

durch in der Molekel bewirkte Änderung ist ohne Einfluss auf die Symmetrie der Molekel und lässt deshalb das Absorptionsspektrum der Substanz im Wesentlichen unberührt.

Zu diesen Messungen fanden dieselben Präparate von Phenolindophenol, *Bindschedler's* Grün und Phenolblau Verwendung, welche früher (s. Zitat 3) zu potentiometrischen Untersuchungen gebraucht wurden. Malachitgrün wurde als Perchlorat aus Eisessig umkrystallisiert.

Chemisches Institut der Universität Zürich.  
Chemisches Laboratorium der Stadt Zürich.

---

### 185. Zur Kenntnis der Diamin-oxydase.

#### 3. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Poly-aminen<sup>1)</sup>

von E. Albert Zeller.

(1. XI. 38.)

In der vorangehenden Mitteilung dieser Reihe<sup>2)</sup>, hier als Mitteilung 2 zitiert, wurde der Nachweis geleistet, dass die Histaminase nicht, wie man früher annahm, spezifisch auf Histamin eingestellt ist, sondern dass das Enzym auch Äthylen-diamin, Putrescin, Cadaverin und Agmatin oxydativ desaminiert, wobei pro Molekel verbrauchten Sauerstoffs eine Molekel Wasserstoffperoxyd entsteht.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Problem der Spezifität erneut studiert und dabei weitere geeignete Substrate gefunden (Trimethylen-diamin, Spermin, Spermidin). Dadurch wurden die Bedingungen, die ein Körper erfüllen muss, damit er von der Diamin-oxydase angegriffen wird, genauer bekannt, und es fand sich beispielsweise ein Einfluss des Abstandes der zwei basischen Gruppen und der Substitution der letzteren. Für die Untersuchung der Enzymreaktion erwiesen sich verschiedene Carbonylreagentien und substituierte Guanidine als besonders günstig, und es konnten aus diesen Versuchen Rückschlüsse auf den Bau der prosthetischen Gruppe der Diamin-oxydase gemacht werden. Die Einwirkung der Blausäure wurde als neuer Typus einer Blausäure-Fermentreaktion erkannt. Durch die völlige Zerstörung des Enzyms durch eiweisspaltende Fermente wurde die Beteiligung von Eiweiss am Aufbau der Diamin-oxydase sichergestellt. Um einen Einblick in die Grösse der Redox-Potentiale zu erhalten, wurde das System Enzym-Substrat bei Anwesenheit einer Reihe von verschiedener Redox-Indikatoren geprüft.

---

<sup>1)</sup> Vorläufige Mitteilung: *E. A. Zeller*, *Naturwiss.* **26**, 578 (1938).

<sup>2)</sup> *E. A. Zeller*, *Helv.* **21**, 880 (1938); *Naturwiss.* **26**, 282 (1938).

Ausser den aufgezählten Fermentgiften wurden noch mehrere andere angewandt. Bei den Versuchen, die Diamin-oxydase in verschiedene Komponenten zu zerlegen, wurde ein bis jetzt in Schweineniere und Rattenleber vorhandener sehr wirksamer Aktivator von Eiweiss- oder Enzymnatur gefunden.

### Methodisches.

Die Methoden sind im allgemeinen dieselben, wie die in der Mitteilung 2. Es werden hier einige Abänderungen und Ergänzungen angeführt.

#### a) Fermentpräparate.

Ferment I ist das in Mitteilung 2 angewandte. Ferment II wird aus gemahlener Schweineniere durch Fällen mit der vierfachen Menge Aceton und durch sofortiges und rasches Absaugen des Niederschlags gewonnen. Aktivator aus Schweineniere: Der Organbrei wird mit Sand verrieben, mit der gleichen Menge Wasser im Eisschrank mehrere Stunden stehen gelassen, zentrifugiert, die Lösung mit zwei Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, der Niederschlag in wenig Wasser gelöst, 48 Stunden gegen fließendes Wasser aus Cellophanschläuchen dialysiert, zentrifugiert und die Lösung mit 2 Volumen eiskaltem Aceton gefällt und der Niederschlag getrocknet. Aktivator aus Rattenleber: Dieser wird in gleicher Weise gewonnen. Am Schluss wird der Niederschlag zweimal auf der Zentrifuge mit 0,002-m.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gewaschen. *d*-Aminosäureoxydase: Rattennieren werden mit der zwei- bis dreifachen Menge Phosphatpuffer  $p_{\text{H}}$  7,2 verrieben, zentrifugiert und 24 Stunden gegen denselben Puffer bei 2° dialysiert. Trypsin: Pankreatinum absol. *Merck*. Pepsin: Pepsinum pulv. solub. *Merck*.

#### b) Fermentlösungen.

Ferment I und II: 1 Teil Trockenpulver wird mit 20 Teilen 2,5-proz. Natriumchloridlösung bei 38° extrahiert, filtriert und mehrere Tage gegen 2,5-proz. Kochsalzlösung dialysiert.

Aktivator: 1 Teil wird mit 20 Teilen Phosphatpuffer 10 Minuten verrieben und zentrifugiert. Davon werden 0,2 cm<sup>3</sup> zu jedem Ansatz zugegeben.

#### c) Substrate und Zusätze.

Alle Angaben von Konzentrationen beziehen sich auf das Gesamtvolumen. Die Präparate stammen mit wenigen Ausnahmen von der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co.*, Basel<sup>1)</sup>. Sie werden wenn immer möglich in 0,066-m. Phosphatpuffer, dessen  $p_{\text{H}}$  6,8 beträgt, gelöst. Freie Säuren und Basen werden mit molarem primärem und sekundärem Phosphat neutralisiert und die Lösung soweit verdünnt, bis die Pufferkonzentration wieder 0,066-m. ist. Spermin wird in Wasser gelöst und mit Natriumhydroxyd neutralisiert. Dekamethylen-diguanid gelangt in Form von Synthalin A (*Schering-Kahlbaum*) zur Verwendung. Eine Pille wird mit 2 cm<sup>3</sup> Puffer verrieben und vom Unlöslichen abfiltriert. Von den Redox-Indikatoren (*British Drug Houses*, London) werden 0,05-proz. Lösungen in Puffer hergestellt.

#### d) Ansätze für Ammoniakbestimmung.

2,5 cm<sup>3</sup> Fermentlösung wird mit 2,5 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer 0,066-m.  $p_{\text{H}}$  6,8 und mit den in diesem gelösten Zusätzen versetzt, Endkonzentration des Puffers 0,033-m. Substratkonzentration und Versuchsdauer werden so gewählt, dass im Zeitpunkt der Ammoniakbestimmung nicht alles Diamin zerlegt ist (Ausnahme Tabelle 2). Die Inkubation geschah entweder in grossen Reagensgläsern, durch die Luft oder Sauerstoff perlte, oder in Mikro-*Kjeldahl*-Kolben, die mit 120 Oszillationen in der Minute geschüttelt

<sup>1)</sup> Der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co.* danke ich für die Überlassung einer Menge Spermin-hydrochlorid.

wurden. Dieser Unterschied ist besonders für kurz dauernde Versuche wichtig, weil durch das Schütteln am Anfang Ammoniak verschwindet und die von *McHenry* und *Gavin*<sup>1)</sup> gefundene Inkubationsperiode verlängert wird. Wie die Kurven der Figuren 3, 5, 6 und 7 zeigen, nimmt aber trotz des Schüttelns der Sauerstoffverbrauch regelmässig von Anfang an zu. Dehydrierung und Desaminierung gehen demnach am Anfang nicht parallel.

e) Messung des Sauerstoffverbrauchs.

