

Menthols gleich riechen, hat nach unseren Annahmen seinen Grund darin, daß hier vorzugsweise die Molekelform Einfluß hat, da Adsorption eintritt. Der sterische Bau des D- und L-Menthols ist nun nicht so grundsätzlich verschieden, und die Adsorptionskräfte sind nicht so stark sterisch beeinflußbar, als daß die beiden Antipoden nicht an gleicher Stelle und mit gleicher Stärke am Riechnerven adsorbiert werden könnten. Bei höheren Konzentrationen dagegen tritt neben der Adsorption (bedingt durch die Molekelform) die Reaktion der osmophoren Gruppe (OH-Gruppe?) in Erscheinung. Bei dieser Reaktion ist, wie ja auch Doll annimmt, ein sterischer Einfluß wahrscheinlich. Die Folge davon ist die verschiedenen starke Kälteempfindung, die die beiden Antipoden verursachen.

Auch eigene Ergebnisse können in dieser Weise gedeutet werden. Von den eingangs erwähnten Di-n-alkyl-acetaldehyden besitzt der Äthyl-n-amyl-acetaldehyd einen ausgesprochenen Geruch nach Orangenschalen, während dieser Geruch bei n-Propyl-n-butylacetaldehyd und Di-n-butylacetaldehyd nicht so charakteristisch ist, sondern sich wieder mehr dem schärferen, etwas ranzigen Geruch des als Vergleichssubstanz benutzten n-Pelargonaldehyds nähert. Nimmt man den in der Parfümerie vielfach benutzten Methyl-n-heptylacetaldehyd hinzu, so scheint es, daß die geruchlichen Eigenschaften besonders günstig bei den Aldehyden sind, die die Aldehyd-Gruppe in 2- oder 3-Stellung der geraden Kohlenwasserstoffkette tragen. Die Geruchsnote nähert sich wieder derjenigen des normalen, unverzweigten Aldehyds, je symmetrischer die Aldehyd-Gruppe mit der Kohlenwasserstoff-Kette verknüpft ist.

Versucht man eine Erklärung auf Grund der obigen Hypothese, so kann man hier fast Rückschlüsse aus dem Geruch auf die Molekularstruktur ziehen, die evtl. beweisbar sind. Von dem geradkettigen Aldehyd ist anzunehmen, daß seine Aldehyd-Gruppe verhältnismäßig wenig – höchstens von einer Seite her – abgeschirmt ist, in welchem Aggregatzustand, gasförmig, gelöst oder als Tröpfchen, er auch an das Riechzentrum gelangen mag. Die osmophore Gruppe dieses Aldehyds wird sich also, wenn auch abgeschirmt, bemerkbar machen. Bei den Dialkyl-acetaldehyden dagegen wird die resultierende Molekelform entweder leicht verschiebbar sein oder durch den Energieinhalt der vielen möglichen Konfigurationen bestimmt werden. Zwei „Grenzzustände“ sind hier a priori denkbar, einmal ein kranzartiges Umschließen der CHO-Gruppe von beiden Seiten her, wobei diese Gruppe dann vollkommen abgeschirmt ist, oder ein

Abspreizen der Alkylketten nach der entgegengesetzten Seite hin. Dieses Abspreizen wird begünstigt sein durch Dispersionskräfte zwischen den Alkyl-Gruppen. Enthalten beide Alkyl-Gruppen die gleiche Zahl von Resten, so ist diese energetische Begünstigung am größten, wie von Hildebrand¹⁰⁴⁾ festgestellt wurde.

Nach der Geruchsart genügt bei den symmetrischen Dialkyl-acetaldehyden diese Begünstigung, um die zweite Form zur herrschenden Form zu machen. Hier tritt also wieder unter der Wirkung der osmophoren Gruppe, die noch stärker abgeschirmt ist als bei der geradkettigen Verbindung, der „Aldehyd-Geruch“ auf. Dagegen scheint bei den unsymmetrischen Dialkyl-acetaldehyden die ringförmige Form begünstigt zu sein. Das hat zur Folge, daß hier die Molekelform den Geruch zum fruchtartigen hin verschleibt.

Natürlich sind solche Schlußfolgerungen mit Vorsicht aufzufassen, andererseits zeigen sie aber einen Weg, wie Geruchsbeziehungen objektiver Prüfung zugänglich gemacht werden können und wie man den Geruch nicht nur als empirische erinnerungsmäßige Hilfe, sondern auch als empfindlichen Hinweis auf das Vorliegen oder Vorwiegen einer besonderen Molekelform benutzen kann. Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß die von Guillot¹⁷⁾ auf Grund der Untersuchung der partiellen Anosmien aufgefundene Tatsache, daß der gleiche oder ähnliche Geruch verschiedenartiger Stoffe nicht auf der Reizung identischer Geruchszentren beruht, in keinerlei Widerspruch zu den vorstehenden Hypothesen steht. Hier handelt es sich zweifellos um ein biologisches Problem. Man kann sich etwa vorstellen, daß bei genügender Anzahl von reinen Geruchszentren im Riechnerven nicht für alle solche Zentren im Gehirn entsprechend viele Reiz-auffangvorrichtungen vorhanden sind und daher verschiedene Reize „irrtümlich“ als identisch empfunden werden.

Das Problem Konstitution und Geruch kann sowohl Chemiker als auch Biologen zu gründlichen und vielseitigen Untersuchungen anregen. Am meistversprechenden erscheint es, jetzt weiter in experimenteller Richtung die Einflüsse von Molekelform und Art und Stellung der osmophoren Gruppen auf den Geruch zu untersuchen bzw. Stoffe zu synthetisieren, die bei gleicher Molekelform verschiedenen Aufbau besitzen, die also der Theorie nach trotzdem Geruchsanalogien zeigen sollten.

Eingeg. am 7. August 1951

[A 391]

¹⁰⁴⁾ J. Amer. chem. Soc. 59, 794 [1937].

Aminosäure-Decarboxylasen

Von Prof. Dr. Dr. E. WERLE, München

Chirurgisch-klinisches Institut der Universität München

Decarboxylierungsprodukte von Aminosäuren finden sich in Tieren, Pflanzen und Bakterien¹⁾. Ihre biologische Bedeutung ist vielseitiger, als ursprünglich angenommen wurde, weshalb das Interesse für die Aminosäure-Decarboxylasen²⁾ erheblich zugenommen hat. Am eingehendsten sind die Bakterienenzyme untersucht.

I. Aminosäure-Decarboxylasen der Bakterien

Die Vermutung, alle Aminosäuren seien durch Bakterien decarboxylierbar, hat sich bisher nicht bestätigt. Bei der Untersuchung zahlreicher Stämme der verschiedenen Bakteriengruppen wurden nur für sechs Aminosäuren rasch wirkende Decarboxylasen aufgefunden³⁾, nämlich für L-Histidin, L-Ornithin, L-Lysin, L-Arginin, L-Tyrosin und L-Glutaminsäure. L-Asparaginsäure, Phenylalanin¹⁸⁾ und Dioxyphenylserin werden durch

¹⁾ M. Guggenheim: Die biogenen Amine, S. Karger, Basel/New York 1940 u. 1951.

²⁾ Zusammenfassende Darstellungen¹⁻¹⁰⁾.

³⁾ P. Holtz, Erg. Physiol. 44, 230 [1941].

⁴⁾ E. Werle, diese Ztschr. 56, 141 [1943].

⁵⁾ E. Werle, Fermentforsch. 17, 103 [1943].

⁶⁾ H. Blaschko, Adv. Enzymology 5, 67 [1945].

⁷⁾ C. F. Gale, ebenda 6, 1 [1946].

⁸⁾ P. Karrer, Schweiz. Z. Path. u. Bakteriol. 10, 351 [1947].

⁹⁾ E. Werle, Z. Vit.-Ferm.-Horm.-Forsch. 1, 504 [1947].

¹⁰⁾ I. C. Gunsalus, Fed. Proc. 9, 556 [1950].

¹¹⁾ H. Blaschko, Biochim. et Biophys. Acta 4, 130 [1950].

¹²⁾ O. Schales in: Sumner-Myrbäck, Enzymes. Acad. Press Inc. New York 1951.

¹³⁾ R. W. McGilvery u. P. P. Cohen, J. biol. Chemistry 174, 813 [1948].

Bakterien langsam decarboxyliert. Die Amine von Tryptophan, Valin, Leucin und Serin sind als bakterielle Stoffwechselprodukte in biologischem Material gefunden worden¹⁾, doch ist unbekannt, ob sie durch fermentative Decarboxylierung entstehen.

