird diese Reaktion sehr wahrscheinlich nicht durch ein Ferment sui generis, sondern durch eine sogenannte Sekundäroxydation bewirkt. In unserer Mitteilung wird ein in verschiedenen Schlangengiften vorkommendes, zu den Desmolasen gehörendes Ferment beschrieben, das eine ganze Reihe von (natürlichen) *l*-Aminosäuren, insbesondere Monoamino-monocarbonsäuren, oxydativ desaminiert. Von den bisher bekannten *l*-Aminosäure-oxydasesen zeichnet es sich durch eine aussergewöhnliche Aktivität und durch seine freie Löslichkeit aus und stellt deshalb ein überaus geeignetes Material dar, um die Spezifität und den Reaktionsverlauf des enzymatischen Abbaues natürlicher Aminosäuren zu studieren. Darüber hinaus kann es für den quantitativen Nachweis von kleinen Mengen von *l*-Aminosäuren, *l*-Peptiden, *l*-Peptidasen und von äusserst geringen Katalase-Aktivitäten verwendet werden.

In der vorliegenden Publikation werden hauptsächlich Versuche mit dem Gift der *Vipera aspis* L. beschrieben. In einer späteren Mitteilung werden die Ergebnisse der analogen Untersuchungen an Gift weiterer *Vipera*-Arten (*V. libetina*, *V. latastei*), am Kobra- und am Lanzenschlangengift zur Darstellung gelangen. Soweit es sich um die *l*-Aminosäure-oxydase handelt, ergaben auch diese Gifte genau die gleichen Resultate wie das Aspisgift⁴⁾.

¹⁾ Ausschnitte aus dem hier publizierten Material wurden am 8. 7. 44 an der 25. Tagung des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen (E. A. Zeller, Helv. physiol. acta, 2, C33 (1944)) und am 3. 9. 44 an der 124. Tagung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft (E. A. Zeller und A. Maritz, Verhandl. Schweiz. med.-biologische Gesellschaft, im Druck) vorgetragen.

²⁾ Zusammenfassung: C. H. Kellaway, Animal Poisons, Annual Rev. Biochem. 8, 541 (1939).

³⁾ E. E. Dunn: J. Pharmacol. exp. Therap. 50, 386, 393 (1934).

⁴⁾ Für die Überlassung von Giftpräparaten sprechen wir den Herren Priv.-Doz. Dr. H. Bloch, Prof. Dr. H. Hediger, Direktor des Basler Zoologischen Gartens, P. Seiler und C. Stemmler-Morath unsfern besten Dank aus. Ohne die grossen Mengen von Aspis-gift, die uns von Herrn Seiler zur Verfügung gestellt wurden, wäre die weitgehende Analyse der neuen Fermentreaktion nicht möglich gewesen.

1. Experimentelle Ermittlung der Reaktionsgleichungen.

I. Sauerstoffverbrauch.

In der Gegenwart von Aspisgift nehmen unter geeigneten Reaktionsbedingungen mehrere *l*-Aminosäuren rasch Sauerstoff auf, bis annähernd 1 Mol Sauerstoff pro Moleköl Substrat erreicht wird. Die Substrate, wie *l*-Tyrosin, Derivate des *l*-Tyrosins und Tryptophan, bewirken einen Sauerstoffverbrauch, der etwas über diesen Wert hinausgeht (Tabelle 1 und 9), während dieses mit Substraten mit kleiner Oxydationsgeschwindigkeit wie *l*-Valin nicht erreicht wird, offenbar deshalb, weil das Enzym während der langen Versuchsdauer teilweise inaktiviert wird.

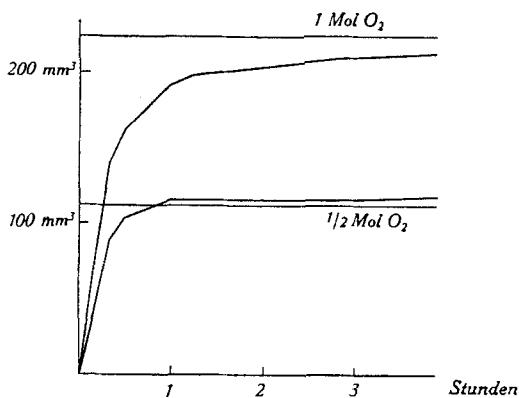


Fig. 1.

Oxydation von Phenylalanin bei Gegenwart und Abwesenheit von hämolysierten Erythrocyten.

Frisches Aspisgift 1 mg, Phenylalanin 10^{-5} Mol, gewaschene Erythrocyten 10^{-3} cm 3 , Gesamtvolumen 2,5 cm 3 .

Wenn den Ansätzen gewaschene Erythrocyten oder andere Katalasequellen zugesetzt werden, so hört der Sauerstoffverbrauch schon bei einem Atom Sauerstoff pro Mol Substrat auf (Fig. 1). Ist dieser Wert erreicht, so verläuft die Kurve horizontal, während in den Gefässen ohne diesen Zusatz die Oxydation langsam dem Endwert zustrebt.

Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme ist aussergewöhnlich gross. Unter günstigen Bedingungen kann 1 mg getrocknetes Aspisgift in einer Stunde eine Sauerstoffaufnahme bis über 2100 mm 3 bewirken (Tabelle 10), was dem mehr als zehn- bis tausendfachen Wert für die bisher bekannten *l*-Aminosäure-oxydasen entspricht.

II. Ammoniakbildung.

Die Oxydation der Aminosäure mit Hilfe des Aspisgiftes ist ausnahmslos mit einer Ammoniakbildung verknüpft. Wenn unter den üblichen Versuchsbedingungen ein Mol Sauerstoff pro Mol Substrat verbraucht worden ist, dann liegt der gesamte Amino-Stickstoff als Ammoniak vor. In vielen Fällen ist die oxydative Desaminierung

schon vollständig, bevor ein Mol Sauerstoff erreicht worden ist (Tabelle 1). Wenn die Oxydation in Gegenwart von Erythrocyten durchgeführt wird, die im allgemeinen ein Weiterschreiten des Sauerstoffverbrauches über 0,5 Mol verhindern, so wird trotzdem eine völlige Ablösung der Aminogruppe erreicht. Es ist somit 1 Atom Sauerstoff notwendig, um 1 Mol Ammoniak in Freiheit zu setzen, wie dies auch für andere oxydative Desaminierungen gilt, beispielsweise für den früher von dem einen von uns untersuchten enzymatischen Abbau von Di- und Poly-aminen¹⁾. Dieses Verhältnis von 1 Atom Sauerstoff zu 1 Mol Ammoniak kann wohl grösser als 1 werden, wenn die Oxydation weitergeht, während eine Unterschreitung dieses Wertes in sehr zahlreichen Versuchen nie beobachtet werden konnte.