Zu 1,5 cm<sup>3</sup> Fermentlösung wird 1 cm<sup>3</sup> 0,066-m. Phosphatpuffer (Endkonzentration 0,046-m.) gegeben.

f) Versuche mit Pepsin und Trypsin.

5 cm<sup>3</sup> Ferment werden mit 0,1 g Pepsin und mit 5 cm<sup>3</sup> 0,1-m. HCl vermischt, eine Probe nur mit Wasser und eine nur mit HCl. Nach einstündiger Inkubation wird die Lösung mit *Sørensen*'schem Borat auf p<sub>H</sub> 6,8 umgepuffert und mit 0,001-m. Histamin eine Diamin-oxydase-Reaktion angeschlossen, die durch den Ersatz von Phosphat- durch Boratpuffer nicht beeinflusst wird (Abschnitt 11). In gleicher Weise wird mit Trypsin verfahren (0,05 g auf 5 cm<sup>3</sup> Fermentlösung). Nach der Inkubation wird das 0,033-molare sekundäre Phosphat mit primärem von der gleichen Konzentration umgepuffert und die Lösungen einige Stunden dialysiert.

1. Über den Abbau von aliphatischen Diaminen.

Um die Reihe der Diamine zu vervollständigen, wurde auch das Trimethylen-diamin geprüft und gefunden, dass eine Ammoniakbildung stattfindet, deren Grösse zwischen der aus Äthylen-diamin und Putrescin liegt. In der Figur 1 ist ein Versuch wiedergegeben, bei dem die Desaminierung der Reihe der Diamine vom Äthylen- bis zum Pentamethylen-diamin bei gleicher Konzentration gemessen wurde. Die allgemeinen Versuchsbedingungen sind, wie auch für die folgenden Tabellen und Kurven, im vorangehenden Abschnitt genau angeführt.

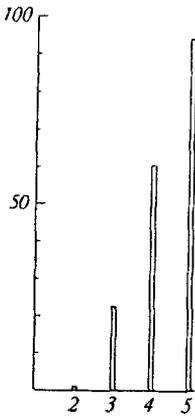


Fig. 1.

Abszisse: Zahl der C-Atome (2 bis 5)  
 Ordinate: Stickstoff in γ  
 Ferment II, Substrate 0,002-m., 7,5  
 Stunden, *Kjeldahl*-Kolben.

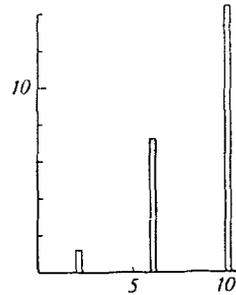


Fig. 2.

Abszisse: 10<sup>-3</sup> Mol Äthylen-diamin  
 Ordinate: Stickstoff in γ  
 Ferment II, *Kjeldahl*-Kolben, Dauer  
 6 Stunden.

<sup>1)</sup> *E. W. McHenry* und *G. Gavin*, *Biochem. J.* **26**, 1365 (1932).

Der Umsatz nimmt bei der gewählten Versuchsanordnung mit grösser werdendem Abstand der Aminogruppen nahezu linear zu, 0,002-m. Äthylen-diamin wird wegen seiner geringen Affinität zum Ferment kaum angegriffen; mit steigender Konzentration aber findet doch ein deutlicher und immer stärker werdender Abbau statt, Fig. 2.

Desaminierungsgeschwindigkeit und Affinität gehen nicht parallel; so hemmt beispielsweise Äthylen-diamin den Abbau von Cadaverin stärker als Trimethylen-diamin.

Tabelle 1.

Ferment II, Kjeldahl-Kolben, 16 Stunden, Substrat 0,002-m.

	$\gamma$ N
Ferment allein. . . . .	5
Ferment + Äthylen-diamin . . . . .	11,5
Ferment + Trimethylen-diamin . . . . .	18
Ferment + Cadaverin . . . . .	151
Ferment + Äthylen-diamin + Cadaverin . . . . .	34
Ferment + Trimethylen-diamin + Cadaverin . . . . .	63

Ein ähnliches Verhältnis besteht zwischen Cadaverin und Histamin. Aus der Tabelle 3 der Mitteilung 2 ist zu ersehen, dass aus Cadaverin in der angegebenen Versuchszeit die doppelte Menge Ammoniak in Freiheit gesetzt wurde. Im Konkurrenzversuch aber zeigte es sich, dass die Desaminierung nur mit einer dem Histamin entsprechenden Geschwindigkeit erfolgte.

Mit diesen Versuchen ist ein Schritt zur schärferen Erfassung der Spezifität der Diamin-oxydase erreicht: Nicht nur das Vorhandensein von zwei basischen Gruppen ist ausschlaggebend, sondern auch deren gegenseitiger Abstand.

## 2. Die Menge des durch die Diamin-oxydase abspaltbaren Ammoniaks.

In den üblichen Ansätzen hört die Desaminierung nach Abspaltung einer Molekel Ammoniak pro Mol Substrat auf. Bei der Verwendung nichtdialysierter Enzymlösungen und bei sehr kleiner Substrat-Konzentration geht die Reaktion jedoch weiter, sodass z. B. beim Histamin noch eine zweite und dritte Molekel Ammoniak frei wird. Die Verhältnisse sind der Einfachheit halber in der Form einer Tabelle wiedergegeben.

McHenry und Gavin<sup>1)</sup> hatten festgestellt, dass pro Mol Histamin ein Mol Ammoniak gebildet wird, und dass die freie nach van Slyke bestimmbare Aminogruppe verschwindet<sup>2)</sup>. Best und McHenry<sup>3)</sup> nahmen auf Grund ihrer Versuche an, dass neben dieser Desaminie-

<sup>1)</sup> Biochem. J. **26**, 1365 (1932).

<sup>2)</sup> Biochem. J. **29**, 622 (1935).

<sup>3)</sup> J. Physiol. **70**, 349 (1930).

rung der Seitenkette eine Öffnung des Histaminringes erfolge. Nach einer mündlichen Verhandlung mit Herrn Prof. Dr. *E. W. McHenry* soll das ringaufspaltende Ferment als Histaminase im engeren Sinn, und das die freie Aminogruppe oxydativ desaminierende, entsprechend den Resultaten der 2. und 3. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe als Diamin-oxydase bezeichnet werden.

**Tabelle 2.**  
Fermentlösung I.

Enzym	Substrat	Molarität	$\gamma$ N gef.	$\gamma$ N berechnet für 1 Atom N
dialysiert	Histamin	0,00001-m.	83	28
„	„	0,00025-m.	112	70
„	„	0,0005-m.	140	140
„	„	0,001-m.	270	280
dialysiert	Putrescin	0,001-m.	71	70
„	„	0,002-m.	128	140
dialysiert	Cadaverin	0,002-m.	119	140
„	„	0,001-m.	48	42
„	„	0,001-m.	44	42
dialysiert	Agmatin	0,00033-m.	18,5	14
„	„	0,001-m.	62	42
„	„	0,002-m.	87	84
„	„	0,004-m.	133	168
nicht dial.	Histamin	0,001-m.	332	140

### 3. Über den Abbau von Spermin und Spermidin.

Es war weiterhin wichtig zu wissen, ob auch Körper mit mehr als zwei basischen Funktionen durch die Diamin-oxydase abgebaut werden. Unter diesen boten für die vorliegende Untersuchung besonderes Interesse die beiden in vielen Säugerorganen vorkommenden Substanzen<sup>1)</sup> Spermin  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  und Spermidin  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ , über deren biologische Bedeutung und Stoffwechsel bis jetzt nichts bekannt war.

