

Aiguilles jaunes très légèrement verdâtres fondant à 157°.

3,038 mgr. subst. ont donné 7,225 mgr. CO<sub>2</sub> et 1,065 mgr. H<sub>2</sub>O

3,256 mgr. subst. ont donné 0,489 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (23°, 758 mm)

C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>      Calculé C 65,25    H 3,79    N 17,58%

                  Trouvé „ 64,86    „ 3,92    „ 17,27%

Ce composé est le 4-nitro-2-phényl-indazole déjà décrit par *S. Reich* et *M. Ghazarian*<sup>1)</sup>. Nous avons comparé notre produit avec un échantillon préparé, d'après ces auteurs, par réduction de la (2,6-dinitro-benzyl)-aniline au moyen de chlorure d'étain(II). Notre produit, purifié par chromatographie, est d'un jaune plus pur; mais le point de fusion est le même et celui du mélange n'a montré aucune dépression.

Si l'on réduit la durée de la réaction décrite ci-dessus à 32 heures, le précipité primitif ne contient que de l'azoïque de départ; le 4-nitro-2-phényl-indazole se trouve, à côté du reste de l'azoïque et de diverses impuretés, dans l'eau-mère alcoolique. La quantité d'azoïque que l'on peut récupérer est un peu plus grande; le rendement en 4-nitro-2-phényl-indazole est un peu plus faible.

Institut de Chimie de l'Université de Fribourg (Suisse).

---

### 157. Über die Beeinflussung der Diamin-oxydase durch Kaliumcyanid<sup>2)</sup>.

7. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Polyaminen<sup>3)</sup>

von **E. A. Zeller.**

(18. X. 40.)

Mit der 1938 aufgefundenen Diamin-oxydase (Do.)<sup>4)</sup> lassen sich eine Reihe biogener Diamine oxydativ desaminieren. Das Ferment ist identisch mit der 1929 entdeckten Histaminase<sup>5)</sup>. In vielen Hunderten von Versuchen fand sich ohne eine einzige Ausnahme ein gleichartiges Verhalten von Histamin und anderen Diaminen (am häufigsten wurden Cadaverin und Putrescin verwendet) gegenüber allen Hemmungs- und Aktivierungsstoffen und Enzympräparaten, obwohl diese letztern aus verschiedenen Organen stammten und aus sehr vielen Tierarten gewonnen wurden<sup>6)</sup>. Die Identität beider

---

<sup>1)</sup> Bl. [4] **19**, 260 (1916).

<sup>2)</sup> Teilweise vorgetragen in der Sitzung des Vereins der Schweiz. Physiologen am 27. I. 40; Verh. Schweiz. Physiol. **16**, 31 (1940).

<sup>3)</sup> 6. Mitteilung; *E. A. Zeller, B. Stern* und *M. Wenk*, Helv. **23**, 3 (1940). Für die Literatur wird auf diese und die 5. Mitteilung (*E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. Mislín* und *M. Wenk*, Helv. **22**, 1381 (1939)) hingewiesen. Die Arbeiten dieser Publikationsreihe werden durch römische Ziffern bezeichnet.

<sup>4)</sup> II, S. 881.

<sup>5)</sup> *C. H. Best*, J. Physiol. **67**, 256 (1929).

<sup>6)</sup> V. S. 1385.

Fermente zeigte sich erneut bei dem Befund, dass sowohl die „Histaminase“<sup>1)</sup> wie auch die Diamin-oxydase<sup>2)</sup> im Blut von Schwangeren gegenüber dem von Nichtschwangeren um das Mehrfache erhöht ist, was eine fermentchemische Diagnose der Schwangerschaft erlaubt. Es besteht kein Zweifel darüber, dass das Ferment im tierischen Organismus Gelegenheit hat, neben Histamin auch andere biogene Di- und Polyamine abzubauen. Beim gegenwärtigen Stande der Kenntnis lassen sich noch keinerlei Aussagen darüber machen, ob der Histaminabbau seine Hauptaufgabe darstellt. Besonders jetzt, da das Enzym eine gewisse allgemeine medizinische Bedeutung zu erlangen scheint, ist es wichtig, dass die Bezeichnung Histaminase durch die allgemeinere der Diamin-oxydase ersetzt wird, um die ausschliessliche Fixierung des Ferments an den Begriff des Histamins zu verhindern.

Eine der markantesten Eigenschaften der Do. ist ihre Hemmbarkeit durch Kaliumcyanid, die schon von der „Histaminase“ her bekannt war<sup>3)</sup>. Schon in der ersten Mitteilung über Do.<sup>4)</sup> wurde darauf hingewiesen, dass es sich bei der Einwirkung von Cyanid auf die Do. um einen komplexen Vorgang handle. So wird der Abbau verschiedener Substrate sehr verschieden beeinflusst, und es gelingt sogar, bei geeigneten Versuchsbedingungen mit Kaliumcyanid die Reaktion zu beschleunigen<sup>5)</sup>. Die Hemmbarkeit der Do. durch Kaliumcyanid wurde in Beziehung zu der ausserordentlich starken Hemmung durch alle bisher untersuchten Carbonylreagentien gebracht<sup>6)</sup> (Hydroxylamin, Semicarbazid, Natriumbisulfit, Thiosemicarbazid und Dimedon). *Werle* et al. übertrugen diese Versuche auf die Histidin-carboxylase<sup>7)</sup> und stellten ein gleichartiges Verhalten dieses Enzyms gegenüber Carbonylreagentien fest. Kürzlich konnte *Werle*<sup>8)</sup> die gleiche Wirkung weiterer ähnlicher Körper, wie die der *Girard*'schen Ketonreagentien<sup>9)</sup> und Phenylhydrazin auf beide Fermente nachweisen. Es ist somit äusserst wahrscheinlich, dass die Do. in ihrer prosthetischen Gruppe eine Carbonylgruppe besitzt. Es gilt nun nachzuweisen, dass auch Blausäure mit diesem Carbonyl zu reagieren imstande ist. *Haldane*<sup>10)</sup> hat, besonders im Anschluss an die Versuche von *Olsson*<sup>11)</sup>, der die Malzamylyase mit allerdings

1) *E. Werle* und *G. Effkemann*, Arch. Gynäk. **170**, 82, 173 (1940).

2) *E. A. Zeller* und *H. Birkhäuser*, Schweiz. Med. Wschr. **70**, 975 (1940); *E. A. Zeller*, Naturwiss. **28**, 712 (1940).

3) *C. H. Best*, *E. W. McHenry*, J. Physiol. **70**, 349 (1930).

4) II, S. 889.                    5) III, S. 1658.

6) II, S. 888, III, S. 1655, VI, S. 7.

7) *E. Werle* und *K. Heitzer*, Biochem. Z. **299**, 420 (1938).

8) *E. Werle*, Bioch. Z. **304**, 201 (1940).

9) *A. Girard* und *G. Sandulesco*, Helv. **19**, 1095 (1936).

10) *J. B. S. Haldane*, Enzymes, London 1930, S. 154.

11) *U. Olsson*, Z. physiol. Ch. **114**, 51 (1921).

hohen Konzentrationen von Phenylhydrazin, Hydroxylamin, Semicarbazid, Natriumsulfit und Natriumcyanid inaktivieren konnte, schon die Frage diskutiert, ob die Blausäure durch Bindung an ein Carbonyl ein Ferment hemmen könne. Meines Wissens existieren aber keine experimentellen Arbeiten, die einen solchen Reaktionsmechanismus nachgewiesen hätten. Um eine sichere Grundlage zu schaffen, diese Frage von allgemeinerem fermentchemischem Interesse am Beispiel der Do. zu entscheiden, wurde die Reaktion zwischen Do. und Kaliumcyanid einer eingehenden Analyse unterworfen.

### Methodik.

Die Messungen geschahen ausnahmslos manometrisch im *Warburg*-Apparat. Die Methoden waren die gleichen, die in den vorangehenden Mitteilungen entwickelt worden sind. Es wurde in erster Linie das Verhalten der Oxydationsstufe 1 untersucht. Das System der Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion (DDR.) nimmt nämlich sehr rasch eine halbe Molekel Sauerstoff pro Molekel Substrat auf (DDR. 1), während der Verbrauch einer zweiten halben Molekel Sauerstoff sehr viel langsamer erfolgt<sup>1)</sup>. Der Einfluss dieser 2. Oxydationsstufe (der Einfachheit halber als DDR. 2 bezeichnet) macht sich aber schon nach wenigen Minuten bemerkbar, so dass in jedem einzelnen Falle entschieden werden muss, welcher Stufe die Beeinflussung des Reaktionsverlaufes zuzurechnen ist.

Als Ferment wurde Trockenpulver aus Schweineiere benutzt, das in der schon mehrfach beschriebenen Weise dargestellt und mit Kochsalzlösung extrahiert wurde. Die Fermentlösung dialysierte gegen Phosphatpuffer  $p_H$  7,2. Die Konzentrationsverhältnisse und die übrigen Angaben werden bei den betreffenden Tabellen und Kurven angegeben.