Wirkungsspezifität?

Es werden nur L- α -Aminosäuren decarboxyliert, die außer der NH₂- und COOH-Gruppe noch eine dritte polare Gruppe besitzen. Eine Ausnahme macht das Phenylalanin¹⁸⁾. Peptidgebundene oder am Stickstoff substituierte Aminosäuren oder α -Ketosäuren werden nicht angegriffen. Wahrscheinlich vermag schon die durch eine der polaren Gruppen einer Aminosäure vermittelte lockere Bindung an Plasmakolloide die Decarboxylierung zu verhindern. So ist es z. B. erklärlich, daß neben einer hochaktiven Lysin-decarboxylase in Bakterien eine hohe Konzentration an freiem Lysin bestehen kann⁷⁾. Da L-Lysin-Decarboxylase L-Ornithin nicht anzugreifen vermag und umgekehrt Ornithin-Decarboxylase Lysin nicht angreift, ist auch die Länge der

Kohlenstoffkette für die Decarboxylierbarkeit durch ein bestimmtes Ferment ausschlaggebend. Aus Glutaminsäure entsteht γ -Aminobuttersäure; Asparaginsäure dagegen wird je nach dem verwendeten Mikroorganismus zu α - oder β -Alanin decarboxyliert. So lassen *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *B. cadaveris*, *Rhizobium trifolii* β -Alanin entstehen¹⁴⁾, Leguminosebakterien (*Pseudomycobakterium*)¹⁵⁾ und *Clostridium Welchii* S. R. 12¹⁶⁾ dagegen α -Alanin. Der gleiche Mikroorganismus, sowie pflanzliche¹⁷⁾ und tierische Glutaminsäure-Decarboxylase¹⁸⁾, bilden ausschließlich γ -Aminobuttersäure¹⁹⁾. Es gibt also zwei Asparaginsäure-decarboxylasen, die unter sich und von der Glutaminsäure-decarboxylase verschieden sind. Die Aktivität der Asparaginsäure-decarboxylase ist niedrig in Übereinstimmung damit, daß die zum Aufbau der für das Bakterienwachstum notwendige Pantothenäure-Menge sehr gering ist¹⁸⁾. Die Spezifitätsverhältnisse bei der Decarboxylierung verschiedener Mono- und Dioxy-phenylalanine wurden durch *Blaschko*¹¹⁾ studiert. Danach wird L-3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa) durch zwei verschiedene Enzyme decarboxyliert, und zwar durch die L-Tyrosin-Decarboxylase der Bakterien und die L-Dopa-Decarboxylase der Säugetiere. Sie unterscheiden sich in ihrer Affinität zum L-Tyrosin, welches wahrscheinlich das natürliche Substrat des Bakterienenzymes ist und das durch die tierische Dopa-Decarboxylase nicht angegriffen wird. L-2,5-Dioxyphenylalanin wird durch Bakterien nicht decarboxyliert, wohl aber durch ein Ferment tierischer Herkunft. Racemisches 2,3-Dioxyphenylalanin wird durch *Streptococcus faecalis* R und durch Meerschweinchen-Nierenextrakt decarboxyliert¹⁹⁾.

Die Untersuchung der Spezifitätsverhältnisse bei den drei Mono-oxy-phenylalaninen ergab: Bakterien decarboxylieren p-Oxyphenylalanin etwa dreimal so schnell wie die o- und m-Verbindung. Durch das Säugetierferment werden o- und m-Verbindung etwa gleich schnell und etwa ebenso rasch decarboxyliert wie 3,4-Dioxy-phenylalanin. Nach kompetitiven Hemmversuchen sind für diese Decarboxylierungen die bakterielle Tyrosin- und die tierische Dopa-Decarboxylase verantwortlich. Eine Molekül der d-L-Aminosäuren ergibt jeweils ein halbes Mol CO_2 . Offenbar wird nur die L-Form decarboxyliert. Die Natur der Kräfte, welche zwischen Enzym und Substrat wirksam sind, ist unbekannt. Möglicherweise handelt es sich um eine Wasserstoff-Bindung zwischen Enzym und Substrat, wobei die Hydroxyl-Gruppen entweder als Donator oder als Acceptor fungieren. Jedenfalls werden die Befunde verständlich mit der Annahme, daß das Substrat durch eine Gruppe festgehalten wird, die im Enzym so gelegen ist, daß sie mit einer Hydroxyl-Gruppe in einer der benachbarten Stellungen am Benzol-Ring reagieren kann. Die Stellung dieser Gruppe würde für das Bakterienenzym und das Säugetierenzym verschieden sein. In Übereinstimmung mit diesen Anschauungen steht es, daß die drei Chlorphenyl-alanine weder durch tierisches noch durch Bakterienenzym angegriffen werden. Die Substrate haben auch keinerlei Affinität zu den genannten Enzymen¹¹⁾. Die gefundenen Spezifitätsverhältnisse bei der Decarboxylierung der Mono- und Dioxyphenylalanine werden von *Blaschko*²⁰⁾ wie folgt zusammengefaßt.

	Substrat						
	<chem>c1ccccc1C(=O)N</chem>	<chem>c1ccccc1C(R)N</chem>	<chem>c1ccccc1C(R)C</chem>	<chem>c1ccccc1C(R)C=C</chem>	<chem>c1ccccc1C(R)C=C=C</chem>	<chem>c1ccccc1C(R)C=C=C=C</chem>	<chem>c1ccccc1C(R)C=C=C=C=C</chem>
HCOH							
HCNH ₂							
COOH							
Ferment aus <i>B. coli</i>	++	++	-	?	+	+	-
Nebennieren- mark	++	++	++	++	-	++	++

R bedeutet $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$, die Valenzstriche OH-Gruppen

- ¹⁴⁾ W. E. David u. H. C. Lichstein, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 73, 216 [1950].
¹⁵⁾ S. R. Mardashev, L. A. Semina, R. N. Etinghof u. A. I. Balasnaya, Biochimia, 14, 44 [1949].
¹⁶⁾ K. Meister, H. A. Sober u. S. V. Tice, J. biol. Chemistry 189, 577 [1951].
¹⁷⁾ K. Okumuki, Bot. Magazin (Tokio) 51, 270 [1937].
¹⁸⁾ E. Roberts u. S. Frenkel, J. biol. Chemistry 188, 789 [1951].
¹⁹⁾ H. Blaschko u. H. Langemann, Biol. J. 48, Pr.: VII [1951].
²⁰⁾ H. Blaschko, Vortrag Skand. Pharm. Ges. 1950, ref. diese Ztschr. 63, 147 [1951].

Verteilung der sechs rasch wirkenden Aminosäure-Decarboxylasen

Die Untersuchung bei den verschiedenen Bakterienarten ergab, daß kein Enzym konstant mit einem anderen vergesellschaftet ist. Nur *Escherichia coli* vermag alle sechs Fermente zugleich zu bilden. Tyrosin- und Histidin-Decarboxylase wurden außer bei *Escherichia coli* nie gleichzeitig angetroffen. Die wichtigsten Produzenten der sechs Decarboxylasen sind die Coli-Arten, Streptococcen und Gasbrandbazillen²¹⁾.

Aktivitätsbestimmung⁶⁾

Die Aktivität der Bakterien-Decarboxylasen wird ausgedrückt in Q_{CO_2} , d. i. $\mu\text{l CO}_2$, die pro Stunde bei 30° und optimalem pH pro mg Bakterium, bezogen auf Trockensubstanz, entwickelt werden. Sie wird in Warburg-Manometern gemessen. Die Q_{CO_2} -Werte schwanken in weiten Grenzen (von 1 bis 1200).

Bedingungen für die Bildung der Decarboxylasen in Bakterien

Sie werden von *Gale*⁷⁾ in folgender Weise zusammengefaßt:
1) Der Mikroorganismus muß die Fähigkeit zur Bildung der Enzyme in seiner enzymatischen Konstitution vorgebildet haben.
2) Das Wachstum muß in Gegenwart des spezifischen Substrates stattfinden (Ausnahme: Glutaminsäure). 3) Der Mikroorganismus muß zur Synthese der Co-Decarboxylase befähigt sein, wenn nicht, muß das Nährmedium gewisse Substanzen enthalten, welche für die Synthese der Co-Decarboxylase nötig sind. 4) Das Nährmedium muß sauer sein. Es ist offenbar die undissozierte Carboxyl-Gruppe für die Anregung der Enzybildung wesentlich. Nur bei saurer Reaktion ist die vorhandene Substrat-Säurekonzentration der vorhandenen Aminosäure-Menge gleich, während bei neutraler Reaktion, bei der die Carboxyl-Gruppe praktisch dissoziert ist, einer niedrigen „aktuellen“ Substratkonzentration eine sehr geringe Enzybildung entspricht. 5) Die Enzyme werden in den Organismen erst gegen Ende der aktiven Zellteilung gebildet.

