

90. Über den oxydativen Abbau des Histidins im tierischen Organismus

von S. Edbacher und H. Grauer.

(27. III. 43.)

Die bisher bekannten biologischen Abbauwege des Histidins sind die folgenden: Im Jahre 1926 konnten S. Edbacher¹⁾ und unmittelbar darauf P. György und H. Röthler²⁾ nachweisen, dass in frischen Leberextrakten aller untersuchten Wirbeltiere *l*-Histidin durch eine Hydrolase, die Histidase genannt wurde, unter Ammoniakbildung zerlegt wird. In einer längeren Reihe von Arbeiten wurde diese Histidase in bezug auf ihre Wirksamkeit genauer untersucht³⁾. Es ergab sich dabei, dass unter Öffnung des Imidazolringes ein Äquivalent Ammoniak abgespalten wird. Die dabei entstehenden anderen Reaktionsprodukte konnten infolge ihrer leichten Zersetzlichkeit nicht isoliert werden. Aus dem Reaktionsgemisch liess sich jedoch je ein weiteres Äquivalent Ammoniak, Ameisensäure und *l*-Glutaminsäure isolieren. Diese von verschiedenen Laboratorien wiederholt bestätigten Zersetzungsreaktionen dürften den Hauptweg des Histidinabbaus beim Wirbeltier bilden. Die Histidase ist streng spezifisch auf die natürliche Form des Histidins eingestellt. In einer ausführlichen Untersuchung konnten Edbacher und Baur⁴⁾ zeigen, dass die unnatürliche *d*-Form sowie andere Imidazole die Histidase in charakteristischer Weise blockieren. Diese „Fixierungs-Spezifität“, welche von anderen Forschern, speziell von Bamann, für die Peptidasen nachgewiesen werden konnte, ist besonders charakteristisch für die Histidase. Neben diesem hydrolytischen Abbau wird das Histidin durch Decarboxylasen verschiedenen Vorkommens zu Histamin abgebaut, was bekanntlich zuerst von D. Ackermann⁵⁾ festgestellt wurde. Das Vorkommen der Histidin-Decarboxylase im tierischen Organismus wurde von P. Holtz⁶⁾ und von E. Werle⁷⁾ nachgewiesen. In einer grösseren Anzahl von Untersuchungen gaben weiterhin Kotake und seine Mitarbeiter an⁸⁾, dass Histidin zu Urocaninsäure (Imidazolyl-acrylsäure) abgebaut werden kann. Die Nachprüfung dieser Untersuchungen durch Edbacher, Baur und Stachelin⁹⁾ und

¹⁾ Z. physiol. Ch. **157**, 106 (1926).

²⁾ Bioch. Z. **173**, 334 (1926).

³⁾ Z. physiol. Ch. **191**, 225 (1930); **195**, 267 (1931); **224**, 261 (1934).

⁴⁾ Z. physiol. Ch. **265**, 61 (1940); **270**, 176 (1941).

⁵⁾ Z. physiol. Ch. **65**, 504 (1910).

⁶⁾ Arch. exptl. Pharm. **188**, 580 (1938).

⁷⁾ Bioch. Z. **288**, 292 (1936).

⁸⁾ Z. physiol. Ch. **122**, 230 (1922); **219**, 191 (1933).

⁹⁾ Z. physiol. Ch. **270**, 165 (1941).

von Bidder¹⁾ führte zu dem Ergebnis, dass Urocaninsäure als Stoffwechselprodukt niemals isoliert werden konnte, dass sich aber tatsächlich in der Leber aller untersuchten Tierarten ein Enzym vorfindet, welches Urocaninsäure hydrolytisch unter Ammoniakbildung zerlegt. Es konnte dabei ebenfalls *l*-Glutaminsäure aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden.

Eine allerdings nicht enzymatisch verlaufende Reaktion konnte fast gleichzeitig von *S. Edlbacher* und *A. von Segesser*²⁾ und von *P. Holtz*³⁾, sowie *E. Abderhalden*⁴⁾ gefunden werden, indem Histidin bei Gegenwart von Ascorbinsäure und Spuren von Eisensalzen einer oxydativen Desaminierung anheim fällt. Wir erblicken darin eine Modellreaktion für einen eventuell möglichen enzymatischen Abbau. Ob diese Reaktion physiologische Realität besitzt, muss noch durch weitere Versuche festgestellt werden. *Borghi* und *Tarantino*⁵⁾ geben endlich an, dass in der Haut der Ratte ein Enzym vorkommen soll, welches *l*-Histidin oxydativ desaminiert. Die Nachprüfung dieser Versuche durch *Edlbacher* und *F. Litvan*⁶⁾ führte zu der Erkenntnis, dass dieser oxydative Abbau des Histidins durch ein atypisches Coli-Bacterium bewirkt wird, welches sich aus den Hautextrakten in Reinkultur züchten liess. Diese Histidin-oxydase wird gegenwärtig von uns genauer untersucht.

Wir verweisen in diesem Zusammenhang auch auf die Untersuchungen von *Raistrick*⁷⁾, der ebenfalls die bakterielle Zersetzung des Histidins untersuchte.

Nun werden nach *Krebs*⁸⁾ alle *d*-Aminosäuren durch die wasserlösliche *d*-Aminosäure-oxydase abgebaut, während hingegen die *l*-Aminosäuren durch die nichtextrahierbare und Blausäure-hemmbarere *l*-Aminosäure-oxydase angegriffen werden. Beide Enzyme finden sich vorzugsweise in der Niere, aber auch in der Leber, die *d*-Aminosäure-oxydase auch in anderen Organen. Nach *Neber*⁹⁾ findet auch in der Darmschleimhaut eine starke oxydative Desaminierung statt. Während beim oxydativen Abbau der *d*-Aminosäuren die entsprechenden α -Ketosäuren entstehen, sind die Verhältnisse bei der *l*-Aminosäure-oxydase viel undurchsichtiger. In der Folge wurden für verschiedene *l*-Aminosäuren, so unter anderem für Prolin (*Krebs*)¹⁰⁾, Tyrosin und Phenyl-alanin (*Felix* und *Zorn*¹¹⁾, *K. Lang* und *U. Westphal*¹²⁾, für Glutaminsäure (*H. von Euler*)¹³⁾ andere oxydative Abbau-

1) Z. physiol. Ch. **273**, 163 (1942).

4) Fermentforschung **15**, 285 (1937).

2) Bioch. Z. **290**, 370 (1937).

5) Sperimentale **92**, 89 (1938).

3) Z. physiol. Ch. **248**, 1 (1937).

6) Schw. med. Wschr. **71**, 297 (1941).

7) Biochem. J. **11**, 71 (1917); **13**, 446 (1919).

8) Z. physiol. Ch. **217**, 191 (1933); Biochem. J. **29**, 1620 (1935).