### 1. Die Beeinflussung der Diamin-oxydase durch Natriumsulfid und Thioharnstoff.

Aus den früheren Untersuchungen über die „Histaminase“ und die Do. liess sich der Schluss ziehen, dass an der DDR. primär kein Schwermetallenzym beteiligt sei. Weder Pyrophosphat<sup>2)</sup> noch Kohlenoxyd<sup>3)</sup> üben einen hemmenden Einfluss aus, Natriumazid erst nach längerer Zeit<sup>4)</sup>. Ausserdem ist das System der DDR. autoxydabel, erkenntlich an der Bildung von Wasserstoffperoxyd<sup>5)</sup>, was wohl mit der Anwesenheit eines Flavins in Zusammenhang steht<sup>6)</sup>. Es gibt ja mehrere Flavinfermente, die direkt mit Sauerstoff reagieren. Für die eigentliche Do. scheint demnach auch nicht eine Sauerstoffaktivierung durch das *Warburg-Keilin*-System nötig zu sein.

<sup>1)</sup> IV, S. 842.

<sup>2)</sup> E. W. McHenry und G. Gavin, *Biochem. J.* **26**, 1385 (1932).

<sup>3)</sup> I, S. 723.

<sup>4)</sup> III, S. 1658.

<sup>5)</sup> II, S. 884.

<sup>6)</sup> VI, S. 10.

In frühern Versuchen wurde begreiflicher Weise nicht zwischen erster und zweiter Oxydationsstufe unterschieden, da entweder das Verschwinden des Histamins pharmakologisch gemessen oder die Bildung von Ammoniak aus Diaminen bestimmt wurde. Es wurde deshalb der Einfluss von zwei weiteren Schwermetallgiften, Natriumsulfid und Thioharnstoff, auf die Do. analysiert.

**Tabelle 1.**  
(Nr. W 356)

1 g Fermentpulver mit 8 g Kochsalzlösung extrahiert. Für jedes Gefäß werden 2,5 cm<sup>3</sup> Lösung + 1 Tropfen Octylalkohol benützt, Gesamtvolumen 3 cm<sup>3</sup>. Hemmkörper (0,001-m.) werden gleichzeitig mit dem Substrat (Cadaverin-Dichlorhydrat 0,00267-m.) zur Fermentlösung gekippt. Im Gasraum befindet sich Luft. p<sub>H</sub> = 7,2. Der Verbrauch von ½ Molekel O<sub>2</sub> pro Molekel Substrat entspricht einem Verbrauch von 89,6 mm<sup>3</sup>. Die sehr kleinen Leerwerte sind subtrahiert worden.

Minuten	Cadaverin		Cadaverin + Na <sub>2</sub> S		Cadaverin + CS(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	
	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	k	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	k	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	k
10	28,1	0,0162	20,1	0,0109	22,0	0,0122
15	37,0	153	30,7	119	29,4	166
20	47,6	167	38,4	121	36,5	113
30	67,1	198	53,8	132	48,5	112
40	77,4	225	64,6	137	57,6	111
50	84,8	370	70,6	132	64,5	111

Aus dem Versuch 1 geht hervor, dass beide Reagentien den Sauerstoffverzehr verringern. Es handelt sich aber ausschliesslich um die Hemmung der 2. Oxydationsstufe. Das lässt sich leicht in folgender Weise zeigen: Bei der DDR. bestimmt die Zerfallsgeschwindigkeit der Ferment-Substrat-Verbindung die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion. Dieser Zerfall stellt in erster Annäherung eine monomolekulare Reaktion dar. Der Sauerstoffverbrauch erfüllt in den ersten Minuten die Gleichung für monomolekulare Reaktionen<sup>1)</sup>, d. h.

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}^2$$

ist konstant ( $a$  = Anfangskonzentration,  $x$  = die mit der Zeit  $t$  umgesetzte Menge). Dann nimmt aber  $k$  sehr rasch zu, weil die 2. Oxydationsstufe sich immer stärker bemerkbar macht. Das gleiche Verhalten zeigt sich auch beim Versuch in der Tabelle 1 (Cadaverin allein). In den Ansätzen mit Natriumsulfid und Thioharnstoff dagegen bleibt  $k$  praktisch konstant, d. h. es tritt die 2. Oxydationsstufe nicht in Erscheinung, die damit in einfachster Weise ausge-

<sup>1)</sup> IV, S. 843.

<sup>2)</sup> In der Tabelle sind nicht die natürlichen, sondern die dekadischen Logarithmen verwendet worden, was auf die Konstanz keinen Einfluss hat.

schaltet werden kann. Die beiden Reagentien haben keine hemmende Wirkung auf die 1. Oxydationsstufe und somit auch nicht auf die DDR., da die 2. Stufe eigentlich nicht mehr zur DDR. zu zählen ist.

Wie aus der voranstehenden Tabelle hervorgeht, erfährt  $k$  mit zunehmender Reaktionsdauer eine immer deutlicher werdende leichte Abnahme. Das zeigt, dass es sich nicht um eine monomolekulare, sondern um eine unvollständig verlaufende, reversible Reaktion handelt, deren Gleichgewicht unter den üblichen Bedingungen allerdings stark nach der Zerfallsseite verschoben ist. Schon in frühern Versuchen über die Aktivierung der Do. durch Kaliumcyanid wurde auf die Reversibilität der DDR. hingewiesen<sup>1)</sup>.

Von *M. Kiese* wurde die „Histaminase“ präparativ in die DDR. 1 und DDR. 2 getrennt<sup>2)</sup>.

In einer analogen Anordnung wie bei dem in Tabelle 1 wiedergegebenen Versuch zeigte Natriumazid eine sehr ähnliche Reaktion wie Natriumsulfid und Thioharnstoff. Auch hier schaltet das Azid fast ausschliesslich die 2. Oxydationsstufe aus. Doch sind die Verhältnisse etwas komplizierter als bei den beiden andern Stoffen und sollen in einer spätern Publikation dargestellt werden.

Alle diese Versuche führen zu dem gleichen Ergebnis, dass es sich bei der Do. nicht um ein Schwermetallferment handeln und dass somit der Einfluss von Cyaniden nicht auf einer Reaktion mit einem Schwermetallion beruhen kann.

## 2. Die Reversibilität der Cyanidhemmung der Diamin-oxydase.

In der ersten ausführlichen Mitteilung über die Diaminoxidase<sup>3)</sup> wurde schon auf die Reversibilität der Cyanidhemmung hingewiesen. Wenn man nämlich in den zylinderförmigen Einsätzen der Manometergefässe gewöhnliche Lauge zur Absorption des Kohlendioxyds verwendet, so absorbiert jene die Blausäure ziemlich rasch, und es kommt anstatt zu einer Hemmung nur zu einer kurz dauernden Verzögerung der DDR. Man muss deshalb für solche Versuche entweder die *Krebs*'schen Cyanid/Lauge-Mischungen benützen<sup>4)</sup>, die die gleiche Blausäuredampfspannung wie die benutzten Cyanidlösungen besitzen, oder aber überhaupt ohne Lauge arbeiten. Die letztere Anordnung wurde in den meisten Fällen benutzt, da bei der DDR. kein Kohlendioxyd entsteht, und da bei Verwendung sehr aktiver, gereinigter und gut dialysierter Fermentlösungen höchstens Spuren von Kohlendioxyd durch andere Reaktionen frei werden.

Die Reversibilität der Cyanidhemmung der Do. lässt sich auf dreierlei Weise dartun:

<sup>1)</sup> III, S. 1658.

<sup>3)</sup> II, S. 890.

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **305**, 22 (1940).

<sup>4)</sup> *H. A. Krebs*, Biochem. J. **29**, 1620 (1935).

a) In der eben geschilderten Anordnung lässt man die Blausäure durch Lauge absorbieren.

**Tabelle 2.**  
(Nr. W 320)

Fermentlösung und Mengenverhältnisse wie bei Versuch 1. Cadaverin (0,00267-m.) und Kaliumcyanid (0,001-m.) gleichzeitig zur Fermentlösung zugekippt. Im Einsatz 0,1 cm<sup>3</sup> 10-proz. Natronlauge resp. 0,2 cm<sup>3</sup> eines Gemischs von 10 cm<sup>3</sup> n. KCN+1 cm<sup>3</sup> n. NaOH. Oxydationsstufe 1 entspricht einem Verbrauch von 112 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>. Leerwerte, weil sehr klein, nicht berücksichtigt. Die Zahlen geben die verbrauchten mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>.

Minuten	Cadaverin Einsatz: NaOH	Cadaverin+ KCN Einsatz: NaOH	Cadaverin+ KCN Einsatz: NaOH/KCN
10	11,3	8,3	3,5
20	31,1	32,7	2,5
30	60,1	65,5	6,3
40	68,8	82	0,5

Schon nach 20' ist dort die Verzögerung des Sauerstoffverzehr eingeholt worden, wo im Einsatz nur Lauge vorhanden war, während bei Verhinderung der Blausäureabsorption durch eine KCN/NaOH-Mischung nach vielen Stunden nur ein sehr geringer Sauerstoffverbrauch gefunden wurde. In andern analogen Versuchen wurde die anfänglich vorhandene KCN/NaOH-Mischung durch gewöhnliche Lauge ersetzt. Obwohl vorher keine Oxydation stattfand, setzte sie gleich nach dem Wechsel der Absorptionsflüssigkeit ein.