Tabelle 1.

Sauerstoffverbrauch und Ammoniakbildung in Gegenwart und Abwesenheit von Erythrocyten.

Der Sauerstoffverbrauch ist in Atomen, die Ammoniakbildung in Molen angegeben.
Substratmenge: 10^{-5} Mol., Erythrocyten $0,1 \text{ cm}^3$.

Substrat	Gift	O ₂ -Verbrauch		NH ₃ -Bildung		Atome O Mol NH ₃	
		ohne Eryth.	mit Eryth.	ohne Eryth.	mit Eryth.	ohne Eryth.	mit Eryth.
<i>l</i> -Phenylalanin	V. aspis	$1,45 \times 10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-5}$	$0,99 \times 10^{-5}$	1,42	1,03
<i>l</i> -Leucin	V. aspis	2,00	1,03	0,95	1,06	2,11	0,97
<i>l</i> -Tyrosin	V. libet.	2,35	1,43	1,07	1,02	2,01	1,40

III. Bildung von Carbonylverbindungen.

Wie die oxydative Desaminierung der *d*-Aminosäuren scheint auch der Abbau der *l*-Aminosäuren durch Aspisgift zu α -Ketonsäuren zu führen. Wenn den Versuchsansätzen Dinitrophenylhydrazin zugesetzt wird, bildet sich ein starker gelbroter Niederschlag. In Lösungen von Aminosäuren, die längere Zeit der Wirkung des Giftes ausgesetzt waren, lässt sich ein solcher Niederschlag nicht mehr erzeugen, wohl aber, wenn die Reaktion in Gegenwart von Erythrocyten sich vollzog.

Das Abbauprodukt von *l*-Phenylalanin lässt sich aus saurer Lösung mit Äther extrahieren und dem Äther mit Sodalösung wieder entziehen. Nachdem es wieder in Äther übergeführt und der Äther abgedampft worden ist, gibt es den erwähnten Niederschlag mit Dinitrophenylhydrazin. Auf Zusatz von Lauge löst sich der Niederschlag unter Bildung einer braunroten Farbe auf, deren Intensität im Stufenphotometer leicht gemessen werden kann²⁾. Als Vergleichssubstanz diente synthetische Phenylbrenztraubensäure.

¹⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938).

²⁾ Diese Methode, die eine Modifikation derjenigen von L. Penrose und J. H. Quastel, Biochem. J. **31**, 266 (1937), darstellt, wurde für die Bestimmung von Phenylbrenztraubensäure im Harn von Patienten mit Oligophrenia phenylpyruvica ausgearbeitet und wird an anderer Stelle genauer beschrieben.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das Abbauprodukt von 182 mg *l*-Phenylalanin 126 mg Phenylbrenztraubensäure entsprach (70% Ausbeute).

Tabelle 2.

Sauerstoffverbrauch und Bildung von Carbonylverbindungen.

Frisches Aspisgift 1 mg, Phenylalanin 10^{-5} Mol. Gesamtvolume 2,5 cm³. Menge der gewaschenen Erythrocyten in Volumina der ursprünglichen Blutmenge angegeben.

Erythrocyten	Verbrauch Sauerstoffatome	Niederschlagsbildung mit Dinitrophenylhydrazin
0 cm ³	$1,79 \times 10^{-5}$	—
0,1 cm ³	0,95	++
0,01 cm ³	0,90	+
0,001 cm ³	0,95	—

Die präparative Isolierung der Reaktionsprodukte verschiedener Aminosäuren ist im Gange. Als vorläufige Mitteilung sei hier angeführt, dass sich nach dem Abbau von Phenylalanin in der eben erwähnten Weise ein Hydrazon gewinnen lässt, das nach Schmelzpunkt 159—160,5°, Mischschmelzpunkt 163—164° mit einem synthetischen Präparat 169° und nach seinem Löslichkeits- und Sublimationsverhalten sich als identisch mit dem Hydrazon der Phenylbrenztraubensäure erwies¹⁾.

IV. Bildung von Kohlendioxyd.

In gewöhnlichen Ansätzen, in denen 1 Mol Sauerstoff pro Mol Substrat verbraucht werden ist, lassen sich beträchtliche Mengen von Kohlendioxyd nachweisen. Das geschieht mit Hilfe von je 2 Manometergefäßern, die in genau gleicher Weise mit Fermentlösung und Substrat beschickt werden, von denen aber das eine nicht wie sonst üblich Lauge zur Absorption von Kohlendioxyd enthält. Die Druckunterschiede der parallelen Ansätze entsprechen bei Berücksichtigung der Absorptions-Koeffizienten von Kohlendioxyd und Sauerstoff der Menge des gebildeten Kohlendioxyds (Fig. 2). Auf diese Weise liessen sich beim Leucin nach 2 Stunden 44%, beim Phenylalanin nach 16 Stunden 77% des Kohlendioxyds erfassen, das durch die vollständige Decarboxylierung der Aminosäure entstehen müsste. Wenn den Enzymlösungen gewaschene Erythrocyten zugesetzt werden, so ist die Drückabnahme in den Gefäßen mit und ohne Lauge innerhalb der Fehlerbreiten der Methode vollkommen identisch. Es bildet sich in diesem Fall somit kein Kohlendioxyd.