9) Z. physiol. Ch. **240**, 78 (1936).

12) Z. physiol. Ch. **276**, 179 (1942).

10) Enzymologia **7**, 53 (1939).

11) Z. physiol. Ch. **247**, 141 (1937).

13) Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1938).

wege festgestellt. Die Versuche von *Krebs* wurden hauptsächlich mit *l*-Asparaginsäure ausgeführt, die im Gegensatz zu den meisten anderen Aminosäuren stärker als der *d*-Antipode desaminiert wird. Deshalb dürfen seine Ergebnisse von vornherein nicht als bindend für die Abbauewege der anderen *l*-Aminosäuren betrachtet werden. Das *l*-Histidin jedoch wird durch überlebende Nieren- wie Leberschnitte oxydativ abgebaut, was von *Krebs* einwandfrei nachgewiesen werden konnte. Verglichen mit dem hydrolytischen Abbaueweg durch die Histidase ist der Umfang des oxydativen Abbaus jedoch nur geringfügig.

Für die *d*-Aminosäure-oxydase liegen die Verhältnisse bedeutend klarer. *Warburg* und *Christian*¹⁾ konnten die Wirkungsgruppe dieses Enzyms bekanntlich als Alloxazin-Adenin-Dinucleotid isolieren und andererseits wurde das Protein durch *Negelein* und *Brömel*²⁾ weitgehend gereinigt. *P. Karrer* und *H. Frank*³⁾ haben nun die Spezifität dieser gereinigten *d*-Aminosäure-oxydase untersucht und kamen zu dem Ergebnis, dass bei weitem nicht alle Aminosäuren, für die *Krebs* einen Abbau durch Rohextrakte angibt, angegriffen werden, so besonders nicht das uns hier interessierende *d*-Histidin. Die beiden Autoren nehmen deshalb an, dass mehrere *d*-Aminosäure-oxydasen existieren müssen. *J. R. Klein* und *Ph. Handler*⁴⁾ behaupten andererseits wieder, dass mit der gereinigten *d*-Aminosäure-oxydase alle von *Krebs* angegebenen *d*-Aminosäuren abgebaut werden können und machen für die abweichenden Ergebnisse von *P. Karrer* und *H. Frank* (l. c.) die leichte Autoxydierbarkeit des Proteins verantwortlich. Möglicherweise wurde aber bei diesen Versuchen die Eiweisskomponente nicht weitgehend genug gereinigt. Es bleibt also die von *Krebs* nachgewiesene Tatsache bestehen, dass Nierenextrakte *d*-Histidin oxydativ abbauen.

Es wurde daher die Frage des oxydativen Abbaus von *l*- und *d*-Histidin von uns einer gründlichen Prüfung unterworfen, über die wir hier berichten. Die Untersuchungen wurden in folgender Weise durchgeführt:

1. Messung des Sauerstoffverbrauchs in Organextrakten mittels der *Warburg-Barcroft*'schen Methode.
2. Dialyseversuche zur Abtrennung des Cofermentes, Reaktivierungen durch verschiedene Reinigungsstufen des Cofermentes.
3. Bestimmung des gebildeten Ammoniaks.
4. Bestimmung des nicht zersetzten Histidins auf kolorimetrischem Wege.

¹⁾ Bioch. Z. **298**, 150 (1938).

²⁾ Bioch. Z. **300**, 225 (1939).

³⁾ Helv. **23**, 948 (1940).

⁴⁾ J. Biol. Chem. **139**, 103 (1941).

Herstellung der Organextrakte.

Sofort nach dem Töten des Tieres durch Kopfschlag wird das betreffende Organ rasch gewogen, dann in einem Mörser mit Quarzsand unter allmählicher Zugabe von eisgekühltem 0,067-m. Phosphatpuffer p_H 8,0, und zwar pro 1 g Organ 2 cm³ Puffer, zu Brei verrieben. Der so erhaltene Gewebsextrakt wird vom Quarzsand dekantiert und 15 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Lösung bildet den Organextrakt.

Ein Teil dieses frischen Extraktes wurde sofort für den ersten Versuch verwendet. Ein zweiter Teil wurde während 5 Stunden der Dialyse unterworfen: 10 cm³ Extrakt (evtl. mehr) wurden in einen Cellophanschlauch gebracht und im Eisschrank gegen ein Liter giasdestilliertes, vorher auf Eisschrank-Temperatur gebrachtes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde alle 30—45 Minuten gewechselt. Nach 5 Stunden hatte sich das Volumen des Extraktes auf ungefähr 14 cm³ erhöht. Es wurde mit Wasser auf 16 cm³ gebracht und dann noch 4 cm³ 0,33-m. Phosphatpuffer p_H 8,0 zugegeben, um wieder eine Pufferkonzentration von ungefähr 0,067-m. zu erhalten. Ein dritter Teil des Extraktes wurde während der Dialysezeit im Eisschrank aufbewahrt. Unmittelbar nach Beendigung der Dialyse wurde der zweite Versuch mit dem dialysierten und mit dem im Eisschrank aufbewahrten Extrakt ausgeführt.

Messung des Sauerstoffverbrauches.

Es wurde der Sauerstoffverbrauch des frischen, des gealterten und des dialysierten Extraktes mit und ohne Zugabe von verschiedenen *l*- und *d*-Aminosäuren mit Hilfe des *Warburg*-Apparates gemessen. In den Hauptraum eines Gefäßes brachten wir jeweils 1 cm³ Extrakt (2 cm³ beim dialysierten Extrakt) und soviel 0,067-m. Phosphatpuffer p_H 8,0 als in jedem Falle nötig war, um das gesamte Flüssigkeitsvolumen des Gefäßes auf 3,7 cm³ zu bringen; in die seitliche Birne gaben wir 0,5 cm³ 0,2-m. Aminosäurelösung, in den Einsatz 0,2 cm³ n. KOH. Alle Lösungen, die in den Hauptraum oder in die Birne eingeführt wurden, wurden mit 0,067-m. Phosphatpuffer p_H 8,0 hergestellt. In allen Versuchen waren demnach die Extraktmenge und -konzentration, die Pufferkonzentration und das p_H gleich. Temperatur 38°, Manometer mit Sauerstoff gefüllt, Dauer des Versuchs meist 60 Minuten.

Ammoniakbestimmungen.

