

170. Über die Diamin-oxydase der Smegmabazillen

von F. Roulet und E. A. Zeller.

(12. IX. 45.)

W. Franke und A. Schillinger beschrieben vor kurzem den Abbau von Histamin und Putrescin durch *Mycobacterium lacticola*¹⁾, womit der erste Hinweis auf die Existenz der Diamin-oxydase (DO) in säurefesten Bakterien gegeben war. Schon vorher wurde dieses Enzym in mehreren Bakterien wie *Pseudomonas pyocyanea*²⁾, *B. coli*³⁾, *B. proteus*³⁾ usw. nachgewiesen. Die DO ist in der Natur sehr weit verbreitet⁴⁾ und findet sich ausser in Bakterien in Organen von Säugern, Vögeln⁵⁾, Reptilien⁶⁾, Pilzen³⁾ und in den Wurzeln von höhern Pflanzen⁷⁾. Sie wurde 1938 in der Schweineniere entdeckt⁸⁾ und als identisch mit der Histaminase (*Best*)⁹⁾ erkannt¹⁰⁾. Ihre Eigenschaften, besonders der Spezifitätsbereich und verschiedene Hemmungsreaktionen, wurden in einer Reihe von Publikationen genauer erforscht¹¹⁾.

Wir stellten uns die Aufgabe, eine Bakterien-DO in ähnlich eingehender Weise wie die Säuger-DO zu prüfen und die Ergebnisse mit den früheren zu vergleichen. Es sollte damit die Frage beantwortet werden, ob die beiden Fermente — „Säuger“- und „Bakterien“-DO — sich je nach ihrer Herkunft gleich oder verschieden verhalten.

Als geeignetes Material für unsere Untersuchungen erwies sich das *Mycobact. smegmatis*, das eine beträchtliche DO-Aktivität aufweist, auf synthetischen Nährboden leicht zu züchten ist und in reichlicher Menge zur Verfügung stand.

¹⁾ W. Franke und A. Schillinger, *Bioch. Z.* **316**, 313 (1944).

²⁾ E. F. Gale, *Biochem. J.* **36**, 64 (1942).

³⁾ E. Werle, *Bioch. Z.* **309**, 61 (1941).

⁴⁾ Zusammenfassungen: a) E. A. Zeller: Diamin-oxydase. *Advanc. in Enzymol.* (New York) **2**, 93 (1942). b) E. Werle: Histaminase = Diamin-oxydase, *Fermentf.* **17**, 128 (1943).

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

⁶⁾ Unveröffentlichte Versuche von E. A. Zeller und A. Maritz über die DO der Ringelnatterleber und -niere.

⁷⁾ B. T. Cromwell, *Biochem. J.* **37**, 722 (1943).

⁸⁾ E. A. Zeller, *Naturwiss.* **26**, 282 (1938).

⁹⁾ C. H. Best, *J. Physiol.* **67**, 256 (1929).

¹⁰⁾ E. A. Zeller, *Helv.* **21**, 880 (1938).

¹¹⁾ 10. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Polyaminen: E. A. Zeller, *Helv.* **24**, 539 (1941).

Methodik.

Die Smegmabazillen wurden auf *Sauton*-Lösung gezüchtet, auf der sie in Form von trockenen Schichten rasch gediehen. Diese wurden abgehoben, zwischen Filtrierpapier getrocknet und gewogen. Je 40 mg dieses Materials wurden in 1 cm³ m/15-Phosphatpuffer, p_H 7,2, suspendiert. Substrate und Inhibitoren wurden im gleichen Puffer gelöst und der Ansatz auf 2 cm³ ergänzt. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf dieses Volumen. Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxydbildung wurden in mit Sauerstoff durchströmten *Warburg*-Manometern, die Ammoniakproduktion in den *Conway*-units gemessen.

In den eben beschriebenen Versuchsansätzen trat auch ohne Zugabe eines Substrats ein Sauerstoffverbrauch auf, der je nach dem Alter der Kultur, der die Bakterien entnommen wurden, verschieden gross war und pro Stunde 5—100 mm³ betrug. Wurde ein geeignetes Substrat wie Putrescin- und Cadaverin-dihydrochlorid, Agmatinsulfat, Sperminphosphat, Histamin-dihydrochlorid¹⁾ zugesetzt, so nahm der Sauerstoffverzehr gegenüber den jedesmal mitgeführten Kontrollansätzen beträchtlich zu. — Weitere methodische Einzelheiten finden sich in den folgenden Abschnitten.

Ergebnisse.

1. Abhängigkeit der Diamin-oxydase vom Alter der Bakterienkultur.

Wenn wir von einer Smegmabazillen-Kultur vom 2. Tag an alle zwei Tage Proben entnehmen und diese auf ihre Fähigkeit prüfen, Diamine zu oxydieren, so stellen wir fest, dass diese ständig und für alle Substrate in ungefähr derselben Weise abnimmt (Figur 1).

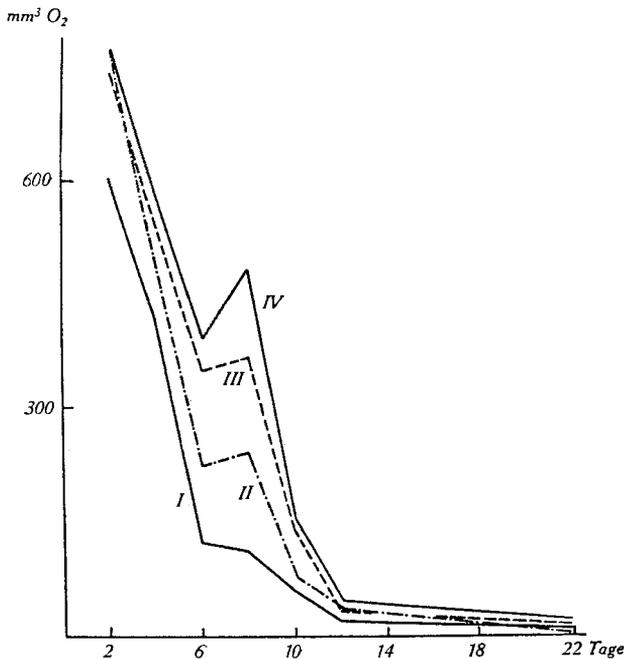


Fig. 1.
Abhängigkeit der DO-Aktivität vom Alter der Bakterienkultur.
Abszisse: Alter der Kultur.
Ordinate: Sauerstoffverbrauch nach 5 Stunden in Kubikmillimetern. Pro Ansatz werden 40 mg Bakterienbrei und 1 mg Substrat verwendet. Kurve I: Kontrollversuch, Kurve II: Cadaverin, Kurve III: Agmatin, Kurve IV: Putrescin.