Aus dem Versuch in der Tabelle 2 geht weiterhin hervor, dass Kaliumcyanid eine wesentlich grössere Affinität zur Do. als Cadaverin besitzt. Trotz der dreimal kleineren Konzentration hat das Cyanid das Ferment vollständig blockiert.

b) In einer frühern Arbeit wurde mitgeteilt<sup>1)</sup>, dass die Hemmung der DDR. durch Carbonylreagentien vollständig durch Zusatz von Brenztraubensäure verhindert werden kann. Das gleiche lässt sich auch für die Cyanidhemmung zeigen.

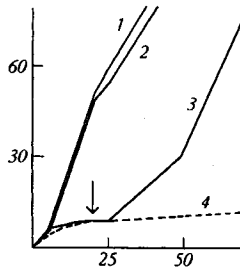


Fig. 1.  
(Nr. W 334)

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

Fermentlösung wie bei Versuch 1, davon 2 cm<sup>3</sup> für jeden Versuch. Gesamtvolumen 3 cm<sup>3</sup>. Cadaverin (0,0033-m.), KCN (0,002-m.) und teilweise Pyruvat (0,01-m.) gleichzeitig zur Fermentlösung zugekippt. Das letztere in einem Fall erst später zugegeben (Pfeil). Im Manometergefäss findet sich reiner Sauerstoff. Einsatz ohne Lauge. Abszisse: Minuten, Ordinate: mm<sup>3</sup> Sauerstoff (Leerwerte subtrahiert). Kurve 1: Cadaverin + KCN + Pyruv., Kurve 2: Cadaverin, Kurve 3: Cadaverin + KCN + Pyruv. (Pfeil), Kurve 4: Cadaverin + KCN.

Aus der Figur geht hervor, dass die angewandte Kaliumcyanid-Konzentration die DDR. vollständig hemmt. Wenn aber nachträglich noch Pyruvat zugesetzt wird, so beginnt nach wenigen Minuten der Sauerstoffverbrauch anzusteigen. In kurzer Zeit ist die Reaktionsgeschwindigkeit gleich gross wie bei dem Ansatz ohne Cyanid. Gleichzeitiger Zusatz von Kaliumcyanid und Pyruvat lässt, besonders am Anfang, keinen Unterschied gegenüber dem Versuch ohne Cyanid erkennen.

Trotz der vorhin erwähnten relativ hohen zwischen Do. und Cyanid bestehenden Affinität lässt sich also der Komplex Cyanid/Do. durch Zusatz eines Carbonylkörpers leicht zerlegen. Die 20' dauernde Einwirkung von 0,002-m. KCN hat keine erkennbare Schädigung des Enzyms verursacht.

c) Ein solches Abfangen des Kaliumcyanids müsste auch dann eintreten, wenn es stimmt, dass als erstes Produkt der DDR. (neben Ammoniak und Wasserstoffperoxyd) ein Aldehyd entstände<sup>1)</sup>. Das ist auch tatsächlich immer dann der Fall, wenn die Kaliumcyanid-Konzentration so gewählt wird, dass ein wenn auch noch so kleiner Umsatz vorhanden ist. Der entstehende Aldehyd bindet einen Teil des Cyanids, was eine raschere Reaktion zur Folge hat, die wiederum mit grösserer Geschwindigkeit weiteres Kaliumcyanid unschädlich macht. Wenn die Substratkonzentration gross genug ist, müsste die Oxydationsgeschwindigkeit schliesslich wie bei Fig. 1 die normale Grösse erreichen. Das trifft, wie Fig. 2 zeigt, auch tatsächlich ein.

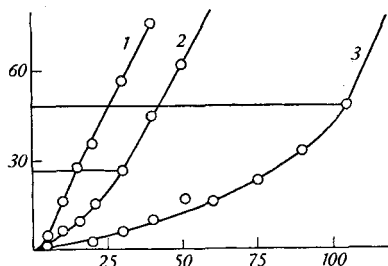


Fig. 2.  
(Nr. W 335)

Gleiche Versuchsanordnung wie Figur 1. Cadaverin 0,00535-m. KCN 0,000833-m. resp. 0,00133-m. Abszisse und Ordinate wie bei Figur 1. Kurve 1: Cadaverin, Kurve 2: Cad. +  $2,5 \times 10^{-6}$  Mol. KCN, Kurve 3: Cad. +  $4 \times 10^{-6}$  Mol KCN.

<sup>1)</sup> II, S. 887.

Wie die Figur erkennen lässt, handelt es sich um eine typische Autokatalyse. Die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit wird noch dadurch vergrößert, dass bei abnehmender Substratkonzentration die Eigenhemmung stetig kleiner wird. Je grösser die Cyanidkonzentration ist, desto länger dauert es, bis die normale Geschwindigkeit erreicht ist. Das ist genau dann der Fall, wenn so viel Mole Substrat oxydiert worden sind, als Mole Cyanid vorhanden sind. Aus dem in Fig. 2 dargestellten Versuch erhält man folgende Zahlen (Tabelle 3):

Tabelle 3.

Cyanidmenge in Mol	O <sub>2</sub> -Verbrauch bis Auftreten Max. Geschw.	oxydierte Substrat- menge in Mol
2,5 × 10 <sup>-6</sup>	27	2,4 × 10 <sup>-6</sup>
4,0 × 10 <sup>-6</sup>	48	4,3 × 10 <sup>-6</sup>

Ein gleichartiger Versuch ergab folgendes Resultat:

Tabelle 4.

(Nr. W 336)

Anordnung wie bei Figur 2.

Cyanidmenge in Mol	O <sub>2</sub> -Verbrauch bis Auftreten Max. Geschw.	oxydierte Substrat- menge in Mol
2 × 10 <sup>-6</sup>	25	2,2 × 10 <sup>-6</sup>
3 × 10 <sup>-6</sup>	31	2,75 × 10 <sup>-6</sup>
4 × 10 <sup>-6</sup>	44	3,9 × 10 <sup>-6</sup>

Die Übereinstimmung zwischen der Menge des umgesetzten Substrats und der der Cyanidmenge ist eine überaus gute, so dass diese Versuche sowohl als Beweis für die Reversibilität der Cyanidhemmung der DDR., wie auch für das Auftreten eines Carbonyls gelten können. Es wäre zwar noch denkbar, dass die Blausäure durch das entstehende Wasserstoffperoxyd oxydiert und dadurch unwirksam gemacht würde. Tatsächlich wurde früher in zahlreichen, nicht veröffentlichten Versuchen die Unwirksamkeit von Kaliumcyanat bis hinauf zu grossen Konzentrationen festgestellt. Diese sekundäre Oxydation der Blausäure würde aber einen entsprechenden zusätzlichen Sauerstoffverbrauch bedingen, wie das beispielsweise für zugesetzten Alkohol der Fall ist<sup>1)</sup>. Ein solcher Mehrverbrauch konnte aber bisher noch nie gefunden werden.

Die Tatsache, dass je eine oxydierte Substratmolekel eine Molekel Cyanid unwirksam macht, kann dazu dienen, aus Kurven

<sup>1)</sup> II, S. 884.



von der Art der Fig. 2 die umgesetzte Substratmenge und damit auch die noch vorhandene Cyanidmenge zu ermitteln. Die Tangente gibt in den betreffenden Punkten die Oxydationsgeschwindigkeit an.

### 3. Die Beeinflussung der Cyanidhemmung durch verschiedene Substratkonzentrationen.

In einer frühern Arbeit wurde ein Befund mitgeteilt<sup>1)</sup>, der mit der Annahme, dass Kaliumcyanid wie die übrigen Carbonylreagentien mit den Substraten der Do. um diese konkurrierte, nicht verträglich erschien. Es wurde nämlich durch Kaliumcyanid die Desaminierung des Histamins stärker gehemmt als es dessen grosser Affinität zur Do. entsprach. Dieses Resultat wurde in Zusammenhang mit der Eigenhemmung der DDR. durch überoptimale Substratkonzentration gebracht<sup>2)</sup>. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt nämlich innerhalb eines bestimmten Bereichs mit wachsender Substratkonzentration zu, um dann beim Histamin besonders rasch, bei Cadaverin und Putrescin nur langsam wieder abzunehmen<sup>3)</sup>.

Um diesen vermuteten Zusammenhang zwischen dieser Eigen- und der Cyanidhemmung aufzudecken, wurden eine grosse Zahl von Versuchen durchgeführt, in denen systematisch das Substrat, die Konzentrationsverhältnisse und andere Versuchsbedingungen variiert wurden.

Wenn die eben erwähnte Annahme richtig ist, dass Cyanid und Substrat um die Do. konkurrieren, dann muss die Cyanidhemmung durch Variation der Substratkonzentration beeinflusst werden können. In dem in Tabelle 5 dargestellten Versuch nimmt auch wirklich die Oxydationsgeschwindigkeit vorerst zu, wenn bei gleichbleibender Cyanidmenge die Substratkonzentration zunimmt. Wenn man aber die Umsätze mit denen ohne Kaliumcyanid vergleicht, so ist in diesem Bereich die Geschwindigkeit auch für die letzteren grösser geworden. Das bedeutet, dass das Ferment hier noch nicht mit dem Substrat gesättigt war, und dass deshalb die Beschleunigung nicht mit Sicherheit auf eine Verdrängung des Cyanids von der prosthetischen Gruppe des Ferments zurückzuführen ist. Diese müsste aber von der Konzentration 0,0053-m. an deutlich sein, da hier sicher Sättigung erreicht ist. Wie die Tabelle 5 zeigt, trifft aber das Gegenteil des Erwarteten ein: Die Geschwindigkeit nimmt ab. Auch die Ansätze ohne Cyanid zeigen die „Eigenhemmung“, aber sehr viel weniger ausgeprägt. Die Cyanidwirkung verstärkt also die Hemmung durch eine überoptimale Substratkonzentration, und umgekehrt diese den Cyanideffekt. Es ist verständlich, dass diese Reaktion zuerst beim Histaminabbau beobachtet wurde, da bei diesem die Eigenhemmung besonders stark hervortritt. Sie soll, um lange Umschreibungen zu vermeiden, als Summationseffekt bezeichnet werden.