V. Bildung von Wasserstoffperoxyd.

Bei der oxydativen Desaminierung von *d*-Aminosäuren²⁾, von Mono-aminen³⁾ und von Di- und Poly-aminen⁴⁾ bildet sich Peroxyd, das mit seiner Wirkung auf leicht oxydierbare Substrate, wie Äthanol, erkannt werden kann (sogenannte Sekundäroxydation). Dasselbe

¹⁾ E. A. Zeller, Helv. **26**, 1614 (1943). (Schmelzpunkt des Phenylhydrazons nach Erlenmeyer (A. **271**, 137 (1892)) 160—161°).

²⁾ D. Keilin und E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. **119**, 114 (1936).

³⁾ M. L. C. Hare, Biochem. J. **22**, 968 (1928).

⁴⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938).

gilt für die *l*-Aminosäure-oxydase des Schlangengifts. Nur ist hier der Zusatz eines besondern Sauerstofffakzitors nicht nötig, weil ein Reaktionsprodukt, die α -Ketonsäure, an dessen Stelle tritt. Es liegen die gleichen Verhältnisse wie bei der gereinigten, katalasefreien *d*-Aminosäure-oxydase vor, die *d*-Alanin in Essigsäure, Kohlendioxyd und Ammoniak umwandelt, während ungereinigte *d*-Aminosäure nur Brenztraubensäure entstehen lässt¹⁾. Da auch das Schlangengift vollständig frei von Katalase ist, kommt es unter Bildung von Kohlendioxyd und unter Verbrauch eines weiteren Atoms Sauerstoff zu einer Oxydation des Reaktionsproduktes. Dadurch wird verständlich, dass in Gegenwart von Katalase (Erythrocyten) der Sauerstoffverbrauch im allgemeinen auf die Hälfte herabgesetzt und die Kohlendioxyd-Bildung verhindert wird, während die Ammoniakentwicklung keine Beeinflussung erfährt, wie in den vorangehenden Abschnitten schon gezeigt wurde. Ein Zusatz von Katalase bewirkt somit eine tiefgreifende Änderung der durch das Schlangengift katalysierten Abbaureaktion der *l*-Aminosäuren. Es ist auf diese Weise die Katalase erkennbar, die in den Erythrocyten von 10^{-6} cm^3 Menschenblut enthalten ist (Tabelle 3). Mit den üblichen Methoden der Katalasebestimmung können Mengen, die in 10^{-3} cm^3 Blut enthalten sind, erfasst werden.

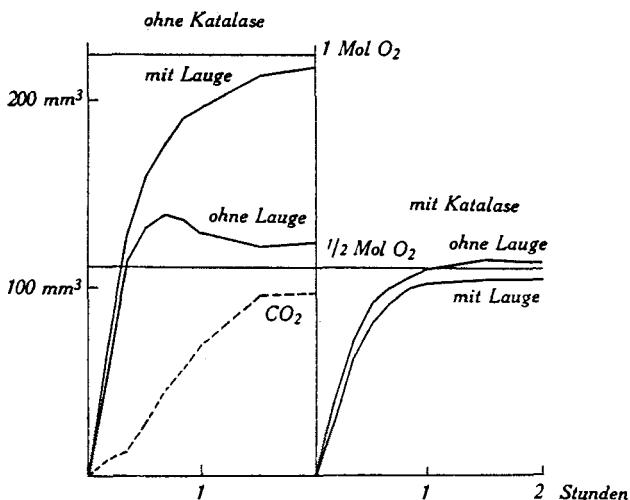


Fig. 2.

Kohlendioxydbildung bei Gegenwart und Abwesenheit von Erythrocyten. Trockenes Aspisgift 1 mg, Leucin 10^{-5} Mol, gewaschene Erythrocyten $0,1 \text{ cm}^3$. Ausgezogene Kurve: Sauerstoffverbrauch in mm^3 , gestrichelte Kurve: Kohlendioxydbildung in mm^3 .

¹⁾ E. Negelein und H. Brömel, Bioch. Z. 300, 225 (1939).

Tabelle 3.

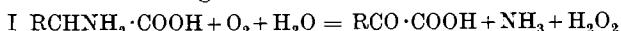
Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs durch Erythrocyten.
Frisches Aspisgift 1 mg, Phenylalanin 10^{-5} Mol, Versuchsdauer 2 Stunden.

Erythrocyten	mm ³ O ₂	Sauerstoffatome
0	215	$1,92 \times 10^{-5}$
0,1	114	1,02
0,01	111	0,99
0,001	115	1,03
0,0001	159	1,42
0,00001	178	1,59
0,000001	203	1,81

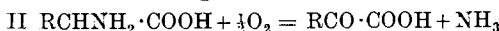
Das Peroxyd lässt sich qualitativ auch direkt mit Phenolphthalin¹⁾ und mit Kaliumjodid und Stärke nach Säurezusatz nachweisen. Hämoglobin wird nach längerer Inkubationszeit braun, was wohl auf die Methämoglobinbildung zurückzuführen ist²⁾). Diese Beobachtung bietet möglicherweise eine Erklärung für die in der Einleitung erwähnte Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin durch Schlangengift. So findet sich im Gift der indischen Kobra, das Hämoglobin oxydiert, eine Protease und eine Peptidase³⁾ und, wie wir nachweisen konnten, die eben von uns beschriebene *l*-Aminosäure-oxydase (Tabelle 10). Es ist deshalb immer mit einer teilweisen Umwandlung des in den Versuchslösungen vorhandenen Eiweisses in Aminosäuren und mit der Oxydation derselben durch die Oxydase zu rechnen, wobei Peroxyd entstehen muss, das sekundär Methämoglobin bildet. Damit in Einklang steht die Feststellung, dass die Hämoglobin-Oxydation erst nach einigen Stunden Inkubationszeit eintritt⁵⁾. Es sind somit alle Voraussetzungen für die Deutung der Methämoglobin-Entstehung als einer Sekundär-oxydation und damit nicht als einer besonderen Fermentreaktion vorhanden. In ähnlicher Weise wurde vor kurzem die für Aspergillus postulierte und auch, wie wir eben anführten, im Schlangengift nachweisbare „Jodid-oxydase“ auf eine Sekundär-oxydation zurückgeführt⁶⁾. In diesem Falle ist es die Oxydation von Glucose zu Gluconsäure, die zur Peroxyd-Bildung und zur Oxydation des Jodids führt.