¹⁾ Für die Überlassung der Substrate sind wir der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Cie. A.G.*, Basel, zu grossem Dank verpflichtet.

Der am 8. Tag erfolgende Unterbruch der Kurven ist weniger auf die eigentliche DO-Reaktion als auf die später zu behandelnden Sekundäroxidationen zurückzuführen.

Aber nicht nur die Oxydation der Amine, sondern auch der durch die Bakterien allein bedingte Sauerstoffverbrauch folgt der gleichen Gesetzmässigkeit. Sie lässt sich hier in besonders einfacher Weise darstellen, wenn die Oxydationsgeschwindigkeit als Logarithmus in ein Koordinatensystem aufgetragen wird. Dann nimmt die Zeit-Aktivitäts-Kurve für die Zeit vom 2. bis 10. Tag verhältnismässig genau die Form einer Geraden an (Figur 2).

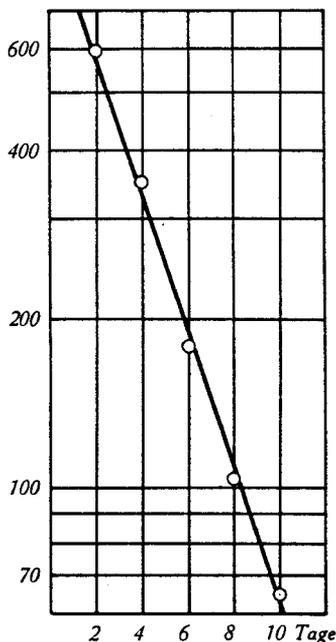


Fig. 2.

Abhängigkeit der Atmungsgeschwindigkeit von *Smegmabazillen* vom Alter der Bakterienkultur.

Abzisse: Alter der Kultur. Ordinate: Logarithmus des Sauerstoffverbrauchs nach 5 Stunden. Pro Ansatz werden 40 mg Bakterienbrei verwendet.

Die in Figur 1 dargestellte Kurve entspricht der einer monomolekularen Reaktion. Doch handelt es sich wohl sicher um einen wesentlich komplizierteren Vorgang, der zufällig einen Verlauf zeigt, wie er häufig in der Fermentkinetik gefunden wird¹⁾.

Bei den Bakterienproteasen wurden schon früher ähnliche Verhältnisse bekannt. Manche Peptidasen „verschwinden fast plötzlich oder allmählich entweder ganz oder teilweise wieder aus der Kultur“²⁾.

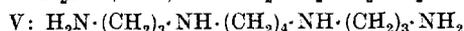
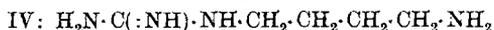
¹⁾ *D. D. van Slyke*: The Kinetics of Hydrolytic Enzymes and their Bearing on Methods for Measuring Enzyme Activity. *Advanc. in Enzymol.* (New York) **2**, 33 (1942).

²⁾ *E. Maschmann*: Bakterien-Proteasen, *Ergebn. Enzymf.* (Leipzig) **9**, 155 (1944).

Der Einblick in diese Verhältnisse gestattet es, die günstigste Zeitspanne für die DO-Versuche zu wählen. Wie aus der Figur 1 ohne weiteres hervorgeht, umfasst diese die Zeit vom 6. bis 8. Tag, während welcher die Leer- im Vergleich zu den Substratwerten verhältnismässig klein sind.

2. Spezifität der Diamin-oxydase der Smegmabazillen.

In Gegenwart der „Säuger“-DO wird u. a. die Oxydation der Di- und Polyamine Putrescin (Tetramethylen-diamin (I)), Cadaverin (Pentamethylen-diamin (II)), Histamin (β -[Imidazyl-4-(5)]-äthylamin (III)), Agmatin (IV) und Spermin (V)



beschleunigt, also von Stoffen, die mindestens 2 basische Gruppen aufweisen¹⁾. Von diesen werden I, II, IV und V auch in Gegenwart der Smegmabazillen von Sauerstoff leicht angegriffen (Figur 3).

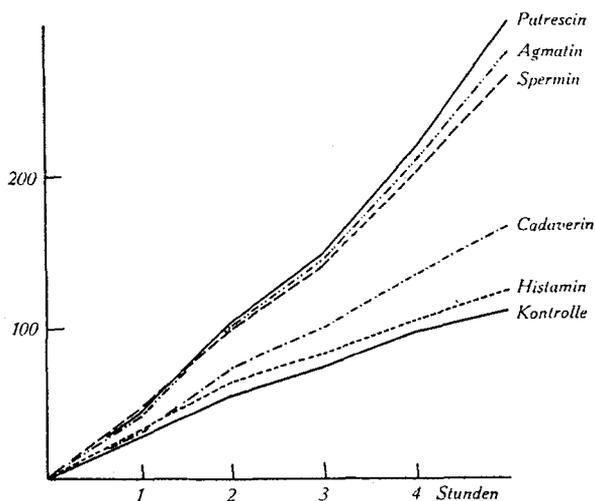


Fig. 3.

Enzymatischer Abbau von Diaminen und Spermin durch Smegmabazillen. Es werden je 40 mg Bakterienbrei verwendet. Substrate 0,005-m. Dauer des Versuchs 4 Stunden.

Hier stossen wir auf einen ersten deutlichen Unterschied zwischen der „Smegma“- und „Säuger“-DO: Während bei der letztern Cadaverin und Histamin hinsichtlich der Oxydationsgeschwindigkeit an erster Stelle stehen, finden sie sich bei der „Smegma“-DO an letzter. Die Änderung der Cadaverinkonzentration zwischen 0,08—0,01-m. brachte keine Steigerung der Abbaugeschwindigkeit.