<sup>1)</sup> III, S. 1658.

<sup>2)</sup> IV, S. 849, VI, S. 9.

<sup>3)</sup> IV, S. 844.

**Tabelle 5.**  
(Nr. W 328/329)

Fermentlösung und Ansätze wie bei Fig. 1. Cadaverin und KCN gleichzeitig zugekippt. Bei den Ansätzen mit Cyanid kann als Reaktionsgeschwindigkeit nur ein Mittelwert angegeben werden, da die S. 1425 beschriebene autokatalytische Reaktionsbeschleunigung auch hier zu finden ist. Als Geschwindigkeitsmass wurde die Zeit bestimmt, bis das KCN eliminiert war und bis die Reaktion mit der normalen Geschwindigkeit weiterlief (vgl. Fig. 3).

Konzentration Cadaverin	Anfangsgeschw. ohne KCN	mittlere Anfangsgeschw. mit KCN (0,000833-m.)
0,0013-m.	1,7 mm <sup>3</sup> /Min.	0,7 mm <sup>3</sup> /Min.
0,0026-m.	1,9 „	1,0 „
0,0053-m.	2,1 „	1,2 „
0,0106-m.	1,7 „	0,8 „
0,0213-m.	1,4 „	0,5 „

In einer schematischen Zeichnung (Fig. 3) ist diese merkwürdige Reaktion nochmals dargestellt worden. In dieser ist der Verlauf des Sauerstoffverzehrs des Systems Cadaverin-Diamin-oxydase mit und ohne Kaliumcyanid aufgetragen. In der Reaktionsphase a, während der die Bindung des Kaliumcyanids an den sich bildenden Carbonylkörper erfolgt, ist der Einfachheit halber nicht durch die wirkliche Kurve (vgl. Fig. 2), sondern durch eine Gerade wiedergegeben. Für die Phase b ist die Geschwindigkeit für alle Ansätze die gleiche, sofern nicht ein wesentlicher Teil des Cadaverins vorher verbraucht worden ist.

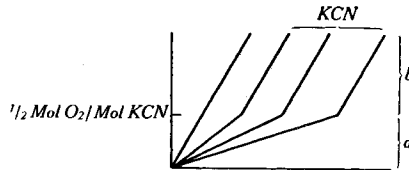


Fig. 3.

Schematische Darstellung der DDR. in Abhängigkeit von der Cadaverinkonzentration. Die erste Kurve (von links) entspricht einer optimalen Cadaverinkonzentration ohne KCN, die nächste der gleichen Cadaverinkonzentration mit KCN und die folgenden zunehmend stärker überoptimalen Cadaverinkonzentrationen mit KCN. Abszisse: Zeit, Ordinate: verbrauchter Sauerstoff.

In einigen Versuchen ist bei der höchsten Konzentration die Phase b erst nach 2 Stunden aufgetreten.

#### 4. Die Verdrängung des Kaliumcyanids durch Cadaverin.

Auch die scheinbar widersprechenden Resultate des vorangehenden Abschnitts 3 lassen sich mit der Vorstellung von der Konkurrenz zwischen Cyanid und Substrat um die Do. in Einklang

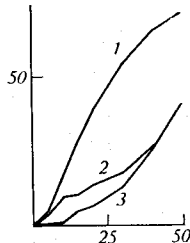
bringen (vgl. Diskussion der Ergebnisse). Es gelingt aber, die Verdrängung des Cyanids durch Cadaverin auch direkt aufzuweisen. Wenn man nämlich bei gleichbleibender Cyanid- die Cadaverinkonzentration steigert, so tritt, wie das eben belegt wurde, zuerst eine Verstärkung der Cyanidhemmung, im weiteren Fortschreiten aber eine Verminderung derselben auf. Das kann nur so begriffen werden, wenn man eine zunehmende Verdrängung des Cyanids durch das Cadaverin annimmt.

**Tabelle 6.**  
(Nr. W 306)

Fermentlösung und Versuchsanordnung wie bei Fig. 1. Substrat und KCN gleichzeitig zugekippt. In Spalte 2 und 3 sind als Mass für die Reaktionsgeschwindigkeit die verbrauchten  $\text{mm}^3 \text{O}_2$  angegeben. Die sehr kleinen Leerwerte sind subtrahiert.

Substrat	$\text{mm}^3 \text{O}_2$ nach 10 Minuten	$\text{mm}^3 \text{O}_2$ nach 20 Minuten
0,0011-m. Cadav. . . . .	27,6	32,4
0,0033-m. Cadav. . . . .	58,8	83,6
0,01-m. Cadav. . . . .	26,5	52,8
0,0011-m. Cadav. + 0,001-m. KCN . .	14	15,6
0,0033-m. Cadav. + 0,001-m. KCN . .	7,2	8,5
0,01-m. Cadav. + 0,001-m. KCN . .	8,3	11,5

Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen der Do. und dem Kaliumcyanid scheint verhältnismässig langsam zu erfolgen, so dass Cadaverin, wie es häufig gefunden wird, zuerst mit normaler Geschwindigkeit oxydiert wird, wenn es gleichzeitig mit dem Cyanid zur Fermentlösung zugefügt wird, bis dann nach einigen Minuten die Cyanidwirkung plötzlich sichtbar wird. Wenn man aber das Cyanid einige Zeit vor dem Substrat mit dem Ferment zusammenbringt, dann tritt, wie die Fig. 4 zeigt, von Anfang an eine entsprechende Hemmung auf.



**Fig. 4.**  
(Nr. 333)

Fermentlösung und Versuchsanordnung wie bei Fig. 1. Cyanid (0,001-m.) teils 40' vor (Kurve 3) dem Cadaverin (0,0027-m.), teils gleichzeitig (Kurve 2) mit diesem zugekippt. Abszisse: Minuten, Ordinate:  $\text{mm}^3 \text{O}_2$ . Kurve 1: Oxydationsverlauf bei Abwesenheit von Cyanid.

Aus der Fig. 4 erkennt man ferner, dass auch bei Abwesenheit des Substrats eine 40 Minuten dauernde Inkubation des Ferments dieses nicht schädigt. Nach der üblichen autokatalytischen Steigerung der Reaktion durch Eliminierung des Cyanids ist die Oxydationsgeschwindigkeit praktisch dieselbe wie in dem Ansatz ohne Kaliumcyanid (Kurve 1) oder in dem mit gleichzeitigem Zusatz der beiden Agentien (Kurve 2). Das spricht auch gegen eine Annahme, dass es sich bei dieser Cyanidhemmung um einen ähnlichen Prozess wie bei der irreversiblen Hemmung der Xanthin-oxydase durch Kaliumcyanid<sup>1)</sup> handelt, die regelmässig nur dann auftritt, wenn das Enzym vor der Vereinigung mit dem Substrat mit Kaliumcyanid inkubiert worden ist.

Auch aus Tabelle 5 ist ohne weiteres ersichtlich, dass die volle Cyanidhemmung erst nach einigen Minuten bemerkbar wird.

#### 5. Die Beschleunigung der Diamin-Diaminoxydase-Reaktion durch Kaliumcyanid.

Kaliumcyanid hemmt nicht nur den Abbau der Diamine durch die Do. durch „competitive inhibition“, sondern kann auch bei geeigneten Versuchsbedingungen die Oxydation der Substrate der Do. beschleunigen<sup>2)</sup>, eine Reaktion, die in der Cyanidhemmung der Schwermetallfermente keine Analogie besitzt. Diese zuerst paradox anmutende Umkehr der Wirkung von Kaliumcyanid ist nach dem Vorstehenden unschwer zu deuten:

Wenn die Annahme von der Reversibilität der Do. richtig ist (vgl. Abschnitt 1), dann muss es gelingen, durch Eliminierung des einen ihrer Produkte, z. B. des Aldehyds, die Reaktion zu einer vollständigen zu machen und die Umsatzgeschwindigkeit zu erhöhen. Das kann folgendermassen geschehen: Setzt man einer Fermentlösung verhältnismässig wenig Cadaverin und Kaliumcyanid zu, so nimmt die anfängliche Hemmung infolge der in Abschnitt 1c beschriebenen Anfangsreaktion ab, so dass schliesslich die Oxydation in den Ansätzen mit und ohne Kaliumcyanid ungefähr gleich rasch erfolgt. Wenn die Geschwindigkeit in dem letztern infolge Substratmangel rasch abnimmt, bleibt sie in der erstern länger auf der gleichen Höhe, so dass es zu der häufig beobachteten Kreuzung der beiden Kurven des Sauerstoffverbrauchs (Fig. 5) kommt. Um das zu erreichen, muss man die Mengen so wählen, dass Kaliumcyanid einen beträchtlichen Teil des Reaktionsprodukts zu binden vermag, ohne aber die initiale Hemmung zu gross werden zu lassen.