Unmittelbar an die Messung des Sauerstoffverbrauches wurde in zahlreichen Versuchen die Bestimmung des gebildeten Ammoniaks angeschlossen. In den ersten Versuchen nach der Methode von *J. Parnas*¹⁾: In den Hauptraum der Gefäße wurde sofort nach Ver-

¹⁾ Bioch. Z. **152**, 1 (1924); **173**, 224 (1926).

suchsende ein Tropfen 2-n. Schwefelsäure zum Abstoppen des fermentativen Abbaues gegeben und die Gefäße in den Eisschrank gebracht. Dann wurde ein Ansatz nach dem anderen destilliert. In den *Parnas*-Apparat wurden 3 cm³ Versuchslösung eines Ansatzes gegeben, ferner neben einem cm³ Paraffin und 2 cm³ Boratlösung noch ein Tropfen 2-n. NaOH. Es wurde so lange destilliert, bis das mit zwei Tropfen 0,1-n. HCl beschickte Auffanggefäß 10 cm³ Destillat enthielt. Nach der Destillation aller Proben wurde je 1,0 cm³ *Nessler*-Reagenz zugegeben, auf 20 cm³ mit dest. Wasser aufgefüllt und am Stufenphotometer nach *Pulfrich* kolorimetriert (Filter S 45, 30 mm-Küvette).

Infolge der Notwendigkeit grösserer Reihenversuche haben wir alle späteren Bestimmungen nach der *Conway*-Methode¹⁾ ausgeführt: Sofort nach Versuchsende wurde in den Aussenraum der „units“ 2 cm³ Versuchsflüssigkeit pipettiert, in den Innenraum 2 cm³ 0,04-n. HCl, sodann rasch 1 cm³ gesättigte Kaliumcarbonatlösung in den Aussenraum gegeben, durch Rotieren gut durchgemischt und die „units“ 2 Stunden in den Brutschrank bei 38⁰ gestellt. Darauf wurde 1 cm³ aus dem Innenraum in ein Messkölbchen pipettiert, ca. 10 cm³ Wasser zugefügt, dann 1 cm³ *Nessler*-Reagenz zugegeben und mit Wasser auf 25 cm³ aufgefüllt. Kolorimetrie wie bei der *Parnas*-Bestimmung.

Histidinbestimmung.

In einigen Ansätzen mit 0,5 cm³ 0,1-m. Histidin haben wir ferner nach Versuchsende die kolorimetrische Bestimmung des Histidins nach *Edlbacher*²⁾ mit p-Chloranilin ausgeführt. Die Versuchsflüssigkeit wurde in Reagenzgläser abpipettiert, diese 10 Minuten ins siedende Wasserbad gestellt und dann filtriert. Vom klaren Filtrat wurde 1 cm³ auf 25 cm³ mit Wasser verdünnt, davon 1 cm³ zur kolorimetrischen Bestimmung benützt. Mit Hilfe dieser Bestimmung kann also untersucht werden, ob bei der Einwirkung des Extraktes auf Histidin der Imidazolring angegriffen wird.

Oxydativer Abbau der optischen Isomeren von Alanin, Valin, Leucin und Histidin durch Rattenleberextrakte.

Der Abbau wurde jeweils in einem ersten Versuche mit dem frischen Extrakt gemessen. Da aber rohe Leberextrakte immer eine hohe Leeratmung aufweisen, wurde der gleiche Versuch 5 Stunden später mit dem bei 0⁰ dialysierten Extrakt einerseits und mit dem während dieser Zeit bei 0⁰ aufbewahrten Kontrolleextrakt andererseits wiederholt. Wir wussten von früheren Versuchen, dass durch fünf-stündige Dialyse infolge der starken Dissozierbarkeit der Pyridin-

¹⁾ Biochem. J. **27**, 419 (1933); **29**, 2755 (1935).

²⁾ Z. physiol. Ch. **270**, 158 (1941).

proteide die Leeratmung praktisch verschwindet; andererseits gibt *Warburg* (l. c.) an, dass die *d*-Aminosäure-oxydase von *Krebs* (l. c.) nur eine kleine Dissoziierbarkeit aufweise und durch 48-stündige Dialyse nur ein Drittel ihrer Aktivität einbüsse. Die Ergebnisse unserer Versuche sind in der folgenden Figur 1 zusammengestellt.

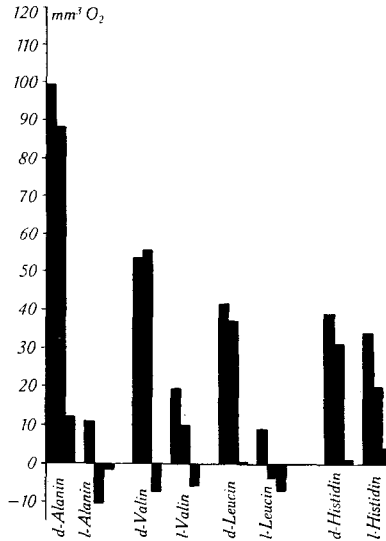


Fig. 1.

Oxydativer Abbau von Aminosäuren durch Rattenleberextrakte.

Die Stäbe geben den Sauerstoffmehrerbrauch nach 60 Minuten Versuchsdauer bei Zugabe verschiedener Aminosäuren zum Rattenleberextrakt wieder. Der erste Stab einer Dreiergruppe stellt jeweils den oxydativen Abbau durch den frischen Extrakt, der zweite den Abbau durch den während 5 Stunden gealterten und der dritte den Abbau durch den während 5 Stunden dialysierten Extrakt dar.

Während der von *Krebs* gefundene, optisch spezifische Abbau für Alanin, Valin und Leucin voll bestätigt werden konnte, wurden *l*- und *d*-Histidin in vielfach wiederholten Versuchen immer grössenordnungsweise gleich stark oxydiert, *l*-Histidin bisweilen etwas weniger stark als *d*-Histidin. Weiter führte die fünfständige Dialyse ausnahmslos zu fast vollständiger Inaktivierung der Leberextrakte. Dazu ist zu bemerken, dass *Warburg* die geringe Dissoziierbarkeit der *d*-Aminosäure-oxydase für Aceton-Trockenpräparate angibt, während wir mit frischen Extrakten arbeiteten.

Die Kurven für den Abbau der anderen untersuchten Aminosäuren verhalten sich gleich, weshalb wir auf ihre Wiedergabe verzichten können. Auf einen Unterschied im Abbau von *d*- und *l*-Histidin gegenüber den anderen Aminosäuren soll jedoch noch hingewiesen werden: Der oxydative Histidinabbau nimmt im Verlaufe

der zweiten Versuchsstunde ein Ende, während der Abbau von *d*-Alanin, *d*-Valin und *d*-Leucin deutlich weitergeht.

Aus diesen Tatsachen ergaben sich nun zwei neue Fragestellungen:

1. Kann der durch Dialyse inaktivierte Abbau von *d*-Aminosäuren im Extrakt der Rattenleber durch nachträglichen Zusatz des Cofermentes der *d*-Aminosäure-oxydase wieder reaktiviert werden?
2. Baut der so reaktivierte Rattenleberextrakt auch *d*- und *l*-Histidin ab, mit anderen Worten: ist die *d*-Aminosäure-oxydase für den Abbau von *d*- und *l*-Histidin verantwortlich?