Die Züchtung aktiver Mikroorganismen in großem Maßstab geschieht am besten in einem Nährmilieu bestehend aus trypsin-verdaute Casein und 2% Glucose (unter Zusatz von 0,1% Marmit bei Streptococcen), bei Coli-Arten bei 25°, bei Streptococcen und Clostridien bei 37°. Die Bakterien werden geerntet, wenn die aktive Zellteilung aufhört.

Gewinnung zellfreier Lösungen von Aminosäure-Decarboxylasen⁷⁾

Werden die Bakterien mit Aceton getrocknet, so bleiben die Decarboxylasen meistens erhalten, können mit Pufferlösung extrahiert und mit Hilfe gebräuchlicher Methoden angereichert werden. Zellfreie Präparate, die nur eine Decarboxylase enthalten, können in der Weise gewonnen werden, daß man von einem Mikroorganismus ausgeht, der nur ein Ferment zu produzieren vermag. Solche Mikroorganismen²²⁾ können zur quantitativen Bestimmung der entsprechenden Aminosäuren z. B. in Proteinhydrolysaten herangezogen werden und da sie jeweils nur die L-Komponente decarboxylieren, auch zur Gewinnung der d-Formen von Aminosäuren.

So decarboxyliert *Clostr. septicum Pasteur III N. C. T. C.*²³⁾ Nr. 547 nur L-(–)-Ornithin, *Streptoc. faec.* nur L-(–)-Tyrosin²⁴⁾, *Escherichia coli* N. C. T. C. Nr. 7020 nur L-Arginin. Bei der Trocknung des an Histidin-Decarboxylase reichen Materials, nämlich *Clostr. Welchii* N. C. T. C. 21, wird die begleitende Glutaminsäure-Decarboxylase zerstört, so daß nur die Histidin-Decarboxylase übrig bleibt. Aus *B. cadaveris* (N. C. T. C. 6578) wird reine Lysin-Decarboxylase erhalten. Zellfreie Extrakte aus acetongetrockneten Coli-Arten enthalten neben L-Glutaminsäure-, L-Arginin- und L-Lysin-Decarboxylase, die bei etwa 8-tägigem Stehen im Eisschrank inaktiv sind, so daß die beständige Glutaminsäure-Decarboxylase allein übrig bleibt. Glutaminsäure und Asparaginsäure können mit Hilfe von *Clostr. Welchii* S. R. 12 nebeneinander bestimmt werden auf Grund der Tatsache, daß 10⁻³ molare Semicarbazid- oder Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid-Lösung die Asparagin-, nicht aber die Glutaminsäure-Decarboxylase reversibel hemmt. Nach der Decarboxylierung

²¹⁾ Über die Verbreitung der Aminosäure-Decarboxylasen im Bakterienreich, s. 7).
²²⁾ Eine Zusammenstellung geeigneter Mikroorganismen findet sich in 7). Bei der quantitativen Bestimmung von Lysin werden in Gegenwart von Oxylysin zu hohe Werte gefunden, weil auch Oxylysin decarboxyliert wird (S. Lindstedt, Acta chem. Scand. 5, 486 [1951]), wenn auch langsamer als Lysin.

²³⁾ N.C.T.C. — National Collection of Type Cultures.

²⁴⁾ Durch ein Aceton-Trockenpulver von *Strept. faec. R.* wird auch Phenylalanin langsam decarboxyliert¹⁸⁾, was bei der Tyrosin-Bestimmung von Hydrolysaten zu Fehlern Anlaß geben kann.

der Glutaminsäure wird durch Zusatz von Brenztraubensäure die Hemmung aufgehoben, und es tritt nunmehr Decarboxylierung der Asparaginsäure^{25, 26)} ein.

Hemmkörper der Decarboxylasen

Alle Decarboxylasen werden durch Cyanwasserstoff, durch Aldehyd- und Keton-Reagentien, wie Semicarbazid und Hydroxylamin reversibel gehemmt. Schwermetall-bindende Agentien, wie H_2S , CO , Sulfanilamid sind ohne Einfluß auf die Aktivität. Da bei spektrometrischen Untersuchungen veraschter, gereinigter Decarboxylasen keine Metalle angetroffen wurden, ist ihre Cyanid-Empfindlichkeit auf die Gegenwart einer Carbonylgruppe in der Fermentmoleköl zurückzuführen. Silber und Quecksilber-Ionen hemmen die einzelnen Decarboxylasen mehr oder weniger stark.

Aktivitäts- p_{H} -Optima

Die Aminosäure-decarboxylasen sind in einem engen, sauren p_{H} -Bereich wirksam.

Die Optima liegen (s. Tabelle 1) bei Verwendung der zellfreien Fermentlösungen etwas weniger sauer als bei Verwendung der Bakteriensuspensionen. Die Decarboxylierung verschiebt das p_{H} des Zellplasmas in Richtung zum Neutralpunkt, während das p_{H} der Suspensionsflüssigkeit sich nicht ändert. Wahrscheinlich ist hierauf der scheinbare Unterschied in der Lage der Wirkungsoptima zurückzuführen.

Bei *C. Welchii* tritt in gepufferten Lösungen (Acetatpuffer) Decarboxylierung ein im Bereich von $p_{\text{H}} 3,5-6$ mit Optimum bei 5,5. Mit ungepufferten Lösungen dagegen wurde Decarboxylierung im Bereich von 3,5 bis 9,5 festgestellt¹⁶⁾.

Decarboxylase	p_{H} -Optimum		Michaelis-Konstante	
	Bakterien-suspension	Zellfreies Präparat	Bakterien-suspension	Zellfreies Präparat
L(-)Histidin	2,5-3,0	4,5	0,00075 M	0,00075 M
L(+)Lysin	4,5-5,0	6,0	0,0028	0,0015
L(+)Arginin	4,0-4,8	5,2	0,00056	0,00075
L(+)Glutaminsäure .	4,0-4,5	4,5	0,005	0,027
L(+)Ornithin	5,0-5,5	5,2	0,003	0,004
L(-)Tyrosin	5,0-5,5	5,5	—	—

Tabelle 1

(Aus E. F. Gale, Adv. Enzymology, 6, 16 [1946])
 p_{H} -Optimum und Michaelis-Konstante von Bakterien-Suspension und zellfreiem Präparat verschiedener Decarboxylasen.

Die Michaelis-Konstanten sind für die zellfreien Decarboxylase-Lösungen und die in den Zellen verankerten Fermente nahezu gleich. Nur bei der Glutaminsäure-Decarboxylase ist der Unterschied größer, was auf eine Schädigung des Fermentes bei der Freilegung hinweist. Für die Tyrosin-Decarboxylase kann die Michaelis-Konstante nicht angegeben werden, da bei gesättigter Tyrosin-Lösung das Ferment noch nicht tyrosingesättigt ist.

Bei der Untersuchung der Aktivität der Decarboxylasen an intakten gewaschenen Bakterien ist der Umstand zu berücksichtigen, daß das Eindringen der Aminosäuren in Bakterien einmal durch freie Diffusion des (isoelektrischen) Aminosäure-Ions, wie im Falle des Lysins, oder nur mit Hilfe von energie-liefernden Stoffwechselprozessen der Bakterien, z. B. des Abbaues von Glucose, erfolgt, wie für die Glutamin-Asparaginsäure und für Histidin nachgewiesen wurde. Agentien, welche diese Prozesse unterbinden, z. B. Penicillin, hemmen auch das Eindringen der genannten Aminosäuren in Bakterien und damit auch ihre Decarboxylierung⁷⁾.

Trennung der Decarboxylasen in Apo- und Co-Enzym⁷⁾

Werden *Coli*-Kulturen öfters gewaschen, so nimmt die Aktivität der Decarboxylasen stark ab (Ausnahmen: Glutaminsäure- und Histidin-Decarboxylase). Sie kann durch Zusatz von Hefekochsaft wieder hergestellt werden. Aus Lösungen von L(+)-Lysin-Decarboxylase kann durch Ammoniumsulfat bei alkalischer Reaktion ein Protein gefällt werden, welches nach seiner Wiederauflösung gegenüber Lysin inaktiv ist und aktiviert wird durch Zusatz von gekochter Lysin-Decarboxylase-Lösung, gekochten Bakterien, Hefeextrakt oder gekochtem Leberextrakt. Ähnlich wurden die Apo-Enzyme der Ornithin-, Arginin- und Tyrosin-Decarboxylase erhalten.