Aus der nachstehenden Fig. 5 geht hervor, dass die Reaktion nach Verbrauch eines Atoms Sauerstoff noch nicht zu Ende ist. Die Weiteroxydation verläuft aber bei dieser kleinen Substratkonzentra-

<sup>1)</sup> M. Dixon und D. Keilin, Proc. Roy. Soc. [B] **119**, 159 (1936).

<sup>2)</sup> III, S. 1658.

tion so langsam, dass es vorübergehend zur Einstellung des Gleichgewichts und mit Kaliumcyanid zu einer Beschleunigung der Oxydation kommt.

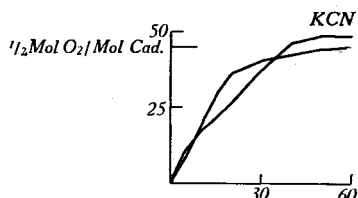


Fig. 5.  
(Nr. W 330)

Fermentlösung und Versuchsanordnung wie bei Fig. 1. Cadaverin (0,00133-m.) und KCN (0,000833-m.) gleichzeitig zugekippt. Oxydationsstufe 1 entspricht einem Verbrauch von  $37 \text{ mm}^3 \text{ O}_2$ . Leerwerte subtrahiert. Abszisse: Minuten, Ordinate:  $\text{mm}^3 \text{ O}_2$ .

## 6. Der Einfluss von Kaliumcyanid auf die zweite Oxydationsstufe der Diamin-Diaminoxidase-Reaktion.

Verschiedene Schwermetallinhibitoren wie Natriumsulfid, Thioharnstoff und Natriumazid schalten die DDR. 2 aus (Abschnitt 1). Damit besteht auch die Möglichkeit, dass Kaliumcyanid als das bekannteste Schwermetallgift ebenfalls diese Oxydationsstufe beeinflusst. Der Mechanismus wäre ein ganz anderer wie bei der Einwirkung auf die DDR. 1: In dem einen Fall handelt es sich um eine Konkurrenzerscheinung zwischen Kaliumcyanid und dem Substrat, in dem andern müsste die klassische Reaktion zwischen dem Cyanid und einem Schwermetall vorliegen.

Eine solche Hemmung der DDR. 2 ist nicht leicht nachzuweisen, da schon die vorangehende Reaktion in so mannigfaltiger Weise durch Kaliumcyanid verändert wird. Nimmt man eine zu grosse Cyanidkonzentration, so kommt die Reaktion zu langsam in Gang, wählt man eine zu kleine, so wird das Kaliumcyanid sehr rasch durch den entstehenden Aldehyd abgefangen, so dass es nicht mehr auf die DDR. 2 wirken kann. Aber auch hier kommt man durch systematische Variation der Konzentrationen zum Ziel.

Wählt man die Substrat- und die Cyanidkonzentration derart, dass die letztere gleich oder bis dreimal kleiner als die erstere ist, so wird die 2. Oxydationsstufe vollständig ausgeschaltet (Tabelle 7). Ist die Zahl der Substratmolekeln wesentlich grösser als die des Cyanids, dann geht die Oxydation über den Verbrauch eines Atoms Sauerstoff pro Molekel Substrat hinaus.

**Tabelle 7.**  
(Nr. W 321)

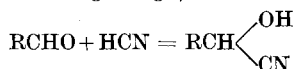
2,5 cm<sup>3</sup> Fermentlösung pro Ansatz, sonst gleiche Versuchsanordnung wie bei Fig. 1. Cyanid (0,000833-m., insgesamt  $2 \times 10^{-6}$  Mol) und Cadaverin (0,0033-m. und 0,01-m., insgesamt  $10 \times 10^{-6}$  und  $30 \times 10^{-6}$  Mol) gleichzeitig zugesetzt. Die sehr kleinen Leerwerte subtrahiert.

Minuten	Konz. Cadav.	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> ohne KCN	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> mit KCN	% Hemmung
10	0,0033-m.	34	22	34
20	(entspricht einem	63	57	10
31	Verbrauch von	91	86	6
111	112 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> für	144	115	19
222	DDR. 1)	158	127	20
		(=1,41 × 10 <sup>-6</sup> *)	(=1,13 × 10 <sup>-6</sup> *)	
10	0,01-m.	31	22	27
20	(entspricht einem	65	54	16
31	Verbrauch von	101	93	8
111	336 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> für	322	336	+4
222	DDR. 1)	448	460	+3
		(=1,34 × 10 <sup>-6</sup> *)	(=1,37 × 10 <sup>-6</sup> *)	

\*) Die eingeklammerten Zahlen bedeuten die pro Mol Substrat verbrauchten  $\frac{1}{2}$  Mol Sauerstoff.

Auch hier nimmt die Hemmung der Do. durch Kaliumcyanid zuerst autokatalytisch ab. Bei der kleinern Cadaverinkonzentration nimmt sie aber dann wieder zu, so dass der Sauerstoffverbrauch nicht wesentlich über 1 Atom pro Molekel Substrat hinausgeht. Bei der grössern Cadaverinkonzentration dagegen bleibt die Oxydationsgeschwindigkeit nach Eliminierung des Cyanids praktisch die gleiche wie die des Ansatzes ohne Kaliumcyanid.

In Abschnitt 2c wurde gezeigt, dass die durch die Gleichung



dargestellte Reaktion gilt. Es handelt sich hier um eine nicht vollständig verlaufende Reaktion, da ein kleiner Teil des Cyanids nicht als Cyanhydrin gebunden wird, auch wenn die Menge des Aldehyds grösser ist als die der Blausäure. Diese sehr kleinen Mengen an nicht gebundenem Kaliumcyanid verhindern den Verbrauch eines zweiten Atoms Sauerstoff. Das spricht dafür, dass es sich bei der DDR. 2 um eine Schwermetallkatalyse handelt, da diese im allgemeinen durch Cyanidkonzentrationen von  $10^{-5}$  bis  $10^{-7}$ -m. gehemmt werden, während das bei der DDR. 1 erst bei ungefähr  $10^{-3}$ -molaren Lösungen der Fall ist. Erhöht man aber die Carbonylkonzentration durch Vergrösserung der Cadaverinmenge, so wird das Gleichgewicht obiger Gleichung so stark nach rechts verschoben, dass die Konzentration

an ungebundenem Kaliumcyanid so klein wird, dass sie nicht einmal mehr für eine Schwermetallhemmung ausreicht. Die Hemmung der DDR. 2 scheint also im Gegensatz zu der der DDR. 1 eine typische Reaktion zwischen einem Schwermetall und Blausäure zu sein.

Diese Ausschaltung der DDR. 2 durch Kaliumcyanid hatte auch den Nachweis, dass das Reaktionsprodukt der DDR. 1 und Kaliumcyanid in stöchiometrisch definierten Mengen miteinander reagieren, erlaubt. Solange noch freie Blausäure in der Lösung vorhanden ist, solange findet kein durch die DDR. 2 bedingter zusätzlicher Sauerstoffverbrauch statt; man misst also nur den der DDR. 1.

In den Versuchen der Tabellen 5 und 7 sind fast die gleichen Substrat- und Kaliumcyanid-Konzentrationen zur Anwendung gelangt. Trotzdem ist im letztern Fall der Summationseffekt im Gegensatz zum erstern nur gerade angedeutet. Das rührt daher, dass es sich beim Versuch Tabelle 7 um eine grössere Fermentmenge (2,5 cm<sup>3</sup> Enzymlösung anstatt 2,0 cm<sup>3</sup> pro Ansatz von 3 cm<sup>3</sup>) und um ein sehr viel aktiveres Ferment als im Versuch Tabelle 5 handelt. Die Eigenhemmung und der Summationseffekt hängen aber von der Grösse des Quotienten [Cadaverin]/[Ferment] ab, der für den Versuch Tabelle 7 dreimal kleiner ist als für den Versuch Tabelle 5.

Das Resultat des vorliegenden Abschnitts ist schon in der Angabe der ersten ausführlichen Mitteilung über die Do.<sup>1)</sup> vorweggenommen worden. Dort wurde festgestellt, dass der Sauerstoffverbrauch bei Kaliumcyanid-haltigen Ansätzen bei einem Atom Sauerstoff pro Molekel Substrat aufhört. Die gleiche Tatsache geht auch aus dem Versuch 4 der 6. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe hervor<sup>2)</sup>.

## 7. Die Beeinflussung der enzymatischen Oxydation von Histamin und Putrescin durch Kaliumcyanid.

Der enzymatische Abbau des Putrescins, des nächsten niedrigeren Homologen des Cadaverins, wird durch Kaliumcyanid in ähnlicher Weise wie der des letzteren beeinflusst. Doch sind die in den vorangehenden Abschnitten für das Cadaverin beschriebenen Reaktionen beim Putrescin weniger deutlich ausgeprägt. Der Grund liegt darin, dass die Affinität des Putrescins zur Do. nur halb so gross ist wie des Cadaverins<sup>3)</sup>. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird deshalb unter den üblichen Bedingungen hauptsächlich durch die Cyanid- und sehr viel weniger durch die Substratkonzentration bestimmt (Tabelle 8). Die Eigenhemmung durch überoptimale Substratkonzentration ist beim Putrescin noch weniger stark als beim Cadaverin ausgebildet. Die Verstärkung der Kaliumcyanid-Hemmung durch hohe Substratkonzentrationen (Summationseffekt) ist beim Putrescin demgemäss

<sup>1)</sup> II, S. 890.

