

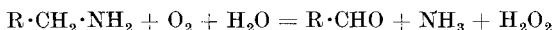
1. Über die Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion

6. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Poly-aminen¹⁾

von E. A. Zeller, R. Stern und M. Wenk.

(3. XI. 39.)

In der 2. Mitteilung dieser Reihe²⁾ wurde folgende Gleichung für die Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion (DDR.) aufgestellt:



Damals wurde Sauerstoff, Wasserstoffperoxyd und Ammoniak bestimmt. Es fehlte somit noch der Nachweis und die Messung des Aldehyds, was wir jetzt nachholten.

Es wurde früher die Anschauung entwickelt, dass die Diamine, bevor sie von der Diamin-oxydase abgebaut werden, sich mit zwei verschiedenen Gruppen derselben verbinden³⁾. Die eine Bindung scheint von ähnlicher Natur zu sein, wie sie zwischen den Aminen und der Monoamin-oxydase zustande kommt. Es müsste demnach Ephedrin, das die Monoamin-oxydase durch „competitive inhibition“ beeinflusst, auch auf die Diamin-oxydase in gleichem Sinne einwirken.

Die Cyanidhemmung der Diamin-oxydase wurde durch den einen von uns⁴⁾ als verschieden von den bisher bekannten Mechanismen der Inaktivierung von Fermenten durch Blausäure angesehen. Das Kaliumcyanid, so wurde angenommen, soll mit einer Carbonylgruppe des Ferments, deren Anwesenheit durch Versuche mit einer ganzen Reihe von Carbonylreagentien erschlossen wurde⁵⁾, unter Bildung eines Cyanhydrins reagieren und sie so gegenüber dem Zutritt der einen Aminogruppe des Substrats zu blockieren. Die Frage wurde einer erneuten Prüfung unterzogen und versucht, zwei scheinbar mit dieser Hypothese nicht in Einklang stehende Resultate in ihrem Sinn zu interpretieren.

Es gelang bis jetzt nie, durch blosse, langandauernde Dialyse eine Trennung der Diamin-oxydase in Ferment und Coferment zu erzielen. Ein früher gefundener Aktivator⁶⁾ hatte Eiweiss-(Enzym)-charakter und wurde nicht durch Abtrennung von dem Ferment gewonnen. Wir versuchten jetzt, durch etwas energischere Mittel eine Aufspaltung der Diamin-oxydase zu erreichen.

¹⁾ 5. Mitteilung (V): E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. Mislin und M. Wenk, *Helv.* **22**, 1381 (1939).

²⁾ 2. Mitteilung (II): E. A. Zeller, *Helv.* **21**, 880 (1938), S. 887.

³⁾ 3. Mitteilung (III): E. A. Zeller, *Helv.* **21**, 1645 (1938), Abschnitt 12.

⁴⁾ III, S. 1658; IV, S. 849.

⁵⁾ III, S. 1655. ⁶⁾ III, 11. Abschnitt.

Die enzymatische Oxydation der Diamine, besonders die des Histamins, geht über den Verbrauch eines Atoms Sauerstoff pro Substratmolekel hinaus. Wir studierten den Vorgang, der dieser Weiteroxydation zugrunde liegt.

Die in dieser Mitteilung veröffentlichten Resultate stammen aus Untersuchungen, die noch nicht in allen Teilen abgeschlossen sind. Da die Arbeiten für eine Weile unterbrochen werden mussten, geben wir sie jetzt schon bekannt.

1. Nachweis der Aldehydgruppe beim Produkt der DDR.

Einen ersten Hinweis auf das Entstehen einer Aldehydgruppe als Produkt der DDR. bildete der Befund, dass Kaliumcyanid unter bestimmten Bedingungen den enzymatischen Abbau von Cadaverin fördert¹⁾. Das Cyanid kann eine Fermentreaktion beschleunigen, wenn diese deutlich reversibel ist, und wenn ein Reaktionsprodukt eine Carbonylgruppe enthält. Die in der 1. Mitteilung²⁾ als Abbauprodukt des Histamins als schön krystallisierendes Dinitrophenylhydrazon angegebene Carbonylverbindung kommt nicht in Frage, weil sie viel stärker oxydiert ist, als es dem ersten Reaktionsschritt der DDR. entspricht.

Der qualitative Nachweis geschah auf folgende Weise: Eine gut dialysierte Fermentlösung wurde mit Cadaverin-dichlorhydrat einige Stunden inkubiert und enteiwisst. Im Filtrat war eine starke Reduktionsfähigkeit von Ag⁺ in ammoniakalischer Lösung beim Erhitzen nachweisbar.

Bei den quantitativen Bestimmungen wurde die Fermentlösung mit Trichloressigsäure enteiwisst, mit Natronlauge auf p_H 7 eingestellt und etwa das Dreifache der nötigen Menge an 0,01-m. Natriumbisulfit zugesetzt. Nach 15 Minuten langem Stehen wurde der Überschuss des Bisulfits zurücktitriert, indem eine bestimmte Menge 0,01-m. Jodlösung zugesetzt und das nicht verbrauchte Jod mit Thiosulfat gemessen wurde. Schon hier zeigte es sich regelmässig, dass die Haupt- gegenüber den Leerversuchen mehr Bisulfit gebunden hatten. Hierauf wurde mit Borax eine leicht alkalische Reaktion erzeugt und in gleicher Weise das in Freiheit gesetzte Bisulfit titriert. Ein Beispiel ist in Versuch 1 wiedergegeben. Es wurde nie der volle theoretische Wert gefunden. Das lag wohl daran, dass der entstehende Aldehyd teilweise schon oxydiert war (vgl. Abschnitt 6), was begreiflicherweise nicht dadurch verhindert werden konnte, dass wie üblich ein Aldehyd-abfangendes Mittel zum Ansatz gegeben wurde.

¹⁾ III, S. 1658.