VI. Reaktionsgleichungen.

Die hier mitgeteilten Daten lassen sich wohl am einfachsten in den folgenden Gleichungen zusammenfassen:



Diese Gleichung I ist bei der Beeinflussung der Reaktion durch Katalase durch die folgende zu ersetzen:



Wenn aber das Peroxyd durch Katalase nicht zerstört wird, wirkt es teilweise im Sinne von Gleichung Ia, wobei ausdrücklich betont sei, dass noch andere Oxydationswirkungen des Peroxyds

¹⁾ O. Schales, B. 71, 477 (1938).

²⁾ F. Bernheim, M. L. C. Bernheim und A. G. Gillaspie, J. Biol. Chem. 114, 657 (1936).

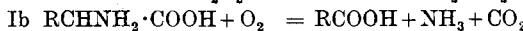
³⁾ E. A. Zeller, Helv. 21, 880 (1938).

⁴⁾ B. N. Ghosh und S. S. De, J. Soc. Chem. Ind. 13, 627 (1936).

⁵⁾ E. E. Dunn, l. c.

⁶⁾ A. A. Pearce, Biochem. J. 34, 1493 (1940).

wahrscheinlich sind. Bei der Kombination von Gleichung I und Ia kommen wir zur Gleichung Ib, die ebenfalls nur eine beschränkte Geltung besitzt:



2. Charakterisierung der *l*-Aminosäure-oxydation als Fermentreaktion.

Das im Aspis- und in anderen Schlangengiften vorhandene Agens, das die Oxydation der Aminosäuren katalysiert, ist sehr hitzeempfindlich, da es schon durch kurzfristige Erhitzung (Aufkochen) auf 100° inaktiviert wird. Langdauernde Dialyse setzt die Wirksamkeit des Giftes nur wenig herab (Tabelle 4).

Tabelle 4.

Dialyseversuch mit Aspisgift.

Frisches Aspisgift 1 mg, Dialyse gegen Phosphatpuffer, Leucin 10^{-5} Mol, Gesamtvolumen $2,5 \text{ cm}^3$.

Alter der Giftlösung Std.	Behandlung der Giftlösung	Q_{O_2}
24	nicht dialysiert	630
48	nicht dialysiert	630
	dialysiert	580
72	nicht dialysiert	610
	dialysiert	550

Der Abbau der *l*-Aminosäure ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Das Optimum ist ziemlich flach und liegt etwas oberhalb des Neutralpunktes. Unterhalb p_H 6 und oberhalb p_H 8 erfolgt ein rascher Abfall der Aktivität (Tabelle 5).

Tabelle 5.

p_H -Abhängigkeit der Leucin-Oxydation.

Frisches Aspisgift 1 mg, Leucin 10^{-5} Mol, Gesamtvolumen $2,5 \text{ cm}^3$. Einstellung des p_H durch m/15 Phosphatpuffer.

p_H	Q_{O_2}	p_H	Q_{O_2}
4,5	0	7,2	540
5,3	60	7,6	486
6,2	288	8,3	36
6,8	462		

Obwohl eine Fermentreaktion nie eine Reaktion erster Ordnung sein kann, entspricht die Kurve ihres Reaktionsverlaufes häufig der einer solchen¹⁾²⁾. Das gilt auch für die *l*-Aminosäure-oxydase des

¹⁾ D. van Slyke, Advances in Enzymology, The Kinetics of Hydrolytic Enzymes and Their Bearing on Methods for Measuring Enzyme Activity, 2, 33 (1943).

²⁾ E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin, Helv. 22, 837 (1939).

Schlangengifts, sofern die Reaktion in Gegenwart von Katalase sich abspielt (Gleichung II). In diesem Falle bestünde somit die Möglichkeit, den Abbau durch die Konstante der monomolekularen Reaktion zu charakterisieren.

Tabelle 6.

Verlauf der durch Aspisgift katalysierten Leucinoxydation.
Frisches Aspisgift 1 mg, Leucin 10^{-5} Mol, 0,1 cm³ Erythrocyten, Gesamtvolume 2,5 cm³.

Zeit	mm ³ O ₂	$c = \frac{1}{t} \cdot \lg \frac{a}{a-x}$
10	35	0,0162
20	68	0,0203
30	85	0,0206
40	97	0,0219
50	102	0,0210
60	107	0,0225
90	111	0,0228

Die Abbaugeschwindigkeit der *l*-Aminosäure ist von der Substratkonzentration abhängig und steigt mit zunehmender Konzentration an, bis sie nach Überschreiten einer optimalen Konzentration deutlich wieder abfällt (Fig. 3). Diese Erscheinung einer optimalen Substratkonzentration wurde bisher mit *l*-Leucin, *l*-Phenylalanin, *l*-Tryptophan und *l*-Histidin festgestellt.

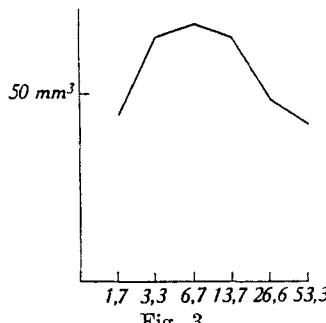


Fig. 3.

Substratkonzentration und Oxydationsgeschwindigkeit.

Frisches Aspisgift 0,5 mg, Gesamtvolume 3 cm³, Abszisse: Leucinkonzentration in milli-Mol, Ordinate: mm³, Sauerstoffverbrauch nach 20 Minuten.

Das Auftreten eines Substratoptimums lässt auf eine doppelte Bindung zwischen Ferment und Substrat, wie beispielsweise bei der Diamin-oxydase¹⁾ und bei der *l*-Cholinesterase²⁾, schliessen. Das Modell für die Enzym-Substratbindung der *l*-Aminosäureoxydase ist somit das gleiche wie für die beiden erwähnten Fermente, das in den angegebenen Publikationen zur Darstellung gelangte und deshalb hier nicht noch einmal angeführt wird.

¹⁾ E. A. Zeller, Helv. **23**, 1418 (1940).

²⁾ E. A. Zeller und A. Bissegger, Helv. **26**, 1619 (1943).