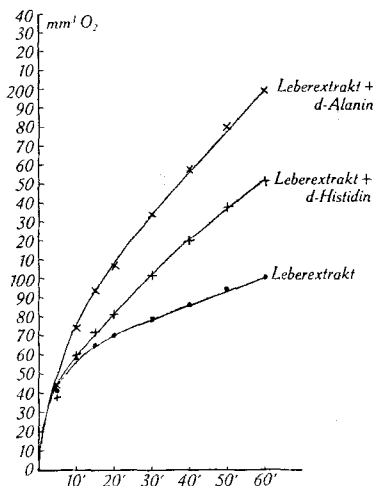


Fig. 2.

Rattenleber.

Figur 2 gibt Auskunft über die Leeratmung und den oxydativen Abbau von *d*-Alanin und *d*-Histidin während der ersten 60 Minuten eines Versuchs.

Da nun Warburg und Christian ein Verfahren zur Reindarstellung des Alloxazin-Adenin-Dinucleotides aus Hefe beschrieben haben, beschritten wir diesen Weg und haben die Reaktivierbarkeit des oxydativen Abbaues von *d*-Alanin, *l*- und *d*-Histidin durch Leberkochsaft, Hefekochsaft, sowie durch die verschiedenen Reinigungsstufen des Hefekochsaftes bis zum reinen Dinucleotid geprüft. Lang und Westphal haben zur Zeit dieser Untersuchungen die Ergebnisse ihrer Versuche über den oxydativen Abbau von *l*-Phenyl-alanin durch Rattenleberextrakte publiziert und ebenfalls die Inaktivierbarkeit durch Dialyse, Reaktivierbarkeit durch Leber- und Hefekochsaft, nicht aber durch weitgehend gereinigte Dinucleotidpräparate gefunden. Wir haben deshalb das Verhalten des Leberextrakts gegenüber *l*- und *d*-Phenyl-alanin ebenfalls mituntersucht.

Reaktivierung der durch Dialyse inaktivierten Rattenleberextrakte durch Leber- und Hefekochsaft sowie durch verschiedene Reinigungsstufen des Hefekochsaftes bis zum reinen Alloxazin-Adenin-Dinucleotid.

Herstellung der verschiedenen Zusätze.

Frischer Leberextrakt (Zubereitung früher beschrieben) wurde 10 Minuten im siedenden Wasserbad gekocht und filtriert. Je 1 cm³ des klaren gelben Filtrates (manchmal weissliche Trübung bei grösserem Glykogengehalt der Lebern) wurde zu den zu reaktivierenden Ansätzen gegeben. Der Hefekochsaft wurde nach den Angaben *Warburg's* hergestellt, ebenso die weiteren Reinigungsstufen mit Ausnahme einiger kleiner Modifikationen. Untersucht wurde die Reaktivierung nach der Reinigung des Hefekochsaftes über die Phenol-extraktion (kurz „Phenolextrakt“ genannt), nach der Fällung als Silbersalz („Silbersalz“) und nach der Kresol-extraktion („Kresol-extrakt“). Wir verwendeten die einzelnen Reinigungsstufen immer in ziemlich konzentrierter Form, brachten sie jeweils unmittelbar vor dem Versuche auf 0,067-m. Phosphatpuffer-Konzentration p_H 8,0 und gaben davon je 1 cm³ zu den zu reaktivierenden Ansätzen. Es handelt sich bei all diesen Versuchen um mehr qualitative Untersuchungen. Wir sahen hauptsächlich darauf, dass sicher genügende Dinucleotidmengen in den einzelnen Reinigungsstufen vorhanden waren. Vom reinen Bariumsalz des Alloxazin-Adenin-Dinucleotids¹⁾ lösten wir pro Ansatz 40—100 γ in 1 cm³ Wasser und brachten es kurz vor Versuchsbeginn auf 0,067-m. Phosphatpufferkonzentration p_H 8,0. Ein Beispiel eines solchen Versuches geben wir in Tabelle 1.

Die Ergebnisse dieser mehrfach ausgeführten Reaktivierungsversuche sind in den Figuren 3—6 zusammengestellt.

Durch Leber- und Hefekochsaft sowie durch den Phenolextrakt aus Hefekochsaft wird der Abbau aller untersuchten Aminosäuren, also von *d*-Alanin, *d*- und *l*-Phenyl-alanin und von *d*- und *l*-Histidin reaktiviert, daneben aber auch die Leeratmung der Extrakte, da in den Zusätzen (auch im Phenolextrakt nach *Warburg* und *Griese*²⁾) auch die für die Leeratmung notwendigen Pyridin-Adenin-Dinucleotide enthalten sind. Fig. 3 gibt die Reaktivierung durch den Phenolextrakt wieder; eine bildliche Darstellung der gleichen Resultate mit Leber- und Hefekochsaft erübrigt sich. In Fig. 4 kommt die Reaktivierbarkeit des Abbaues aller untersuchten Aminosäuren durch die Silbersalzfraktion deutlich zum Ausdruck; dagegen wird die Leeratmung bereits nicht mehr reaktiviert. Nach der weiteren Reinigung

¹⁾ Wir erhielten dies durch Vermittlung von Hrn. Prof. *O. Warburg*, und möchten ihm auch hier für seine grosse Freundlichkeit den besten Dank aussprechen.

²⁾ *Bioch. Z.* **282**, 157 (1935).

Tabelle 1.

Versuch Nr. 51	A										B (5 Stunden nach Versuch A)									
	1	2	3	4 ^o	10	10 ^o	11	11 ^o	12	12 ^o	5	5 ^o	6 ^o	4 ^o						
Manometer Nr.																				
Inhalt:																				
0,067-m. Phosphatpuffer p _H 8,0 .	2,5	2	2	3,5	1,5	1	1	0,5			2,5	2	2	3,5						
Frischer Leberextrakt	1	1	1																	
5 Stunden alter Leberextrakt . .											1	1	1							
5 Stunden dialys. Leberextrakt .					2	2	2	2	2	2										
Dinucleotid 100 γ/1 cm ³							1	1	1	1										
0,2-m. <i>d</i> -Histidin		0,5				0,5			0,5			0,5								
0,2-m. <i>l</i> -Histidin			0,5							0,5			0,5							
<i>n</i> -KOH	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2						
Ableseung:																				
h korrig. 0—60 Minuten	81	104	108		1	0	3	-5	-1	-2	43	77	62							
X _{O₂} 0—60 Minuten	134	183	166		2	0	5	-11	-2	-4	68	126	120							
X _{O₂} -Leerwert 0—60 Minuten . .		49	32			-2	3		9	7		58	52							

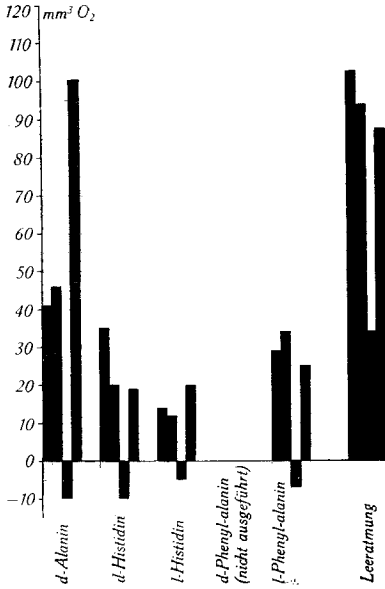


Fig. 3. Rattenerleber.