²⁾ 1. Mitteilung (I): S. Edbacher und A. Zeller, Helv. **20**, 717 (1937).

Versuch 1:

Titration des bei der DDR. entstehenden Aldehyds.

10 cm³ Fermentlösung + 1 cm³ 0,1-m. Cadaverin-dichlorhydrat resp. 1 cm³ Puffer (p_H 7,2). Inkubation 5 Stunden¹⁾. Leerwerte subtrahiert.

freigesetztes NH ₃	3 × 10 ⁻⁵ Mol
verbrauchte 0,01-m. Jodlösung	2,0 cm ³
berechnet als Carbonylverbindung	10 ⁻⁵ Mol
Prozent des theoretischen Werts	33

2. Die Hemmung der Diamin-oxydase durch Ephedrin.

Die Mono- und die Diamin-oxydase ähneln in vielem einander. Beispielsweise lässt sich die Einwirkung dieser Enzyme auf Basen durch dieselbe Gleichung ausdrücken. Ein wichtiger Unterschied aber besteht darin, dass die letztere durch Carbonylreagentien und durch Kaliumcyanid gehemmt wird, die erstere aber nicht. Daraus scheint hervorzugehen, dass die Monoamin-oxydase im Gegensatz zur Diamin-oxydase keine an der Reaktion beteiligte Carbonylgruppe aufweist. Mit dieser Anschauung stimmt die Tatsache überein, dass die Monoamin-oxydase auch sekundäre Amine wie Adrenalin sehr gut abbaut²⁾. Wir nehmen an, dass die Bindung zwischen Monoamin und Monoamin-oxydase dieselbe sei wie die zwischen der „substituierbaren Aminogruppe“ und der Diamin-oxydase³⁾. Wenn diese Anschauungen richtig sind, dann muss Ephedrin (C₆H₅ · CHOH · CH(NHCH₃) · CH₃), das als „competitive inhibitor“ auf die Amin-oxydase wirkt⁴⁾, auch die Diamin-oxydase entsprechend beeinflussen. Das ist tatsächlich der Fall. In Versuch 2 wird die Desaminierung von Cadaverin durch Rinderniere mit 0,02-m. Ephedrin deutlich gehemmt. Die Hemmung ist etwas geringer, aber von derselben Größenordnung, wie sie *Blaschko, Richter* und *Schlossmann*⁵⁾ für die Monoamin-oxydase gefunden hatten: Sie stellten für 0,0025-m. Isoamyl-amin mit 0,02-m. Ephedrin eine Hemmung von 50% fest.

Versuch 2:

Hemmung der enzymatischen Desaminierung durch Ephedrin.

3,0 cm³ Fermentlösung (Rinderniere) + 0,4 cm³ 0,01-m. Cadaverin-dichlorhydrat-Puffer-Lösung (p_H 7,2) + 1 cm³ 0,1-m. *l*-Ephedrin-Pufferlösung + Puffer ad 5 cm³ + Octylalkohol + Toluol. Die Ansätze wurden 3 Stunden in Mikro-*Kjeldahl*-Kolben im Thermostat geschüttelt. Ammoniak-Leerwerte subtrahiert.

	γ N	Prozent Hemmung
Cadaverin (0,0008-m.)	36	
Cadaverin (0,0008-m.)	35	
Cadaverin + <i>l</i> -Ephedrin (0,02-m.)	25	30

¹⁾ Über die Methodik, soweit sie nicht angegeben ist, vgl. die vorangehenden Mitteilungen.

²⁾ *H. Blaschko, D. Richter* und *H. Schlossmann*, J. Physiol. **90**, 1 (1937).

³⁾ III, S. 1664.

⁴⁾ *H. Blaschko, D. Richter* und *H. Schlossmann*, Biochem. J. **31**, 2187 (1937).

⁵⁾ l. c.

Wenn es sich in unserm Fall wie bei der Monoamin-oxydase um eine Konkurrenzerscheinung handelt, dann muss der Einfluss des Ephedrins bei Substraten mit verschiedener Affinität verschieden gross sein. Das ist, wie der Versuch 3 zeigt, auch wirklich der Fall. Unter den angegebenen Bedingungen wird wohl der Abbau von Cadaverin, aber nicht der von Histamin vermindert.

Versuch 3:

Beeinflussung des enzymatischen Histamin- und Cadaverinabbaus durch Ephedrin.

2,5 cm³ Fermentlösung (Pferdeniere) + 0,5 cm³ 0,01-m. Cadaverin- resp. Histamin-dichlorhydrat-Pufferlösung + 2,0 cm³ 0,1-m. *l*-Ephedrin-Pufferlösung + Puffer ad 5 cm³. In weiten Reagensgläsern, durch die Luft geleitet wird, 3 Stunden im Thermostat inkubiert. Octylalkohol und Toluol. Ammoniak-Leerwerte subtrahiert.

	γ N	Prozent Hemmung
Cadaverin 0,001-m.	28,5	
Cadaverin 0,001-m. + Ephedrin 0,04-m.	19	28
Histamin 0,001-m.	9	
Histamin 0,001-m. + Ephedrin 0,04-m.	10	0

Das Ephedrin ist also für beide Fermente ein „competitive inhibitor“.

3. Der Einfluss von Curare auf die Diamin-oxydase.

Wir untersuchten deshalb die Wirkung von Curare (*Hoffmann-La Roche*), weil uns bekannt war, dass das Alkaloid eine starke Ausschwemmung von Histamin aus der Muskulatur bewirkt¹⁾. Es schien möglich, dass die Ursache dieser Erscheinung die Ausschaltung der Diamin-oxydase des Muskels sei. Das Ferment ist zwar im Muskel nur in kleiner Konzentration vorhanden²⁾, spielt aber in Anbetracht der Grösse der gesamten Muskulatur sicher eine nicht unbedeutende Rolle im Polyamin-Stoffwechsel. Es zeigte sich aber, dass Curare erst in Mengen von über 3 mg pro üblichem Ansatz einen hemmenden Einfluss auf die Desaminierung und den Sauerstoffverbrauch der DDR. auszuüben beginnt. Das sind aber Dosen, die weit über denen liegen, die im Tierversuch wirksam sind. Die tiefgreifende Reaktion des tierischen Organismus auf Curare lässt sich also nicht durch dessen Wirkung auf die Diamin-oxydase erklären.