Beide Körper werden durch die Diamin-oxydase angegriffen. Die Geschwindigkeit, mit der das geschieht, ist für Spermidin ungefähr gleich wie für Trimethylen-diamin, für Spermin wesentlich geringer. Dieser Unterschied ist möglicherweise die Ursache der bekannten Tatsache, dass Spermidin in sehr viel geringerer Menge im tierischen Organismus vorkommt als Spermin. Für beide Stoffe besteht ein Substratoptimum.

<sup>1)</sup> *M. Guggenheim*, Les amines biologiques, Paris 1934, S. 176.

Tabelle 3.

Ferment II, Kjeldahl-Kolben, 16 Stunden.

	Molarität	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	—	2,4
Spermin allein . . . . .	0,01	0,6
Spermidin allein . . . . .	0,01	0,1
Ferment + Spermin . . . . .	0,002	0,8
Ferment + Spermin . . . . .	0,006	16,6
Ferment + Spermin . . . . .	0,01	10,5
Ferment + Spermidin . . . . .	0,004	22,0
Ferment + Spermidin . . . . .	0,012	44,0
Ferment + Spermidin . . . . .	0,02	41,0

Die Desaminierung der Poly-amine wird, wie es aus der Tabelle 5 hervorgeht, sicher durch dasselbe Ferment beschleunigt, wie die der Diamine. Der Abbau beider Arten von Substanzen wird durch Semicarbazid in ausserordentlich geringer Konzentration (0,0001-m. und weniger) völlig verhindert, und Spermin und Spermidin wirken gegenüber den Diaminen als „competitive inhibitors“.

Tabelle 4.

Ferment II, Durchleiten von Luft, 16 Stunden, Spermin 0,002-m., Spermidin 0,004-m.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	4
Ferment + Putrescin 0,002-m. . . . .	117
Ferment + Spermin . . . . .	10
Ferment + Spermidin . . . . .	19
Ferment + Spermin + Putrescin 0,002-m. . . . .	91,5
Ferment + Spermidin + Putrescin 0,002-m. . . . .	97
Ferment + Spermidin + Semicarbazid 0,0001-m. . . . .	3

Es wäre denkbar, dass die Bedeutung dieser Poly-amine darin läge, dass sie den Stoffwechsel des Histamins, dessen Anwesenheit im tierischen Organismus durch *D. Ackermann* und *M. Mohr*<sup>1)</sup> nun endgültig sichergestellt worden ist, in der oben angegebenen Weise beeinflussen.

#### 4. Über die Frage der Identität der *d*-Aminosäure-oxydase und der Diamin-oxydase.

In der Mitteilung 2 wurde besonders mit Hilfe von Konkurrenzversuchen wahrscheinlich gemacht, dass die zwei in der Überschrift genannten Enzyme voneinander verschieden sind. Blausäure hemmt, wie weiter unten gezeigt wird, die Diamin-oxydase unter Umständen schon in einer 0,0002-molaren Lösung, die erste Oxydationsstufe der

<sup>1)</sup> *D. Ackermann* und *M. Mohr*, Z. physiol. Ch. **255**, 75 (1938).

Aminosäuren-oxydase auch bei sehr viel höherer Konzentration gar nicht. Da es seither *K. Felix* und *K. Zorn*<sup>1)</sup> gelungen ist, mit Schweinenieren-Präparaten sowohl *d*-Aminosäuren als auch Putrescin, Cadaverin und Agmatin zu desaminieren, und die genannten Autoren die Ansicht vertraten, es handle sich um dasselbe Fermentsystem, führte ich die folgenden Versuche durch, um eine Entscheidung zwischen beiden Anschauungen zu erzielen.

Während die von mir gewöhnlich angewandten Präparate aus Schweineniere sehr gut die Diamine, aber nicht oder höchstens spurenweise die *d*-Aminosäuren abbauen, benützte ich hier als Ausgangsmaterial Rattenniere, von der schon bekannt war, dass sie eine sehr aktive *d*-Aminosäure-oxydase<sup>2)</sup>, aber keine Histaminase enthält<sup>3)</sup>. Diese Erfahrungen wurden bestätigt; denn es wurde von der Rattenniere *d,l*-Valin sehr rasch, Putrescin, Cadaverin, Histamin und *l*(+)-Alanin gar nicht desaminiert. Es wurde schon erwähnt, dass 0,0001-m. Semicarbazid die Diamin-oxydase vollständig inaktiviert, und aus der Tabelle 5 ist zu ersehen, dass die zehnfache Menge den Abbau von *d,l*-Valin eher fördert. Wie in den früheren Versuchen *d,l*-Valin den Abbau der Diamine nicht beeinflusst, so wirken hier die Diamine nicht als „competitive inhibitors“ auf die *d*-Aminosäure-oxydase.

Tabelle 5.

Rattenniere, Durchleiten von Luft, 4 Stunden, Substrate 0,0033-m., Semicarbazid 0,001-m.,  $p_H$  7,2.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	60
Ferment + <i>d,l</i> -Valin . . . . .	94
Ferment + Histamin . . . . .	45
Ferment + <i>d,l</i> -Valin + Histamin . . . . .	94
Ferment + <i>d,l</i> -Valin + Semicarbazid . . . . .	108

Aus allen diesen Versuchen geht wohl mit Sicherheit hervor, dass die beiden Fermente voneinander verschieden sind.

### 5. Das Verhalten substituierter Diamine gegenüber der Diamin-oxydase.

Am Beispiel des Histamins und des Agmatins, die man als substituierte Putrescine auffassen kann, ersieht man, dass einseitig substituierte Diamine von der Diamin-oxydase abgebaut werden können.

<sup>1)</sup> *K. Felix*, Kongressbericht II des XVI. Int. Physiol.-Kongr. Zürich 1938, S. 199. *K. Zorn*, Klin. Wochenschr. **17**, 1025 (1938).

<sup>2)</sup> *H. A. Krebs*, Z. physiol. Ch. **217**, 191 (1933); *F. Bernheim*, *M. C. L. Bernheim*, J. Biol. Chem. **109**, 131 (1935).

<sup>3)</sup> *S. Edlbacher* und *A. Zeller*, Helv. **20**, 17 (1937); *Rose*, *Bram*, *Browne*, erwähnter Kongressbericht S. 261.

Als ein an beiden Stickstoff-Atomen substituiertes Putrescin untersuchte ich Arcain (Tetramethylen-diguanid) und fand, dass auch mit sehr aktiven Enzympräparaten keine Desaminierung erfolgt, auch wenn man die Konzentration des Arcains bis auf 0,01-m. erhöhte.

Tabelle 6.

Ferment II, Durchleiten von Luft, 6 Stunden, Histamin 0,001-m.