<sup>2)</sup> VI, S. 8.

<sup>3)</sup> II, S. 844.

nur in sehr abgeschwächter Form bemerkbar. Daher kommt es, dass die Oxydation des Putrescins bei grössern Konzentrationen weniger stark als Cadaverin durch Kaliumcyanid gebremst wird, obwohl Cadaverin die grössere Affinität als Putrescin besitzt. Bei kleinen Konzentrationen, bei denen der Summationseffekt noch keine wesentliche Rolle spielt, wird der Putrescinabbau erwartungsgemäss durch die gleiche Cyanidkonzentration sehr viel stärker gehemmt als der Cadaverinabbau (Tabelle 8).

**Tabelle 8.**  
(Nr. W 330/31)

Fermentlösung und Versuchsanordnung wie bei Fig. 1. Substrat und KCN (0,000833-m.) gleichzeitig zugekippt. Die Zahlen geben die in 10' nach Versuchsbeginn gemessenen verbrauchten  $\text{mm}^3 \text{O}_2$  an.

Substrat	$\text{mm}^3 \text{O}_2$ ohne KCN	$\text{mm}^3 \text{O}_2$ mit KCN	% Hemmung
Putrescin 0,00133-m. . .	28	18	36
Putrescin 0,00266-m. . .	22	18	18
Cadaverin 0,00133-m. . .	21	18	10
Cadaverin 0,00266-m. . .	17	9	47

Beim Putrescin findet sich die Eliminierung des Kaliumcyanids durch die DDR. in gleicher Weise wie beim Cadaverin. Nur ist es bei ersterm bisher noch nicht gelungen, die für viele Cadaverinversuche typische Kreuzung der Kurven des Sauerstoffverbrauchs zu realisieren, d. h. den Sauerstoffverbrauch mit Kaliumcyanid grösser als den ohne Kaliumcyanid zu machen.

Das Verhalten des Histamins gegenüber der Do. und Kaliumcyanid, das schon in frühern Arbeiten<sup>1)</sup> experimentell behandelt worden ist, sei der Ergänzung halber hier noch angeführt. Der Ausgangspunkt dieser Untersuchungsreihe bildete ja die Feststellung, dass der Histaminabbau sehr viel stärker durch Kaliumcyanid verzögert wird, als es seiner hohen Affinität entspricht. Diese Erscheinung ist durch die vorliegende Arbeit nun aufgeklärt: Wegen der besonders hohen Eigenhemmung durch überoptimale Substratkonzentration befindet man sich beim Histamin bei den normalen Konzentrationsverhältnissen schon im Gebiet des Summationseffekts. Es ist deshalb auch begreiflich, dass dieser zuerst hier beobachtet wurde.

Histamin, Cadaverin und Putrescin werden also in ihrem enzymatischen Abbau durch die Do. durch Kaliumcyanid qualitativ gleichartig beeinflusst, während in quantitativer Hinsicht Unterschiede vorhanden sind, die mit den verschiedenen grossen Affinitäten dieser Substrate zur Do. im Zusammenhang stehen.

<sup>1)</sup> II, S. 889 und 890; III, S. 1658; VI, S. 7.



### Diskussion der Ergebnisse.

Es herrscht in der Literatur wenig Klarheit über den Mechanismus der Einwirkung von Cyaniden auf Dehydrasen<sup>1)</sup>. Es sei deshalb im Folgenden die zwischen der Do. und Kaliumcyanid sich abspielenden Reaktionen zusammenfassend besprochen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Ähnliches bei andern Enzymen vorkommt.

Die Dehydrasenatur der Do. geht nicht nur aus der Sekundäroxidation von Hämoglobin, Äthylalkohol<sup>2)</sup>, Indigo-disulfonat<sup>3)</sup> und Brenztraubensäure<sup>4)</sup> hervor, sondern kann auch direkt durch anaerobe Hydrierung von Toluylenblau durch die DDR. bewiesen werden<sup>4)</sup>. Diese Dehydrierung der Polyamine ist nicht obligat mit dem *Warburg-Keilin*'schen Eisensystem verknüpft, wie das normalerweise für die Succinodehydrase der Fall ist, da keines der jenes ausschaltenden Agentien, wie Sulfide, Thioharnstoff, Kohlenoxyd, Natriumazid die DDR. 1 hemmen. Der aktivierte und transportierte Wasserstoff kann mit Hilfe eines Flavins<sup>5)</sup> direkt mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxyd reagieren.

Die Dehydrasenatur eines Ferments schliesst nicht aus, dass in dessen prosthetischer Gruppe ein Schwermetall eingebaut ist, wie es für die Polyphenol-oxydase, die u. a. Brenzcatechin zu o-Chinon dehydriert, der Fall ist. Es handelt sich hier um ein Kupfer-Proteid<sup>6)</sup>. Es könnte sich also prinzipiell bei der Einwirkung von Kaliumcyanid auf die Do. ebenfalls um eine typische Komplexbildung mit einem Schwermetall handeln, wodurch dieses entionisiert und am Valenzwechsel verhindert würde. Eisen-Cyanid-Komplexe sind für die Katalase spektroskopisch nachgewiesen worden<sup>7)</sup>. Dieser Blausäurehemmungs-Mechanismus kommt für die Do. aber ohne Zweifel nicht in Frage. Es wäre sonst vollkommen unverständlich, dass keines der aufgezählten Schwermetallinhibitoren und Pyrophosphat, das wie Kaliumcyanid Schwermetallionen komplex bindet, einen bremsenden Einfluss ausüben. Auch tritt bei Hämifermenten die Hemmung bei Konzentrationen auf, die 2 bis 3 Zehnerpotenzen kleiner sind als bei der Do. Bei jenen tritt die Ausschaltung des Enzyms praktisch augenblicklich auf, während bei der Do. 5—10 Minuten verstreichen, bis die volle Wirkung auftritt (Fig. 4). Andererseits liegt es dafür umso näher, die Hemmung durch Cyanid mit der durch alle bisher untersuchten Carbonylreagentien in Zusammenhang zu bringen. Es handelt sich dabei um sehr verschiedene Körper, deren gemeinsame Eigenschaft wirklich nur die ist, dass sie mit Carbonylen

<sup>1)</sup> Zusammenfassung bei *C. Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, Supplement S. 1118 (1939).      <sup>2)</sup> II, S. 884.

<sup>3)</sup> III, S. 1662, *E. A. Zeller*, Naturwiss. **28**, 712 (1940).

<sup>4)</sup> Unveröffentlichte Versuche.      <sup>5)</sup> VI, S. 10.

<sup>6)</sup> *Kubowitz*, Biochem. Z. **292**, 221 (1937).

<sup>7)</sup> *K. Zeile* und *H. Hellström*, Z. physiol. Ch. **192**, 171 (1930).

reagieren können. Neben Hydrazinderivaten wie Semicarbazid, Thiosemicarbazid, Phenylhydrazin, Dinitro-phenylhydrazin, *Girard*-reagens T und F und andern Basen wie Hydroxylamin, kommen hydro-aromatische Verbindungen (Dimedon) und rein anorganische (Natriumhydrogensulfit) vor. Der Konzentrationsbereich der Hemmung ist für die verschiedenen Carbonylreagentien und für Kaliumcyanid ungefähr derselbe. Eine Ausnahme macht vor allem das Semicarbazid, dessen hemmende molare Konzentration um eine Dezimale kleiner ist als die von Kaliumcyanid.

Von einer weitem Dehydrase, der Xanthin-oxydase, ist eine Hemmung durch Kaliumcyanid bekannt<sup>1)</sup>. Sie tritt normalerweise nur bei Inkubation des Enzyms durch Kaliumcyanid in Abwesenheit des Substrats auf. Sie ist irreversibel und nimmt mit steigender Inkubationsdauer zu. Damit scheint es sich um einen andern Mechanismus wie bei der Do. zu handeln, da deren Kaliumcyanid-Hemmung reversibel ist, auch bei Anwesenheit des Substrats vorhanden ist und bei länger dauernder Inkubation ohne Substrat wenigstens auf den Anfang der DDR. 1 ohne Einfluss ist (Fig. 4). Es ist aber trotzdem möglich, dass es sich hier nur um graduelle und nicht prinzipielle Unterschiede handelt. Gerade die Erfahrung, dass Kaliumcyanid nur in Abwesenheit des Substrats wirkt, spricht für eine ähnliche Konkurrenz von Kaliumcyanid und Substrat wie bei der Do. Auch der Befund, dass der Cyanidzusatz bei der Do. erst nach einigen Minuten voll wirksam wird (Fig. 4), deutet in die gleiche Richtung.

Die einst von *Wieland* entwickelte Vorstellung von der unspezifischen Adsorption von Blausäure an die Kolloidteilchen des Ferments ist für die Do. ebenfalls abzulehnen, da sonst so überaus oberflächenaktive Stoffe wie Urethan eine stark hemmende Wirkung ausüben müssten, was aber durchaus nicht der Fall ist. Urethan beginnt erst bei einer derart grossen Konzentration (0,8-m.) zu wirken, bei der sogar Kochsalz die DDR. hemmend beeinflusst<sup>2)</sup>.