Nach den Ausführungen des 2. Abschnittes ist zu erwarten, dass alle Alkaloide, in genügend hoher Konzentration angewandt, die DDR. stören werden. Uns interessieren in diesem Zusammenhang aber nur die Fälle, wo in vitro ähnliche oder vergleichbare Konzentrationsverhältnisse bestehen wie in vivo.

¹⁾ M. Alam, G. V. Anrep, G. S. Barsoum, M. Talaat und E. Wieninger, J. Physiol. 95, 148 (1939). ²⁾ V, S. 1392.

4. Die Einwirkung von Kaliumcyanid auf die Diamin-oxydase.

In Tabelle 11 der 3. Mitteilung¹⁾ wird ein Versuch dargestellt, der zeigt, dass die enzymatische Desaminierung von Putrescin bei gleichen Bedingungen viel stärker als die des Cadaverins durch Kaliumcyanid vermindert ist. Dieser Befund allein genügt schon, um zu erkennen, dass es sich hier um einen neuen, von dem wohl-bekanntem Cyanid-Hemmungsmechanismus bei Schwermetallfermen-ten grundsätzlich verschiedenen Mechanismus handelt. Wir glaubten, dass in unserm Fall Cyanid und Substrat um das Ferment konkurrieren, was seither noch dadurch erhärtet wurde, dass die Messung der *Michaelis'* Konstanten von Putrescin ($1/k_M = 840$) und Cadaverin ($1/k_M = 1800$)²⁾ eine mehr als doppelt so hohe Affinität des Cada-verins gegenüber der des Putrescins ergab. Bei den Schwermetall-fermenten dagegen ist das Ausmass der Hemmung allein von der Konzentration des Cyanids und nicht von der Substrat-Affinität abhängig. Das System Cyanid-Diamin-oxydase ist auch verschieden von dem, das durch Cyanid und Xanthin-oxydase gebildet wird. *M. Dixon* und *D. Keilin* stellten fest³⁾, dass die Aktivität der Xan-thin-oxydase verringert ist, wenn das System vor Zusatz des Sub-strats mit Kaliumcyanid inkubiert wird, und zwar um so stärker, je länger dies dauert. Diese Reaktion ist irreversibel. Für die Diamin-oxydase dagegen ist die Hemmung reversibel⁴⁾. Die Beeinflussung der Diamin-oxydase durch Kaliumcyanid muss demnach eine neue Reaktion sein. Sie wurde in Beziehung zu einer Reihe von Körpern, wie Semicarbazid, Thiosemicarbazid, Hydroxylamin, Dimedon und Natrium-bisulfit, die als einzige gemeinsame Eigenschaft die besitzen, mit Carbonylgruppen zu reagieren, und die alle den enzymatischen Abbau von Diaminen schon bei sehr kleinen Konzentrationen ver-hindern, während eine Reihe von andern typischen Fermentgiften wie Kohlenoxyd und Arsentrifoxyd⁵⁾, Pyrophosphat⁶⁾, Urethan⁷⁾, Natriumazid, Natriumfluorid, Jodacetat und Malonat⁸⁾ keine wesent-liche Wirkung ausüben, gesetzt. Es wäre geradezu unverständlich, wenn die Cyanide das nicht auch könnten, um so mehr, als sie gerade in der Fermentchemie wegen ihrer Fähigkeit der raschen Cyanhydrin-Bildung oft verwendet werden, um Carbonyle aus dem Reaktions-gleichgewicht zu entfernen. Es sind nun auch andere Autoren dazu übergegangen, in Anlehnung an die DDR. diesen Cyanid-Mechanis-mus für weitere Fermente zu diskutieren⁹⁾. In der Tabelle 1 sind

¹⁾ l. c. ²⁾ 4. Mitteilung (IV): *E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin*, *Helv.* **22**, 857 (1939), S. 844.

³⁾ *Proc. Roy. Soc. B*, **119**, 159 (1936). ⁴⁾ *III*, S. 1655. ⁵⁾ *I*, S. 723 und 724.

⁶⁾ *E. W. McHenry und G. Gavin*, *Biochem. J.* **26**, 1365 (1932).

⁷⁾ *II*, S. 888. ⁸⁾ *III*, S. 1658—1660.

⁹⁾ Histidin-carboxylase: *E. Werle und K. Heitzer*, *Biochem. Z.* **299**, 420 (1938); Cholin-esterase: *L. Massart und R. Dufaÿ*, *Enzymologia* **6**, 283 (1939).

einige wichtige unterscheidende Merkmale der 3 bisher bekannten Möglichkeiten der Reaktion zwischen Enzym und Kaliumcyanid zusammengestellt.

Tabelle 1.
Hemmung von Fermenten durch Cyanide.

Ferment	Substrataffinität beeinflusst H.	Einwirkungsdauer beeinflusst H.	Reversibilität der H.
Schwermetallenzym	—	—	+
Xanthin-oxydase	(H. nur bei Abwesenheit des Substrats)	+	—
Diamin-oxydase	+	—	+

Unter den bisherigen Resultaten gibt es zwei, die mit der geschilderten Anschauung nicht im Einklang zu sein scheinen: Erstens die stärkere Hemmung des Histaminabbaues gegenüber dem eines Substrates mit einer kleinern Affinität und zweitens die unter bestimmten Umständen auftretende Förderung der Cadaverindesaminierung¹⁾. Wegen der prinzipiellen Bedeutung dieser Befunde wurde die Beeinflussung der Diamin-oxydase durch Kaliumcyanid einer erneuten Analyse unterworfen. Wir untersuchten diesmal nicht die Desaminierung, sondern die Oxydation der Diamine, deren Verfolgung mit der manometrischen Methode einen genauen Einblick in den Reaktionsverlauf erlaubt.