¹⁾ E. A. Zeller, Helv. 21, 880 (1938); vgl. auch zusammenfassende Darstellungen über die Diamin-oxydase, l. c.

Einen weiteren Unterschied zwischen den beiden Fermenten brachte der Vergleich der Histaminoxydationen zutage. Während Histamin durch die „Säuger“-DO mit einer eher grösseren Geschwindigkeit wie Putrescin angegriffen wird, sofern nicht überoptimale Konzentrationen verwendet werden¹⁾, setzt in der Mehrzahl der Fälle der Zusatz von Histamin den Sauerstoffverbrauch der Bakteriensuspensionen nicht herauf, sondern herab, und zwar um so mehr, je grösser die Histaminkonzentration gewählt wurde (Tabelle II). Immerhin konnte mehrmals eine eindeutige Steigerung des Sauerstoffverzehrs registriert werden. So verschwanden beispielsweise nach Zusatz von $0,5 \times 10^{-5}$ Mol Histamin in 5 Stunden 42 mm^3 Sauerstoff und wurden 8γ Ammoniak-Stickstoff (11% des Amino-Stickstoffs) frei. Aber auch in den Versuchen, in denen Histamin scheinbar keine Veränderung erleidet, lässt sich im Konkurrenzversuch mit andern Substraten eine gut messbare Affinität desselben zur „Smegma“-DO nachweisen. Als Beispiel findet sich in der Tabelle I eine beträchtliche Hemmung des Putrescin-Abbaues durch eine äquimolare Histaminkonzentration.

Tabelle I.

Hemmung des enzymatischen Putrescinabbaues durch Histamin.

Je 40 mg Smegmabazillen werden in 2 cm^3 Phosphatpuffer $p_{\text{H}} 7,2$ suspendiert. Konzentration des Putrescins und Histamins 0,01-m. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Δ bedeutet die Differenz gegenüber den Ansätzen ohne Putrescin.

	Sauerstoffverbrauch	
	total	Δ
Bazillen allein	115 mm^3	—
Bazillen + Histamin	120 „	—
Bazillen + Putrescin	1120 „	1005 mm^3
Baz. + Hist. + Putr.	845 „	725 „ = 27% Hemmung

Ähnliche Verhältnisse fand *E. F. Gale*²⁾ bei der DO von *Ps. pyocyanea* vor, die wohl die Oxydation von I, II und IV, nicht aber die von Histamin katalysierte. Wenn dagegen die Bazillen auf Histamin-haltigen Nährböden gezüchtet wurden, dann trat auch der Histaminabbau deutlich zutage. Wir übertrugen diese Versuche auf die Smegmabazillen und liessen diese auf histaminhaltiger *Sauton*-Nährlösung wachsen. Parallel dazu wurden Kulturen ohne Histamin gewonnen. Die Fähigkeit zur Histaminoxydation ist für beide Kulturen verschieden stark ausgeprägt (Tabelle II).

¹⁾ *E. A. Zeller, B. Schür und S. Staehlin, Helv. 22, 837 (1939), Figuren 5 und 6.*
²⁾ *E. F. Gale, l. c.*

Tabelle II.

Einfluss des Histamingehalts der Nährlösung auf den Histamin-Abbau. Smegmazellen werden auf gewöhnlicher und histaminhaltiger (0,002-m.) *Sauton*-Lösung 6 Tage lang gezüchtet. Pro Ansatz wurden 40 mg Bazillen verwendet. Dauer des Versuchs 5 Stunden. Δ bedeutet die Differenz gegenüber den Ansätzen ohne Histamin.

Histamin	Sauerstoffverbrauch			
	ohne Histamin kultiviert		mit Histamin kultiviert	
	total	Δ	total	Δ
—	198 mm ³	—	195 mm ³	—
0,005-m.	192 „	— 6 mm ³	256 „	61 mm ³
0,01-m.	191 „	— 7 „	250 „	55 „
0,02-m.	184 „	— 14 „	240 „	45 „
0,1-m.	184 „	— 14 „	197 „	2 „

Mit steigender Histaminkonzentration nimmt die Oxydationsgeschwindigkeit ab (Tabelle II, letzte Spalte). Wie bei der „Säuger“-DO liegt auch hier die Erscheinung eines Optimums der Histaminkonzentration vor¹⁾.

Im ersten Abschnitt wurde dargelegt, dass die Fähigkeit zum Abbau von Diaminen mit zunehmendem Alter der Kultur abnimmt. Wenn hingegen der Nährlösung Putrescin zugesetzt wird, dann ist die Putrescin- und Agmatinoxydation wesentlich grösser als die der ohne Putrescin kultivierten Bakterien. Wenn wir der Nährlösung Agmatin zufügen, so wird weder Putrescin noch Agmatin rascher oxydiert (Tabelle III).

Tabelle III.

Einfluss der Zusammensetzung der Nährlösung auf den Diamin-Abbau. Es wurden 3 parallele Kulturen angelegt, *Sauton*-Lösung I ohne Zusatz, Lösung II mit 1 mg Putrescin.2 HCl pro cm³, Lösung III mit 1 mg Agmatinsulfat pro cm³. Es werden je 40 mg Bakterien und 1 mg Substrat verwendet. Dauer des Versuchs 6 Stunden.

Nährlösung	Substrat	Sauerstoffverbrauch	
		total	Δ
I normal	—	5 mm ³	—
	Putr.	36 „	31 mm ³
	Agmat.	45 „	40 „
II mit Putr. . .	—	36 „	—
	Putr.	160 „	124 „
	Agmat.	173 „	137 „
III mit Agmat. .	—	32 „	—
	Putr.	52 „	20 „
	Agmat.	53 „	21 „

Wenn alle diese Ergebnisse zusammengefasst werden, so kann mit Sicherheit daraus geschlossen werden, dass auch die Smegma-

¹⁾ E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin, l. c., Figur 6.

bazillen die Oxydation von Histamin zu beschleunigen vermögen; nur ist die Geschwindigkeit oft so klein, dass sie bei dem verhältnismässig grossen Sauerstoffverbrauch durch die Bakterien nicht immer nachweisbar ist (vgl. Diskussion der Ergebnisse). Durch Steigerung der DO-Aktivität durch Zusatz eines geeigneten Diamins zur Nährlösung wird auch der Histaminabbau deutlicher. Doch scheint es sich nicht um eine spezifische Reaktion für Histamin wie bei *Ps. pyocyanea*¹⁾ zu handeln, da bei diesem das zur Nährlösung hinzugefügte Histamin im wesentlichen nur eine Oxydationssteigerung für Histamin bewirkt. Wir können also bei den Smegmabazillen im Gegensatz zu den Pyocyaneusbakterien den Histaminabbau als adaptativen Enzymvorgang nicht von der Diamin-Oxydation im engeren Sinn als konstitutivem Prozess abtrennen²⁾.