Beiläufig sei darauf hingewiesen, dass bis in die jüngste Zeit hinein Reaktionen zwischen Enzymen und Blausäure beschrieben werden, die entweder nur auf einer  $p_H$ -Verschiebung der zu wenig gepufferten Systeme durch Kaliumcyanid beruhen oder dadurch beeinflusst sind, dass bei manometrischen Versuchen als Absorptionsflüssigkeiten reine Lauge verwendet wird, die in kürzester Zeit die in der Enzymlösung vorhandene Blausäure absorbiert und somit aus der Reaktion ausschaltet.

Die Beschleunigung von Dehydrierungsreaktionen durch Kaliumcyanid ist schon längere Zeit bekannt. Entweder

<sup>1)</sup> L. F. Leloir und M. Dixon, *Enzymologia* 2, 81 (1937).

<sup>2)</sup> II, S. 888.

handelt es sich um die Ausschaltung von hemmenden Schwermetallspuren, wie das wahrscheinlich für die Dehydrierung von Hexosediphosphat durch Bäckerhefe gilt<sup>1)</sup>, oder um die Eliminierung einer bei der Reaktion entstehenden Carbonylverbindung. Es gelingt beispielsweise, die reversible Dehydrierung von Milchsäure durch die Lactico-dehydrase durch Zusatz von Kaliumcyanid zu beschleunigen, weil die Brenztraubensäure durch Cyanhydrinbildung aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird<sup>2)</sup>. Das gleiche findet bei der DDR. 1 statt, nur dass die Reaktion meistens durch die gleichzeitige hemmende Wirkung von Kaliumcyanid verdeckt wird. Die Demonstration der Beschleunigung der DDR. durch Kaliumcyanid gelang nur deshalb, weil gerade durch die Bindung des Cyanids an den bei der DDR. 1 entstehenden Aldehyd die hemmende Wirkung zum Verschwinden gebracht wird.

Der Summationseffekt bedarf zu seinem Verständnis der Erörterung der Bindungsverhältnisse zwischen der Do. und ihrem Substrat. Dabei sollen hier mehr die quantitativ-kinetischen Gesetzmässigkeiten als die qualitativ-chemischen Bindungsverhältnisse besprochen werden, welche letztere einer spätern Mitteilung vorbehalten bleiben sollen.

Eine Verbindung kann nur dann von der Do. oxydiert werden, wenn sich Substrat und Enzym an zwei Stellen miteinander verbinden. Bei den einfachen Substraten sind es die beiden Aminogruppen (Putrescin, Cadaverin usw.), bei den übrigen teils Aminogruppen, teils andere basische Komplexe. Das geht beispielsweise aus folgenden Versuchen hervor: Die Spermidin-Homologen  $H_2N(CH_2)_aNH(CH_2)_bNH_2$  können sich, wenn die Anschauung von der „zweipoligen“ Bindung richtig ist, auf zwei Arten mit der prosthetischen Gruppe der Do. verbinden, entweder mit der kürzern oder mit der längern Kette. Erfolgt sie vorzugsweise mit der längern Kette, dann wird das Triamin rascher abgebaut als im andern Fall, weil die Oxydations- und Desaminierungsgeschwindigkeit mit zunehmender Kettenlänge zunimmt<sup>3)</sup>. Wie die Versuche mit einer grössern Zahl von Spermidin homologen mit systematisch variierteter Kettenlänge zeigten<sup>4)</sup>, wird die kürzere Kette bevorzugt und diese determiniert daher die Abbaugeschwindigkeit. Mit der Vorstellung einer „einpolygonen“ Bindung wären Versuchsergebnisse der geschilderten Art nicht interpretierbar.

Dass eine zweipolige Bindung für den Abbau nötig ist, zeigt sich auch darin, dass Amylamin, das sich von Cadaverin nur durch das Fehlen einer Aminogruppe unterscheidet, niemals von der Do. angegriffen wird, auch wenn man den Abbau dadurch zu er-

<sup>1)</sup> Leloir und Dixon, l. c.

<sup>2)</sup> D. E. Green und J. Brosteaux, Biochem. J. **30**, 1489 (1936).

<sup>3)</sup> III, S. 1647.      <sup>4)</sup> IV, S. 842.

zwingen versucht, dass man Kaliumcyanid zusetzt, um in der eben geschilderten Weise das Reaktionsprodukt, den entsprechenden Aldehyd abzufangen<sup>1)</sup>. Das gilt auch für eine grosse Zahl anderer untersuchter Monoamine: Tyramin, Tryptamin,  $\beta$ -Phenyl- $\beta$ -oxy-äthylamin und Ephedrin<sup>1)</sup>. Diese Monoamine kommen bei den zur Anwendung gebrachten Konzentrationen auch nicht als „competitive inhibitors“ in Frage. Der Nachweis wurde an den Systemen Do./Histamin/Tyramin, Do./Putrescin/Tyramin und Do./Histamin/Tryptamin geleistet<sup>1)</sup>. Eine Ausnahme machen das sekundäre Amin Ephedrin<sup>2)</sup>  $C_6H_5 \cdot CH(OH) \cdot CH(NH \cdot CH_3) \cdot CH_3$ , Guanidin und besonders die substituierten Guanidine Mono- und asym. Dimethyl-guanidin, Tetra- und Decamethylen-diguanidin<sup>3)</sup>. Die eine der beiden Haftstellen ist sicher eine Elektrovalenz (Säure-Basen-Bindung), die auch durch stärker basische Monoamine besetzt werden kann (Fig. 6a).

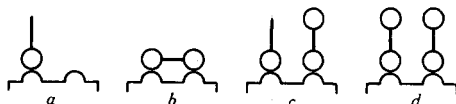


Fig. 6.

Schematische Darstellung der Bindungsverhältnisse zwischen Diaminen und der Diamin-oxydase.

Die Kreise bedeuten die Amino- oder andern basischen Gruppen. Die übrigen Erklärungen vgl. Text.

Wenn ein Diamin mit der prosthetischen Gruppe der Do. reagiert, so wird im allgemeinen zuerst nur eine basische Gruppe des Substrats mit der entsprechenden Gruppe des Ferments sich verbinden. Um diese Verknüpfungsstelle wird die Substratmolekel rotatorische Bewegungen ausführen, bis auch die andere Bindung zustande kommt (Fig. 6b). Die andere Haftstelle ist nun entweder frei, so dass die doppelte Verknüpfung zustande kommt („zweipolige Bindung“) und die Molekel dehydriert werden kann (Fig. 6b), oder sie ist entweder schon durch ein Monoamin (Fig. 6c) oder eine zweite Molekel des Diamins besetzt (Fig. 6d), was eine richtige Bindung zwischen Ferment und Substrat unmöglich macht („einpolige Bindung“). Der in Fig. 6d dargestellte Fall wird um so häufiger eintreten, je höher die Diaminkonzentration ist. Solange nicht alle vorhandenen prosthetischen Gruppen besetzt sind, solange wird eine Zunahme der Substratkonzentrationen auch eine Erhöhung der Zahl der pro Zeiteinheit umgesetzten Substratmolekel bedingen. Ist aber die Konzentration so gross, dass das Ferment mit dem Substrat gesättigt ist, so wird bei einer weitem Steigerung die einpolige Bindung die zweipolige immer stärker konkurrenzieren, d. h. die Reaktionsgeschwin-

<sup>1)</sup> E. A. Zeller, Habils.schrift Basel 1938.

<sup>2)</sup> VI, S. 5.

<sup>3)</sup> III, S. 1653.

digkeit nimmt wieder ab. Mit dieser Vorstellung stimmt aufs beste überein, dass man bei denjenigen Substraten, bei denen die eine der beiden Funktionen stark basisch ist, diese Erscheinung der „Eigenhemmung“ am ausgeprägtesten findet. Es lässt sich sogar, wie aus Tabelle 9 hervorgeht, halbquantitativ angeben, dass die Eigenhemmung in dem Masse auftritt, als die eine, für die Erscheinung verantwortliche basische Gruppe, als Monoamin der Do. zugesetzt, den Abbau von Diaminen verhindert.

Tabelle 9.

Substrat	Eigenhemmung	Entsprechendes Monoamin	Hemmung der Do.
Histamin $\begin{array}{c} \text{N} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{NH}_2 \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{CH} \quad \text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array}$	+++	Imidazol <sup>1)</sup> $\begin{array}{c} \text{N} \text{---} \text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{CH} \quad \text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array}$	+++
Agmatin <sup>1)</sup> $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \text{---} (\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2 \end{array}$	+++	Methylguanidin $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \text{---} \text{CH}_3 \end{array}$	+++
Spermin <sup>2)</sup> $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	++	Ephedrin $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CHOH} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CH}_3 \\   \\ \text{NH} \text{---} \text{CH}_3$	++
Cadaverin $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	+	Amylamin <sup>1)</sup> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	+

Die Eigenhemmung wird demnach bei ein und demselben Diamin umso stärker auftreten, je grösser das Verhältnis der Zahl der Substratmolekel zu der der reaktionsfähigen prosthetischen Gruppen des Enzyms ist (vgl. Abschnitt 6). Wenn nun ein Teil der letztern durch Kaliumcyanid blockiert wird, so wird entsprechend dieser Quotient und demnach die Eigenhemmung grösser, wie das aus Tabelle 5 klar hervorgeht. Dieser Summationseffekt bildet eine starke Stütze für die Vorstellung, dass Kaliumcyanid und Substrat miteinander konkurrieren, d. h. an der gleichen Stelle der prosthetischen Gruppe der Do. angreifen. Da schon früher experimentell dargelegt worden ist, dass die Diamine (z. B. Putrescin, Cadaverin, Histamin) ebenfalls mit den Carbonylreagentien (z. B. Semicarbazid, Natriumhydrogensulfit) in Konkurrenz treten<sup>3)</sup>, ist somit wohl definitiv der Beweis geleistet, dass Kaliumcyanid in seiner

<sup>1)</sup> Unveröffentlichte Versuche.