Im Versuch 4 kommen beide erwähnten Tatsachen zum Ausdruck. Die Cadaverin-Oxydation ist während einer kleinen Zeit beschleunigt, die des Histamins verzögert. Der erstere Effekt ist scheinbar nicht gross, liegt aber sicher ausserhalb der Fehlerbreite

Versuch 4:

Der Einfluss von Kaliumcyanid auf die enzymatische Oxydation von Histamin und Cadaverin.

3,4 cm³ Fermentlösung (Schweineiere) + 0,4 cm³ 0,01-m. Substrat-Pufferlösung p_H 6,9 (0,001-m.) + 0,2 cm³ 0,01-m. KCN (0,0005-m.) + Puffer ad 4 cm³ + 1 Tropfen Octylalkohol. Im Einsatz 0,3 cm³ einer Mischung von 5 cm³ n. KCN + 1 cm³ n. KOH. Leerwerte (innerhalb einer Stunde kleiner als 3 mm³ O₂) subtrahiert. Die Zahlen bedeuten mm³ O₂.

Zeit (Minuten)	Histamin	Histamin + KCN	Prozent Hemmung	Cadaverin	Cadaverin + KCN	Prozent Hemmung
6	—	—	—	10,5	9,9	— 6
19	15,6	6,5	58	18,3	19,2	+ 5
29	28,3	12,6	55	26,6	29,7	+ 12
54	52,4	22,1	58	37,4	38,2	+ 2
64	58,6	24,9	59	38,3	38,2	0
84	61,3	33,7	45	40,0	39,4	1
181	65,0	51,9	20	40,1	41,0	+ 2

¹⁾ III, S. 1658.

der Methode. Diese erst nach einigen Minuten auftretende Beschleunigung des Cadaverinabbaues erklären wir uns so, dass das Kaliumcyanid den entstehenden ω -Aminovaleraldehyd abfängt und aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Der grosse negative Einfluss des Kaliumcyanids auf den Histaminabbau zeigt aufs Deutlichste, dass es einen beträchtlichen Teil des Fermentes blockiert hatte, dass also die Beschleunigung wesentlich grösser ist, als sie sich durch einfachen Vergleich der Werte mit und ohne Kaliumcyanid ergibt. Da die Verzögerung der Histaminoxidation längere Zeit konstant bleibt, muss man annehmen, dass die Bildung des Cyanhydrins des Imidazol-acetaldehyds nicht mit genügend grosser Geschwindigkeit erfolgt, um das Reaktionsgleichgewicht zu beeinflussen. Wir nehmen also an, dass die Hemmung beim Cadaverin durch die Beschleunigung überdeckt wird. Es gelingt sogar, bei zwei einander so ähnlichen Körpern wie Putrescin und Cadaverin, dass der Abbau des einen gefördert, der des andern gehemmt wird¹⁾. Der erstere wird wegen seiner geringen Affinität so stark vom Cyanid verdrängt, dass eine aktivierende Wirkung nicht zum Ausdruck kommt.

Die so starke und auffallende Bremsung der Histamin-oxydation könnte auch durch einen Mechanismus verstärkt werden, auf den schon einmal hingewiesen wurde²⁾. Histamin wurde in optimaler Konzentration angewandt. Wenn nun ein Teil des Ferments durch das Cyanid blockiert wird, dann wird die Histaminkonzentration gegenüber der verbliebenen Enzymmenge zu hoch, es tritt entsprechend der Kurve 6 der 4. Mitteilung³⁾ eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit ein. Zu der Kaliumcyanid-Hemmung würde demnach noch eine Eigenhemmung treten, die natürlich beim Cadaverin nicht vorhanden ist. Es ist deshalb angezeigt, inskünftig bei Konkurrenzversuchen mit Substraten verschiedener Affinität nicht mehr Histamin zu benützen, weil dieses die Verhältnisse in unübersichtlicher Weise komplizieren kann, sondern etwa Putrescin und Cadaverin, deren Abbaugeschwindigkeit wenig, deren Affinität aber stark voneinander verschieden ist.

Der Versuch 5 bildet eine klare Illustration für die geschilderten Vorstellungen. Hier ist die Cyanidkonzentration zu klein, um von Anfang an merklich das Histamin vom Ferment zu verdrängen. Erst wenn ein Teil des Histamins verbraucht ist, kann das Kaliumcyanid in erfolgreiche Konkurrenz mit jenem treten; es tritt zunehmende Hemmung auf. Es sind also kleine Änderungen in der Substratkonzentration von grossem Einfluss auf die Cyanid-Reaktion, was am einfachsten durch die Annahme einer „competitive inhibition“ erklärt wird.

1) III, Tabelle 12.

2) IV, S. 849.

3) l. c.

Versuch 5:

Einfluss von Kaliumcyanid auf die enzymatische Oxydation von Histamin.

Gleiches Ferment und gleiche Bedingungen wie bei Versuch 4, mit der Ausnahme, dass die Cyanidkonzentration halb so gross wie bei Versuch 4 ist. Im Einsatz befinden sich 0,3 cm³ einer Mischung von 2,5 cm³ n. KCN + 1 cm³ n. KOH. Leerwerte (maximal mm³) subtrahiert.

Zeit (Minuten)	Histamin	Histamin + KCN	Prozent Hemmung
10	5,9	5,9	0
20	15,9	13,8	13
32	30,9	23,1	25
45	45,7	30,2	34

5. Über die Abtrennung eines Cofermments der Diamin-
oxydase.