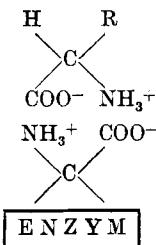
3. Inhibitoren des *l*-Aminosäuren-Abbaues.

Zur weiteren Charakterisierung des enzymatischen Abbaues der *l*-Aminosäuren durch Schlangengifte wurde dieser mit mehreren der üblichen Fermentinhibitoren geprüft. Von den negativen Ergebnissen seien nur die mit Kaliumcyanid und Semicarbazid angeführt. Das erstere bewirkte auch bei einer 0,01-m. Konzentration keine Hemmung der Oxydation und Desaminierung von Leucin. Es wurde bei diesen Versuchen nicht die gewöhnliche Lauge zur Absorption von Kohlendioxyd in den Manometergefassen verwendet, sondern die Krebs'schen Cyanid-Lauge-Mischungen, die den gleichen Blausäure-Dampfdruck wie die Versuchslösung aufweisen^{1,2)}. Auch 0,033-m. Semicarbazid beeinflusste die Oxydation nicht (Leucin) oder nur in sehr geringem Ausmaße (Phenylalanin). Durch den negativen Ausfall dieser beiden Hemmungsreaktionen unterscheidet sich das neue Ferment sehr wesentlich von der Diamin-oxydase, der es sonst in vieler Hinsicht sehr ähnlich ist³⁾.

Die Affinität der *d*-Aminosäuren zu dem Ferment ist so klein, dass keine Hemmung des Abbaues der *l*-Aminosäure durch Zusatz von *d*-Aminosäuren eintritt. Es kann somit hier nicht wie beim Histidinabbau von einer „antipodischen“ Hemmung⁴⁾ gesprochen werden.

Hemmung durch aromatische Sulfosäuren.

Aus den Versuchen über das Substratoptimum wurde geschlossen, dass zwischen Ferment und Substrat eine doppelte Bindung eingegangen wird. Die nächstliegende Annahme ist die einer salzartigen Verbindung der beiden geladenen Gruppen des Substrates mit einer α -Aminosäure-Gruppierung des Enzyms.



Wenn diese Anschauung richtig ist, dann müsste die NH_3^+ -Gruppe des Enzyms durch aromatische Sulfosäuren, die mit der Aminogruppe von Aminosäuren schwerlösliche Salze geben⁵⁾, blockiert und das Substrat müsste vom Ferment verdrängt werden. Das ist tatsächlich der Fall. Mit einer grösseren Zahl von solchen Sulfosäuren wurden ausnahmslos Hemmungen sehr verschiedenen Grades erzielt. So verminderte 4-Nitrodiphenylamin-sulfosäure den Leucinabbau noch in einer Konzentration von 7×10^{-5} -m. zu 21 %. Eine kleine Auswahl der untersuchten Sulfosäuren ist in der Tabelle 7 vereinigt.

¹⁾ H. A. Krebs, Biochem. J. **29**, 1620 (1935).

²⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938).

³⁾ E. A. Zeller, Diamin-Oxidase, Advances in Enzymology **2**, 93 (1942).

⁴⁾ S. Edlbacher und H. Baur, Z. physiol. Ch. **270**, 176 (1941).

⁵⁾ D. G. Doherty, W. H. Stein und M. Bergmann, J. Biol. Chem. **135**, 487 (1940).

Tabelle 7.

Hemmung der Leucin-oxydation durch aromatische Sulfosäuren.
Aspisgift 0,25 mg, Gesamtvolumen 3,5 cm³, Leucin 10⁻⁵ Mol, Versuchsdauer 15 Minuten.
Sulfosäuren als Natriumsalze zugesetzt.

Sulfosäure	Q_{O_2}	Hemmung
keine Sulfosäure	928	—
2,5-Dibrombenzol-sulfosäure . .	320	66%
29 × 10 ⁻³ -m.	80	91%
Azobenzol-sulfosäure	224	76%
29 × 10 ⁻³ -m.	48	95%
p-Oxyazobenzol-sulfosäure . .	176	81%
29 × 10 ⁻³ -m.	32	97%
2,5-Dichlorbenzol-sulfosäure . .	416	55%
29 × 10 ⁻³ -m.	64	93%
α-Chlortoluol-4-sulfosäure . .	464	50%
29 × 10 ⁻³ -m.	112	88%

Wenn diese Sulfosäuren tatsächlich so wirken, dass sie mit den Aminosäuren in Konkurrenz um das Enzym treten, dann müsste durch Steigerung der Substratkonzentration die Hemmung abnehmen, was vom Experiment bestätigt wird (Tabelle 8).

Tabelle 8.

Abhängigkeit der Sulfosäurehemmung von der Substratkonzentration.
Getrocknetes Aspisgift 0,25 mg, Leucin 10⁻⁵ Mol, Gesamtvolumen 3,0 cm³, Konzentration der 4-Nitrotoluol-2-sulfosäure 0,33 × 10⁻³-m, Versuchsdauer 20 Minuten.

Konzentration des Leucins	Q_{O_2} ohne Inhibitor	Q_{O_2} mit Inhibitor	Hemmung
m/600	504	348	31%
m/300	708	575	19%
m/150	803	768	5%
m/75	740	700	5%
m/30	600	600	0%

Damit ist eine neue Gruppe von Fermentinhibitoren gefunden worden, deren Wirkung auf andere Aminosäure-oxydasen gegenwärtig von uns untersucht wird.

4. Spezifität des Schlangengiftferments.

Mit Hilfe des Giftes der V. aspis und der andern in der Einleitung genannten Giftarten konnten die in der Tabelle 9 zusammengestellten Aminosäuren oxydativ desaminiert werden. Von diesen wurden *l*-Dibrom-, *l*-Dijod- und *l*-Nitrotyrosin zum erstenmal enzymatisch angegriffen, *l*-Cystein, *l*-Cystin, *l*-Methionin und *l*-Arginin und *l*-Dioxyphenylalanin erstmals oxydativ desaminiert.

Tabelle 9.