Reaktivierung durch „Phenolextrakt“.

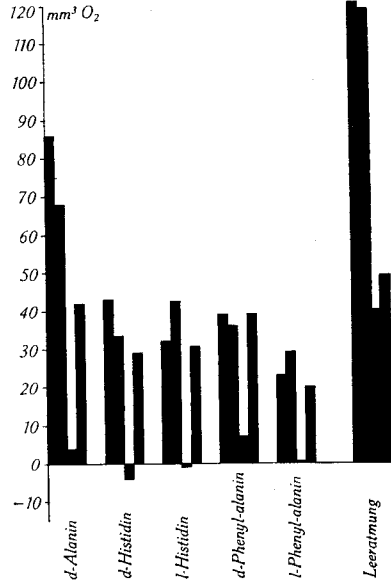


Fig. 4. Rattenerleber.

Reaktivierung durch „Silbersalz“.

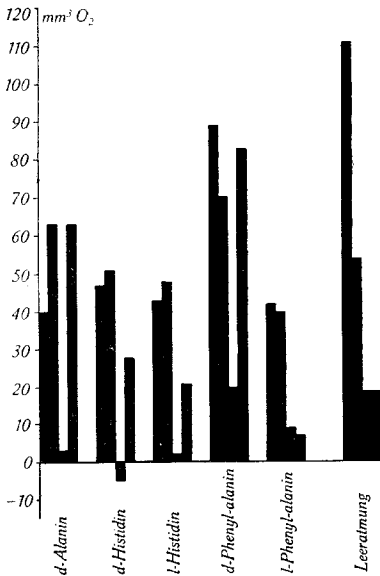


Fig. 5. Rattenerleber.

Reaktivierung durch „Kresolextrakt“.

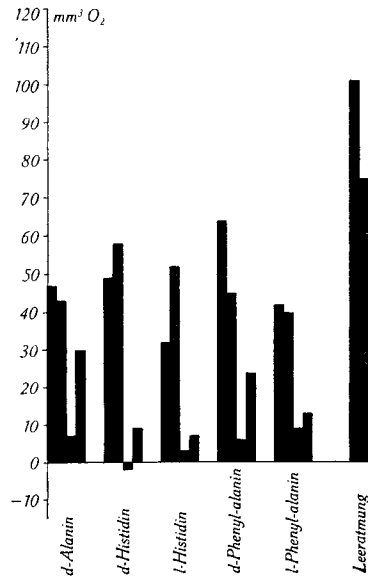


Fig. 6. Rattenerleber.

Reaktivierung durch

„Alloxazin-Adenin-Dinucleotide“.

Der oxydative Abbau von Aminosäuren wird wie in Fig. 1 durch 5 Stäbe wiedergegeben. Erste drei Stäbe: Abbau durch frischen, 5 Stunden gealterten und 5 Stunden dialysierten Extrakt von Rattenerlebern. Der 4. Stab stellt jeweils den Abbau durch den dialysierten Extrakt nach Cofermentzusatz dar; er gibt also über die Reaktivierbarkeit durch den betreffenden Zusatz Aufschluss.

über die Kresolextraktion (Fig. 5) ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, dass nur noch der Abbau von *d*-Alanin und *d*-Phenylalanin voll reaktiviert wird, während derjenige von *d*- und *l*-Histidin nur unvollständig, derjenige von *l*-Phenylalanin sowie die Leeratmung überhaupt nicht reaktiviert werden. Endlich erfolgt eine Reaktivierung des Abbaues durch das reine Alloxazin-Adenin-Dinucleotid (Fig. 6) nurmehr beim *d*-Alanin und *d*-Phenylalanin; der Abbau der übrigen Aminosäuren sowie die Leeratmung werden nicht reaktiviert. Sogar die Reaktivierung des Abbaues der unnatürlichen Formen von Alanin und Phenylalanin erfolgt trotz überreicher Dinucleotidzusätze (100 γ pro Ansatz) nicht ganz vollständig.

Diese Ergebnisse lassen die oben genannten Fragen in folgendem Sinne beantworten:

1. Der durch Dialyse inaktivierte Abbau von *d*-Alanin sowie von *d*-Phenylalanin durch Rattenleberextrakte ist zu einem grossen Teil durch Zugabe des Cofermentes der *d*-Aminosäure-oxydase wieder reaktiviert worden. Eine vollständige Reaktivierung konnte jedoch in keinem Versuch erzielt werden, weshalb wir annehmen müssen, dass neben der *d*-Aminosäure-oxydase für den oxydativen Abbau von *d*-Alanin und *d*-Phenylalanin möglicherweise noch ein anderer Faktor verantwortlich gemacht werden kann.

2. Der durch Dialyse inaktivierte oxydative Abbau von *d*- und *l*-Histidin durch Rattenleberextrakte kann durch das Coferment der *d*-Aminosäure-oxydase nicht reaktiviert werden, die *d*-Aminosäure-oxydase kann also für den Abbau von *d*- und *l*-Histidin nicht in Frage kommen.

Weiter ist mit diesen Untersuchungen der Befund von *Lang* und *Westphal* bestätigt, dass *l*-Phenylalanin ebenfalls nicht durch die *d*-Aminosäure-oxydase oxydativ abgebaut wird.

Beim Abbau von *l*- und *d*-Histidin und von *l*-Phenylalanin können die beiden Pyridinfermente (Codehydrase I und II) kaum in Frage kommen, denn die Leeratmung bleibt beim Reaktivierungsversuch durch die Silbersalzfraktion aus, während *l*- und *d*-Histidin sowie *l*-Phenylalanin durch den genannten Zusatz oxydiert werden. Es können demnach die bekannten Pyridinfermente in der Silbersalzfraktion in wirksamer Menge nicht vorhanden sein. Das verschiedene Verhalten von *l*- und *d*-Histidin einerseits und von *l*-Phenylalanin andererseits beim Reaktivierungsversuch mit dem über die Kresolextraktion gereinigten Hefeextrakt (Fig. 5) scheint dafür zu sprechen, dass auch für den Abbau dieser beiden Aminosäuren zwei verschiedene Fermente verantwortlich zu machen sind. Als Coferment für diese Form des Histidinabbaues kommt möglicherweise ebenfalls ein Adenin-Nucleotid in Frage, da der Kresolextrakt nach

Warburg und Christian ausser dem Alloxazin-Adenin-Dinucleotid noch andere Adenin-Nucleotide enthält.