In der ersten Mitteilung¹⁾ wurde auf Grund der Hemmbarkeit der „Histaminase“ durch Kaliumcyanid die Möglichkeit erwogen, ob das Ferment Hämincharakter besitze. Da aber jene Erscheinung jetzt in ganz anderer Weise (vgl. vorangehender Abschnitt) erklärt wird und da bei der DDR. Wasserstoffperoxyd entsteht, die Diamin-
oxydase somit zu den Dehydrasen zu zählen ist, so ist diese An-
nahme unwahrscheinlich geworden. Es ist natürlich immer noch
möglich, dass in der intakten Zelle kein Wasserstoffperoxyd ent-
steht, sondern dass die Oxydation in bekannter Weise noch über
die Eisensysteme geleitet wird.

Es fiel uns seit längerer Zeit schon auf, dass bei unsern Präpa-
raten Gelbfärbung und Aktivität einigermassen parallel liefen, was
durch Extinktionsmessungen im Stufenphotometer mit dem Filter
S 45 (Filterschwerpunkt 450 m μ) bestätigt wurde. Es lag der Ge-
danke nahe, an ein Flavin zu denken, um so mehr, als die *d*-Amino-
säure-oxydase, deren Reaktionsgleichung mit der der Diamin-oxy-
dase übereinstimmt, sich als ein Flavinferment erwies²⁾.

Wenn man unser Aceton-Trockenpulver aus Schweineniere mit
einer Mischung aus gleichen Teilen Aceton und Wasser eine halbe
Stunde bei 38^o extrahiert, so verliert das Pulver fast oder ganz
seine Fähigkeit, Diamine zu oxydieren. Setzt man aber den gelben
eingedampften Extrakt hinzu, so tritt ein Teil der Aktivität wieder
auf (Versuch 6a). Wurde die gelbe Lösung alkalisiert und ein Teil
derselben belichtet, während ein anderer im Dunkeln gehalten wurde,
so aktivierte nur der letztere (Versuch 6b).

¹⁾ I, S. 726.

²⁾ F. H. Straub, Nature (London) **141**, 603 (1938); O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. **295**, 261 (1938); **296**, 294 (1938); **298**, 150, 386 (1938).

Versuch 6:

Trennung der Diamin-oxydase in Apoferment und Coferment.

a) Messung des Sauerstoffverbrauchs von mit Wasser-Aceton extrahierten Nierenpräparaten (Schwein). Die Zahlen bedeuten mm³ Sauerstoff. 2,4 cm³ des in üblicher Weise aus obigem Pulver hergestellten Extrakt + 0,1 cm³ 0,1-m. Cadaverin-dichlorhydrat + 0,5 cm³ eingedampfte Cofermentlösung + Puffer (p_H 6,9) ad 3 cm³. Dauer 323 Minuten.

Ferment	Ferment + Cadaverin	Ferment + Coferment	Ferment + Coferment + Cadaverin
11,7	13,7	4,9	24,5

b) Gleiche Versuchsanordnung. Ein Teil der gelben eingedampften Lösung eine halbe Stunde bei alkalischer Reaktion mit einer hochkerzigen Metallfadenlampe unter Kühlung belichtet. Kontrolle im Dunkeln gehalten. Dauer 985 Minuten.

Ferment + Coferment	Ferment + Coferment + Cadaverin	Ferment + bestr. Coferment	Ferment + bestr. Coferment + Cadaverin
17	40	18,4	17

Diese Inaktivierung der Cofermentlösung durch das Belichten bei alkalischer Reaktion und die übrigen Beobachtungen deuten darauf hin, dass an der DDR. ein Flavin beteiligt ist (Lumiflavin-Reaktion).

6. Die weitere Oxydation der Produkte der DDR.

Es wurde schon öfters betont, dass der Sauerstoffverbrauch der DDR. über 1 Atom pro Molekel Substrat hinausgeht. Beim Cadaverin ist die Reaktionsgeschwindigkeit der 2. Stufe sehr viel kleiner als die der ersten¹⁾, während sie beim Histamin der ersten nur wenig nachsteht²⁾. So kann unter geeigneten Versuchsbedingungen die Geschwindigkeit des Sauerstoffverzehrs der enzymatischen Oxydation des Histamins die des Cadaverins nach einer Zeit übertreffen, obwohl die Anfangsgeschwindigkeit bei gleicher Konzentration mit Cadaverin immer grösser ist³⁾.

Uns interessierte das Problem, auf welche Weise diese zusätzliche Oxydation stattfindet. Streng genommen handelt es sich hier nicht mehr um das Gebiet der Diamin-oxydase, weil die Substrate dieser Reaktion, ω -Amino-aldehyde, sicher nicht an der Diamin-oxydase aktiviert werden. Man denkt, sofern es sich um schon bekannte Fermente handelt, in erster Linie an die Monoamin- und die Xanthin-oxydase. Die erste könnte die ω -Aminogruppe oxydativ abspalten, die letztere die Aldehydgruppe zur Säure dehydrieren.

¹⁾ IV, Figur 4.

²⁾ IV, Figur 7.

³⁾ Versuch 4.

Monoamin-oxydase.

Wenn die Monoamin-oxydase regelmässig an der Oxydation der bei der DDR. entstehenden Amino-aldehyde beteiligt wäre, so müssten die beiden Fermente stets zusammen gefunden werden. Wir untersuchten deshalb eine Zahl von Organen verschiedener Tiere auf ihren Gehalt an Monoamin- und Diamin-oxydase¹⁾. Dabei stellte es sich heraus, dass mit 2 Ausnahmen immer dort, wo die Diamin-oxydase vorkommt, auch viel Monoamin-oxydase anzutreffen ist, während das Umgekehrte nicht regelmässig der Fall ist. Als Beispiel werden die Befunde einiger Schweineorgane in Versuch 7 angeführt.

Versuch 7:

Enzymatische Oxydation von Tyramin und Cadaverin durch Schweineorgane.