	Molare Konzentration des Arcains	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	—	3,8
Arcain allein . . . . .	0,004	1,9
Ferment+Arcain . . . . .	0,0004	4,4
Ferment+Arcain . . . . .	0,004	4,4
Ferment+Histamin . . . . .	0,01	6,1
Ferment+Histamin . . . . .	—	49

Es wäre noch denkbar, dass das System Diamin-oxydase/Arcain wohl Sauerstoff verbraucht, aber kein Ammoniak bildet. Es wurde daher auch die Sauerstoffaufnahme gemessen, wobei das Resultat völlig negativ ausfiel.

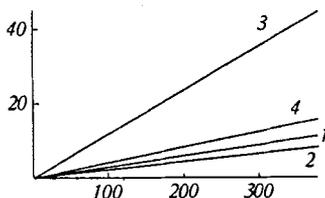


Fig. 3.

- Abszisse: Minuten
- Ordinate: mm<sup>3</sup> verbrauchter Sauerstoff
- Ferment II 1,5 cm<sup>3</sup>, Puffer ad 2,5 cm<sup>3</sup>, Cadaverin 0,002-m., Arcain 0,008-m.
- Kurve 1: Ferment allein
- Kurve 2: Ferment+Arcain
- Kurve 3: Ferment+Cadaverin
- Kurve 4: Ferment+Cadaverin+Arcain.

Es scheint also so zu sein, dass an beiden Stickstoff-Atomen substituierte Diamine für die Diamin-oxydase nicht in Frage kommen. Damit ist ein weiterer Schritt zur Präzisierung der Spezifität gelungen.

Diese Regel lässt sich sehr schön an der Abbaugeschwindigkeit von Spermin und Spermidin demonstrieren. Das Spermin kann man als symmetrisch an beiden Stickstoff-Atomen substituiertes Putrescin oder als ein an einem Stickstoff-Atom substituiertes Trimethylen-diamin betrachten. Nach dem eben Gesagten muss sich das Spermin dem Ferment gegenüber als Trimethylen-diaminderivat verhalten. Spermidin ist ein einfach substituiertes Putrescin und reagiert somit

wie Putrescin. Die Abbaugeschwindigkeit der beiden Körper sollte sich demnach ähnlich verhalten wie die des Trimethylen-diamins zu der des Putrescins, was tatsächlich der Fall ist (Tabelle 3).

Wie die voranstehende Kurve 3 zeigt, hemmt das Arcain die Diamin-oxydase. Diese Reaktion soll im Zusammenhang mit dem Einfluss der Guanidin-Derivate besprochen werden (Abschnitt 6).

## 6. Über die Beeinflussung der Diamin-oxydase durch Guanidin-Derivate.

Es wurde eben erwähnt, dass die Diamin-oxydase durch Arcain gehemmt wird. Die Desaminierungs-Geschwindigkeit nimmt mit wachsender Konzentration des Tetramethylen-diguanids ab, um dann wieder leicht anzusteigen.

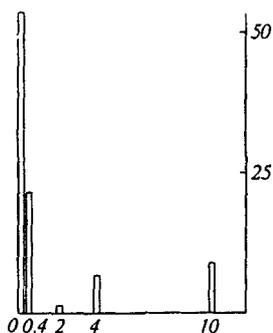


Fig. 4.

Abszisse: Konzentration des Arcains ( $10^{-3}$  Mol)

Ordinate: Stickstoff, aus 0,002-m. Histamin freigemacht

Ansatz wie Tabelle 6. Die Zahlen der Kontrollen wurden von denen der Hauptansätze subtrahiert.

In einem Versuch, der wie der in der Tabelle 7 angestellt worden war, reagierte das Dekamethylen-diguanid in derselben Weise wie Arcain. Die Ammoniakproduktion mit 0,004-molarem Dekamethylen-diguanid betrug nur 13% derjenigen ohne Zusatz dieser Verbindung.

Weiterhin konnte *H. Blaschko*<sup>1)</sup> mit Guanidin den Abbau von Diaminen verhindern, während ich einen um so stärkeren Einfluss des Guanidins fand, je stärker dieses methyliert war.

Die Wirkung der Guanidine beruht auf ihrer Fähigkeit, den Diaminen gegenüber als „competitive inhibitors“ aufzutreten. Dies lässt sich dadurch nachweisen, dass man die ersteren abwechslungsweise mit Substraten von verschiedener Affinität zum Enzym zusammen mit diesem reagieren lässt. Beispielsweise darf die Desami-

<sup>1)</sup> *H. Blaschko*, Diskussion zum Vortrag *E. A. Zeller*: Über den enzymatischen Abbau von Diaminen. XVI. Int. Physiol.-Kongr. Zürich 1938.

nierung des Histamins mit der grössten bisher bekannten Affinität am wenigsten beeinflusst werden. Wie die Tabelle 8 zeigt, stimmt der als Beleg wiedergegebene Versuch mit Arcain und asymmetrischem Dimethyl-guanidin sehr gut mit dieser Anschauung überein.

**Tabelle 7.**  
Ferment II, Durchleiten von Luft, 7 Stunden, Cadaverin 0,002-m.

	Molare Konzentration der Guanidin-Derivate	$\gamma$ N	Prozent Hemmung
Ferment allein . . . . .	—	8	—
Ferment + Guanidin . . . . .	0,01	10	—
Ferment + Methyl-guanidin . . . . .	0,01	8	—
Ferment + asym. Dimethyl-guanidin . . . . .	0,01	7	—
Ferment + Cadaverin . . . . .		78	—
Ferment + Cadaverin + Guanidin . . . . .	0,001	87	— 10
Ferment + Cadaverin + Methyl-guanidin . . . . .	0,001	33,5	63
Ferment + Cadaverin + asym. Dimethyl-guanidin . . . . .	0,001	25,5	73
Ferment + Cadaverin + Guanidin . . . . .	0,01	41	42
Ferment + Cadaverin + Methyl-guanidin . . . . .	0,01	12	93
Ferment + Cadaverin + asym. Dimethyl-guanidin . . . . .	0,01	7	100

**Tabelle 8.**  
Ferment II, Durchleiten von Luft, 6 Stunden. Substrate: 0,001-m., Arcain 0,0004-m., asym. Dimethyl-guanidin 0,001-m.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	6
Ferment + Arcain . . . . .	4,5
Ferment + Dimethyl-guanidin . . . . .	4,5
Ferment + Putrescin . . . . .	51
Ferment + Histamin . . . . .	54
Ferment + Putrescin + Arcain . . . . .	13,5
Ferment + Histamin + Arcain . . . . .	45
Ferment + Putrescin + Dimethyl-guanidin . . . . .	11,5
Ferment + Histamin + Dimethyl-guanidin . . . . .	48,5

H. Blaschko (l. c.) erhielt mit Guanidin/Histamin und Guanidin/Putrescin ähnliche Resultate.

Zur Deutung dieser Befunde wird folgende Arbeitshypothese aufgestellt: An der Bildung des Ferment-Substratkomplexes sind beide basische Gruppen des Substrats beteiligt; denn Mono-amine werden durch das Ferment nicht gebunden (Mitteilung 2). Die entsprechenden zwei Haftstellen des Enzyms müssen verschieden voneinander sein, weil die eine Aminogruppe substituiert werden darf,

die andere nicht. Es wird nun angenommen, dass die Guanidine mit den Diaminen um den Fermentteil konkurrieren, der mit der substituierbaren Gruppe reagiert, und zwar soll diese Bindung eine heteropolare sein. Damit wäre die Steigerung der hemmenden Wirkung durch die zunehmende Methylierung, die die Basizität verstärkt, verständlich gemacht.