Es war demnach zu entscheiden, ob für den oxydativen Abbau von *d*- und *l*-Histidin zwei verschiedene Enzyme anzunehmen sind oder eines. Alle bisher mitgeteilten Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich um ein Ferment handelt, welches beide Formen in gleichmässiger Weise abbaut. Wie in der Folge gezeigt werden wird, scheint tatsächlich nur ein einziges Enzym vorzukommen, und wir nennen dieses von nun ab *d,l*-Histidin-oxydase. Dieses Enzym musste nun genauer charakterisiert werden.

Konkurrenzversuche zwischen *l*- und *d*-Histidin.

Die Resultate wiederholter Konkurrenzversuche sprechen eindeutig für das Bestehen eines einzigen Fermentes für den Abbau von *l*- und von *d*-Histidin in der Rattenleber. Tabelle 2 gibt ein Beispiel eines solchen Versuches:

Tabelle 2.

	O ₂ -Verbrauch mm ³ in 60 Minuten	O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert
1 cm ³ Extrakt	68	—
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>d</i> -Histidin	126	58
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>l</i> -Histidin	120	52
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>d</i> -Histidin + 0,5 0,2-m. <i>l</i> -Histidin	115	47

Verhalten gegenüber Blausäure und arseniger Säure.

Das Verhalten der Histidin-oxydase in Rattenleberextrakten gegenüber Blausäure und arseniger Säure wurde sowohl mit *l*- als auch mit *d*-Histidin geprüft. In die Haupträume der Gefässe wurde in den Ansätzen mit Blausäure soviel in 0,067-m. Phosphatpuffer p_H 8,0 gelöstes Kaliumcyanid gegeben, dass die Konzentration 0,001-m. betrug. Nach Krebs wurde dabei in die Einsätze an Stelle von n. KOH eine Mischung von einem Teil n. KOH und 10 Teilen n. KCN gegeben. Bei den Ansätzen mit arseniger Säure wurde diese ebenfalls in Puffer gelöst und so viel in die Haupträume der Ansätze gebracht, dass die Endkonzentration auch hier 0,001-m. betrug.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, hemmt 0,001-m. HCN sowohl den Abbau von *l*- als auch den von *d*-Histidin vollständig. 0,001-m. As₂O₃ dagegen fördert die Oxydation beider Antipoden mässig. Die Leeratmung wird durch beide Zusätze ungefähr gleich stark gehemmt. Im Gegensatz zu der Krebs-Warburg'schen *d*-Aminosäure-oxydase, die durch Blausäure nicht beeinflusst wird, wird — wie gezeigt — sowohl die *l*- als auch die *d*-Histidinoxydation gehemmt. Die Histidin-oxydase verhält sich aber gleich wie die Krebs'sche *l*-Aminosäure-

oxydase, trotzdem sie auch *d*-Histidin oxydiert. Während arsenige Säure auf die *l*- und *d*-Aminosäure-oxydase nach *Krebs* ohne Einfluss ist, können wir einen geringen fördernden Einfluss auf die Histidinoxidation feststellen; doch ist es möglich, dass es sich hier um eine parallel laufende Reaktion handelt, die das Histidin selbst vielleicht nicht betrifft. Dieses Verhalten ist ein weiterer Grund zur Annahme einer bisher unbekanntenen Histidin-oxydase in der Rattenleber.

Tabelle 3.

	O ₂ -Verbrauch mm ³ in 60 Minuten	O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert
1 cm ³ Extrakt	118	—
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>d</i> -Histidin	162	44
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>l</i> -Histidin	146	28
1 cm ³ Extrakt + KCN	68	—
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>d</i> -Histidin + KCN	67	-1
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>l</i> -Histidin + KCN	72	4
1 cm ³ Extrakt + As ₂ O ₃	59	—
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>d</i> -Histidin + As ₂ O ₃	124	65
1 cm ³ Extrakt + 0,5 0,2-m. <i>l</i> -Histidin + As ₂ O ₃	94	35

Abhängigkeit der Histidin-oxydase von der Substratkonzentration.

Die Untersuchung des Sauerstoffmehrverbrauchs des Rattenleber-Extrakts bei steigenden Konzentrationen von *l*- und *d*-Histidin ergab für beide optischen Isomeren die gleiche Kurve. Fig. 7 zeigt, dass bei einer Zugabe von 10—15 mg zu 1 cm³ Leberextrakt der maximale Sauerstoffverbrauch erreicht wird, d. h. bei einer Konzentration von ungefähr 0,02-m. Histidin in der Versuchsflüssigkeit.

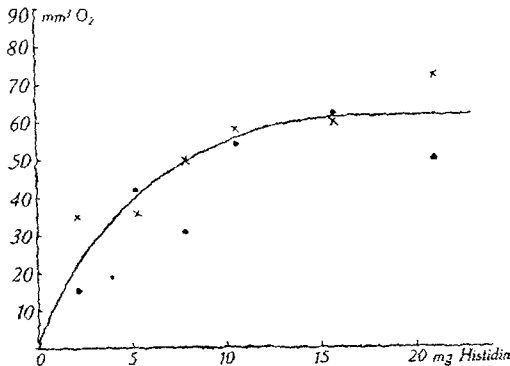


Fig. 7. „Abhängigkeit der Histidin-oxydase von der Substratkonzentration“.

x x x Werte für *d*-Histidin • • • Werte für *l*-Histidin

Abhängigkeit der Histidin-oxydase von der Wasserstoffionenkonzentration.

Von dem wie gewöhnlich mit Phosphatpuffer p_H 8,0 zubereiteten frischen Rattenleberextrakt wurde pro Ansatz 1 cm^3 verwendet, dazu in den Ansätzen ohne Histidin $2,5\text{ cm}^3$, in denen mit Histidin 2 cm^3 Phosphatpuffer p_H 5,9—8,0 oder Glykokollpuffer p_H 8,5—9,6 gegeben. Die gepufferten Histidinlösungen wurden durch Zusatz von n. HCl oder n. NaOH auf das gleiche p_H wie der zum entsprechenden Ansatz zugesetzte Puffer gebracht. Auf diese Weise erhielten wir immer je einen Wert für den Sauerstoffverbrauch des Extraktes mit und ohne Histidinzusatz. Die p_H -Werte massen wir jeweils nach Schluss des Versuches mittels Indikatorpapier. So kamen wir zu den in Fig. 8 wiedergegebenen zwei Kurven für den Abbau von *l*- und *d*-Histidin bei verschiedenem p_H .