Darstellung der Fermente vgl. 5. Mitteilung²⁾. Organe mit der fünffachen Menge Kochsalzlösung extrahiert. 2,4 cm³ Fermentlösung + 0,5 cm³ 0,25-m. Tyramin resp. 0,1 cm³ 0,1-m. Cadaverin-dichlorhydrat + Puffer (p_H 7,2) ad 3 cm³. Tyraminansätze ohne, Cadaverinansätze mit Octylalkohol. Die Zahlen geben den Sauerstoffverbrauch in den ersten 15 Minuten an.

	Niere				Leber	
	Rinde		Mark		-	+
	-	+	-	+		
Tyramin	4,2	27	1,3	6,1	3,4	49
Cadaverin	3,2	22	3,7	1,4	3,4	3,5

Bemerkenswerte Fälle von Parallelität im Vorkommen beider Fermente finden sich bei der Rattenniere, die als grosse Ausnahme nur sehr wenig Monoamin-³⁾ und keine Diamin-oxydase⁴⁾ enthält, und bei der Niere des Menschen. In der 5. Mitteilung²⁾ wurde gezeigt, dass in der Niere des Erwachsenen die Konzentration der Diamin-oxydase in Rinde und Mark ungefähr gleich gross ist, und dass das Enzym beim Neugeborenen im Mark stark überwiegt, während sonst in allen bekannten Fällen die Verteilung umgekehrt ist. Aus Versuch 8 geht hervor, dass für die Monoamin-oxydase genau das gleiche gilt wie für die Diamin-oxydase.

¹⁾ V, 7. Mitteilung (VII): E. A. Zeller, B. Schär und M. Wenk (in Vorbereitung).

²⁾ l. c.

³⁾ H. Blaschko, D. Richter und H. Schlossmann, Biochem. J. **31**, 2187 (1937), P. Holtz, R. Heise und W. Spreyer, Arch. exptl. Path. Pharm. **188**, 580 (1938), C. E. M. Pugh und J. H. Quastel, Biochem. J. **31**, 286 (1937).

⁴⁾ I, l. c., Rose, Bram und Browne, XVI. Int. Physiol.-Kongress Zürich 1938, Kongressbericht II, S. 261, P. Holtz c. s., l. c.; E. W. McHenry und G. Gavin, Biochem. J. **26**, 1365 (1932); E. Gebauer-Fuelnegg und H. L. Alt, Proc. Soc. exptl. Biol. Med. **29**, 531 (1932).

Versuch 8:

Monoamin- und Diamin-oxydase in der menschlichen Niere.

a) Monoamin-oxydase: Niere des Erwachsenen mit der dreifachen Menge Kochsalz-lösung extrahiert. 1,8 cm³ Fermentlösung + 0,2 cm³ 0,25-m. Tyramin + Puffer ad 2,0 cm³. Dauer: 2 Stunden. Leerwert subtrahiert. Niere des Neugeborenen mit der fünffachen Menge extrahiert. 2,5 cm³ Fermentlösung + 0,5 cm³ Tyramin + Puffer ad 2 cm³. Dauer: 1 Stunde. Die Zahlen bedeuten γ N.

b) Diamin-oxydase: Erwachsener, Niere mit der zehnfachen Menge extrahiert. 4 cm³ Fermentlösung + 0,5 cm³ 0,01-m. Cadaverin-dichlorhydrat + Puffer (p_H 6,9) ad 5 cm³. Dauer 28 Stunden. Neugeborener wie Erwachsener, 2 cm³ Enzymlösung + 0,1 cm³ 0,1-m. Cadaverin + Puffer ad 2,5 cm³. Dauer: 4 Stunden.

	Monoamin-oxydase		Diamin-oxydase	
	Niere		Niere	
	Rinde	Mark	Rinde	Mark
Erwachsener	40,2	40,7	70	60
Neugeborener	0	7,3	0	14

Die einzigen bisher bekannten Ausnahmen (= viel Diamin-oxydase und wenig oder keine Monoamin-oxydase) bilden der Pancreas des Menschen und vor allem der Rattendarm. Die Ratte fällt überhaupt dadurch aus der Reihe der Säugetiere¹⁾, dass ihr Darm nur wenig Monoamin-oxydase enthält (Versuch 9).

Versuch 9:

Oxydation von Tyramin und Cadaverin durch die Schleimhaut des Rattendarmes.

Darmschleimhaut mit Objektträger abgekratzt und mit der dreifachen Menge Kochsalzlösung verrieben. 2,5 cm³ Enzymlösung, Substrat wie Versuch 8. Puffer (p_H 7,2) ad 3 cm³. Leerwerte subtrahiert. Die Zahlen bedeuten mm³ O₂.

Zeit (Minuten)	Cadaverin	Tyramin
40	16,4	10,4
60	47	18
100	78	24

Alle diese Erfahrungen lassen es als möglich erscheinen, dass die Monoamin-oxydase regelmässig an der Oxydation der Produkte der DDR. beteiligt ist. Die zwei erwähnten Ausnahmen bilden kein Hindernis für diese Vorstellung, schon deshalb nicht, weil auch in diesen Organen die Monoamin-oxydase nicht völlig fehlt. Es wurde auch schon früher betont²⁾, dass ein Substrat in verschiedenen Organen nicht immer dasselbe Schicksal erleiden müsse, auch wenn es primär immer mit dem gleichen Enzym reagiert. Überdies gelangt Blut vom Pancreas und Darm durch die vena portae direkt in die

¹⁾ K. Bhagvat, H. Blaschko und D. Richter, Biochem. J. **33**, 1338 (1939).

²⁾ V, S. 1390.

Leber, die wohl bei allen Säugern eine hohe Monoamin-oxydase-Aktivität besitzt, so dass es sogar bei den „Ausnahmen“ leicht zu einer Desaminierung der ω -Aminoaldehyde kommen könnte.