Die Feststellung, dass schon 0,001-molares Methyl-guanidin den Abbau von Histamin beträchtlich verringert, gibt vielleicht eine Erklärung für das früher von *W. F. Koch*<sup>1)</sup> gefundene gleichzeitige Vorhandensein von Histamin und Methyl-guanidin im Harn von parathyreopriven Hunden. Man könnte sich denken, dass durch die erzeugte Stoffwechselstörung Methyl-guanidin entsteht, das die Diamin-oxydase hemmt und damit das Erscheinen des Histamins im Harn bewirkt. Von besonderer Bedeutung scheint mit die Tatsache zu sein, dass alle spezifisch auf die Diamin-oxydase wirkenden Guanidin-Derivate, ebenso wie das Histamin<sup>2)</sup>, einen starken Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel ausüben. Dekamethylen-diguanid wird als Antidiabetikum verwendet.

#### 7. Die Hemmung der Diamin-oxydase durch verschiedene Carbonylreagentien.

In der Mitteilung 2 wurde gezeigt, dass 0,01- bis 0,001-m. Hydroxylamin die Diamin-oxydase stark hemmt. Bei allen bisher untersuchten Carbonylreagentien fand sich derselbe Effekt. Wie aus Fig. 5 zu ersehen ist, übte 0,00004-m. Semicarbazid schon einen deutlichen Einfluss aus. Unter den Bedingungen dieses Versuchs wurde bei einer Konzentration von 0,0001-m. Semicarbazid überhaupt kein Sauerstoff aufgenommen.

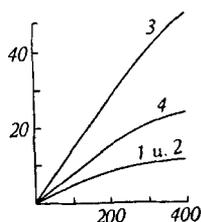


Fig. 5.

Abszisse:	Minuten
Ordinate:	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>
Ferment I	Cadaverin 0,004-m., Semicarbazid 0,00004-m.
Kurve 1:	Ferment allein
Kurve 2:	Ferment + Semicarbazid
Kurve 3:	Ferment + Cadaverin
Kurve 4:	Ferment + Cadaverin + Semicarbazid.

<sup>1)</sup> *W. F. Koch*, *J. Biol. Chem.* **15**, 43 (1913).

<sup>2)</sup> *W. Feldberg* und *E. Schilf*, *Histamin*, Berlin 1930, S. 369.

In der Tabelle 9 ist die Wirkung von Dimedon (Dimethyl-cyclohexan-dion), Bisulfit und Thio-semicarbazid, gemessen an der Ammoniakbildung, angegeben. Diese wird durch alle drei Körper schon bei einer Konzentration von 0,001-m. verringert.

**Tabelle 9.**  
Ferment II, Cadaverin 0,002-m., Durchleiten von Luft.

Dauer		Molare Konzentration Carbonylreagens	$\gamma$ N
6 Std.	Ferment allein . . . . .	—	18
	Ferment+ Cadaverin . . . . .	—	148
	Ferment+ NaHSO <sub>3</sub> + Cadaverin . . . . .	0,01	92
	Ferment+ NaHSO <sub>3</sub> + Cadaverin . . . . .	0,001	136
16 Std.	Ferment allein . . . . .	—	10,5
	Ferment+ Cadaverin . . . . .	—	137,5
	Ferment+ Thiosemicarbazid . . . . .	0,002	41
	Ferment+ Thiosemicarbazid+ Cadaverin . . . . .	0,002	37
	Ferment+ Thiosemicarbazid+ Cadaverin . . . . .	0,0002	56
7 Std.	Ferment allein . . . . .	—	8
	Ferment+ Cadaverin . . . . .	—	78
	Ferment+ Dimedon . . . . .	0,01	4,5
	Ferment+ Dimedon+ Cadaverin . . . . .	0,01	9
	Ferment+ Dimedon+ Cadaverin . . . . .	0,001	50,5

Soweit die fünf aufgezählten Körper untersucht wurden, hemmten sie den Abbau von Substraten mit verschiedener Affinität zum Ferment verschieden stark, was dafür spricht, dass es sich hier, wie bei den Guanidin-Derivaten, um „competitive inhibitors“ handelt. Am Beispiel des Semicarbazids (Tabelle 10) und des Bisulfits (Fig. 6) soll das dargelegt werden.

**Tabelle 10a.**  
Ferment I, Durchleiten von Luft, Substrate 0,002-m., Semicarbazid 0,0001-m., 17 Stunden.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	0,5
Ferment+ Histamin . . . . .	64
Ferment+ Cadaverin . . . . .	98,5
Ferment+ Semicarbazid+ Histamin . . . . .	8,5
Ferment+ Semicarbazid+ Cadaverin . . . . .	1

Semicarbazid hemmt das System Enzym-Histamin weniger als das System Enzym-Putrescin, selbst wenn das Histamin nur halb so konzentriert ist. In dem Versuch mit Bisulfit (Fig. 6) wurde bis zu dem angegebenen Zeitpunkt der Abbau von Histamin gar nicht beeinflusst, wohl aber der von Putrescin.

Tabelle 10b.

Ferment II, *Kjeldahl*-Kolben, Histamin 0,0016-m., Putrescin 0,0033-m., Semicarbazid 0,000066-m.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	4
Ferment+ Histamin . . . . .	48
Ferment+ Putrescin . . . . .	75,5
Ferment+ Semicarbazid . . . . .	1
Ferment+ Semicarbazid+ Histamin . . . . .	14,5
Ferment+ Semicarbazid+ Putrescin . . . . .	3,5

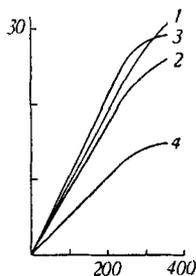


Fig. 6.

Abszisse: Minuten  
 Ordinate: mm<sup>3</sup> verbrauchter Sauerstoff  
 Ferment II Substrate 0,001-m., Bisulfit 0,01-m.  
 Kurve 1: Histamin  
 Kurve 2: Putrescin  
 Kurve 3: Histamin + Bisulfit  
 Kurve 4: Putrescin + Bisulfit.

Die Resultate werden in ähnlicher Weise wie die des Abschnitts 5 gedeutet: Die Carbonylreagentien werden durch die Diamin-oxydase gebunden und konkurrenzieren dadurch die eigentlichen Substrate. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Verknüpfung von Seiten des Enzyms durch eine Carbonyl-, vielleicht durch eine Aldehydgruppe (die nicht einem Kohlehydratrest angehört), geschieht, da Dimedon ein so stark wirkendes Agens ist. Es wird weiterhin als Arbeitshypothese aufgestellt, dass die nicht substituierbare Aminogruppe des Diamins mit diesem Carbonyl unter Bildung einer *Schiff*'schen Base reagiert. Dieser Gedanke lag deshalb nahe, weil sich verschiedene Körper mit reaktionsfähiger Carbonylgruppe (Isatin, Ninhydrin, Alloxan) als besonders günstige Modelle für die Nachahmung der fermentativen oxydativen Desaminierung der Aminosäuren bewährt hatten<sup>1)</sup>, und in Mitteilung 2 bewiesen wurde, dass die Gleichungen für die erste Reaktionsstufe der Diamin-oxydase und der  $\alpha$ -Aminosäure-oxydase identisch sind. *Franke*<sup>2)</sup> nimmt in seinem

<sup>1)</sup> Zusammenfassung bei *W. Langenbeck*, Die organischen Katalysatoren, Berlin 1935.