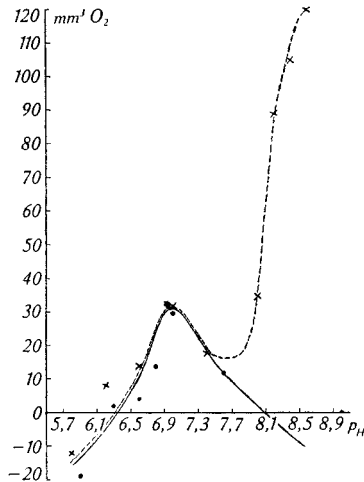


Fig. 8.

„Abhängigkeit der Histidin-oxydase von der Wasserstoffionenkonzentration“.

× × × Werte für *l*-Histidin
 ● ● ● Werte für *d*-Histidin

Der maximale Abbau von *d*-Histidin liegt ungefähr bei p_H 7,0 (in anderen Versuchen bei p_H 7,5); gegen den sauren wie den alkalischen Bereich fällt die Kurve gleichmässig ab, sodass der Nullwert ungefähr bei p_H 6,3 und bei p_H 8,3 erreicht wird. Was nun den oxydativen Abbau von *l*-Histidin betrifft, so erfolgt er ungefähr gleich von p_H 6,3—7,3. Bei stärkerer Alkalität steigen jedoch die Werte sehr stark an, sogar weit über das erste Maximum bei p_H 7,0 hinaus. Die Erklärung für diesen zweiten Anstieg der Kurve wird dadurch

gegeben, dass im alkalischen Bereich die Wirkung der von *Edlbacher* gefundenen Histidase eintritt. Diese baut nun *l*-Histidin hydrolytisch bis zu *l*-Glutaminsäure ab; in Leberextrakten findet sich aber ebenfalls noch die *l*-Glutaminsäure-dehydrase (von *Euler* und Mitarbeiter), welche die aus Histidin entstandene Glutaminsäure *oxydativ* desaminiert. Wir können demnach auch aus der p_H -Aktivitätskurve auf die Einheitlichkeit unserer „Histidin-oxydase“ schliessen.

Bildung von Ammoniak.

Während bei den Versuchen mit *d*-Alanin jedesmal die nach *Krebs* zu erwartende Ammoniakmenge gefunden werden konnte, war beim *d*-Histidin meistens nur eine geringe Ammoniakbildung festzustellen. In dieser Hinsicht verhält sich der oxydative Abbau des *d*-Histidins ganz ähnlich wie der von *Lang* untersuchte Abbau für *l*-Phenylalanin und der von *Felix* untersuchte für *l*-Tyrosin. Eine Untersuchung der Ammoniakwerte bei der Oxydation des *l*-Histidins wurde nicht durchgeführt, da die in den Enzymlösungen vorhandene Histidase auf jeden Fall beträchtliche Mengen von Ammoniak in Freiheit gesetzt hätte. Wie weit durch eventuelle Umaminierungen Harnstoff oder andere Aminosäuren entstanden sind, wurde bisher noch nicht untersucht.

Tabelle 4.

Vergleich des Sauerstoffverbrauches und der Ammoniakbildung beim oxydativen Abbau von *d*-Alanin und *d*-Histidin durch Rattenleberextrakte:

Versuch Nr.	Substrat	O ₂ -Verbrauch in mm ³	Ammoniakbildung in mm ³
31	<i>d</i> -Alanin	94	147
40	„	46	98
42	„	86	210
45	„	33	59
46	„	40	53
49	„	50	81
50	„	40	87
53	„	47	91
Durchsch.	„	54	92
33	<i>d</i> -Histidin	71	35
41	„	35	14
43	„	43	21
49	„	56	0
50	„	38	7
51	„	49	31
54	„	50	14
Durchsch.	„	49	17

Bestimmung der Imidazolwerte.

Die kolorimetrischen Untersuchungen der Imidazolwerte vor und nach der oxydativen Spaltung ergeben für *d*-Histidin keine Abnahme. Für *l*-Histidin wurden diese Untersuchungen nicht durchgeführt, denn auch hier war es selbstverständlich, dass durch die Histidase eine starke Abnahme zu erwarten war, wie wir das in unserer Mitteilung (l. c.) ausführlich beschrieben haben.

Tabelle 5.

Vergleich des Sauerstoffverbrauchs und der Imidazolwerte beim oxydativen Abbau von *d*-Histidin durch Rattenleberextrakte.

Histidin-Zusatz 0,5 cm ³	O ₂ -Verbrauch in mm ³		gefundene Histidinmenge in γ	
	mit Extrakt	ohne Extrakt	mit Extrakt	ohne Extrakt
0,1-m.	41	0	108	109
0,1-m.	33	0	128	118
0,05-m.	13	0	59	55
0,05-m.	56	0	64	64

Vorkommen der Histidin-oxydase.

Nach unseren bisherigen Untersuchungen findet sich die *d,l*-Histidin-oxydase in merklich nachweisbarer Menge nur in der Rattenleber, und zwar schwanken die erhaltenen Werte bei normal ernährten Ratten ziemlich bedeutend. Gewinnt man die Enzymlösung aber von Ratten, die vor dem Versuch 24 Stunden gehungert haben, so sind die erhaltenen Werte äusserst konstant, und zwar ist die Aktivität des Ferments bei Hungerratten im Durchschnitt stärker als bei nicht hungernden Tieren. Nach 48stündigem Hunger liess sich keine weitere Steigerung der Enzymaktivität mehr erzielen. In diesem Zusammenhang haben wir auch die Aktivität der Histidin-oxydase bei Beriberi-Ratten geprüft und gefunden, dass sie im Durchschnitt gegenüber den normal ernährten Tieren ebenfalls erhöht ist. Bei anderen Tieren konnten wir die Histidin-oxydase nicht in sicher messbaren Mengen feststellen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die dabei erhaltenen Werte.

Aus der Tabelle 6 ist ersichtlich, dass in der Niere und bei manchen Tierarten auch in der Leber der oxydative Abbau immer streng spezifisch erfolgt, indem nur *d*-Histidin abgebaut wird. Da andererseits aber *Karrer* und *Frank* durch ihre Versuche mit reinem Ferment gezeigt haben, dass das von *Warburg* und *Christian* dargestellte Alloxazin-Adenin-Dinucleotid mit dem Protein der Hammelniere *d*-Histidin nicht abzubauen vermag, ist es sicher, dass neben unserer *d,l*-Histidin-oxydase eine weitere *d*-Histidin-oxydase auftritt, welche ein allgemeineres Vorkommen aufweist als das von uns

beschriebene Enzym. Die von uns beschriebene *d,l*-Histidin-oxydase findet sich zunächst also nur in der Rattenleber in merkbarer Aktivität.

Tabelle 6.

Untersuchung des oxydativen Histidinabbaues durch Leber- und Nierenextrakte verschiedener Tierarten.