Allen diesen Überlegungen scheint die Erfahrung zu widersprechen, dass in unsern vielen bisherigen Versuchen die Desaminierung nach Abspaltung einer Molekel Ammoniak normalerweise aufhört¹⁾, währenddem die Oxydation weitergeht. Das Verhältnis des verbrauchten Sauerstoffes zu dem freigesetzten Ammoniak ist daher immer grösser als 1 und kann sogar den Wert 2 oder 3 erreichen, wenn man die Versuche lange genug laufen lässt. Das Verschwinden des 2. Sauerstoffatoms ist also nicht wie das des ersten mit einer Desaminierung gekoppelt. Auch *K. Felix* und *K. Zorn*²⁾ fanden, dass nur eine Molekel Ammoniak aus Diaminen freigemacht wird, und dass die Werte für das oben genannte Verhältnis zwischen 1 und 2 liegen. Es ist aber dennoch möglich, dass in vivo die Monoamin-oxydase in dem oben angedeuteten Sinn arbeitet. Unsere Fermentpräparate besitzen zwar wirklich nur eine geringe Aktivität an Monoamin-oxydase, aber die Organe, aus denen sie gewonnen wurden, enthalten sie in den meisten Fällen in beträchtlichen Mengen. Das Enzym ist viel empfindlicher als die Diamin-oxydase und wird durch die Behandlung mit Aceton, durch das lange Stehen beim Dialysieren und durch den Octylalkohol schwer geschädigt. Trotzdem gelingt es beispielsweise mit Vogelleber, die Desaminierung etwas weiter als 1 Atom N zu treiben. Da besonders Octylalkohol die Monoamin-oxydase irreversibel schädigt, verglichen wir den enzymatischen Abbau von Diaminen in Gegenwart und Abwesenheit dieses Stoffes und konnten feststellen, dass die Desaminierung ohne Octylalkohol ein wenig stärker ist, währenddem die Oxydation nicht beeinflusst wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es möglich und sogar wahrscheinlich ist, dass die Monoamin-oxydase die von der Diamin-oxydase oxydierten Substrate in vivo weiter desaminiert. Ob aber dieser Weg der normale ist, auf dem die Diamine (im engern Sinn) im Stoffwechsel abgebaut werden, oder ob er nur eine Nebenreaktion darstellt, müssen die weiteren Untersuchungen lehren.

Xanthin-oxydase.

Für Körper wie Histamin oder Agmatin kommt der eben beschriebene Weg nicht in Frage, da die Monoamin-oxydase weder den Imidazolring noch die Guanidingruppe aufspalten kann. Und gerade beim Histamin erfolgt die weitere Oxydation besonders rasch. Es kann sich dabei wohl nur um den Übergang von Imidazol-acetaldehyd in die entsprechende Säure handeln, die schon *Dale* und

¹⁾ III, Tabelle 2.

²⁾ Z. physiol. Ch. **258**, 16 (1938).

*Laidlaw*¹⁾ als Stoffwechselprodukt des Histamins wahrscheinlich gemacht hatten.

Der Annahme, dass diese Oxydation durch die Xanthinoxydase bewirkt werde, widersprachen die Literaturangaben²⁾, nach denen in der Schweineniere, mit der wir meistens experimentierten, das Enzym fehle. Wir dagegen fanden eine wenn auch sehr kleine, aber eben messbare Menge des Ferments vor. Wir untersuchten verschiedene Organe einer Reihe von Tieren auf Xanthin-oxydase und verglichen sie mit dem Gehalt an Diamin-oxydase³⁾. Wir stellten fest, dass überall, wo letztere vorkommt, auch die erstere in kleinerer oder grösserer Konzentration zu finden ist.

Wir prüften weiterhin die Frage, ob die Xanthin-oxydase auch basische Aldehyde angreife. *V. H. Booth*⁴⁾ hatte bei einer grossen Anzahl von Aldehyden untersucht, mit welcher Geschwindigkeit sie von der Xanthin-oxydase dehydriert werden. Unter ihnen befand sich auch ein basischer Aldehyd (p-Dimethylamino-benzaldehyd), der mit langsamer, aber doch messbaren Geschwindigkeit abgebaut wird.

Wir wählten für unsere Untersuchungen den m-Aminobenzaldehyd, der leichter löslich als die Dimethylverbindung ist. Wir bestimmten in einigen Milchproben und Organen, mit welcher Geschwindigkeit die typischen Substrate der Xanthin-oxydase (Hypoxanthin, Salicylaldehyd) und der erwähnte Aldehyd oxydiert werden. In den meisten Fällen massen wir den Sauerstoffverbrauch, in der Milch auch die Geschwindigkeit der Dehydrierung von Methylenblau unter anaeroben Bedingungen. Wir stellten fest, dass der m-Aminobenzaldehyd regelmässig von den Präparaten oxydiert wurde, die Xanthin-oxydase enthielten, wenn auch die Geschwindigkeit, mit der das geschah, regelmässig und in ähnlich bleibendem Verhältnis kleiner war als die mit der Hypoxanthin oxydiert wurde. Es ist demnach wohl sicher, dass die Xanthin-oxydase auch basische Aldehyde aktivieren kann, was vorauszusehen war, da die Xanthin-oxydase zu andern basischen Körpern wie Xanthin und Hypoxanthin eine besonders hohe Affinität besitzt.

Als typischen basischen Aldehyd und Homologes des Imidazol-acetaldehydes stellten wir den Imidazol-aldehyd dar, indem wir nach *R. Weidenhagen* aus Fructose 4-(-5-)Oxymethyl-imidazol⁵⁾ synthetisierten und dieses mit Salpetersäure zum entsprechenden Aldehyd oxydierten⁶⁾, der über das Pikrat gereinigt wurde. Er wurde von der Enzymlösung, die wir für unsere Diaminoxydase-Versuche benützten, oxydiert. So verbrauchte 1 mg Aldehyd in einem üblichen Ansatz

¹⁾ *J. Physiol.* **43**, 182 (1912).