Eine (unvollständige) Zerlegung der Glutaminsäure-Decarboxylase aus einem *Esch. coli*-Stamm gelang W. W. Umbreit und J. C. Gunsalus²⁷⁾ durch 24-stündige Dialyse bei $p_{\text{H}} 2,0$ und 0°C .

²⁵⁾ A. Meister, H. A. Sober u. S. V. Tice, J. biol. Chemistry 189, 591 [1951].
²⁶⁾ Die Suspensionen von *C. Welchii* S. R. 12 decarboxylieren auch Glutamin, den γ -Athylester und das γ -Methylamid der Glutaminsäure allerdings nur zu einigen Prozenten — wahrscheinlich erst nach ihrer Überführung in Glutaminsäure¹⁶⁾.

²⁷⁾ J. biol. Chemistry 159, 333 [1945].

Auch hier konnte das Apo-Enzym durch Co-decarboxylase-Konzentrat reaktiviert werden. Eine Zerlegung der Histidin-Decarboxylase war bisher nicht möglich.

Die 5 Apo-Enzyme können gegenüber ihren Substraten durch Zugabe einer Aufkochung irgendeines der 5 unbehandelten Enzyme zur Decarboxylase vervollständigt werden, womit erwiesen ist, daß diese Kochpräparate eine Substanz enthalten, die als Co-Enzym für die 5 Apo-Enzyme anzusprechen ist.

Vorkommen der Co-Decarboxylase⁷⁾

Die Aktivierung der Apo-Enzyme der Decarboxylasen durch Zusatz der Co-Decarboxylase ermöglicht es, die Verbreitung der Co-Decarboxylase in biologischem Material zu untersuchen. Die Geschwindigkeit der Decarboxylierung steht in linearem Verhältnis zur zugefügten Co-Decarboxylase-Menge, solange diese beträchtlich geringer ist, als notwendig wäre, das vorgelegte Apo-Enzym damit abzusättigen. Mit Hilfe dieser Beziehung wurde von Gale unter Verwendung der Apo-Enzyme der Lysin- und Tyrosin-Decarboxylase das Vorkommen der Co-Decarboxylase untersucht. Es wurden positive Resultate bei allen geprüften Bakterien, Pflanzen und tierischen Geweben erhalten, gleichgültig ob sie eine aktive Aminosäure-Decarboxylase enthielten oder nicht, wie etwa Brauerei- und Bäckerhefe. Die Co-Decarboxylase hat also offenbar verschiedene biologische Funktionen (s. u.).

Gewinnung der Co-Decarboxylase⁷⁾

Das günstigste Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Co-Decarboxylase ist Brauereihefe bei milder alkalischer Extraktion. Co-Decarboxylase bildet mit Metallen Salze. Silber-, Quecksilber- und Bleisalz sind in Säure löslich und werden am Neutralpunkt ausgefällt. Das Bariumsalz ist bei allen p_{H} -Werten in Wasser löslich, wird aber bei $p_{\text{H}} 7,0$ durch 60% Methanol oder Äthanol niedergeschlagen. Die Decarboxylase wird auch gefällt durch Phosphorwolframsäure. Die freie Säure ist löslich in Methanol und Äthanol. Durch komplizierte Reinigung konnte die Co-Decarboxylase aufs 15000-fache angereichert werden. Aus ihrem Bleisalz wurde ein 2,4 Dinitrophenyl-semicarbazone gewonnen und in diesem Phosphorsäure nachgewiesen.

Chemische Natur der Co-Decarboxylase^{7, 9)}

Die chemische Natur der Co-Decarboxylase wurde nicht durch ihre weitere Reinigung, sondern auf einem „Umweg“ erschlossen, der im folgenden kurz wiedergegeben sei. Zuerst wurde geprüft, ob ein bereits bekanntes Co-Ferment oder eine Kombination von Co-Fermenten im Versuch mit Decarboxylase-Apo-Enzym das Co-Ferment zu ersetzen vermöge. Der Erfolg war negativ. Dagegen waren in Versuchen von W. D. Bellamy und J. C. Gunsalus²⁸⁾ einige Wirkstoffe der Vitamin B-Gruppe befähigt, die Decarboxylase-Bildung unter bestimmten Züchtungsbedingungen bei *Streptococcus faecalis* zu steigern. Gale²⁹⁾ hatte nämlich gefunden, daß *Streptococcus*-Stämme ihre sehr hohe Tyrosin-decarboxylase-Aktivität weitgehend verlieren, wenn sie in einem vereinfachten Medium gezüchtet werden, auch wenn dieses Tyrosin enthält. Ein starker Abfall der Fermentproduktion trat ein, wenn unter den B-Faktoren Nicotinsäure und Pyridoxin fehlten. Sie beide allein beschleunigten die Enzymbildung so stark wie der Komplex der übrigen Faktoren zusammen. Bei weiteren Arbeiten waren für Bellamy und Gunsalus Untersuchungsergebnisse von Snell³⁰⁾ und Mitarbeitern wegweisend, die zeigten, daß in tierischen Geweben eine Substanz vorkommt, die die Wirkung, die das Pyridoxin als Wuchsstoff bei Milchbakterien hat, zu ersetzen und bei *Streptococcus lactis R.* sogar zu übertreffen vermöge. Diese Substanz, die als Pseudo-pyridoxin bezeichnet wurde, ließ sich nachweisen in Hefe, in tierischen und pflanzlichen Geweben. Wird Pyridoxin mit Wasserstoffperoxyd behandelt oder mit Cystein druckerhitzt, so wird die Wirkung des Pyridoxins als Wachstumsfaktor gesteigert, so daß die Vermutung auftauchte, das Pseudo-pyridoxin

²⁸⁾ J. Bacteriol. 48, 191 [1944].

²⁹⁾ E. F. Gale, Biochem. J. 34, 846 [1940].

³⁰⁾ E. E. Snell, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 61, 356 [1942]. E. E. Snell, B. M. Guirard u. R. J. Williams, J. biol. Chemistry 143, 519 [1942].

könne ein Oxydationsprodukt des Pyridoxins sein. *Strept. lactis R.* wächst in einem Medium, in welchem Pyridoxin als Wirkstoff durch d-Alanin ersetzt werden kann. Es besitzt aber dann keine Tyrosin-Decarboxylase-Aktivität. Diese kann nun in den inaktiven Coccen hervorgerufen werden durch Zusatz von Pseudo-pyridoxin, welches aus Pyridoxin gewonnen worden war. Daraus folgt, daß diese *Streptococcus* auf pyridoxin-defektem Nährboden wohl das spezifische Enzymprotein, nicht aber die dazugehörige Wirkgruppe bilden können³¹). Durch diese Ergebnisse angeregt, synthetisierten *Harris, Heyl und Folkers*³²) Pyridoxin-Derivate, insbes. Pyridoxal mit einer Aldehyd-Gruppe und Pyridoxamin mit einer NH₂-Gruppe in 4-Stellung. Beide Verbindungen sind, wie das Pseudo-pyridoxin, als Wachstumsfaktoren bei *Strept. lact. R.* wirksam.

Während Pyridoxin, Pyridoxamin und Pyridoxal unter den erwähnten Bedingungen bei wachsenden Mikroorganismen die Tyrosin-Decarboxylase-Aktivität hervorrufen, waren sie bei gewaschenen Bakteriensuspensionen, mit Ausnahme von Pyridoxal, unwirksam³³). Wurden aber die Bakterien vor dem Zusetzen von Pyridoxal getrocknet, so war auch dieses unwirksam. Setzte man aber außer Pyridoxal noch Adenosin-triphosphorsäure zu oder durch Thionylchlorid und Silberphosphat oder Phosphoroxychlorid phosphoryliertes Pyridoxal, so trat Tyrosin-decarboxylase-Aktivität auf. Daraus folgt, daß ein phosphoryliertes Pyridoxal das Co-Enzym der Tyrosin-Decarboxylase darstellt³⁴). In der Tat konnten *Baddiley und Gale*³⁵) bei der Apo-Carboxylase des Tyrosins, Arginins und Ornithins durch Zusatz von Pyridoxalphosphat die gleiche Höchstaktivität erzielen wie mit Co-decarboxylase-Präparaten aus Hefe. Die Identität der Co-Decarboxylase mit dem Pyridoxal-phosphat erscheint gesichert, obwohl beide Verbindungen noch nicht absolut rein vorliegen. Die Co-Decarboxylase wird also durch Oxydation von Pyridoxin zu Pyridoxal und durch fermentative Phosphorylierung des Pyridoxals mit Adenosin-triphosphorsäure als Phosphatdonator aufgebaut. Pyridoxalphosphat kann aber auch nach *Meister, Sober und Tice*³⁶) durch Transaminierung aus Pyridoxaminphosphat und Pyruvat entstehen. Diese Tatsache gewinnt weiter an Bedeutung durch die engen Beziehungen der Co-Decarboxylasen zu den Transaminasen (s. u.).