Enzymatischer Abbau von *l*-Aminosäuren durch Aspisgift.
Trockenes Gift 0,25 mg, Gesamtvolumen 2,5—3 cm³. Neben Q_{O_2} ist der gesamte Sauerstoffverbrauch (nach 3 und mehr Stunden) und die am Schluss der Versuche gebildete Ammoniakmenge angegeben, die letztere in Prozenten des Gesamt-Amino-Stickstoffs. Die Zahlen stammen nicht aus einer einzigen Versuchsserie, so dass die Zahlenwerte nur angenähert das gegenseitige Verhältnis der Oxydationsgeschwindigkeit wiedergeben.

Substrat	Konzentration	Q_{O_2}	Gesamt-verbrauch an Sauerstoff-atomen	NH ₃ -Bildung in % des NH ₂ -N
<i>l</i> -Alanin	10×10^{-5} Mol	30	$0,94 \times 10^{-5}$	7%
<i>l</i> -Valin	1×10^{-5}	71	0,79	40%
<i>l</i> -Isoleucin	10^{-5}	162	1,58	76%
<i>l</i> -Leucin	10^{-5}	612	1,76	94%
<i>l</i> -Cystein	10^{-5}	68	1,19	54%
<i>l</i> -Cystein ohne Gift . . .	10^{-5}	46	0,42	14%
<i>l</i> -Cystin	10^{-5}	42	1,02	64%
<i>l</i> -Methionin	10^{-5}	390	1,88	85%
<i>l</i> -Arginin	10^{-5}	26	0,82	52%
<i>l</i> -Phenylalanin	10^{-5}	780	1,92	100%
<i>l</i> -Tyrosin	10^{-5}	402	1,51	79%
<i>l</i> -Nitrotyrosin	2×10^{-5}	129	2,71	47%
<i>l</i> -Dijodtyrosin	1×10^{-5}	135	1,84	60%
<i>l</i> -Dibromtyrosin	10^{-5}	216	2,46	85%
<i>l</i> -Dioxyphenylalanin . . .	10^{-5}	294	2,02	84%
<i>l</i> -Dioxyphen. ohne Gift. . .	10^{-5}	0	1,87	18%
<i>l</i> -Histidin	4×10^{-5}	78	0,71	19%
<i>l</i> -Tryptophan	1×10^{-5}	540	1,97	94%

Bisher konnte eine Oxydation oder Desaminierung folgender Aminosäuren und Derivate nicht gefunden werden: *l*-Ornithin, *l*-Lysin, *l*-Prolin, *l*-Oxyprolin, *l*-Glutamin-säure, *l*-Asparaginsäure, *l*-Asparagin, *d*, *l*-Serin, *d*, *l*-Thyroxin, Glykokoll, Sarkosin, Hippursäure, β -Alanin, Kynurensäure, Glycyl-*l*-leucin, Glycyl-*l*-tyrosin, *l*-Leucyl-glycin und Glycyl-glycin.

Bei solchen Untersuchungen über die Spezifität scheint es sehr wichtig zu sein, bei negativem Ausfall einer Reaktion diese mit verschiedenen Substratkonzentrationen zu wiederholen. So konnte zuerst bei *l*-Alanin in den üblichen Versuchsansätzen kein Abbau festgestellt werden. Als aber die Konzentration gesteigert wurde, trat eine deutliche Oxydation und Desaminierung ein. Die Abbaugeschwindigkeit nimmt in der Reihe der aliphatischen Aminosäuren mit kürzer werdenden Kettenlängen sehr stark ab (vgl. Tabelle 9). Wir untersuchten deshalb die wichtigsten, durch Schlangengift nicht oxydierbaren Aminosäuren; Glykokoll, *l*-Ornithin, *l*-Lysin, *l*-Asparagin über einen grösseren Konzentrationsbereich von $0,8 \times 10^{-3}$ m. bis 33×10^{-3} , *l*-Oxyprolin über den Bereich von $0,7 \times 10^{-3}$ m. bis $5,3 \times 10^{-3}$ m., ohne eine Reaktion erzwingen zu können. Beim *l*-Prolin wurde das pH zwischen 6,6 und 7,8 variiert. Die Versuche mit *l*-Alanin wurden mit einem aus Wasser umkristallisierten Produkt durchgeführt.

Eine Sonderstellung nehmen *l*-Histidin und *l*-Arginin ein, die beiden einzigen oxydierbaren Aminosäuren, die keine Monoamino-monocarbonsäuren sind. Die Oxydation tritt nur sehr langsam nach einer Inkubationsperiode auf. *l*-Histidin wurde zur Reinigung mit 2,5-Dichlorbenzol-sulfosäure gefällt und mit Pyridin wieder zerlegt¹⁾. Eine Änderung

¹⁾ D. G. Doherty c. s., I. c.

des Verhaltens gegenüber dem Schlangengift war nicht feststellbar. Diese beiden Substrate besitzen trotz ihrer geringen Oxydationsgeschwindigkeit eine messbare Affinität zur Aminosäure-oxydase, die dann zutage tritt, wenn die Aminosäuren einem Ansatz, der Leucin oxydativ desaminiert, zugesetzt werden. *l*-Arginin verminderte die Geschwindigkeit der Leucinoxydation um 18%, *l*-Histidin um 33%. Da *d*-Histidin über den Konzentrationsbereich von $0,8 \times 10^{-3}$.m. bis 33×10^{-3} nicht die geringste Oxydier- und Desaminierbarkeit aufwies, kann der Abbau von *l*-Histidin nicht auf einer unspezifischen Reaktion beruhen.

Die Spezifität lässt sich zusammenfassend durch den Ausschluss der Monoamino-dicarbonsäuren, der reinen Diamino-monocarbonsäuren, der Aminosäuren mit substituierter NH₂-Gruppe und der Aminosäuren mit nicht α -ständiger Aminogruppe festlegen. Es werden die *l*-Formen sämtlicher untersuchten optisch aktiven Monoamino-monocarbonsäuren und die beiden zweibasischen Aminosäuren *l*-Histidin und *l*-Arginin angegriffen.

Optische Spezifität.