Bei der Herstellung der Extrakte wurden pro 1 g frische Leber immer 2 cm³ Puffer, pro 1 g frische Niere immer 3 cm³ Puffer genommen, mit Ausnahme der Schweinsnieren, für die pro 1 g 2 cm³ zugefügt wurde. Histidinmenge immer 0,5 cm³ 0,1-m. pro Ansatz.

Tierart	Sauerstoffverbrauch in mm ³ nach 60 Minuten			
	Leber		Niere	
	<i>d</i> -Histidin	<i>l</i> -Histidin	<i>d</i> -Histidin	<i>l</i> -Histidin
Ratte	47	43	15	0
Meerschweinchen .	7	0	20	4
Kaninchen	1	0	5	6
Schwein	12	0	65	11
Katze	10	4	48	10
Taube	20	3	48	12

Dass es sich beim optisch spezifischen *d*-Histidinabbau durch Nieren- und Leberextrakte verschiedener Tierarten nicht um unsere *d,l*-Histidin-oxydase handelt, haben wir auch durch Hemmungsversuche mit Blausäure nachgewiesen. Wir konnten durch Zusatz von Blausäure (in der früher angegebenen Menge) zu Nierenextrakten von Katze, Ratte und Meerschweinchen keine Hemmung des oxydativen Abbaues von *d*-Histidin erzielen. Auf eine Wiedergabe dieser Versuche können wir hier verzichten.

Versuche über die Dissoziierbarkeit der *d*-Aminosäure-oxydase bei verschiedenen Tierarten.

Die eigentümliche Tatsache, dass in Rattenleber-Frischextrakten die *Krebs'sche d*-Aminosäure-oxydase als vollkommen dissoziierbares Proteid auftritt, konnte auch noch bei einigen anderen Tieren durch Dialyse-Versuche festgestellt werden, und zwar gibt die folgende Tabelle darüber Auskunft.

Aus Tabelle 7 geht hervor, dass die *d*-Aminosäure-oxydase in frischen Extrakten von Rattenleber und -niere sowie von Meerschweinchenniere in leicht dissoziierbarer Form vorliegt, dass sie in frischen Extrakten von Katzenleber und -niere sowie von Taubenleber dagegen nicht oder kaum dissoziiert.

Vergleichsweise haben wir auch die Dissoziierbarkeit der *d*-Aminosäure-oxydase im Extrakt von Acetontrockenpulver der Hammelniere untersucht. Wir fanden dabei, den Angaben von *Warburg* und *Christian* entsprechend, eine ziemlich geringe Dissoziierbarkeit.

Tabelle 7.

Dissoziierbarkeit der *d*-Aminosäure-oxydase in frischen Organextrakten verschiedener Tierarten.

Für alle Extrakte wurden bei der Herstellung pro 1 g Organ 2 cm³ Puffer verwendet, nur bei der Katzenniere pro 1 g 3 cm³ Puffer.

Tierart	Organ	O ₂ -Verbrauch 60 Minuten nach Zugabe von 0,5 cm ³ 0,2-m. <i>d</i> -Alanin	
		5 Stunden alter nicht dialysierter Extrakt	5 Std. dialysierter Extrakt
Ratte	Leber	88	12
Ratte	Niere	220	88
Meerschweinchen	Niere	90	35
Katze	Niere	188	170
Katze	Leber	173	221
Taube	Leber	41	36

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht also zunächst hervor, dass in der Rattenleber ein dissoziierbares Fermentproteid vorkommt, welches in unspezifischer Weise *d*- und *l*-Histidin oxydativ abbaut. Dieses Enzym ist nicht identisch mit demjenigen Enzym, welches von *Krebs* und *Warburg* als *d*-Aminosäure-oxydase bezeichnet wird. Andererseits geht aus den Versuchen von *Karrer* und *Frank* hervor, dass die *d*-Aminosäure-oxydase in gereinigter Form *d*-Histidin nicht abbauen kann. Es muss also ausserdem eine spezifische *d*-Histidin-oxydase in den Nieren und teilweise in den Lebern verschiedener Tiere vorkommen. Endlich haben wir in früheren Versuchen gemeinsam mit *Litvan* im *Coli*-Bakterium ein drittes Ferment nachgewiesen, welches *l*-Histidin äusserst stark oxydativ abbaut, und zwar unter Spaltung des Imidazolrings. Es gibt also mindestens drei Enzyme, welche Histidin oxydieren:

1. Die vorzugsweise in der Rattenleber auftretende *d, l*-Histidin-oxydase.
2. Die *d*-Histidin-oxydase, welche vorzugsweise in der tierischen Niere auftritt.
3. Die *l*-Histidin-oxydase der *Coli*-Bakterien.

Diese Versuche zeigen wieder deutlich die Tatsache, dass die verschiedenen Organismenarten denselben Körperbaustein in ganz verschiedener Weise umsetzen. Jede Organismenart besitzt eine Enzymausrüstung, die auch bei ganz nahe verwandten Arten charakteristische Abweichungen zeigt. Man darf niemals Ergebnisse, die nur mit einer Art gewonnen sind, verallgemeinern. Gerade auch die

oben angeführten Dialyseversuche zeigen, dass bei einzelnen Arten die *d*-Aminosäure-oxydase einmal in dissoziierbarer und einmal in nicht dissoziierbarer Form vorliegen kann. Wir werden dementsprechend auch die Untersuchungen über den oxydativen Abbau von *d*-Alanin durch das leicht dissoziierende Rattenleberenzym weiter fortsetzen.

Zusammenfassung.

1. In der Rattenleber findet sich ein dissoziierbares Enzym, welches sowohl *d*- als *l*-Histidin auf oxydativem Wege abbaut. Es wird als *d,l*-Histidin-oxydase bezeichnet.

2. Die *d,l*-Histidin-oxydase zeigt ein charakteristisches p_H -Optimum bei 7,0—7,5. Sie ist durch Blausäure vollkommen hemmbar, während arsenige Säure keinen hemmenden Einfluss hat.

3. Die *d,l*-Histidin-oxydase besteht höchst wahrscheinlich aus einem Trägerprotein und einem Coferment, welches sich in derjenigen Fraktion des Hefekochsaftes vorfindet, welche die Codehydrasen nicht mehr, jedoch nach *Warburg* und *Griese* noch verschiedene Adenin-Dinucleotide enthält. Reines Alloxazin-Adenin-Dinucleotid ist sicher als Coferment auszuschliessen.

4. Beim oxydativen Abbau des Histidins durch die *d,l*-Histidin-oxydase wird der Imidazolring nicht angegriffen. Ob das beim oxydativen Abbau eventuell entstehende Ammoniak auf dem Wege von Umaminierungsreaktionen verschwindet, muss erst festgestellt werden, denn es lassen sich nur geringe Mengen von gebildetem Ammoniak nachweisen.

5. Es wird gezeigt, dass bei verschiedenen Tierarten die *d*-Aminosäure-oxydase dissoziierbar ist.

Basel, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.