Die Identität der Co-Enzyme der Decarboxylasen kann aus folgendem erschlossen werden⁷):

a) Die Werte für die Co-Decarboxylase in biologischem Material sind gleich, unabhängig davon, ob das Co-Enzym durch Lysin- oder Tyrosin-Apo-Decarboxylase erzeugt wird.
b) Auf den verschiedenen Reinheitsstufen der Co-Carboxylase-Konzentrate aus Hefe ergeben sich die gleichen Co-Enzym-Aktivitäten bei Verwendung der Lysin- oder der Tyrosin-Apo-Decarboxylase.

c) Ein gekochtes Präparat irgend eines der Enzyme kann als Quelle für das Co-Enzym eines der Apo-Enzyme verwendet werden; z. B. auch für das Apo-Enzym der pflanzlichen Glutaminsäure oder der tierischen Dopa-Decarboxylase.

Weitere Co-Fermentfunktionen des Pyridoxalphosphates

Je nach dem Apo-Enzym, zu welchem das Pyridoxalphosphat in Beziehung tritt, entsteht Ornithin-, Lysin-, Arginin- usw. Fermente also verschiedener Substrat-, aber gleicher Wirkungsspezifität. Das Pyridoxalphosphat kann nun auch Apo-Enzyme zum Holo-Enzym vervollständigen, bei denen sich auch die Wirkungsspezifität ändert. Nach *Umbreit, Wood und Gunsalus*³⁷) wird in einem zellfreien Homogenat von *Neurospora sitophila* ein Apo-Enzym durch Pyridoxalphosphat zu einem Enzym vervollständigt, welches Indol und Serin zu Tryptophan synthetisiert. Aus *Escherichia coli* wurde ein Ferment in zellfreie Lösung übergeführt, das Tryptophan zu Indol, Brenztraubensäure und Ammoniak zerlegt. Die „Tryptophanase“ verliert bei einem bestimmten Reinigungsvorgang ihre Aktivität. Sie kann durch Pyridoxalphosphat wieder hergestellt werden³⁷).

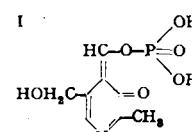
Von ganz besonderer Bedeutung ist es, daß Pyridoxalphosphat auch als Co-Ferment der Transaminasen anzusehen ist³⁸).

- ³¹) W. D. Bellamy u. I. C. Gunsalus, J. biol. Chemistry 155, 557 [1944].
- ³²) S. A. Harris, E. Heyl u. K. Folkers, J. Amer. Chem. Soc. 66, 2088 [1944].
- ³³) I. C. Gunsalus, W. D. Bellamy, J. biol. Chemistry 155, 357 [1944].
- ³⁴) I. C. Gunsalus, W. D. Bellamy, W. W. Umbreit, ebenda 155, 685 [1944].
- ³⁵) J. Baddiley u. E. F. Gale, Nature [London] 155, 828 [1945].
- ³⁶) W. W. Umbreit, W. H. Wood u. I. C. Gunsalus, J. biol. Chemistry 165, 731 [1946].
- ³⁷) W. H. Wood, I. C. Gunsalus, W. W. Umbreit, ebenda 170, 313 [1947].
- ³⁸) E. E. Snell, J. Amer. Chem. Soc. 67, 194 [1945].

Bei B-avitaminotischen Ratten sinkt der Transaminase-Gehalt der Organe. Nur durch Pyridoxalphosphat, nicht aber durch Pyridoxal und Pyridoxamin mit und ohne Adenosin-triphosphorsäure kann die ursprüngliche Aktivität wieder hergestellt werden³⁹). Bei der Reinigung von Transaminasen nimmt mit der Aktivität der Gehalt an gebundenem Pyridoxin-Derivat zu⁴⁰). Erhitzte Transaminase-Präparate konnten die Co-Decarboxylase von *Gale* oder das Pyridoxalphosphat von *Umbreit* als Co-Enzym für die Dopa-Decarboxylase ersetzen⁴¹). Bakterien, die in pyridoxal-freiem Medium gewachsen waren, ergaben Apo-Transaminase-Präparate, die durch Pyridoxalphosphat zum Holo-Enzym vervollständigt werden⁴²).

Der Sitz der Phosphorsäure-Molekel im Pyridoxal-phosphat

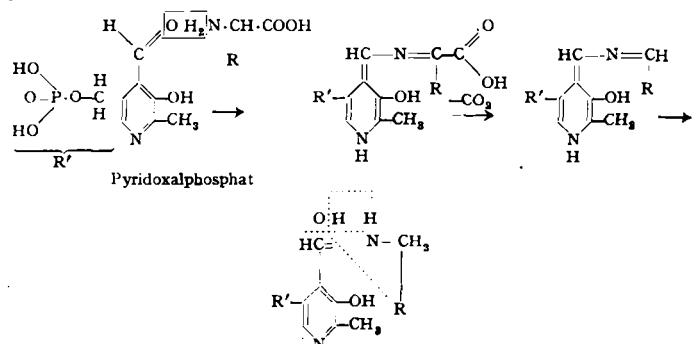
Die Co-Decarboxylase enthält eine Molekel Phosphorsäure, deren Stellung nicht genau bekannt ist. Da Pyridoxal-3-phosphat⁴³) keine Co-Decarboxylase-Aktivität besitzt⁴⁴), wurde angenommen, daß das Phosphat sich in 5-Stellung befindet. *J. Baddiley* und *E. M. Tain*⁴⁵) fanden nun, daß gewaschene Suspensionen eines Lacto-Bacillus sich bei der Synthese von Co-Decarboxylase stark gelb färben und daß Co-Decarboxylase-Lösungen wesentlich intensiver gefärbt sind als äquimolekulare Lösungen von Pyridoxal. Sie diskutieren daher für die Co-Decarboxylase eine chinoide Struktur (I), die die tiefgelbe Farbe, den negativen Ausfall von Phenol-Reaktionen und den positiven Ausfall von Keton-Reaktionen beim Pyridoxal-phosphat erklären würde.



Eine wesentliche Vertiefung der Gelbfärbung der Pyridoxal-phosphat-Lösung haben *E. Werle* und *W. Koch*⁴⁶) beim Versetzen mit Histidin beobachtet. Sie verschwand beim Erhitzen, wobei es zur Decarboxylierung von Histidin kam. Die Farbvertiefung führt auf die intermediaire Ausbildung eines pyridoiden Systems zurück, das auch für die enzymatische Aminosäure-Decarboxylierung von Bedeutung sein soll.

Zum Mechanismus der enzymatischen Decarboxylierung

Werle und *Koch*⁴⁶) haben folgende Vorstellung entwickelt: Nach der Verankerung der Aminosäure am Trägerprotein des Fermentes kommt zuerst die Bildung einer Schiffschen Base zustande. Dann erfolgt durch Elektronenverschiebung eine Wanderung der Doppelbindung und Ausbildung eines „pyridoiden“ Systems. Das Wasserstoff-Atom des der Carbonyl-Gruppe benachbarten C-Atoms wandert dabei bis herunter zum Stickstoff⁴⁷). Es entsteht auf diese Weise und nicht durch Dehydrierung die für die Decarboxylierung von *Knoop*⁴⁸) und *Holtz*⁴⁹) geforderte Iminocarbonsäure. Nach der Abspaltung des CO₂ bildet sich das benzoide System zurück. Es folgt die hydrolytische Spaltung, wobei sich das Amin bildet und das freie Ferment regeneriert wird.