<sup>2)</sup> *W. Franke*, Bioch. Z. 258, 295 (1933).

Schema das primäre Entstehen einer *Schiff'schen* Base zwischen Isatin und der Aminosäure an.

Neben den fünf aufgezählten Körpern kann sich offensichtlich auch Kaliumcyanid mit der Aldehydgruppe des Enzyms verbinden, was aus der Tatsache hervorgeht, dass der Abbau verschiedener Substrate verschieden stark gehemmt wird (Tabelle 11).

**Tabelle 11.**

Ferment II, *Kjeldahl*-Kolben, 8 Stunden, Substrate 0,002-m., KCN 0,0006-m.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	2,5
Ferment+Putrescin . . . . .	100,5
Ferment+Cadaverin . . . . .	161,5
Ferment+KCN . . . . .	6,5
Ferment+Putrescin+KCN . . . . .	19,5
Ferment+Cadaverin+KCN . . . . .	120,0

Dieser Mechanismus wird aber vielfach durch andere überdeckt. So wird die Desaminierung des Histamins meist stärker beeinträchtigt, als nach dessen grosser Affinität zu erwarten wäre. In der Tabelle 12 wird ein Beispiel angeführt, in dem die Diamin-oxydase durch Cyanid sogar aktiviert wird.

**Tabelle 12.**

Ferment II, *Kjeldahl*-Kolben, 6 Stunden, Substrate 0,002-m., KCN 0,0004-m.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	7,5
Ferment+Putrescin . . . . .	76
Ferment+Cadaverin . . . . .	90
Ferment+KCN . . . . .	7,5
Ferment+Putrescin+KCN . . . . .	16
Ferment+Cadaverin+KCN . . . . .	140

Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass das Cyan-Ion mit dem ersten Zwischenprodukt, einem Aldehyd (Mitteilung 2), unter Bildung eines Cyanhydrins reagiert, und damit jenes aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Kaliumcyanid wird vielfach in der Fermentchemie zu diesem Zwecke angewandt. Das Resultat des Versuches, Tabelle 12, ergibt damit auch einen Hinweis für die Reversibilität des Systems Diamin-Diamin-oxydase.

### 8. Der Einfluss verschiedener Fermentgifte auf die Diamin-oxydase.

#### a) Natriumazid.

0,001-m.  $\text{NaN}_3$  hemmt die Desaminierung von Histamin, Cadaverin und Putrescin, am wenigsten die des Histamins. Wie die Tabelle 13 zeigt, beginnt diese Reaktion erst nach einigen Stunden.

**Tabelle 13.**

Ferment II, Kjeldahl-Kolben, Putrescin und  $\text{NaN}_3$  0,001-m.

	$\gamma$ N	
	3 Stunden	7½ Stunden
Ferment allein . . . . .	8,5	4
Ferment+Putrescin . . . . .	23	41,5
Ferment+ $\text{NaN}_3$ . . . . .	2,5	0,5
Ferment+Putrescin+ $\text{NaN}_3$ . . . . .	22	28

b) Natrium-fluorid.

Selbst 0,01-m.  $\text{NaF}$  übt keinen Einfluss auf die Diamin-oxydase aus (Tabelle 14).

**Tabelle 14.**

Ferment I, Durchleiten von Luft, 20 Stunden, Putrescin 0,001-m.

	Molare Konzentration $\text{NaF}$	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	—	2,5
Ferment+Putrescin . . . . .	—	37
Ferment+Putrescin+ $\text{NaF}$ . . . . .	0,01	39
Ferment+Putrescin+ $\text{NaF}$ . . . . .	0,001	35

c) Monojodessigsäure.

0,001-m.  $\text{CH}_2\text{J-COOH}$  wirkt kaum auf die Desaminierung von Cadaverin, 0,01-m. fördert sie sogar.

**Tabelle 15.**

Ferment II, Durchleiten von Luft, 6 Stunden, Cadaverin 0,002-m.

	Molare Konzentration Jodacetat	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	—	18
Ferment+Cadaverin . . . . .	—	145
Ferment+Cadaverin+Jodacetat . . . . .	0,01	178
Ferment+Cadaverin+Jodacetat . . . . .	0,001	128

d) Malonsäure.

Um zu erfahren, ob der durch die Diamin-oxydase aktivierte Wasserstoff über das *Szent-György'sche*  $\text{C}_4$ -Dicarbonsäure-System transportiert wird, untersuchte ich das Verhalten des Ferments gegenüber Malonsäure; denn diese verhindert durch „competitive inhibition“ die Oxydation der Bernsteinsäure durch die Succindehydrogenase<sup>1)</sup>. Aus Tabelle 16a ist ersichtlich, dass 0,01-m. Malonat die Desaminierung um ein Geringes hemmt und aus Tabelle 16b, dass 0,005-m. Malonat den Sauerstoff-Verbrauch sogar etwas steigert.

<sup>1)</sup> J. H. Quastel, Biochem. J. **20**, 166 (1926); J. H. Quastel und Wooldridge, Biochem. J. **22**, 689 (1928).

**Tabelle 16a.**

Ferment I und II, Durchleiten von Luft, 15 Stunden, Cadaverin 0,002-m., Malonat 0,01-m.

	$\gamma$ N
Ferment I allein . . . . .	1,5
Ferment I + Cadaverin . . . . .	47
Ferment I + Malonat . . . . .	1
Ferment I + Cadaverin + Malonat . . . . .	38
Ferment II allein . . . . .	2,5
Ferment II + Cadaverin . . . . .	163
Ferment II + Malonat . . . . .	7
Ferment II + Cadaverin + Malonat . . . . .	143

**Tabelle 16b.**

Ferment I und II, 5,5 Stunden, Durchleiten von Luft, Malonat 0,005-m., Histamin 0,001-m., Leerwerte subtrahiert.

	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>
Ferment I + Histamin . . . . .	12,5
Ferment I + Histamin + Malonat . . . . .	15,5
Ferment II + Histamin . . . . .	28
Ferment II + Histamin + Malonat . . . . .	37

9. Über den Einfluss von Pepsin und Trypsin auf die Diamin-oxydase.

Um die Beteiligung von Eiweiss am Aufbau der Diamin-oxydase sicherzustellen, wurde das Ferment der Einwirkung von Pepsin-Salzsäure und von Trypsin unterworfen. Nach einstündiger Inkubation mit den Proteinase bei 38° und entsprechendem p<sub>H</sub> wurde auf p<sub>H</sub> 6,8 umgepuffert und ein üblicher Ansatz mit Histamin abgeschlossen. Es wurden dazu entsprechende Kontrollen ohne eiweiss-spaltende Fermente laufen gelassen. Aus dem in Tabelle 17 angegebenen Versuch mit Pepsin geht hervor, dass schon 0,05-n. Salzsäure das Enzym fast vollständig inaktiviert und dass Pepsin die letzten Spuren von Wirksamkeit zum Verschwinden gebracht hatte.