Eine oxydative Desaminierung von *d*-Leucin, *d*-Histidin (vgl. voranstehender Abschnitt), *d*-Phenylalanin und *d*-Valin konnte nie nachgewiesen werden, auch wenn die Substratkonzentration sehr hoch gewählt wurde. Die Affinität dieser *d*-Formen zum Ferment ist so gering, dass sie sich nicht nachweisen liess, sogar als die zehnfache Menge zu der entsprechenden *l*-Form zugesetzt wurde. Die Abbaugeschwindigkeit konnte selbst durch diesen Überschuss an *d*-Form nicht beeinflusst werden.

Bei einem Handelspräparat von *d*-Leucin wurde zunächst ein Abbau gefunden. Durch eine ähnliche Umfällung, wie sie beim Histidin beschrieben wurde, erhielten wir ein Produkt, das vom Schlangengift nicht mehr angegriffen wurde. Nach der Grösse des Ausschlages waren 2% einer *l*-Form in der ursprünglichen Aminosäure enthalten. Der Nachweis einer so kleinen Menge an *l*-Aminosäure in der *d*-Aminosäure ist nur möglich, weil die letztere, wie erwähnt, eine äusserst geringe Affinität zum Ferment aufweist. Diese Eigenschaft der *l*-Aminosäure-oxydase des Schlangengifts macht diese möglicherweise zu einem geeigneten Agens, die optische Reinheit von Aminosäuren, die aus Naturprodukten isoliert wurden, zu prüfen.

5. Einheitlichkeit der *l*-Aminosäure-oxydase.

In Anbetracht der grossen Zahl der Substrate der *l*-Aminosäure-oxydase des Schlangengifts musste die Frage der Einheitlichkeit dieses Fermentes gründlich geprüft werden, auch wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, in Hunderten von Ansätzen, in denen das Substrat immer wieder variiert wurde, kein einziges Resultat erhalten werden konnte, das für die Vielheit des Enzyms spräche. Es wurde daher eine grössere Zahl von Konkurrenzversuchen angestellt, in

denen zwei Substrate für sich allein und, in einem parallel laufenden Ansatz, miteinander dem Substrat beigesetzt wurden. In allen Fällen trat eine deutliche Konkurrenz zutage (Tabelle 10).

Tabelle 10.

Konkurrenzversuche mit verschiedenen Substraten.

Alle Versuche wurden mit Aspisgift durchgeführt, mit Ausnahme von **, das mit Kobragift zur Reaktion kam.

Ver-suchs-dauer	Substrat 1	Substrat 2	$Q_{O_2}^1$	$Q_{O_2}^2$	$Q_{O_2}^{1,2}$
10'	<i>l</i> -Leucin 10^{-5} Mol	<i>l</i> -Phenylalanin 10^{-5} Mol	420	342	162
10'	<i>l</i> -Tryptophan 10^{-5} Mol	<i>l</i> -Phenylalanin 10^{-5} Mol	504	348	324
60'	<i>l</i> -Leucin* 4×10^{-5} Mol	<i>l</i> -Tyrosin 10^{-5} Mol	140	144	126
10'	<i>l</i> -Leucin 10^{-5} Mol	<i>l</i> -Tryptophan $2,5 \times 10^{-5}$ Mol	1776	1728	1728
60'	<i>l</i> -Leucin 10^{-5} Mol	<i>l</i> -Cystein 10^{-5} Mol	376	36	312
20'	<i>l</i> -Isoleucin 10^{-5} Mol	<i>l</i> -Methionin 10^{-5} Mol	96	324	330
20'	<i>l</i> -Isoleucin 10^{-5} Mol	<i>l</i> -Tyrosin	96	288	330
20'	<i>l</i> -Methionin 10^{-5} Mol	<i>l</i> -Tyrosin	324	288	342
10'	<i>l</i> -Tryptophan** 2×10^{-5} Mol	<i>l</i> -Tyrosin $0,25 \times 10^{-5}$ Mol	2110	960	1320

* Dieser Versuch verlief in Gegenwart von Erythrocyten.

Konkurrenzversuche werden allgemein als zuverlässiges Hilfsmittel betrachtet, um die Frage der Einheitlichkeit oder Verschiedenheit einer Fermentreaktion zu klären. Doch besitzen sie keine absolute Beweiskraft, weil Konkurrenzerscheinungen zwischen zwei Systemen denkbar sind, die ja aus mehreren miteinander verkoppelten Fermenten zusammengesetzt sind, von denen eines oder mehrere Teilfermente beiden Fermentketten gemeinsam sind. Gerade beim Abbau der *l*-Aminosäuren im tierischen Organismus kommen solche Koppelungen häufig vor¹⁾.

Um diese noch bestehende Unsicherheit zu beseitigen, zogen wir die oben angeführte Eigenschaft der Fermentreaktion heran, durch überoptimale Substratkonzentration gehemmt zu werden. Es wurden zwei Substrate, von denen jedes für sich allein in den Vergleichsansätzen schon in der optimalen oder etwas überoptimalen Konzentration vorlag, gemeinsam der Giftlösung zugesetzt, wodurch also im ganzen die optimale Konzentration wesentlich überschritten würde, sofern es sich um ein und dasselbe Ferment handelte. Tatsächlich war die resultierende Reaktionsgeschwindigkeit kleiner als in jedem der beiden Ansätze, die nur ein einziges Substrat enthielten. (Tabelle 10, erste drei Versuche.) Nach dem Stande der heutigen Kenntnisse lassen sich diese Versuche wohl nur durch den Abbau der verschiedenen *l*-Aminosäuren durch ein und dasselbe Ferment erklären.

¹⁾ S. Edlbacher und H. Grauer, Helv. 27, 928 (1944).

Da es sich bei der in dieser Arbeit beschriebenen *l*-Aminosäureoxydase um ein wohl charakterisiertes Ferment handelt, das in fünf verschiedenen Schlangengiften mit Sicherheit nachgewiesen wurde, wird für diese, aus Gründen der Vereinfachung, die vorläufige Bezeichnung *Ophio-l-amino-säure-oxydase* vorgeschlagen.

Experimentelles.

Die meisten der hier verwendeten Methoden wurden schon in früheren Arbeiten über die Diamin-oxydase¹⁾ und über eine chemische Schwangerschaftsbestimmung²⁾ beschrieben, so dass hier einige kurze Hinweise genügen.