Nachdem nun gezeigt worden ist, dass die Smegmabazillen die wichtigsten Substrate der DO zu oxydieren vermögen, muss die Frage entschieden werden, ob es sich beim Abbau aller erwähnten Amine um ein und dasselbe Ferment handelt. Hinweise für die Identität aller in Frage kommenden Enzyme liefern schon mehrere der bisher angeführten (vgl. z. B. Figur 1, Tabelle III) und in den nächsten Abschnitten (z. B. die Hemmungsreaktion) dargestellten Versuche. Am leichtesten lässt sich das Problem mit Hilfe der üblichen Konkurrenzversuche lösen, auch wenn darauf hingewiesen werden muss, dass diese auch positiv ausfallen können, wenn die zwei zu vergleichenden Fermente zwar verschieden sind, aber gemeinsame Komponenten aufweisen, wie z. B. Dehydrasen, die den Wasserstoff an die gleichen Pyridin- oder Flavinfermente zum Weitertransport abgeben.

Tabelle IV.

Konkurrenzierungsversuche mit verschiedenen Diaminen und Spermin. Es werden je 40 mg Bakterienbrei verwendet. Alle Substrate 0,01-m. Dauer der Versuche 5 Stunden. Δ bedeutet die Differenz gegenüber den Versuchen ohne Substrat, Σ die Werte, die durch Summation der Einzelwerte entstehen müssten.

Substrate	Sauerstoffverbrauch			NH ₃ -Bildung	
	total	Δ	Σ	NH ₃ -N	Σ'
—	140 mm ^c	—		0 γ	
Putrescin	1060 „	920 mm ³		38 „	
Cadaverin	310 „	170 „		6 „	
Spermin	550 „	410 „		10 „	
Putr. + Cad. . . .	765 „	625 „	1090 mm	26 „	44 γ
Putr. + Sper. . .	1240 „	1100 „	1330 „	34 „	48 „

¹⁾ E. F. Gale, l. c.

²⁾ H. Karström: Enzymatische Adaptation bei Mikroorganismen, *Ergebn. Enzymf.* 7, 350 (1938).

Alle Konkurrenzversuche führten nicht zu einer Summationswirkung, sondern zu einer Konkurrenzierung der verschiedenen Substrate um das Ferment. Ein Beispiel ist in der Tabelle IV angeführt.

Aus in Abschnitt 4 II näher erörterten Gründen wurden gleichartige Versuche auch in Gegenwart von Natriumazid durchgeführt, die wiederum zu den gleichen Ergebnissen führten (Tabelle V).

Tabelle V.

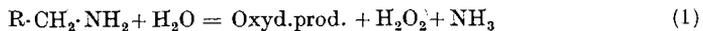
Konkurrenzversuche in Gegenwart von Natriumazid.
NaN₃ 0,01-m., die übrigen Angaben genau wie bei Versuch Tabelle 4.

Substrat	Sauerstoffverbrauch		
	total	Δ	Σ
ohne NaN ₃			
—	180 mm ³	—	
Putrescin	1160 „	980 mm ³	
Cadaverin	395 „	215 „	
Putr.+Cad. . . .	975 „	795 „	1195 mm ³
mit NaN ₃			
—	355 mm ³	—	
Putrescin	555 „	200 mm ³	
Cadaverin	405 „	50 „	
Putr.+Cad. . . .	485 „	130 „	250 mm ³

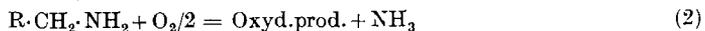
Alle Resultate lassen sich am einfachsten mit der Annahme erklären, dass die angeführten Substrate durch ein einziges Ferment oxydiert (und desaminiert) werden.

3. Verlauf der enzymatischen Diamin-oxydation.

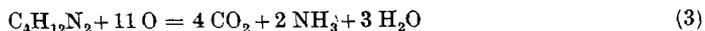
Die Oxydation der Diamine in Gegenwart der „Säuger“-DO verläuft nach folgender Gleichung



In Gegenwart von Katalase wird das Peroxyd zersetzt und an Stelle der Gleichung (1) tritt die Gleichung (2).



Wenn Diamine wie z. B. das Putrescin vollständig oxydiert werden, wie das bei *Ps. pyocyanea* der Fall ist¹⁾, dann gilt die Gleichung (3)



I. Desaminierung. Die Oxydation der Diamine ist in Gegenwart der „Säuger“- wie der „Smegma“-DO ausnahmslos mit einem Freiwerden von Ammoniak verknüpft. (Tabellen IV, VI, VIII.)

¹⁾ E. F. Gale. l. c.

Die Desaminierung erfolgt ungefähr parallel der Grösse des Sauerstoffverbrauchs. Wird dieser durch einen Inhibitor (vgl. Abschnitt 4) verkleinert, dann nimmt auch die Ammoniak-Bildung ab. Natriumazid, das nicht die eigentliche DO-Reaktion als vielmehr die weitere Oxydation des Produktes der DO-Reaktion hemmt, übt einen geringen Einfluss auf die Desaminierung aus.

Eine genauere Übereinstimmung zwischen Sauerstoffverzehr und Ammoniakbildung ist nicht möglich, weil nach der Desaminierung das Reaktionsprodukt mit einer für die verschiedenen Substrate abweichenden Geschwindigkeit weiter oxydiert wird.