Bei den körperfremden Aminosäuren kommt die 2-polige Bindung aus sterischen Gründen nicht zustande. Die Entfernung

- ³⁹) F. Schenk u. E. E. Snell, J. biol. Chem. 157, 425 [1945].
- ⁴⁰) F. Schenk u. A. Fischer, Arch. Biochem. 12, 69 [1947].
- ⁴¹) D. E. Green, L. F. Leloir u. V. Nocito, J. biol. Chemistry 161, 559 [1945].
- ⁴²) H. C. Ichstein, I. C. Gunsalus, W. W. Umbreit, J. biol. Chemistry 161, 311 [1945].
- ⁴³) P. Karrer u. M. Viscontini, Helv. Chim. Acta 30, 52, 524 [1947].
- ⁴⁴) I. C. Gunsalus, W. W. Umbreit, J. biol. Chemistry 170, 1 [1947].
- ⁴⁵) Nature [London] 167, 557 [1951].
- ⁴⁶) Biochem. Z. 319, 305 [1949].
- ⁴⁷) Eine solche Tautomerie am Pyridin-Kern wurde tatsächlich von F. Arndt festgestellt, und zwar am γ -Oxy-pyridin, das in Tautomerie mit γ -Pyridon steht (Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 587, 2965 [1930]). Gelbgefärbte Kondensationsprodukte zwischen Pyridoxal und Aminosäuren wurden inzwischen auch von D. Heyl, A. Harris u. K. Folkers, J. Amer. Chem. Soc. 70, 3429 [1948], beschrieben.
- ⁴⁸) F. Knoop, Klin. Wschr. 17, 1309 [1938].

der beiden Haftstellen ist bei den verschiedenen Aminosäure-Decarboxylasen verschieden groß und es kommt daher die zweipolige Bindung nur bei der einer Decarboxylase zugeordneten Aminosäure zustande. Eine zweipolige Bindung ist auch bei der Blockierung einer der beiden Haftstellen, z. B. der Aldehydgruppe durch HCN oder der Haftstelle am Trägerprotein, z. B. durch Brenzkatechin⁴⁶), unmöglich.

Die Frage, ob die Decarboxylierungsreaktion umkehrbar ist, wurde kürzlich von *Gunsalus* diskutiert¹⁰). Danach spricht für die Umkehrbarkeit der Reaktion, daß Alanin, Lysin, Threonin und Cystin bei gewissen Mikroorganismen ersetzt werden können durch Vitamin B₆, Arginin, Phenylalanin und Tyrosin durch Vitamin B₆ und CO₂. Von der ersten Aminosäure-Gruppe ist eine, von der zweiten sind alle Aminosäuren fermentativ decarboxylierbar. *C. N. Lyman*⁴⁹) fand eine zusätzliche Anregung des Wachstums von *Lactobacillus arabinosus* in Gegenwart eines Überschusses an Vitamin B₆ und CO₂ und Phenyläthylamin an Stelle von Phenylalanin, sie war allerdings gering und bedarf noch der Bestätigung. Da Ornithin das Putrescin als Wuchsstoff bei *B. parainfluenza* nicht ersetzen kann, liegt seine Funktion nicht in einer Umkehr der Decarboxylierung. Tryptophan und Histidin können bei wachsenden Mikroorganismen ersetzt werden durch Vitamin B₆ und Indol, bzw. Brenztraubensäure, aber auch hier finden keine Carboxylierungen statt. Im ersten Falle kondensieren Indol und Serin zu Tryptophan unter der katalytischen Wirkung von Pyridoxalphosphat als Co-Enzym, im letzten Falle führt eine Transaminierung zu Histidin¹⁰).

Bedeutung der Aminosäure-Decarboxylasen für die Bakterien

Die Decarboxylasen werden von den Bakterien gebildet, wenn sie in saurem, die Desaminasen wenn sie in alkalischem Medium wachsen. Etwa in der Mitte des p_H-Bereiches werden beide Enzymtypen nicht in nennenswertem Umfang gebildet. Decarboxylase-führende Bakterien zeigen normales Wachstum, auch wenn sie auf vereinfachten Nährböden keine Decarboxylase aufbauen können. Die Decarboxylasen werden, wie die Desaminasen, erst gegen Ende der aktiven Zellteilung gebildet. Diese Tatsachen sprechen gegen eine besondere Bedeutung der Decarboxylasen wie auch der Desaminasen für Wachstum, Stoffwechsel oder aktive Zellteilung der Bakterien. Da die Wirkung der Decarboxylasen mit einer Verschiebung des p_H von der sauren Seite, zum Neutralpunkt hin verbunden ist, dürfte die Bedeutung der Decarboxylasen und Desaminasen darin liegen, die Bakterien zu befähigen, in einem Medium weiterzuleben, welches durch ihren Stoffwechsel während der frühen Stadien des Wachstums in ungünstigem Sinne verändert wurde. Möglicherweise wird abgespaltenes CO₂ assimiliert, das für das Wachstum vieler Bakterien von wesentlicher Bedeutung ist. Putrescin (aus Orangensaft) ist ein natürlicher Wuchsstoff für *Hämophilus parainfluenza* 7091⁵⁰), Histamin für *Esch. coli* 778 und *A. aerogenes* 688⁵¹). Putrescin kann als Wuchsstoff durch Spermin, Spermidin und Agmatin, nicht aber durch Ornithin, Äthylen- und Trimethylen-diamin, n-Butylamin oder Cadaverin ersetzt werden. Das bei der Decarboxylierung von Asparaginsäure gelieferte β-Alanin dient als Baustein des Bakterienwuchsstoffs Pantothensäure, was daraus hervorgeht, daß alle Bakterien, die Asparaginsäure-α-decarboxylase enthalten, in einem synthetischen Medium ohne Zusatz von β-Alanin oder Pantothensäure wachsen¹⁶). Cystamin-pantothenat⁵²) ist ein Wuchsstoff für *Bact. bulgaric*. Damit ist ein weiteres Decarboxylierungsprodukt als funktionell bedeutsam erkannt. Bei der Ähnlichkeit der Stoffwechselsysteme im Reich der Mikroorganismen ist eine allgemeinere Wuchsstoff-Funktion der Decarboxylierungsprodukte von Aminosäuren zu erwarten. Somit dürfte den Aminosäure-Decarboxylasen für bestimmte Mikroorganismen nicht nur eine „Notfalls“, sondern auch eine fundamentale Funktion zukommen.

⁴⁹⁾ J. biol. Chemistry 167, 177 [1947].

⁵⁰⁾ E. I. Herbst u. E. E. Snell, ebenda 176, 939 [1948].

⁵¹⁾ Sterzl u. Krček, Nature [London] 164, 700 [1949].

⁵²⁾ E. E. Snell, S. M. Brown, V. I. Peters, I. A. Craig, E. L. Little, I. A. Moore, V. M. McGlohon u. D. D. Bird, J. Amer. Chem. Soc. 72, 5349 [1950].

II. Aminosäure-Decarboxylasen in Pflanzen

In Pflanzen wurde bisher nur eine Decarboxylase nachgewiesen und genauer beschrieben¹⁷), nämlich die Glutaminsäure-Decarboxylase, die von *Okunuki* 1937 entdeckt wurde und Glutaminsäure zu γ-Aminobuttersäure decarboxyliert. Das Ferment ist im Pflanzenreich weit verbreitet^{17, 53}). Besonders fermenthaltig ist z. B. der Rettich, der Pfebenkürbis, der Pfeffer und die Frucht des Avocadobaumes. Das p_H-Optimum beträgt 5,6. Das Ferment ist wenig empfindlich, kann mit den üblichen Methoden angereichert und zur quantitativen Bestimmung von L-Glutaminsäure herangezogen werden. Zum Unterschied vom Bakterienenzym wird es durch Dialyse gegen Wasser leicht in Co- und Apo-Enzym zerlegt⁵⁴). Auch hier wirkt Pyridoxalphosphat als Co-Ferment⁵⁵). Die Glutaminsäure steht im tierischen und pflanzlichen Organismus im Mittelpunkt von Transaminierungsreaktionen, die bei neutraler Reaktion mit optimaler Geschwindigkeit verlaufen. Im pflanzlichen Organismus tritt im schwach sauren Milieu die Glutaminsäure-Decarboxylase mit der Transaminase in Konkurrenz.

Urticaceen und *Chenopodiaceen* enthalten größere Mengen von Histamin, Ginster enthält Oxytyramin. Die zugehörigen Decarboxylasen konnten aus diesen Pflanzen nicht isoliert werden. Doch ergab der Zusatz von Histidin oder Dioxyphenylalanin zur Nährösung von Spinat-, bzw. Ginster-Keimlingen eine Vermehrung des Histamin-, bzw. Oxytyramin-Gehaltes in den Keimlingen. Andere Pflanzenkeimlinge waren zu dieser Aminbildung nicht befähigt^{55, 56}).