<sup>2)</sup> III, Tabelle 3.

<sup>3)</sup> III, S. 1656.

Eigenschaft als Carbonylreagens auf die Do. hemmend wirkt.

Es ist auch von anderer Seite schon auf den Zusammenhang zwischen der Eigenhemmung durch überoptimale Substratkonzentration und der doppelten Ferment-Substrats-Bindung hingewiesen worden. Doch ist der von *Haldane*<sup>1)</sup> wiedergegebene mathematische Ansatz nur teilweise auf die vorliegenden Verhältnisse anwendbar.

Die vielfache Einwirkung von Kaliumcyanid auf die Do. bei nicht vollständig hemmender Konzentration lässt sich nun folgendermassen beschreiben: Kaliumcyanid blockiert entsprechend seiner Affinität einen Teil der prosthetischen Gruppen. Dadurch werden diese nicht nur für die Bindung und den Abbau der Diamine ausgeschaltet, sondern es wird wegen Verschiebung des Substrat/Ferment-Quotienten die Eigenhemmung vergrössert. Wenn einige Fermentteilchen aber noch frei sind, so entstehen durch Abbau der Diamine basische Aldehyde, die mit dem Kaliumcyanid sich verbinden. Damit wird das Gleichgewicht des Komplexes Ferment-Kaliumcyanid in der Richtung stärkerer Dissoziation verschoben, und es werden mehr prosthetische Gruppen für den Abbau der Diamine frei, wodurch weiterhin pro Zeiteinheit mehr Molekeln umgesetzt werden können. Dieser Prozess geht weiter, bis bei genügend hoher Substratkonzentration die Dissoziation des erwähnten Komplexes vollständig ist, so dass nun vollständige Enthemmung eintritt. Da nun die Umwandlung der Diamine in basische Aldehyde ebenfalls eine Gleichgewichtsreaktion ist, kann auch diese Gleichgewichtslage verschoben werden, wenn ein genügend grosser Teil des einen Reaktionsprodukts, des Aldehyds, durch Kaliumcyanid aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Die Summe der abgebauten Molekeln wird dadurch erhöht.

Wenn in einer Fermentlösung auch die DDR. 2 vorhanden ist, so wird die DDR. 1 trotz ihrer Reversibilität dadurch zu einer vollständigen gemacht, dass ihr Produkt weiter oxydiert wird. Da Kaliumcyanid die 2. Oxydationsstufe ebenfalls ausschaltet, wird indirekt damit auch die DDR. 1 hemmend beeinflusst, weil die fortlaufende Eliminierung des Reaktionsprodukts wegfällt.

Kaliumcyanid wirkt somit je nach den Versuchsbedingungen auf fünf verschiedene Arten auf den Abbau der Diamine durch die Do. ein:

1. Blockierung der prosthetischen Gruppe.
2. Verstärkung der Eigenhemmung durch überoptimale Substratkonzentration (Summationseffekt).
3. Enthemmung durch Cyanhydrinbildung mit dem entstehenden Aldehyd.

---

<sup>1)</sup> *J. B. S. Haldane*, l. c., S. 87.

4. Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung eines vollständigeren Abbaus der Substrate.

5. Ausschaltung der DDR. 2 mit der dadurch bedingten indirekten Hemmung der DDR. 1 infolge mangelnder Wegschaffung des Reaktionsprodukts.

Die Reaktionen 2 und 3 waren bisher in der Fermentchemie noch nicht bekannt. Für die Reaktion 1 ist durch die vorliegende Arbeit zum erstenmal experimentell bewiesen worden, dass Kaliumcyanid nicht als Schwermetallinhibitor, sondern als Carbonylreagens wirkt.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass bei der Do. noch andere neue Fermentreaktionen aufgefunden wurden. So wurde bei ihr als einem basische Körper abbauendem Enzym zum erstenmal eine Hemmung der Do. durch Vitamin B<sub>1</sub> (Aneurin) gefunden<sup>1)</sup>, während vorher dieses Vitamin ausschliesslich mit dem Kohlehydratstoffwechsel in Beziehung gebracht wurde. Seither wurden noch weitere mit dem Basenstoffwechsel in Zusammenhang stehende Fermente bekannt, die durch Aneurin beeinflusst werden, wie die Cholin-esterase<sup>2)</sup>, Histidase und Arginase<sup>3)</sup>. Besonders interessant erscheint auch das Verhalten der Spermidinhomologen, bei denen nicht nur eine Konkurrenz zweier verschiedener Bindungsmöglichkeiten bei ein und derselben Molekel, sondern noch die eben aufgeklärte Konkurrenz zwischen der ein- und zweipoligen Bindung verschiedener Molekeln hinzukommt.

Durch die hier entwickelten Anschauungen ist es möglich, ein sehr umfangreiches Beobachtungsmaterial widerspruchsfrei zu interpretieren.

#### Zusammenfassung.

1. Die eigentliche Do. (DDR. 1) wird durch Natriumsulfid und Thioharnstoff nicht gehemmt.

2. Die Hemmung der Do. durch Kaliumcyanid ist reversibel.

3. Der bei der Einwirkung der Do. auf die Diamine entstehende Aldehyd reagiert in stöchiometrisch definierten Mengenverhältnissen mit Kaliumcyanid.

4. Kaliumcyanid verstärkt die Eigenhemmung durch überoptimale Substratkonzentration (Summationseffekt).

5. Der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes der DDR. 1 ist eine reversible, nicht vollständig verlaufende Reaktion. Das Gleichgewicht derselben kann durch Kaliumcyanid durch die Eliminierung

<sup>1)</sup> IV, S. 839.

<sup>2)</sup> H. Süllmann und H. Birkhäuser, Schweiz. med. Wschr. **69**, 688 (1939); W. Antopol, S. Glaubach und D. Glück, Proc. Soc. exptl. Biol. Med. **42**, 679 (1939).

<sup>3)</sup> S. Edlbacher und M. Becker, Z. physiol. Ch. **265**, 72 (1940).

des einen Reaktionsproduktes im Sinne eines vollständigeren Abbaus des Substrats beeinflusst werden.

6. Kaliumcyanid konkurriert mit dem Substrat um die prosthetische Gruppe der Do. Dabei ist seine Eigenschaft als Carbonylreagens und nicht als Schwermetallinhibitor massgebend.

7. Natriumsulfid, Thioharnstoff und Kaliumcyanid schalten die DDR. 2 aus.

8. Es wird eine Theorie der Bindung zwischen Substrat und prosthetischer Gruppe der Do. entwickelt.

Ich danke Fr. *M. Gerber* für die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut der  
Universität Basel.

---

### 158. Contribution à l'étude de la constitution de la fibroïne de soie

par Kurt H. Meyer, M. Fuld et O. Klemm.

(24. X. 40.)

On se rappelle que *Bergmann* et *Niemann*<sup>1)</sup> ont émis l'hypothèse d'un arrangement périodique des restes d'amino-acides des molécules protéiques. Une étude analytique de la fibroïne de soie faite par ces auteurs<sup>2)</sup> aboutit à la conclusion que ce protide possède également un arrangement périodique des restes des amino-acides. D'après les analyses de *Bergmann* et *Niemann*, la fibroïne contient 43,8 % de glycolle, 26,4 % d'alanine, 13,2 % de tyrosine; ces chiffres ainsi que ceux d'autres auteurs leur permettent d'affirmer que dans la chaîne polypeptidique de la fibroïne, chaque deuxième reste est constitué par le glycolle, chaque quatrième par l'alanine et chaque seizième par la tyrosine. Comme *Bergmann* et *Niemann* le constatent eux-même, ce résultat est en contradiction avec l'interprétation de l'examen aux rayons X, tel qu'il a été pratiqué par *Meyer* et *Mark*<sup>3)</sup>. La soie donne un diagramme de fibre qui permet de constater, dans les domaines cristallisés, des arrangements identiques se répétant le long de l'axe de la fibre après deux restes d'acides aminés. L'hypothèse la plus simple interprétant ces faits est la suivante: à l'intérieur des cristallites, des restes de glycolle et d'alanine alternent le long d'une chaîne à valences principales, l'alanine pouvant probablement aussi être remplacée par la sérine qui possède à peu près

<sup>1)</sup> *M. Bergmann* et *C. Niemann*, *J. Biol. Chem.* **115**, 77 (1936); **118**, 301 (1937).

<sup>2)</sup> *M. Bergmann* et *C. Niemann*, *J. Biol. Chem.* **122**, 578 (1938).

<sup>3)</sup> *K. H. Meyer* et *H. Mark*, *Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe*, Leipzig 1930.