Wenn die Reaktion mehrere Stunden lang in Gang gehalten wird, dann finden wir neben der Desaminierung, die der eigentlichen DO-Reaktion zugeschrieben werden muss, und die bei den Diaminen wie Putrescin und Cadaverin nur die Hälfte des Aminostickstoffes betrifft (Tabelle VI), noch eine weitere. Diese ist auf die oben erwähnten sekundären Oxydationen und beim Agmatin auf den Abbau der Guanidingruppe zurückzuführen.

Tabelle VI.

Geschwindigkeit von Oxydation und Desaminierung der Polyamine durch Smegmabazillen.

Pro Ansatz 40 mg Bakterienbrei. Substrate 0,005-m. Q_{O_2} resp. Q_{NH_3} geben den pro mg Bakterienmasse und 1 Stunde verbrauchten Sauerstoff in mm^3 resp. gebildetes Ammoniak in γ an.

Substrat	Q_{O_2}	Q_{NH_3}	Mol NH_3 pro Mol Substrat
Histamin	0,06	0,11	0,15
Cadaverin	0,28	0,16	0,22
Spermin	0,78	0,25	0,36
Agmatin	0,85	0,90	1,28
Putrescin	0,96	0,60	0,86

II. Bildung von Peroxyd. Für den Nachweis von Peroxyd als Reaktionsprodukt der DO und für die Entscheidung, welche der Gleichungen (1) oder (2) einzusetzen ist, ist die Gegenwart oder Abwesenheit von Katalase von ausschlaggebender Bedeutung. In den von uns verwendeten Stämmen aus *Mycobact. smegmatis* lässt sich dieses Ferment sehr leicht feststellen und quantitativ bestimmen. Wenn im Manometergefäss die übliche Bakteriensuspension zu einer Wasserstoffperoxyd-Lösung gekippt wird, dann erfolgt ein aussergewöhnlich rascher Druckanstieg, der schon nach einer Minute sein Maximum erreicht hat. Durch Erhitzen abgetötete Bakterien üben keine derartige Wirkung aus (Figur 4).

Bis zur 7. Minute entspricht der Verlauf der Reaktion recht gut dem einer monomolekularen. Die Reaktionskomponente k schwankt zwischen 0.066 und 0.069. Sie kann somit zur quantitativen Erfassung der Katalase dienen¹⁾. Das hier angegebene Verfahren stellt somit eine ausserordentlich einfache Katalasebestimmung dar.

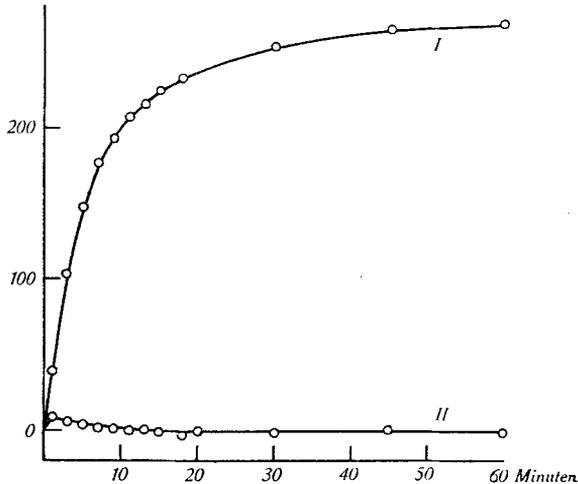


Fig. 4.

Zersetzung von Wasserstoffperoxyd durch Smegmabazillen.

Pro Ansatz werden 4 mg Bakteriensuspension verwendet, die zu einer ca. 0,01-m. H_2O_2 -Lösung (Endkonzentration) gekippt werden. Es können ca. 10^{-5} Mol O_2 maximal in Freiheit gesetzt werden. Kurve I bezieht sich auf lebende Bakterien, Kurve II auf solche, die durch 15 Minuten dauerndes Kochen abgetötet worden sind. Die entsprechenden Leerversuche ohne Peroxyd, deren Kurven sich praktisch vollständig mit Kurve II decken, haben wir der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

Abszisse: Zeit, Ordinate: Menge des gebildeten Sauerstoffs.

Der Nachweis von Peroxyd neben einer so aktiven Katalase kann auf direktem Wege kaum durchgeführt werden. Durch Heranziehung der Sekundäroxydation (coupled oxidation) lässt sich aber die Bildung von Peroxyd dennoch zeigen. Dazu verwendeten wir, wie es seinerzeit mit der „Säuger“-DO geschah²⁾, Äthylalkohol, der durch das entstehende Peroxyd oxydiert wird. Die Katalase soll bei diesem Vorgang eine peroxydatische Funktion ausüben³⁾. Der erwartete Mehrverbrauch an Sauerstoff ist sehr gross (Tabelle VII), weil offenbar nicht nur bei der ersten Oxydationsstufe, sondern auch bei den folgenden Peroxyde entstehen.

¹⁾ K. Zeile: Katalase, Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941, S. 2615.

²⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938).

³⁾ D. Keilin und E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. [B] **119**, 114 (1936).

Tabelle VII.

„Coupled oxidation“ von Äthylalkohol durch die Smegma-Diamin-
oxydase.

Je 40 mg Bakterienbrei einer 8 Tage alten Kultur gelangen zur Verwendung. Cadaverin
0,005-m. 0,1 cm³ einer 10-proz. Äthanol-Lösung in Phosphatpuffer.

	Sauerstoff- verbrauch nach 2 Std.		Sauerstoff- verbrauch nach 5 Std.	
	total	Δ	total	Δ
ohne Substrat	50 mm ³	—	110 mm ³	—
Cadaverin	70 „	20 mm ³	170 „	60 mm ³
Alkohol, ohne Cad.	35 „	—	155 „	—
Cad. + Alkohol	255 „	220 „	770 „	615 „

III. Bildung von Kohlendioxyd. Wenn die Diamine in Gegenwart der DO aus Schweinsnierenextrakten oxydiert werden, dann werden im allgemeinen pro Molekel Substrat 2—3 Atome Sauerstoff verbraucht. Eine wesentliche Kohlendioxydbildung ist dabei nicht zu finden. Mit den Smegmabazillen geht der Sauerstoffverbrauch weit über diese Menge hinaus und erreicht 7 und mehr Atome Sauerstoff (Tabelle VIII). Bei diesem grossen Ausmass der Oxydation ist die Bildung von Kohlendioxyd zu erwarten, was in einfacher Weise nachgewiesen werden kann, wenn in den Manometergefässen die Lauge zur Adsorption des Kohlendioxyds weggelassen wird¹⁾. Die Druckabnahme ist in denselben viel weniger gross als in den andern mit Lauge versehenen Gefässen. Aus der Differenz lässt sich unter Berücksichtigung der Adsorptionskoeffizienten für Kohlendioxyd und Sauerstoff die gebildete Kohlendioxydmenge berechnen. In weniger als einer Stunde beginnt schon eine messbare Kohlendioxydproduktion.