III. Aminosäure-Decarboxylasen des tierischen Organismus^{3-6, 9, 12})

Durch tierische Gewebe werden decarboxyliert: Histidin^{57, 58}), Tyrosin^{59, 60}), Dioxy-phenylalanin⁶¹), Oxyphenylserin⁶²), Dioxyphenylserin⁶³), Cysteinsäure⁶⁴), Glutaminsäure^{18, 65}) und Tryptophan⁶⁶). Die dabei wirksamen Fermente sind Lyoenzyme mit einem Wirkungsoptimum im schwach alkalischen Gebiet, zum Unterschied von den Bakterienenzymen, die nur bei stärker saurer Reaktion aktiv sind. In wäßrigen Lösungen sind sie wenig haltbar und werden beim üblichen Behandeln mit Aceton-Äther meist zerstört. Sie sind daher noch nicht wesentlich angereichert worden. Sie verhalten sich gegenüber Cyanwasserstoff und Carbonyl-Reagentien wie die Bakterienfermente und bestehen wie diese, soweit untersucht, aus einem spezifischen Trägerprotein und Pyridoxalphosphat. Alle Decarboxylasen werden durch Aufkochen zerstört. Nur freie L-Aminosäuren werden decarboxyliert. Hauptfundorte der tierischen Decarboxylasen sind Niere, Leber, Darm, Pankreas. Höchste Aktivitäten zeigen Kaninchen- und Meerschweinchenniere.

Im folgenden seien nur die wichtigsten Daten über die Aminosäure-Decarboxylasen tierischer Gewebe zusammengestellt.

1) Histidin-Decarboxylase^{1-6, 9})

p_H-Optimum zwischen 8 und 9, isoelektrischer Punkt bei p_H 6,5. Die Aktivitäts-p_s-Kurve hat S-Form, doch ist der Aktivitätsabfall bei überoptimaler Substratkonzentration gering. Optimum der Substratkonzentration etwa 0,1 molar.

Die Überführung des Fermentes in ein wirksames Trockenpulver ohne wesentlichen Wirksamkeitsverlust gelingt durch Entwässerung der Extrakte mit Aceton und Äther bei -10°. Gegenüber Säure und Laug (ab p_H 5, bzw. p_H 9) ist das Ferment sehr empfindlich. Durch Papain und Trypsin wird es zerstört.

Eine Zerlegung in Apo- und Co-Enzym gelang bisher nicht, immerhin wurde durch Pyridoxal-5-phosphat das Ferment aus Meerschweinchenniere aktiviert, während es durch Pyridoxin – im Gegensatz zur Dopa-Decarboxylase – gehemmt wird.

Da eine Decarboxylierung des Histamins auch in vivo eintritt, dürfte das im Organismus verbreitete und physiologisch besonders bedeutsame Histamin der Histidin-Decarboxylase seine Entstehung verdanken. Außer

⁵⁷⁾ O. Schales, V. Mimes u. S. S. Schales, Arch. Biochem. 10, 455 [1946].

⁵⁸⁾ E. Werle u. S. Brüninghaus, Biochem. Z. 321, 492 [1951].

⁵⁹⁾ E. Werle u. A. Raub, Biochem. Z. 318, 538 [1948].

⁶⁰⁾ Über weitere Möglichkeiten der Amin-Entstehung in Pflanzen s. 1).

⁶¹⁾ E. Werle, Biochem. Z. 288, 292 [1936]; E. Werle u. H. Herrmann, Biochem. Z. 291, 105 [1937].

⁶²⁾ P. Holtz u. R. Heise, Arch. exper. Path. 186, 377 [1937].

⁶³⁾ E. Werle u. G. Mennicken, Biochem. Z. 291, 325 [1937].

⁶⁴⁾ P. Holtz u. H. Janisch, Arch. exper. Path. 186, 684 [1937].

⁶⁵⁾ P. Holtz, R. Heise u. K. Lüdtke, Arch. exper. Path. 191, 87 [1938].

⁶⁶⁾ E. Werle u. W. Peschel, Biochem. Z. 320, 1 [1949].

⁶⁷⁾ H. Blaschko, K. H. Beyer, J. H. Burn u. H. Langemann, Nature [London] 165, 926 [1950].

⁶⁸⁾ H. Blaschko, Biochem. J. 36, 571 [1942].

⁶⁹⁾ W. J. Wingo u. I. Awapara, J. biol. Chemistry 187, 267 [1950].

in den erwähnten Organen findet sich das Ferment in der Magenschleimhaut⁶⁶) und der Haut⁶⁷) des Menschen, ferner in der Giftdrüse der Biene⁶⁸), deren Sekret Histamin enthält.

2) Dopa-Decarboxylase^{1-6, 9)}

Das von P. Holtz⁶¹) entdeckte Ferment hat von allen tierischen Decarboxylasen die höchste Aktivität. Eine Trennung in Apo- und Co-Decarboxylase gelingt durch 4-tägige Dialyse des durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung vorgereinigten Fermentes gegen 0,002 mol. Ammonium bei 0°⁶¹). Durch Pyridoxalphosphat kann das Apo-Enzym zum Holoenzym ergänzt werden⁶¹), wobei die Gegenwart von verschiedenen Substanzen, wie Glutathion oder Cystein vorteilhaft sein soll⁶⁸). Auch gealterte Enzymlösungen werden durch Pyridoxalphosphat aktiviert⁶⁸). Nach Blaschko sinkt die Dopa-Decarboxylase-Aktivität in der Leber bei Pyridoxin-Mangel-Ratten und steigt nach Zusatz von Pyridoxal und ATP zu den Leberextrakten wieder an⁶⁸.

Die Spezifität des Enzyms wurde bereits besprochen. Haltbare Trockenpulver können durch lyophilisierendes Trocknen der bei 0° gewonnenen Organextrakte gewonnen werden⁶⁸). Das pH-Optimum liegt bei 6,8, das Temperaturoptimum bei 30°, die Michaelis-Konstante zwischen M=0,125-0,21×10⁻⁵.

Die Dopa-Decarboxylierung geschieht auch *in vivo*. Nach i.v. Injektion des Substrates kann das Decarboxylierungsprodukt Oxytyramin im Blut und Urin nachgewiesen werden. Seine Entstehung verrät sich auch durch die bedeutende Blutdrucksteigerung und Hyperglykämie, die es auslöst. Oxytyramin kommt auch physiologisch im Urin vor⁷⁰.

Nach P. Holtz hat die Dopa-Decarboxylase entscheidenden Anteil an der Entstehung des Adrenalin und Noradrenalin des Nebennierenmarkes⁷¹) (s. u.).

3) Decarboxylierung von Oxyphenylserin und Dioxyphenylserin⁶²⁾

D-L-Oxyphenylserin, nicht aber D-L-Phenylserin wird durch Extrakte aus Nieren von Meerschweinchen, Nebennieren und Pankreas von Rindern decarboxyliert. Die Decarboxylierung bleibt stets sehr unvollständig. Das wirksame Ferment ist von der Tyrosin- und Dopa-Decarboxylase verschieden, weil es viel weniger beständig ist als diese und im Gegensatz zu ihnen durch 0,001 mol. Cyanwasserstoff aktiviert wird⁶²).

β-3,4-Dioxy-phenylserin wird durch Meerschweinchen-Nierenextrakt zu L-Noradrenalin decarboxyliert⁶³). N-methyl-dioxyphenylserin, die sog. Adrenalin-carbonsäure, wird nicht angegriffen⁶³). Adrenalin entsteht also sicher nicht durch Decarboxylierung der Adrenalin-carbonsäure. Es könnte entstehen durch Decarboxylierung von Dioxy-phenylserin und nachfolgende fermentative N-Methylierung, die durch E. Büllring⁷²) nachgewiesen wurde. Ob Dioxy-phenylserin die unmittelbare Vorstufe des Noradrenalin darstellt, ist noch nicht entschieden. Durch Versuche mit markiertem Phenylalanin ist sichergestellt, daß der Organismus Phenylalanin zur Adrenalin-Synthese verwenden kann⁷³).