Das frisch gewonnene Viperngift wurde in den früheren Versuchen sogleich in Phosphatpuffer aufgelöst, während es später zuerst im Exsikkator in der Kälte getrocknet wurde. Es löst sich in Wasser und Phosphatpuffer vollkommen klar auf. In den meisten Fällen war nicht einmal eine Dialyse notwendig, da die Sauerstoff- und Ammoniakleerwerte äußerst gering waren. Diese wurden in allen Fällen von den Ergebnissen der Hauptversuche subtrahiert. Die Reaktion wurde immer in einem Phosphatpuffer von pH 7,2 durchgeführt, sofern nicht andere Wasserstoffionenkonzentrationen angegeben werden.

Die Sauerstoff- und Kohlendioxymessung geschah in üblicher Weise im Warburg-Apparat, die Ammoniakbestimmung genau nach der Vorschrift von Conway³⁾. Die dazu verwendete Horizontalbürette wurde etwas abgeändert, insbesondere durch das Anbringen eines Schliffes in dem zum Vorratsgefäß führenden Glasrohr, wodurch die Handlichkeit des Apparates verbessert wurde.

Als Katalasequelle benützten wir Erythrocyten von Mensch und Ratte. Das definierte Blut wurde zentrifugiert und die Erythrocyten dreimal auf der Zentrifuge mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Sie wurden dann mit der Wassermenge hämolytiert, die dem ursprünglichen Blutvolumen entsprach. Die weiteren Verdünnungen wurden mit Phosphatpuffer ausgeführt. Alle Angaben beziehen sich auf das ursprüngliche Blutvolumen. Sämtliche Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Gesamtvolume.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein neues, im Wasser leicht lösliches Ferment im Gift von *Vipera aspis* beschrieben, das alle untersuchten *l*-Formen der optisch aktiven Monoamino-monocarbonsäuren mit freier Aminogruppe mit Ausnahme von *d,l*-Serin und die Diamino-monocarbonsäuren *l*-Histidin und *l*-Arginin oxydativ desaminiert.

2. Zur Ablösung von einem Mol Ammoniak ist 1 Atom Sauerstoff notwendig. Es entstehen weiterhin bei der Abbaureaktion Ketonsäuren und Kohlendioxyd.

3. Bei Gegenwart von Katalase wird die Sauerstoffproduktion auf die Hälfte herabgesetzt und die Kohlendioxyd-bildung verhindert.

4. Durch Variation der Wasserstoffionen- und der Substratkonzentration werden ausgeprägte Reaktionsoptima erhalten.

5. Mehrere aromatische Sulfosäuren üben auf den *l*-Aminosäureabbau eine starke hemmende Wirkung aus.

¹⁾ E. A. Zeller, Helv. **24**, 539 (1941): 10. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Polyaminen.

²⁾ E. A. Zeller, Schweiz. med. Wschr. **71**, 1349 (1941): 4. Mitteilung zur Methodik der fermentchemischen Schwangerschaftsbeurteilung und -diagnose.

³⁾ E. J. Conway, Micro-Diffusion Analysis and Volumetric Error, New York 1940.

6. Durch Kombination des Konkurrenzversuchs mit der über-optimalen Substratkonzentration wird die Untersuchung der Frage der einfachen oder multiplen Fermentnatur verfeinert und auf das vorliegende Ferment, für das die Bezeichnung *Ophio-l-amino-säureoxydase* vorgeschlagen wird, angewandt.

Aktiengesellschaft *Aligena*,
Wissenschaftliche Laboratorien Basel.

Protokoll

der Generalversammlung der Schweiz. Chemischen Gesellschaft
am 3. September 1944, im Hotel Margna in Sils-Baselgia.

Eröffnung der Sitzung durch den Vizepräsidenten Herrn Prof. Dr. *H. Goldstein* um 8.20 Uhr.

A. Geschäftlicher Teil.

Traktanden:

1. Protokoll der Sitzung vom 26. Februar 1944 in Bern. Das in den „*Helvetica Chimica Acta*“ [27, 811—813 (1944)] publizierte Protokoll wird genehmigt.

2. Festsetzung des Ortes für die Winterversammlung 1945. Als Ort für die Winterversammlung wird vom Vorstand Bern vorgeschlagen und von der Generalversammlung angenommen. Als Datum kommt der 25. Februar oder der 4. März in Frage.

3. Festsetzung der Mitgliederbeiträge und des Abonnementspreises der „*Helvetica Chimica Acta*“ für 1945. Der Vorschlag des Vorstandes lautet auf Beibehaltung der Beiträge und des Abonnementspreises von 1944. Er wird von der Generalversammlung angenommen.

4. Bericht des Präsidenten des Redaktionskomitees. Herr Prof. *Fichter* berichtet kurz über die letzte Entwicklung der „*Helvetica Chimica Acta*“. Die Schwierigkeiten für die Redaktion bestehen nach wie vor darin, dass aus finanziellen Gründen ein allzu starkes Anschwellen der Zeitschrift verhindert werden muss, während andererseits das Niveau auf keinen Fall gedrückt werden darf. Nach dem Kriege wird die Abonentenzahl sicher beträchtlich ansteigen, was diese Schwierigkeit weitgehend beheben dürfte.

5. Mitteilungen des Präsidenten des „Conseil de la Chimie Suisse“. Herr Prof. *E. Briner* berichtet, dass die Arbeit in den internationalen Kommissionen und damit auch die vermittelnde Tätigkeit des „Conseil“ zur Zeit wegen des Krieges auf ein Minimum beschränkt ist. Sobald es die Weltlage erlaubt, wird der „Conseil de la Chimie Suisse“ seine Dienste wieder zur Verfügung stellen.

6. Allfälliges. Nichts.

Schluss der Geschäftssitzung 8.30 Uhr.

B. Wissenschaftlicher Teil.

Von 7 angemeldeten Referenten waren 4 am Erscheinen verhindert. In dankenswerter Weise konnte noch Herr Prof. *Ruzicka* in letzter Minute mit einer Mitteilung einspringen.