Gegen diese Art der Bestimmung von Kohlendioxyd kann der Einwand erhoben werden, dass die beiden Systeme nicht ohne weiteres vergleichbar sind. In dem einen wird das Kohlendioxyd absorbiert und somit aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, im andern nicht. Mit Hilfe der Isotopen-Methodik wurde in den letzten Jahren festgestellt, dass die CO₂-Bildung bei Bakterien einen reversiblen Vorgang darstellt. Die Eliminierung des Kohlendioxyds müsste demnach den Oxydationsprozess beschleunigen. In unsern Versuchen scheint aber dieser Effekt nicht messbar zu sein, weil die Ammoniakbildung in beiden Fällen innerhalb der Fehlergrenze dieselbe ist; im Gefäss, in dem das Kohlendioxyd nicht absorbiert wurde, war sie zufälligerweise sogar etwas grösser (Tabelle VIII). Zum gleichen Ergebnis führten alle andern entsprechenden Versuche.

¹⁾ E. A. Zeller und A. Maritz, Helv. 27, 1888 (1944).

Tabelle VIII.

Kohlendioxyd und Ammoniakbildung beim Putrescinabbau durch Smegma-
bazillen.

40 mg Bakterienbrei, 10^{-5} Mol Putrescin (0,005-m.). Die Ausbeute wird in Prozent der nach Gleichung (3) möglichen Menge und in Mol pro Mol Substrat angegeben. Alle Werte wurden doppelt bestimmt.

Substrat	Ergebnis	Δ	Ausbeute
Sauerstoffverbrauch			
—	400 mm ³		
	443 „		
Putrescin .	1250 „	803 mm ³	65%
	1200 „		7,1/2 Mol
Kohlendioxydbildung			
—	241 mm ³		
	249 „		
Putrescin .	577 „	347 mm ³	39%
	606 „		1,55 Mol
Ammoniakbildung			
—	3,2 γ		
	2,8 γ *)		
Putrescin .	200 γ	201 γ	72%
	208 γ *)		1,4 Mol

*) Ansätze ohne Kohlendioxydabsorption.

4. Inhibitoren der „Smegma“-Diaminoxidase.

Von den vielen untersuchten Inhibitoren der „Säuger“-DO wurden hauptsächlich die für dieses Enzym sehr charakteristische Gruppe der Carbonylreagenzien geprüft.

I. Carbonylreagenzien. Alle Stoffe, die mit Carbonylgruppen zu reagieren vermögen, besitzen einen hemmenden Einfluss auf die „Säuger“-DO¹⁾²⁾. Unter ihnen ragt das Semicarbazid durch seine besonders hohe Inhibitorwirkung hervor, die das Vielfache derjenigen von Hydroxylamin beträgt. Auch die „Pyocyanea“-DO wird durch dieses Agens im gleichen Sinn beeinflusst. Alle bisher geprüften Stoffe dieser Gruppe erweisen sich auch als Inhibitoren der „Smegma“-DO. Aus vielen Beispielen ist in Figur 5 die Hemmung des Sperminabbaues durch verschiedene Inhibitoren dargestellt.

An dem in vorstehender Figur dargestellten Versuch fällt auf, dass Hydroxylamin viel stärker hemmend wirkt als Semicarbazid,

¹⁾ E. A. Zeller, Helv. 21, 880, 1645 (1938).

²⁾ E. Werle, Bioch. Z. 304, 201 (1940).

was im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der „Säuger“-DO steht. Das gilt nicht nur für das Spermin, sondern für alle andern Substrate.

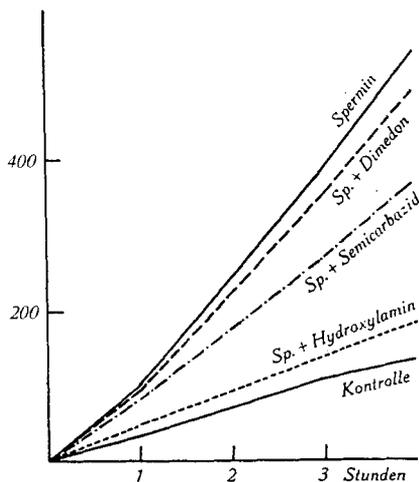


Fig. 5.

Hemmung des enzymatischen Sperminabbaues durch Carbonylreagenzien. 40 mg Bakteriensuspension, Sperminphosphat, Dimedon (Dimethyl-cyclohexan-dion) 0,01-m., Semicarbazid und Hydroxylamin 0,001-m., Substrate je 1 mg. Abszisse: Zeit. Ordinate: Sauerstoffverbrauch.

Eine 0,001-m. Konzentration von Hydroxylamin schaltete den enzymatischen Abbau von Agmatin vollständig aus, und selbst die zehnfach kleinere Konzentration blockierte die „Smegma“-DO fast gänzlich (Putrescin 0,01-m.). Erst nach 2 Stunden begann der Abbau deutlich zu werden, der dann nach 4 Stunden fast die normale Geschwindigkeit erreichte. Dieser Vorgang hängt offensichtlich mit dem früher beschriebenen Abfangen des Carbonylreagens durch das primäre Reaktionsprodukt der DO zusammen¹⁾.

Einige Werte, die aus vielen Versuchen zusammengestellt wurden, sind in der Tabelle IX vereinigt.

Tabelle IX.