4) Tyrosin-Decarboxylase^{1-6, 9)}

Bezüglich Vorkommen, Hemmbarkeit und allgemeine Eigenschaften gilt das für die tierischen Decarboxylasen einleitend Gesagte. Nach G. J. Martin ist Tyrosin für Ratten bei pyridoxin-haltiger Nahrung günstiger als bei pyridoxin-freier, was darauf zurückgeführt wird, daß bei der Mangelernährung keine Tyrosin-Decarboxylase und damit kein Tyramin gebildet werden kann⁷⁴). Dopa- und Tyrosin-Decarboxylase (aus Niere) können durch Adsorption der letzteren an Kaolin getrennt werden.

5) Tryptophan-Decarboxylase⁵⁹⁾

Das Ferment ist in Lebern von Meerschweinchen, Kaninchen, Schweinen und Rindern enthalten⁷⁵). Wirkungsmaximum bei etwa pH 7. Durch Magnesium-Ionen wird es aktiviert. Blausäure aktiviert in 0,001 mol. Lösung, in höherer Konzentration hemmt sie⁷⁵).

6) Cysteinsäure-Decarboxylase^{6, 9)}

Das Ferment wurde von Blaschko entdeckt. Es ist streng spezifisch auf L-Cysteinsäure eingestellt. L-Homocysteinsäure hat zwar Affinität zum Ferment, wird aber nicht angegriffen. Asparaginsäure, welche in bezug auf den Gehalt an polaren Gruppen und ihren räumlichen Abstand der Cysteinsäure nahesteht, hemmt die Cysteinsäure-Decarboxylase nicht⁶⁸).

Das Ferment ist⁶⁴) in der Leber von Hund, Ratte, Meerschweinchen und Schwein, ferner in der Darmwand von Meerschweinchen⁶⁴) nachgewiesen worden. Es fehlt in der Leber und Niere einiger Tierarten, deren Galle Taurin enthält.

Die Aktivität der Leberextrakte von männlichen Ratten ist etwa doppelt so hoch wie die von weiblichen. Der Unterschied verschwindet durch Kastration der weiblichen, nicht aber der männlichen Tiere. Die

⁶⁶⁾ E. Werle, unveröffentlicht.

⁶⁷⁾ G. Stüttgen, Biochem. Z. 1950.

⁶⁸⁾ P. Gonnard, Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 194 [1949].

⁶⁹⁾ H. Blaschko, C. W. Carter, J. R. P. O'Brien u. G. H. Sloane-Stanley, J. Physiol. 107, 18 [1948].

⁷⁰⁾ P. Holtz, K. Credner u. G. Kroneberg, Arch. exper. Path. Pharm. 204, 288 [1947].

⁷¹⁾ P. Holtz u. K. Credner, Arch. exper. Path. Pharm. 204, 244 [1947].

⁷²⁾ Brit. J. Pharmacol. 4, 234, 245 [1949].

⁷³⁾ S. Gurin u. A. M. Deluwa, J. biol. Chemistry 170, 545 [1947].

⁷⁴⁾ G. J. Martin, J. Biol. Chem. 166, 389 [1946].

⁷⁵⁾ G. Martin, Inaug. Diss. München 1949.

Ferment-Aktivität sinkt bei den weiblichen Tieren nach Injektion von Oestron ab⁷⁶). Nach i.v. Injektion von Cystein in der Leber gebildetes Taurin wurde von Work⁷⁷) papierchromatographisch nachgewiesen.

Das Ferment ist in Lösung wenig haltbar, doch kann es nach Vorrangigung durch Aceton in ein aktives Trockenpulver übergeführt werden⁷⁸). Es wird durch HCN, Hydroxylamin und Semicarbazid stark gehemmt. Bei der Dialyse nimmt seine Aktivität rasch ab, sie kann durch eingegengtes Außendialysat und durch Pyridoxalphosphat teilweise wieder hergestellt werden⁶⁴). Bei pyridoxin-freier ernährten Ratten sinkt außer der Dopa-Decarboxylase auch die Cysteinsäure-Decarboxylase-Aktivität der Leber ab. Sie wird aber durch Zusatz von Pyridoxalphosphat zum Leberextrakt nicht wieder hergestellt⁶⁹).

7) Glutaminsäure-Decarboxylase¹⁸⁾

Nach Roberts und Frenkel¹⁸) kommt γ-Aminobuttersäure in frischem Mäuse-, Ratten-, Kaninchen-, Meerschweinchen-, Menschen- und Froschhirn vor. Die Menge an γ-Aminobuttersäure wird in Gegenwart von Glutaminsäure vermehrt, wenn bei pH 7,2 mit Hirnhomogenat von Mäusen oder Aceton-Trockenpulver aus Mäusehirn inkubiert wurde. Homogenate und sterile Autolyse von Leber, Muskel, Tumoren enthalten γ-Aminobuttersäure. Möglicherweise enthalten alle diese Gewebe eine Glutaminsäure-Decarboxylase, die mit Sicherheit in Mäuse- und Rattenhirn nachgewiesen wurde. pH-Optimum 6,8, Michaelis-Konstante 0,021 Mol. Das Ferment wird gehemmt durch HCN, Semicarbazid, Hydroxylamin, nicht durch Octylalkohol. Gegenüber Asparaginsäure ist es inaktiv, doch wird es durch hohe Asparaginsäure-Konzentrationen gehemmt^{17, 68}).

Physiologische Bedeutung der Decarboxylasen im tierischen Organismus^{6, 9)}

Die Aufgabe der Aminosäure-Decarboxylasen besteht darin, spezifische, biologisch hochaktive Substanzen, wie Histamin und Noradrenalin zu bilden, die z. B. als Überträger der Erregung von Nerven auf ihre Erfolgsorgane von fundamentaler physiologischer Bedeutung sind. Dies erklärt den engen Spezifitätsbereich der Enzyme und ihre schwache Wirksamkeit in tierischen Organen. Nur die L-Dopa-Decarboxylase ist so hochaktiv, daß der Hauptabbauweg für L-Dopa über Decarboxylierung und anschließende oxydative Desaminierung durch die Monaminoxydase erfolgen könnte. Ihre hohe Aktivität würde auch verständlich, wenn sich ergeben sollte, daß das Ferment physiologisch für die Decarboxylierung des Dioxy-phenylserins zum Noradrenalin verantwortlich ist, die mit viel geringerer Geschwindigkeit abläuft als die von Dopa.

Ob das Taurin bei allen Tieren seine Entstehung der Decarboxylierung von Cysteinsäure verdankt, ist noch fraglich, die Funktion der γ-Aminobuttersäure im Gehirn noch unbekannt. Möglicherweise gibt es noch andere Aminosäure-Decarboxylasen im tierischen Organismus. So ist die Entstehung des Spermins und Spermidins noch durchaus ungeklärt; auch ist noch nicht entschieden, ob Putrescin, das in Leberautolyse nachweisbar ist, bakteriell gebildet wird. Cystinuriker scheiden im Harn Putrescin und Cadaverin aus. Beide Amine werden nach Verabreichung beim Gesunden im Harn nicht angetroffen. Es wäre denkbar, daß auch beim Gesunden Putrescin und Cadaverin normalerweise im Stoffwechsel entstehen, daß aber die Diaminoxydase, insbes. in der Niere, die Ausscheidung der Substanzen verhindert⁶⁸).

Athanolamin, ein wichtiger Baustein der Kephaline und Sphingomyeline, kann im tierischen Organismus durch Decarboxylierung von Serin entstehen¹). Eine entsprechende Decarboxylase ist allerdings noch nicht beschrieben worden.

Der tierische Organismus ist zur Synthese des Pyridoxalphosphates nicht befähigt. Zur Bildung der Decarboxylasen und der Transaminasen ist er auf die Zufuhr von Pyridoxal, Pyridoxamin oder Pyridoxin aus pflanzlichem Material oder den Darmbakterien angewiesen. Unterbleibt sie, so stellen sich Mangelerscheinungen ein. Es kommt zu Störungen des Wachstums, der Blutbildung, der Hautfunktion, der Muskelinnervation und der Muskelbeschaffenheit, die durch Injektion von Pyridoxal, Pyridoxamin oder Pyridoxin in gleicher Weise behoben werden können. Inwieweit die Ausfallserscheinungen auf die Aktivitätsabnahme der Aminosäure-Decarboxylasen und Transaminasen zurückzuführen sind, ist noch unbekannt.

Eingeg. am 8. September 1951 [A 387]

⁷⁶⁾ G. H. Sloane-Stanley, Biochem. J. 45, 556, [1949].

⁷⁷⁾ E. Work, Nature [London] 165, 74 [1950].

⁷⁸⁾ H. Blaschko, Biochemic. J. 39, 76 [1945].