**Tabelle 17.**

Ferment II, Inkubation mit Pepsin-HCl 1 Stunde, mit Histamin (0,001-m.) 6 Stunden.

	$\gamma$ N
Ferment + aqua . . . . .	2
Ferment + HCl . . . . .	0,7
Ferment + HCl + Pepsin . . . . .	0,4
Ferment + aqua + Histamin . . . . .	38
Ferment + HCl + Histamin . . . . .	3,6
Ferment + HCl + Pepsin + Histamin . . . . .	0,7

Ein ähnliches Resultat kam in den Versuchen mit Trypsin heraus. Nur hatte hier die Einwirkung von Puffer allein (0,033-m. Phosphat) keinen zerstörenden Einfluss.

**Tabelle 18.**

Ferment II, Inkubation mit Trypsin+sek. Phosphat 1 Stunde, mit Histamin (0,001-m.) 8 Stunden.

	$\gamma$ N
Ferment+sekund. Phosphat . . . . .	3
Ferment+sekund. Phosphat+Trypsin . . . . .	0
Ferment+sekund. Phosphat+Histamin . . . . .	42
Ferment+sekund. Phosphat+Trypsin+Histamin . .	5

Das Ergebnis dieser Versuche und die Tatsache, dass man die Fermentlösung wochenlang ohne beträchtlichen Aktivitätsverlust dialysieren kann, lassen mit Sicherheit darauf schliessen, dass, wie es zu erwarten war, die Diamin-oxydase einen Träger von Proteinnatur besitzt. Einige, die praktische Medizin angehende Konsequenzen aus diesen Versuchen werden an anderer Stelle mitgeteilt<sup>1)</sup>.

10. Das Verhalten der Diamin-oxydase in Gegenwart von Redox-Indikatoren und Sauerstoff.

Um einen Einblick in die bei der Diamin-oxydase herrschenden Redox-Potentiale zu gewinnen, wurde das Enzym mit verschiedenen Substraten in Gegenwart von Sauerstoff und verschiedenen Indikatoren mit einem Umschlagpunkt bei  $p_H = 7,0$  von  $-0,253$  Volt bis  $+0,181$  Volt geprüft. Zwischen  $-0,034$  Volt und  $+0,115$  Volt wurde stets eine Hemmung mit 0,005-proz. Farbstofflösungen gefunden. Das Maximum dieser Wirkung wechselte etwas je nach Art des verwendeten Fermentpräparates und des Substrats; gewöhnlich lag es bei  $-0,034$  Volt (Pyocyanin), in dem in Tabelle 19 wiedergegebenen Versuch aber bei  $+0,115$ . Mit Pyocyanin konnte gelegentlich sogar mit 0,001-proz. Lösung eine völlige Ausschaltung des Enzyms erzielt werden.

**Tabelle 19.**

Ferment I, Durchleiten von Luft, Cadaverin 0,002-m., Farbstoffe 0,0025%, 15 Stunden, Leerwerte ohne Substrat subtrahiert.

	Millivolt Redox-Indikator	$\gamma$ N
Ferment+Cadaverin . . . . .	—	65
Ferment+Cadaverin+Indigo-disulfonat . . . . .	- 125	47
Ferment+Cadaverin+Pyocyanin . . . . .	- 34	31
Ferment+Cadaverin+Methylenblau . . . . .	+ 11	12
Ferment+Cadaverin+Toluylenblau . . . . .	+115	2,5
Ferment+Cadaverin+Guajacol-indo-2,6-dibromphenol . .	+159	47
Ferment+Cadaverin+o-Kresol-indo-2,6-dichlorphenol . .	+181	37

<sup>1)</sup> E. A. Zeller und B. Schür, Schweiz. med. Wochenschr. **68**, (1938), im Druck.

Bei diesen Versuchen wurde beobachtet, dass Indigo-disulfonat sich entfärbt. Die Reaktion wird durch Sauerstoffzufuhr beschleunigt, durch Stickstoff verhindert. Wahrscheinlich wird der Farbstoff durch das entstehende Wasserstoffperoxyd (Mitteilung 2) oxydiert. Dieser Vorgang kann benutzt werden, um die Wirkung der Diamin-oxydase in einfachster Weise zu messen. So trat in einem Ansatz mit Cadaverin die Entfärbung nach 4 Stunden, in einem gleichen mit 0,0001-m. Semicarbazid und in den entsprechenden Kontrollen auch nach 24 Stunden noch nicht ein. *C. F. Schönbein*<sup>1)</sup> hatte schon 1856 Indigolösung mit Wasserstoffperoxyd und roten Blutkörperchen „entbläuet“.

### 11. Über einen Aktivator der Diamin-oxydase.

In der Mitteilung 2 wurde der Nachweis geleistet, dass bei der Diamin-Diaminoxidase-Reaktion pro Molekel umgesetztes Substrat eine Molekel Wasserstoffperoxyd gebildet wird. Es erhebt sich nun die Frage, ob der aktivierte Substrat-Wasserstoff nach der ursprünglichen *Wieland'schen* Theorie direkt mit dem Sauerstoff sich verbindet, oder ob er vorher über Wasserstoff transportierende Fermente geleitet wird (*Warburg, v. Szent-György*). Im letzteren Falle müsste man ein System, dessen Glieder nicht in optimaler Menge vorhanden sind, aktivieren können.

Ein solches komplettierbares Präparat stellt das in dieser Mitteilung als Ferment I bezeichnete dar, das aus gemahlener Schweine- niere durch 8—16stündiges Einwirken von Aceton gewonnen wurde. Wenn man zu der aus diesem Trockenpulver stammenden Enzym- lösung einen Faktor hinzufügt, der durch Fällen des wässrigen Ex- traktes aus Schweine- niere mit Ammoniumsulfat hergestellt wurde, und der die Diamine nur spurenweise zerlegt, so erhält man eine doppelt so grosse Desaminierung.

Tabelle 20.

Ferment I, Durchleiten von Luft, 17 Stunden, Cadaverin 0,002-m.,  
Aktivator aus Schweine- niere.

	$\gamma$ N
Ferment allein . . . . .	25,5
Ferment + Cadaverin . . . . .	66,5
Ferment + Aktivator . . . . .	9
Ferment + Aktivator + Cadaverin . . . . .	101
Aktivator allein . . . . .	4
Aktivator + Cadaverin . . . . .	10

Ein Aktivator kommt auch in der Rattenleber vor, der in gleicher Weise wie der aus Schweine- niere gewonnen wurde. Dieser Befund

<sup>1)</sup> Abh. bayer. Akad. W., II, 8, I. Abt. (1856).

ist deshalb von Bedeutung, weil nach *Edlbacher* und *Zeller*<sup>1)</sup> die Rattenleber keine Histaminase enthält. In Bestätigung dieser Angaben bauten die Rattenleberpräparate keine Diamine ab. Aus dem in Tabelle 21 zusammengefassten Versuch geht mit grosser Wahrscheinlichkeit hervor, dass beide Faktoren einander gleich oder sehr ähnlich sind, weil das in dieser Mitteilung hauptsächlich verwendete Ferment II durch den Faktor aus Rattenleber weniger aktivierbar als Ferment I ist.

Tabelle 21.