Hemmung des Diaminabbaues durch Carbonylreagenzien. 40 mg Bakteriensuspension, Substrate 0,01-m. Ergebnis nach 4—5 Stunden Reaktionsdauer abgelesen. Die Zahlen geben die Hemmung in Prozenten an.

Substrat	Dimedon	Semicarbazid		Hydroxylamin	
		0,0001-m.	0,001-m.	0,0001-m.	0,001-m.
Putrescin . .	23%	39%	62%	>90%	>90%
Agmatin . . .		17%	74%	>90%	>90%

¹⁾ E. A. Zeller, Helv. 23, 1418 (1940).

Da es sich bei der Desaminierung um einen primären Vorgang der DO-Reaktion handelt, muss sie durch diese Inhibitoren in gleichem Masse wie der Sauerstoffverzehr betroffen werden, was, wie aus dem Versuch der Tabelle X hervorgeht, auch wirklich eintritt.

Tabelle X.

Hemmung der Desaminierung durch Carbonylreagenzien.
Bakteriensuspension 40 mg, Putrescin 0,01-m. Dauer 5 Stunden.

Substrat	Hydroxylamin	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Semicarbazid	Q _{O₂}	Q _{NH₃}
—	—	1,2	0,02	—	0,9	0,005
Putrescin .	—	5,0	1,18	—	5,7	1,10
—	0,01-m.	1,3	0,07	—	—	—
Putrescin .	0,01-m.	1,3	0,07	0,01-m.	1,1	0,15
Putrescin .	0,001-m.	1,2	0,06	0,001-m.	2,7	0,46
Putrescin .	0,0001-m.	1,8	0,22	0,0001-m.	5,6	1,13

Es besteht somit kein Zweifel, dass Carbonylreagenzien auch auf die „Smegma“-DO einen hemmenden Einfluss ausüben, und dass auch bei dieser eine Carbonylgruppe vermutet werden kann, die für den Reaktionsablauf notwendig ist.

Diese eben beschriebene Reaktion kann verwendet werden, um zu erfahren, ob die DO für die Smegmabazillen lebenswichtig ist. Es wurde den *Sauton*-Nährlösungen Hydroxylamin zugesetzt. Bei einer Konzentration von 0,01-m. trat für 5 Tage eine vollständige Hemmung des Wachstums ein. Dann begann dieses deutlich zu werden, um schliesslich nach weitem 5—6 Tagen die Kontrollansätze einzuholen. Die Konzentrationen von 0,001-m. hatte eine Wachstumsverzögerung für einen Tag, 0,0001-m. überhaupt keine zur Folge. Die Überwindung der Wachstumshemmung hängt möglicherweise mit dem eben erwähnten Mechanismus zusammen: Die wenigen, der Blockierung entgangenen DO-Teilchen bilden aus Diamin kleine Mengen von Aldehyden, die sich mit dem Hydroxylamin verbinden. Damit ist die Möglichkeit für eine autokatalytische Ausschaltung desselben gegeben.

II. Natriumazid und Natriumfluorid. Bei der „Säuger“-DO übt Natriumazid nur einen geringen hemmenden Einfluss aus, der erst nach einiger Zeit zutage tritt. Er ist damit nicht auf die eigentliche DO zu beziehen, sondern auf sekundäre Oxydationsvorgänge. Wir hofften, die gleiche Wirkung bei der „Smegma“-DO zu finden, um die in vielen Fällen die Auswertung störende Weiteroxydation auszuschalten. Tatsächlich kann mit 0,01-m. NaN₃ die Smegma-DO gehemmt werden, ohne die Ammoniakbildung, wie

erwähnt, wesentlich zu vermindern. Der Sauerstoffverbrauch überschreitet während mehrerer Stunden nicht den Wert von ungefähr einem Atom pro Molekel Substrat. Später allerdings kommt es zu einer mächtigen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, so dass die Ansätze mit Natriumazid diejenigen ohne Inhibitor übertreffen. Es ist dann auch Kohlendioxydbildung trotz der Anwesenheit von NaN_3 festzustellen. Offenbar kommt es zu einer Aufspaltung und damit Enthemmung von Fermentsystemen. Es sei in diesem Zusammenhang an die bekannte Tatsache erinnert, dass die Schwermetallatmung die schwermetallfreie Respiration bremst, und dass Natriumazid mehrere Hämifermente hemmt.

Diese Schwierigkeit, verbunden mit einer Steigerung der Leeratmung, verhinderte eine völlige Erfüllung unserer Hoffnung, dass mit Hilfe des Natriumazids die DO von den Fermenten, die die Produkte der DO-Reaktion weiter abbauen, abgeschirmt werden könne. Immerhin gelingt das bis zu einem gewissen Grade, wie der Versuch der Tabelle X zeigt.

Natriumfluorid (0,001-m.) verändert weder bei der „Säuger“- noch bei der „Smegma“-DO die Reaktionsgeschwindigkeit.

Diskussion der Ergebnisse.

Für den Abbau der verschiedenen Di- und Polyamine unter der Einwirkung von *Mycobact. smegmatis* ist ein einziges Ferment, die „Smegma“-DO, verantwortlich zu machen. Zu dieser Schlussfolgerung führen nicht nur die Konkurrenzversuche, sondern auch die Ergebnisse zahlreicher anderer Experimente wie Einflüsse von Inhibitoren, Verlauf der Oxydation, Art der Reaktionsprodukte, Zusammenhänge zwischen Alter der Kulturen und der DO-Aktivität usw. Diese „Smegma“-DO weist alle wesentlichen Eigenschaften auf, die von der DO der Säugetiere bekannt geworden waren. Genaue Analyse und Vergleiche weisen aber auf einige sehr deutlich ausgeprägte Unterschiede hin. So oxydiert das eine Ferment nur sehr schwer Substrate, die vom andern leicht angegriffen werden, und umgekehrt. Ebenso ist die Grösse der Inhibitorwirkung von Hydroxylamin und Semicarbazid bei beiden Fermenten vertauscht. „Smegma“- und „Säuger“-DO sind also nicht gleich im Sinne einer chemischen Identität. Die Bezeichnung Diamin-oxydase ist somit ein Gruppenbegriff, wie das für kristallisierte Proteasen¹⁾ und für die Serum-ChE²⁾ schon früher bekannt geworden ist.

¹⁾ J. H. Northrop: Crystalline Enzymes. New York 1939, S. 31.

²⁾ E. A. Zeller, Helv. 25, 216 (1942), Fig. 4; Helv. physiol. pharmacol. acta. 2, C, 23 (1944). Zur Vermeidung von Verwechslungen sei noch erwähnt, dass hier nicht der Unterschied zwischen e- und s-Cholinesterase („Pseudo“- und „echte“ Cholinesterase), bei der es sich eigentlich um 2 voneinander abzugrenzende Fermente handelt, gemeint ist, sondern die Differenzierungen innerhalb der s-Cholinesterase.

Es wird nicht selten ein Ferment, das mehrere Substrate angreift, nur nach einem einzigen derselben benannt, wie gerade die Diamin-oxydase, die teilweise immer noch als Histaminase bezeichnet wird. Es zeigt sich bei diesen, wie ungünstig eine solche Formulierung sich auswirken kann, weil es nicht logisch wäre, das Smegmaferment, das das Histamin von allen untersuchten Substraten am langsamsten umsetzt, als Histaminase zu klassieren. Das müsste aber geschehen, wenn für das Säugerferment dieser Name beibehalten würde, da beide Fermente nach den Resultaten der vorliegenden Arbeit die gleiche Bezeichnung erhalten müssen.

Die Oxydationsgeschwindigkeit der Diamine unter der Einwirkung der Smegmabazillen ist verhältnismässig gross ($Q_{O_2} = 0,1-5$), reicht aber nicht an die von *Ps. pyocyanea* heran, deren Q_{O_2} ungefähr fünf- bis zehnmal so gross ist. Es muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass die Substrate in die Bazillen eindringen müssen, wofür die Bedingungen bei *Mycobact. smegmatis* mit seinem Lipoidreichtum und bei den Polyaminen mit ihren elektrisch geladenen Gruppen nicht besonders günstige sind. In die Kulturflüssigkeit wird keine DO abgeschieden, so dass die Diffusion in die Bazillen hinein unumgänglich notwendig ist.

Die Analyse der „Smegma“-DO war in mancher Hinsicht schwieriger als die der „Säuger“-DO, weil die Smegmabazillen das Produkt der DO-Reaktion rasch weiter- und teilweise bis zu Kohlendioxyd oxydieren. Ein grösserer und für die verschiedenen Substrate sehr wechselnder Teil des gemessenen Sauerstoffverbrauchs und der Ammoniakbildung ist daher nicht auf die eigentliche DO-Reaktion zurückzuführen (vgl. Tabelle VI). Besonders leicht fällt Putrescin und das Putrescinderivat Spermin diesen sekundären Oxydationen anheim. Die Untersuchung der Reaktion unmittelbar nach dem Start, wenn noch wenige dieser Zwischenprodukte gebildet worden sind, die Heranziehung der Ammoniakmessung und die Verwendung des Natriumazids haben es schliesslich doch erlaubt, zu eindeutigen Schlüssen zu gelangen.

Eine Erschwerung für die Deutung mancher Versuche bildete weiterhin der gelegentlich hohe Sauerstoffverbrauch (vgl. Figur 1), der durch die Bakterienatmung auch ohne Zusatz eines Substrates verursacht wurde. Viele bei solchen Experimenten gewonnene Erfahrungen führten uns zu der Annahme, dass an dieser „Leer“-Atmung auch Substrate der DO beteiligt sind.

Zusammenfassung

1. Die Bakterien des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stammes von *Mycobact. smegmatis* oxydieren Putrescin, Agmatin, Spermin, Cadaverin und Histamin. Die Oxydationsgeschwindig-

keit nimmt in der angegebenen Reihenfolge ab. Als Reaktionsprodukte entstehen Ammoniak, Peroxyd und Kohlendioxyd.

2. Die oxydative Desaminierung wird durch Hydroxylamin, Semicarbazid und Dimedon gehemmt. Besonders stark wirkt Hydroxylamin, das noch bei einer Konzentration von 0,0001-m. den enzymatischen Vorgang fast vollständig blockiert. Natriumazid reduziert anfänglich den Sauerstoffverbrauch, beeinflusst aber nur wenig die Desaminierung.

3. Die Fähigkeit der Oxydation von Polyaminen nimmt mit zunehmendem Alter der Kultur, der sie entnommen wurden, ab.

4. Die Oxydation der angeführten Amine wird durch ein einziges Ferment, das als „Smegma“-Diamin-oxydase bezeichnet wird, katalysiert.

5. Die „Smegma“-Diamin-oxydase stimmt in allen wesentlichen Eigenschaften mit der Diamin-oxydase der Säugerorgane überein. Sie unterscheidet sich aber von derselben durch die Reihenfolge der Abbaugeschwindigkeiten der Substrate und der Hemmungswirkung der Inhibitoren.

6. Im *Mycobacterium smegmatis* findet sich weiterhin eine Katalase, für deren Messung ein einfaches manometrisches Verfahren angegeben wird.

Die Durchführung der Arbeit wurde durch die Unterstützung der *J. R. Geigy A.-G.*, Basel, ermöglicht. Wir sind der Firma zu grossem Dank verpflichtet. Wir danken *Frl. H. Wydler* für ihre wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Pathologisch-anatomische Anstalt
der Universität Basel.

171. Über Steroide.

43. Mitteilung¹⁾.

Totalsynthese der racemischen Bisdehydro-doisylnsäuren.

Über oestrogene Carbonsäuren IV

von *J. Heer*, *J. R. Billeter* und *K. Miescher*.

(12. IX. 45.)

In den beiden letzten Mitteilungen dieser Reihe^{2) 3)} berichteten wir über den Abbau von Oestron und Oestradiol, sowie Equilenin und Dihydro-equilenin mit schmelzendem Alkali und zeigten, dass die

¹⁾ 42. Mitteilung siehe *Helv.* **28**, 1252 (1945).

²⁾ *J. Heer* und *K. Miescher*, *Helv.* **28**, 156 (1945).

³⁾ *J. Heer*, *J. R. Billeter* und *K. Miescher*, *Helv.* **28**, 991 (1945).