²⁾ *E. J. Morgan*, *Biochem. J.* **20**, 1282 (1926).

³⁾ VII, l. c. ⁴⁾ *Biochem. J.* **32**, 494 (1938).

⁵⁾ *R. Weidenhagen*, *B.* **70**, 575 (1937).

⁶⁾ *Pyman*, *Soc.*, **109**, 192 (1916).

(Schweiniere, p_H 6,9) in 15 Stunden 24 mm³ Sauerstoff (nach Abzug der Autoxydation). Damit ist das Experiment von *Barger* und *Dakin*¹⁾, die nach Verfütterung dieses Aldehyds im Hundeharn die entsprechende Säure auffanden, auch in vitro nachgeahmt worden.

Aus allen diesen Versuchen geht hervor, dass in unsern Ansätzen die Weiteroxydation möglicherweise durch die Xanthin-oxydase erfolgt. Das konnten wir auch auf eine andere Weise noch zeigen, dass wir das Reaktionsprodukt der DDR. (Cadaverin) der Einwirkung von Rattenleber, die eine aktive Xanthin- und Monoamin-oxydase aufwies, unterwarfen. Das System verbrauchte Sauerstoff, setzte aber kein Ammoniak frei. Nach diesen Versuchen scheint der Hauptweg der Weiteroxydation auch bei den eigentlichen Diaminen über die Xanthin-oxydase zu verlaufen.

Als Reaktionsprodukte müssen dabei aus Putrescin und Cadaverin schliesslich ω -Aminosäuren entstehen. Wir versuchten, auch diese enzymatisch anzugreifen und benützten als Modellsubstanz β -Alanin, das in mehrfacher Hinsicht von biologischer Bedeutung ist. Es gelang uns, diesen Körper mit Rattenleberpräparaten oxydativ zu desaminieren. Das wirksame Ferment ist nach den bisherigen Ergebnissen verschieden von der *d*-Aminosäure-oxydase. Damit ist schon auch eine 3. Oxydationsstufe angedeutet. In den gewöhnlichen Ansätzen spielt das Ferment keine grosse Rolle, weil es sehr empfindlich und wenig haltbar ist. Es wurde in wechselnder Konzentration in Niere und Leber verschiedener Säuger nachgewiesen.

7. Über den enzymatischen Abbau des Histamins.

Da das Histamin immer noch das biologisch wichtigste Substrat der Diamin-oxydase darstellt, sei mit ein paar Sätzen angedeutet, wie wir uns gegenwärtig seinen enzymatischen Abbau vorstellen:

Die in der Einleitung angeführte Gleichung für die DDR. gilt in gleicher Weise für alle Substrate. Beim Histamin ist sie nur mit der Anschauung vereinbar, dass der Angriff an der Seitenkette erfolgt. In gleicher eindeutiger Weise sprechen auch das übrige, bisher über die Diamin-oxydase gesammelte umfangreiche experimentelle Material und die daraus entwickelten Vorstellungen über den Mechanismus der DDR. In völliger Übereinstimmung damit stehen die Befunde von *E. W. McHenry* und *G. Gavin*²⁾ und von *T. Torisu*³⁾, dass parallel mit dem Histaminabbau die freie, nach *van Slyke* bestimmbare Aminogruppe verschwindet. Die in der ersten Mitteilung erwähnte Carbonylverbindung, die durch enzymatische Oxydation des Histamins gewonnen wurde, besitzt ebenfalls keine nach *van Slyke* bestimmbare Aminogruppe mehr.

¹⁾ Biochem. J. **10**, 376 (1916).

²⁾ Biochem. J. **29**, 622 (1935).

³⁾ Proc. Japan. pharmacol. Soc. **11**, 61 (1937).

Wenn es einmal gelingen wird, durch ein definiertes Enzym den Imidazolring des Histamins zu öffnen, dann wird es sich um einen Vorgang handeln, der nichts mit DDR. zu tun haben wird. Die einzige bisher bekannte Sprengung eines Imidazolringes durch ein wohlcharakterisiertes Ferment bleibt somit immer noch die Histidase-reaktion von *Edlbacher*¹⁾.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Als Produkte der DDR. treten wahrscheinlich Aminoaldehyde auf.

2. *l*-Ephedrin wirkt auf die Diamin-oxydase als „competitive inhibitor“ ein. Diese Reaktion ist somit nicht spezifisch für die Monoamin-oxydase.

3. Curare beeinflusst erst in weit über den pharmakologisch wirksamen Mengen die Diamin-oxydase.

4. Es wird neues Material beigebracht, um zu beweisen, dass die Cyanidhemmung der Diamin-oxydase verschieden von den bisher bekannten zwei Arten der Einwirkung von Cyaniden auf Enzyme sei.

5. Die Diamin-oxydase wird in ein Apoferment und ein Coferment zerlegt. Das letztere scheint eine Flavingruppe zu besitzen.

6. Es wird die Frage der enzymatischen Oxydation der Produkte der DDR. diskutiert.

7. Rattenleber desaminiert oxydativ β -Alanin.

Wir danken Fr. *L. Huber* für wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut
der Universität Basel.

2. Sur l'utilisation de la limite de perceptibilité d'une réaction qualitative pour le dosage approximatif d'un élément

par *G. Gutzeit*.

(13. XI. 39.)

On sait que la limite de perceptibilité d'une réaction donnée n'est pas un chiffre absolu, mais que cette valeur est soumise à des variations relativement considérables, d'une part suivant les conditions de l'expérience, et d'autre part selon l'observateur. Malgré ce facteur d'incertitude, il est possible d'utiliser ce « seuil » dans certains cas particuliers, pour déterminer la quantité approximative d'un élément présent dans un mélange ou dans une combinaison. D'un autre côté, une technique similaire permet d'établir si tel con-

¹⁾ *S. Edlbacher* und *M. Neber*, *Z. physiol. Ch.* **224**, 261 (1934).