Ferment I und II, Durchleiten von Luft, 7,5 Stunden, 10 mg Aktivator aus Rattenleber, Cadaverin 0,002-m.

	$\gamma$ N
Ferment I allein . . . . .	0
Ferment I+Cadaverin . . . . .	14
Ferment I+Aktivator . . . . .	3,5
Ferment I+Aktivator+Cadaverin . . . . .	53
Ferment+Aktivator (15 Min. auf 52°) erhitzt . . . . .	3,5
Ferment I+Cadaverin+Aktivator (52°) . . . . .	48
Ferment II allein . . . . .	1
Ferment II+Cadaverin . . . . .	68
Ferment II+Aktivator . . . . .	4
Ferment II+Aktivator+Cadaverin . . . . .	90

Die Aktivierung wurde auch durch Messung des Sauerstoff-Verbrauchs im *Warburg-Apparat* verfolgt. Aus der Figur 7 ist zu ersehen, dass auf 100° erhitzter Aktivator unwirksam geworden ist.

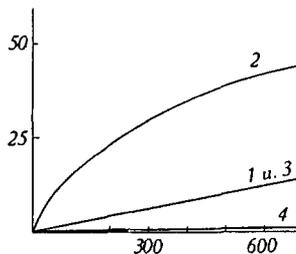


Fig. 7.

- Abszisse: Minuten  
 Ordinate: mm<sup>3</sup> Sauerstoff  
 Ferment I Cadaverin 0,002-m., Aktivator 10 mg, Werte ohne Substrat subtrahiert  
 Kurve 1: Ferment+Cadaverin  
 Kurve 2: Ferment+Cadaverin+Aktivator  
 Kurve 3: Ferment+Cadaverin+15 Min. auf 100° erhitzter Aktivator  
 Kurve 4: Aktivator+Cadaverin.

<sup>1)</sup> Helv. 20, 717 (1937).

Die Eigenschaften des Aktivators sind somit die folgenden: Er ist hochmolekular; denn er dialysiert auch nach mehrtägigem Stehen nicht aus Cellophanschläuchen gegen fließendes Wasser. Er ist ziemlich beständig gegen Erwärmen auf 52°, wird aber durch eine Temperatur von 100° unwirksam gemacht. Er wird durch zweidrittel Sättigung mit Ammoniumsulfat und durch Aceton gefällt und ist gegen das letztere empfindlich. Es scheint sich somit um einen Eiweisskörper (Trägerprotein) oder um ein Enzym zu handeln.

Um zu entscheiden, ob es sich bei dem Aktivator um die kürzlich entdeckte Diaphorase (= coenzyme factor)<sup>1)</sup> handelt, wurde nach den Angaben von *E. Adler* und *W. L. Hughes*<sup>2)</sup> Diaphorase aus Schweineherz dargestellt; sie hatte keinen aktivierenden Einfluss. Nach *von Euler* und *Hellström* (l. c.) ist die Diaphorase in Boratpuffer unwirksam und wird durch 0,0002-m. CuSO<sub>4</sub> beträchtlich gehemmt. Beides traf nicht für die Diamin-oxydase zu. Die Geschwindigkeit der Diaminspaltung ist bei p<sub>H</sub> 6,8 in Boratpuffer gleich wie in Phosphatpuffer und erst in 0,0001-m. CuSO<sub>4</sub> wird die Desaminierung auf ein Drittel reduziert. Die beiden Faktoren scheinen also verschieden voneinander zu sein.

Die Charakterisierung und Reinigung des Aktivators wird fortgesetzt.

## 12. Schema der Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion.

Aus der Tatsache, dass die Diamin-oxydase aus den Diaminen nur ein Mol Ammoniak frei macht, dass wohl einseitig, aber nicht beidseitig substituierte Diamine abgebaut werden, und dass zwei Gruppen von Hemmungskörpern existieren (Guanidin-Derivate, Carbonyl-Reagentien), die die eigentlichen Substrate konkurrieren, ohne selber angegriffen zu werden, wird geschlossen, dass die Bindung zwischen dem Enzym und dem Diamin an zwei Stellen erfolgt. Die substituierbare Aminogruppe wird in der Ammoniumform durch Elektro-Valenz mit einer sauren Gruppe des Ferments und die freie Amino-Gruppe unter Bildung einer *Schiff*'schen Base mit einer Aldehyd-Gruppe verknüpft. Durch diese Anlagerung wird die Bindung zweier Wasserstoff-Atome des Substrats so weit gelockert, dass sie durch ein Wasserstoff-übertragendes Ferment (Aktivator?) auf einen autoxydablen Faktor (Bildung von Wasserstoffperoxyd) oder auf das *Warburg-Keilin*-System übertragen werden können. Der letztere Weg, der durch die Hemmung des Ferments durch Azid wahrscheinlich gemacht wird, führt nicht über das C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure-System noch über die Diaphorase. Die dehydrierte Substrat-Molekel spaltet unter Wasseraufnahme eine Molekel Ammoniak ab.

<sup>1)</sup> *H. von Euler* und *H. Hellström*, Z. physiol. Ch. **252**, 31 (1938); *J. G. Dewan* und *D. E. Green*, Biochem. J. **32**, 628 (1938).

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **253**, 71 (1938).

Zusammenfassung.

1. Als neue Substrate der Diamin-oxydase werden Trimethylen-diamin, Spermin und Spermidin gefunden.
2. Unter den üblichen Versuchsbedingungen wird aus den Diaminen nur ein Mol Ammoniak freigemacht.
3. Die Abbau-Geschwindigkeit nimmt in der Reihe der Diamine von C<sub>2</sub> bis C<sub>5</sub> zu.
4. Es wird neues Material beigebracht, das die Verschiedenheit der *d*-Aminosäure-oxydase und der Diamin-oxydase beweist.
5. An beiden Stickstoff-Atomen substituierte Diamine werden von der Diamin-oxydase nicht oxydativ desaminiert.
6. Guanidin und seine Derivate Methyl-guanidin, asym. Dimethyl-guanidin, Tetra- und Dekamethylen-diguanid verhalten sich wie „competitive inhibitors“. Die Hemmung wird mit zunehmender Methylierung grösser.
7. Die Carbonyl-Reagentien Dimethyl-cyclo-hexan-dion (Dimedon), Natrium-bisulfit, Thiosemicarbazid und Semicarbazid hemmen die Diamin-oxydase bis zu sehr kleinen Konzentrationen (0,00004-m.). Zu dieser Gruppe wird auch die Blausäure gezählt, die möglicherweise noch auf zwei weitere Arten die Reaktion beeinflussen kann, indem sie das erste Reaktionsprodukt abfängt und das *Warburg-Keilin*-System ausschaltet.
8. Wie die zwei aufgezählten Körperklassen wirkt noch Natrium-azid. Ohne grossen Einfluss waren Jodacetat, Natriumfluorid und Malonat.
9. Pepsin und Trypsin zerstören in kurzer Zeit die Diamin-oxydase.
10. Die Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion spielt sich in einem Potential-Bereich von ungefähr +115 bis -34 Millivolt ab. Indigo-disulfonat wird oxydativ entfärbt.
11. Es wurde in Leber und Niere ein Aktivator gefunden, und einige Eigenschaften desselben angegeben.

Frl. *Susy Staehlin* danke ich für wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel.