

## 206. Über eine neue *l*-Aminosäure-oxydase (*Ophio-l*-aminosäure-oxydase).

3. Mitteilung<sup>1)</sup>

von E. A. Zeller, A. Maritz und B. Iselin.

(30. X. 45.)

Fast gleichzeitig wurden im Tierreich zwei Fermente entdeckt<sup>2)3)</sup>, die die Oxydation einer Reihe von *l*-Aminosäuren, wie Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, zu beschleunigen vermögen. Das eine tritt im Säugerorganismus auf<sup>2)4)</sup> und wird im folgenden der Kürze halber als „Säuger-oxydase“ bezeichnet. Das andere, die *Ophio-l*-aminosäure-oxydase („*Ophio*-oxydase“) findet sich in Schlangengiften. Die beiden Fermente sind sehr nahe verwandt miteinander, unterscheiden sich aber durch ihre Fähigkeit, *l*-Prolin anzugreifen. Um die Fermente gegeneinander abzugrenzen, unterzogen wir die Spezifität und einige Hemmungsreaktionen der „*Ophio*-oxydase“ einer eingehenden Analyse. Die Ergebnisse lieferten gleichzeitig einige Beiträge zur Aufklärung der Bindungsverhältnisse zwischen Enzym und Substrat.

### Experimentelles.

#### I. Gifte.

Die Gewinnung und Herkunft des *Aspis*-, *Libetina*- und *Cobragiftes* (Präparat I, Tabelle 2) sind dieselben, wie sie in der vorhergehenden Mitteilung beschrieben wurden<sup>5)</sup>. *Cobragift* II und III (Tabelle 2) kamen aus dem Institut Pasteur. Das *Berugift* wurde von einer Kreuzotter des Zoologischen Gartens Basel, und das Gift der *Naja haje* aus einem mehrere Jahre alten Trockenpräparat der Giftdrüsen gewonnen<sup>6)</sup>.

#### II. Allgemeine Versuchsbedingungen.

Die Versuchsbedingungen sind dieselben wie sie in früheren Mitteilungen beschrieben wurden. Alle Reaktionen wurden bei einem  $p_H$  von 7,2 durchgeführt. Die Phosphatpufferkonzentration betrug  $m/15$ , sofern nicht wegen ungenügender Pufferkapazität (vgl. *Asparaginsäureversuche*) die Phosphatkonzentration erhöht werden musste. Die Konzen-

<sup>1)</sup> 1. Mitteilung: E. A. Zeller und A. Maritz, *Helv.* **27**, 1888 (1944); 2. Mitteilung: E. A. Zeller und A. Maritz, *Helv.* **28**, 365 (1945). Diese beiden Mitteilungen werden im folgenden mit I und II bezeichnet.

<sup>2)</sup> D. E. Green, V. Nocito, S. Ratner, *J. Biol. Chem.* **148**, 461 (1943), zit. nach A. Neuburger und F. Sanger, *Biochem. J.* **38**, 119 (1944).

<sup>3)</sup> E. A. Zeller, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **2**, C 33 (1944).

<sup>4)</sup> M. Blanchard, D. E. Green, V. Nocito und S. Ratner, *J. Biol. Chem.* **155**, 421 (1943).

<sup>5)</sup> II, S. 378.

<sup>6)</sup> Den HH. Prof. Dr. J. Tréfoüel, Directeur de l'Institut Pasteur, Paris, Prof. Dr. H. Hediger, Direktor des Zoologischen Gartens Basel, und C. Stemmler-Morath sind wir für die Überlassung der Präparate zu grösstem Dank verpflichtet.

trationsangaben beziehen sich auf das Gesamtvolumen und nicht auf die zugesetzte Lösung. Den Ansätzen wurde ein Tropfen Octylalkohol zugefügt.

### III. Substrate.

*l*-Leucin, *l*-Phenylalanin und *l*-Tyrosin wurden in bekannter Weise aus Eiweiss dargestellt und waren methioninfrei. *l*-Prolin, *l*-Oxyprolin, *l*-Asparagin und Dimedon wurden von *F. Hoffmann-La Roche & Cie., A.G.*, Basel, bezogen. *l*-Glutamin war ein aus Rüben isoliertes Produkt, das uns von Hrn. Prof. Dr. *F. Leuthardt* zur Verfügung gestellt wurde<sup>1)</sup>.

N-Methyl-*l*-leucin und N-Methyl-*l*-phenylalanin:

Zur Darstellung der N-Monomethyl-derivate von Aminosäuren gab *E. Fischer*<sup>2)</sup> ein einfaches Verfahren an. Nach diesem wird die Aminogruppe vorerst mit *p*-Toluolsulfochlorid acyliert, darauf mit Methyljodid in das N-*p*-Toluolsulfo-methyl-derivat übergeführt und schliesslich mit konz. HCl zur N-Monomethyl-Verbindung gespalten. *Green* und Mitarbeiter<sup>3)</sup> führten die Methylierung zur Darstellung des N-Methyl-*l*-leucins mit Dimethylsulfat aus und erhielten dabei als Zwischenprodukt den Methylester des *p*-Toluolsulfo-N-methyl-*l*-leucins. Unser auf diesem Wege dargestelltes N-Methyl-*l*-leucin zeigte die spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{19} = +19,3^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,52$  in  $H_2O$ )

10,4 mg Subst. zu 2,0 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{19} = +0,10 \pm 0,02^\circ$

Bei der Übertragung des von *Green* angegebenen Methylierungsverfahrens auf das *p*-Toluolsulfo-*l*-phenylalanin wurde der erwartete Methylester des *p*-Toluolsulfo-N-methyl-*l*-phenylalanins nur zum kleinsten Teile gebildet, während in der Hauptmenge das Natriumsalz dieser Verbindung entstand. Die beiden Produkte liessen sich jedoch leicht trennen:

30 g *p*-Toluolsulfo-*l*-phenylalanin<sup>2)</sup> wurden in 600 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O suspendiert und durch Zugabe von 85 cm<sup>3</sup> 2-n. NaOH in Lösung gebracht. Unter Turbinieren wurden 22,2 cm<sup>3</sup> (= 2,5 Mol) Dimethylsulfat innert 2 Stunden zugetropft, wobei zur Aufrechterhaltung einer alkalischen Reaktion weitere 65 cm<sup>3</sup> 2-n. NaOH beigelegt wurden. Nach einer weiteren Stunde wurde das krystalline Produkt abgenutscht. Durch Erwärmen in 500 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O ging das gebildete Natriumsalz des *p*-Toluolsulfo-methyl-*l*-phenylalanins in Lösung und wurde durch Filtration vom unlöslichen Methylester abgetrennt. Aus dem Filtrat krystallisierte das Natriumsalz in langen Nadeln (18 g), die nach nochmaligem Umkrystallisieren aus Wasser bei 211—212° (unkorr.) unter Zersetzung schmolzen. Zur Analyse wurde 5 Stunden bei 100° und 15 mm über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> entwässert<sup>4)</sup>.

200 mg wasserfreie Subst. gaben 39,4 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>NSNa (355,38) Ber. Na 6,47; Gef. Na 6,37%.

Das Natriumsalz wurde durch Behandeln mit Salzsäure in das freie *p*-Toluolsulfo-methyl-*l*-phenylalanin übergeführt. Smp. 91—93° (unkorr.);  $[\alpha]_D^{17} = -32,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,64$  in Aceton).

52,9 mg Substanz zu 2,0 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{17} = -0,86^\circ \pm 0,02^\circ$

30 mg Subst. verbr. 4,24 cm<sup>3</sup> 0,1-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*Kjeldahl*)

C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>NS (333,39) Ber. N 4,20; Gef. N 4,08%.

Der neben dem Natriumsalz gebildete Methylester des *p*-Toluolsulfo-methyl-*l*-phenylalanins (9 g) krystallisierte nach zweimaliger Umkrystallisation aus 80-proz. Äthanol in rechteckigen Täfelchen vom Smp. 72—74° (korr.) und der spezifischen Drehung  $[\alpha]_D^{17} = -18,7^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,45$  in Aceton).

<sup>1)</sup> Wir danken Hrn. Prof. Dr. *F. Leuthardt*, Genève, aufs beste für die Zusendung des *l*-Glutamins.

<sup>2)</sup> *E. Fischer, W. Lipschitz, B. 48, 360 (1915).*

<sup>3)</sup> *M. Blanchard c. s., l. c.*

<sup>4)</sup> Nach *E. Fischer (l. c.)* enthält die Substanz 2 Mol H<sub>2</sub>O.

49,1 mg zu 2,0 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{17} = -0,46^\circ \pm 0,02^\circ$   
 30 mg Subst. verbr. 4,16 cm<sup>3</sup> 0,1-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kjeldahl)  
 C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>SN (347,42) Ber. N 4,03; Gef. N 4,00%.

Bei der hydrolytischen Spaltung ergaben sowohl p-Toluolsulfo-N-methyl-*l*-phenylalanin als auch dessen Methylester in guter Ausbeute N-Methyl-*l*-phenylalanin (Rohausbeute 90%). Nach dreimaligem Umkrystallisieren aus H<sub>2</sub>O betrug die spez. Drehung  $[\alpha]_D^{15} = +49,1^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,55$  in 0,1-n. NaOH).

89,1 mg Subst. zu 5,0 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{15} = +0,27^\circ \pm 0,02^\circ$   
 20 mg Subst. verbr. 5,41 cm<sup>3</sup> 0,1-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kjeldahl)  
 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N (179,21) Ber. N 7,82; Gef. N 7,80%.

## 1. Über die Spezifität der Ophio-*l*-aminosäure-oxydase.

### I. *l*-Prolin und *l*-Oxyprolin.

In Gegenwart der „Säuger-oxydase“ wird *l*-Prolin mit einer Geschwindigkeit oxydiert, die 77 % der Oxydationsgeschwindigkeit des Leucins entspricht<sup>1)</sup> und diejenige von *l*-Tryptophan und *l*-Tyrosin übertrifft<sup>2)</sup>. Dabei wird der Ring des Prolins unter Bildung einer Ketongruppe geöffnet. In 4 Präparaten stand *l*-Prolin hinsichtlich seiner Oxydationsgeschwindigkeit an sechster Stelle von durchschnittlich 10 Aminosäuren. Damit scheint ein Unterschied zur Ophio-oxydase vorzuliegen, bei der noch nie ein Abbau der beiden Proline nachgewiesen werden konnte, obwohl beispielsweise die Konzentration des *l*-Oxyprolins über einen grösseren Bereich variiert wurde<sup>3)</sup>, und das Ferment aus den Giften der *Vipera aspis*, *V. libetina*, *V. latastei*, *Bothrops atrox* und einer *Naja*-Art geprüft wurde<sup>4)</sup>. Trotz unserer früheren zahlreichen Versuche hielten wir die Möglichkeit nicht für ausgeschlossen, dass nur ein gradueller Unterschied zwischen beiden Fermenten vorläge. Es hatte sich nämlich gezeigt, dass Substrate, von denen unter den üblichen Verhältnissen keine Oxydation nachgewiesen werden konnte, unter extremen Bedingungen maximaler Substrat- und sehr hoher Enzymkonzentration doch angegriffen wurden<sup>3)5)</sup>. Deshalb wurde die Konzentration des *l*-Prolins und *l*-Oxyprolins in einer neuen Versuchsreihe sehr stark erhöht, so dass die höchste Konzentration mehr als das Tausendfache der niedrigsten betrug. Um auch die kleinsten Ausschläge zu erfassen, wurden die Substrate unter sonst gleichen Bedingungen, aber bei Abwesenheit der Ophio-oxydase inkubiert. Bei den drei verwendeten Giften, die von Arten stammen, die sich auf die beiden wichtigsten Giftschlangenfamilien verteilen, konnte weder eine Oxydation noch eine Desaminierung des *l*-Prolins gefunden werden, die ausserhalb der Fehlerbreite der Methoden lagen (Tabelle 1). Dabei wurde das Vierfache der üblichen Giftmenge der Reaktionslösung zugesetzt,

<sup>1)</sup> M. Blanchard c. s., l. c., Table V.

<sup>2)</sup> M. Blanchard c. s., l. c., Table VI.

<sup>3)</sup> I, S. 1898.

<sup>4)</sup> II, S. 367.

<sup>5)</sup> II, S. 371.

**Tabelle 1.**  
 Einwirkung verschiedener Schlangengifte auf *L*-Prolin.  
 Giftmenge pro Ansatz: 1 mg. Maximum des Sauerstoffverbrauchs und der Ammoniak-  
 bildung für Leucin: 448 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> und 280 γ NH<sub>3</sub>-N.

Schlangengift	Versuchs- dauer Std. .	Art des Versuches	ohne Substrat		Leucin 0,0067-m.		Prolin													
			O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	NH <sub>3</sub> γ	O <sub>2</sub> <sup>1)</sup> mm <sup>3</sup>	NH <sub>3</sub> γ	0,67-m. <sup>2)</sup>				0,17-m.				0,04-m.				0,01-m.	
							O <sub>2</sub> mm <sup>3</sup>	NH <sub>3</sub> γ												
<i>Vipera aspis</i> . . .	4 ½	mit Gift ohne Gift	7		318		14	13	3	7	7	5	6	3	7	7	6	3		
							6	7	6	2	7	6	9	4						
<i>Vipera libet.</i> . . .	14 ½	mit Gift	-13	3	357	273	-16	6	-20	3	-3	6	-11	4						
<i>Naja</i> . . . . .	4	mit Gift ohne Gift	6	3	377	206	-5	12	-1	5	-3	2	-4	3						
							-8	9	0	2	-2	1	2	5						

<sup>1)</sup> Messung nach 1 Stunde.  
<sup>2)</sup> Für das *d, l*-Serin wurde früher (II, S. 371) scheinbar eine 1,33-m.-Lösung verwendet, die hinsichtlich des allein wirksamen *l*-Serins  
 0,67-m. war.

und die Inkubationsdauer bis auf 14 Stunden ausgedehnt. Ein weiterer Ansatz, dem zur Kontrolle Leucin zugefügt wurde, bewies, dass die Fermente jeweilen eine normale Aktivität aufwiesen.

In gleicher Art verhielten sich kleinere *l*-Prolin-Konzentrationen bis zu einer Molarität von 0,0004. Für *l*-Oxyprolin und Aspisgift wurden gleiche Versuche mit identischem Resultat durchgeführt. Die früheren Befunde wurden damit bestätigt und erweitert. Angesichts der Grösse des Konzentrationsbereiches kann der negative Ausfall der Versuche nicht durch ungeeignete Substratmengen bedingt sein.

Die Nichtangreifbarkeit des Prolins durch die „Ophio-oxydase“ könnte auf zwei verschiedene Arten zustande kommen: In dem einen Fall könnte das Prolin überhaupt nicht mit der Enzymmolekel zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes zusammentreten, im andern Falle wäre das zwar möglich, aber es käme nicht zum Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes unter Bildung der Abbauprodukte und unter Regeneration der Enzymmolekel. Diese Frage kann durch die üblichen Konkurrenzversuche entschieden werden: Wurde zum Ferment neben dem Prolin gleichzeitig ein Substrat wie *l*-Leucin zugesetzt, das durch die Ophio-oxydase leicht angreifbar ist, so wurde Leucin durch Prolin um so stärker verdrängt, je kleiner die Leucin- und je größer die Prolinkonzentration war (Fig. 1).

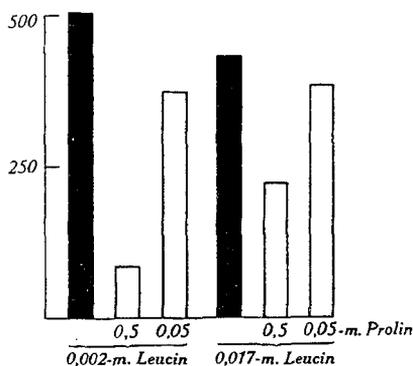


Fig. 1.

Hemmung der Oxydation von *l*-Leucin durch *l*-Prolin.

Ferment: 0,25 mg Aspisgift pro Ansatz. Versuchsdauer: 20 Min. Abszisse: Molare Konzentration des Prolins. Ordinate: QO<sub>2</sub>.

Die Ergebnisse sind dieselben wie die früherer Versuche über die Hemmung der „Ophio-oxydase“ durch organische Säuren<sup>1)</sup>. Nur benötigen wir beim Prolin höhere Konzentrationen, um zu messbaren Hemmungen zu gelangen.

<sup>1)</sup> II, Figur 4.

II. N-Methyl-*l*-leucin und N-Methyl-*l*-Phenylalanin<sup>1)</sup>.

Die „Säuger-oxydase“ beschleunigt ausser der Oxydation der Iminosäure *l*-Prolin auch die von N-Methyl-*l*-leucin. Die Oxydationsgeschwindigkeit war grösser als die für *l*-Leucin und stand in 7 Versuchen mit 4 verschiedenen Oxydase-Präparaten und 10 Aminosäuren sechsmal an erster und einmal an zweiter Stelle<sup>2)</sup>.

Diese Versuche übertrugen wir auf die „Ophio-oxydase“, konnten aber in keinem der zahlreichen Versuche einen messbaren Abbau des N-Methyl-*l*-leucins feststellen. Bei 7 verschiedenen Schlangengiftpräparaten lag der Sauerstoffverbrauch und die Bildung von Ammoniak oder flüchtigen Aminen für Methyl-leucin innerhalb der Grenze, wie sie in den Ansätzen ohne Substrat gefunden wurden. *l*-Leucin dagegen wurde in allen Fällen rasch angegriffen (Tabelle 2).

Tabelle 2.

Verhalten von *l*-Leucin und N-Methyl-*l*-leucin in Gegenwart verschiedener Schlangengifte.

Versuchsdauer: Um einen früheren und späteren Zustand des Ablaufes des Versuches gleichzeitig darzustellen, wurde der Sauerstoffverbrauch nach 1 Stunde, die Ammoniakbildung nach der in der Tabelle angegebenen Zeit gemessen. Maximum des Sauerstoffverbrauches und der Ammoniakbildung: Für 0,0067-m.-Lösungen 448 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> und 280 γ NH<sub>3</sub>-N, für 0,0033-m.-Lösungen 224 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> und 140 γ NH<sub>3</sub>-N. Die negativen Werte bei den Kontrollansätzen ohne Substrat und den Versuchen mit Methyl-leucin bedeuten Druckzunahme.

Schlangengift	Konzentr. Substrate	Giftmenge	Sauerstoffverbrauch			Ammoniakbildung			
			ohne Substrat mm <sup>3</sup>	Leucin mm <sup>3</sup>	Methyl-leucin mm <sup>3</sup>	Zeit Std.	ohne Substrat γ	Leucin mm <sup>3</sup>	Methyl-leucin γ
Vipera aspis .	0,0067-m.	0,25	- 2	98	- 2	3	4	196	6
Vipera libet. .	0,0067-m.	0,5	- 9	331 <sup>3)</sup>	- 4	2	7	243	1
Vipera berus .	0,0067-m.	4)	-12	19	-22	6¼	10	157	10
Naja haje . .	0,0067-m.	2	-13	117	-14	2	0	173	0
Naja Präp. I .	0,0033-m.	1	- 6	84	-20	15	3	132	4
Naja Präp. II	0,0033-m.	2	- 4	110	- 9	15	3	135	10
Naja Präp. III	0,0067-m.	1	- 7	135	- 1	3	5	230	3

Auch beim N-Methyl-leucin sicherten wir uns gegen die Möglichkeit, dass die negativen Resultate durch eine ungeeignete Substratkonzentration bedingt waren und variierten die Methyl-leucin-

<sup>1)</sup> Auszugsweise an der 27. Tagung des schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen am 30. 6. 45 vorgetragen. E. A. Zeller und A. Maritz, Helv. physiol. pharmacol. acta 3, C 48 (1945).

<sup>2)</sup> M. Blanchard c. s., l. c., Table V und VI.

<sup>3)</sup> Q<sub>O<sub>2</sub></sub> für 10':2140.

<sup>4)</sup> Giftmenge so klein, dass sie nicht messbar war.

Konzentration von m/15 bis m/1500. Eine messbare Oxydation oder Desaminierung trat trotzdem nicht ein.

In ähnlicher Weise wie mit Leucin und Methyl-leucin führten wir vergleichende Versuche für *l*-Phenylalanin und N-Methyl-*l*-phenylalanin durch. Auch hier fand sich trotz der Inkubationsdauer von 13 Stunden bei keinem der 3 angewandten Gifte – Aspis-, Libetina- und Cobragift – die geringste Spur von Oxydation und Desaminierung von N-Methyl-*l*-phenylalanin, während Phenylalanin vollständig umgesetzt wurde (Tabelle 3).

**Tabelle 3.**

Verhalten von *l*-Phenylalanin und N-Methyl-*l*-phenylalanin in Gegenwart von Schlangengiften.

Enzym: 0,25 mg (Aspis und Libetina) und 0,5 mg Gift (Cobra) pro Ansatz. Versuchsdauer: 13½ Stunden.  $\Delta$  ist die Differenz der Ergebnisse der Versuche mit und ohne Substrat. Negative Werte entsprechen einer Druckzunahme.

Gift	Substrat 0,0067-m.	Sauerstoff- verbrauch		Ammoniak- bildung	
		mm <sup>3</sup>	$\Delta$ mm <sup>3</sup>	$\gamma$	$\Delta$ $\gamma$
V. aspis	—	4	—	12	—
	Phenylalanin	424	420	308	296
	Methyl-phenylal.	0	-4	15	3
V. libetina	—	3	—	33	—
	Phenylalanin	424	421	314	281
	Methyl-phenylal.	-2	-5	23	-10
Cobra	—	-5	—	13	—
	Phenylalanin	437	442	287	274
	Methyl-phenylal.	-4	1	11	-2
Erreichbares Maximum . . . . .		448 mm <sup>3</sup>			280 $\gamma$

Zur Ausschaltung der Möglichkeit einer nichtoptimalen Substratkonzentration als Ursache für den negativen Ausfall wählten wir wiederum einen grösseren Konzentrationsbereich für das Methyl-phenylalanin (M/1200 bis m/75), konnten aber weder eine Oxydation noch eine Desaminierung erzwingen (Tabelle 4, S. 1622).

Analoge Oxydationsversuche mit einer Laufzeit bis zu 14 Stunden blieben ebenfalls ohne Erfolg.

### III. *l*-Asparagin und *l*-Glutamin<sup>1)</sup>.

Wenn in einer Carbonsäure in  $\gamma$ - oder  $\delta$ -Stellung zur  $\alpha$ -Aminogruppe eine zweite Aminogruppe vorhanden ist, kann die „Ophio-

<sup>1)</sup> Vorläufige Mitteilung: E. A. Zeller und A. Maritz, Exper. 1, 30 (1945).

oxydase“ die Oxydation einer solchen Verbindung nicht katalysieren. Durch die Überführung der  $\omega$ -ständigen Aminogruppe in ein Säureamid durch Acylierung wird der hemmende Einfluss dieser Gruppe ausgeschaltet, wie das für *l*-Citrullin und Benzoyl-*l*-lysin gezeigt wurde<sup>1)</sup>. Eine ähnliche Konfiguration kommt *l*-Asparagin und *l*-Glutamin zu, die in  $\beta$ - und  $\gamma$ -Stellung zur  $\alpha$ -Aminogruppe eine Säureamidgruppe aufweisen. Somit konnte ein anderes Verhalten der Dicarbonsäureamide gegenüber der „Ophio-oxydase“ erwartet werden als das der entsprechenden Dicarbonsäuren, deren Abbau nicht beschleunigt wird<sup>2)</sup>.

Tabelle 4.

Verhalten von *l*-Phenylalanin und N-Methyl-*l*-phenylalanin gegenüber Aspisgift.

Enzym: 0,25 mg Aspisgift pro Ansatz. Versuchsdauer 6½ Stunden. Eingeklammerte Werte beziehen sich auf die Ansätze ohne Giftzusatz.  $\Delta$  ist die Differenz der Ergebnisse der Versuche mit und ohne Substrat. Negative Werte entsprechen einer Druckzunahme.

Substrat	Konzentr. d. Substr.	Sauerstoffverbrauch		Ammoniak-	
			$\Delta$		$\Delta$
—	—	- 11 mm <sup>3</sup>	—	2 $\gamma$	—
Phenylalanin	0,0067-m.	407	418 mm <sup>3</sup>	288	286 $\gamma$
Meth. Phenylal.	0,0008-m.	- 9 mm <sup>3</sup> (- 8)	2 mm <sup>3</sup>	2 $\gamma$ (3)	0 $\gamma$
	0,0016-m.	- 9 „ (- 8)	2 „	4 $\gamma$ (8)	2 $\gamma$
	0,0033-m.	- 11 „ (- 11)	0 „	1 $\gamma$ (6)	- 1 $\gamma$
	0,0067-m.	- 11 „ (- 8)	0 „	4 $\gamma$ (4)	2 $\gamma$
	0,0133-m.	- 2 „ (- 14)	9 „	7 $\gamma$ (5)	5 $\gamma$
Erreichbares Maximum . . . . .			448 mm <sup>3</sup>		280 $\gamma$

Unter den üblichen Bedingungen liess sich seinerzeit eine Oxydation von *l*-Asparagin auch über einen weiten Konzentrationsbereich (0,0008—0,033-molar) nicht sicher erkennen<sup>3)</sup>. Nur bei der höchsten Substratkonzentration war die Andeutung einer Oxydation vorhanden ( $Q_{O_2} = 20$ ), der wir damals keine weitere Beachtung schenkten. Wenn aber die Giftmenge vervierfacht wird, dann tritt Oxydation und Desaminierung des Asparagins durch Aspis- und Libetinagift deutlich zutage (Fig. 2).

Es sind somit ziemlich extreme Versuchsbedingungen nötig, um eine oxydative Desaminierung des *l*-Asparagins beweisen zu können, wie wir sie bisher für die entsprechende *l*-Asparaginsäure nicht angewandt hatten. Aber selbst mit einem noch grösseren Konzentrationsbereich von 0,00013 bis 0,133-molar liess sich im Verlauf von 6 Stunden keine Oxydation von *l*-Asparaginsäure feststellen.

<sup>1)</sup> II, S. 372—374.

<sup>2)</sup> I, S. 1898, II, S. 367.

<sup>3)</sup> I, S. 1898.

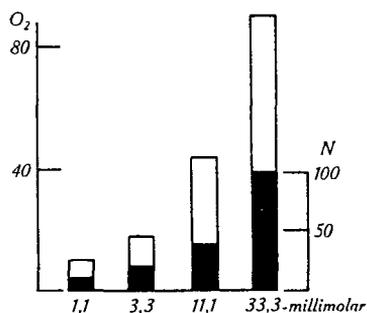


Fig. 2.

Enzymatischer Abbau von *l*-Asparagin.

Enzym: 1 mg Aspis-, resp. 0,5 mg Libetinagift. Versuchsdauer: 60 Minuten ( $\text{O}_2$ -Verbrauch) resp. 6 Stunden ( $\text{NH}_3$ -Bildung).

Abszisse: millimolare Konzentration des Asparagins.

Ordinate:  $\text{Q}_{\text{O}_2}$  resp.  $\gamma\text{NH}_3\text{-N}$ . Die ganze Höhe der Säule bezieht sich auf  $\text{Q}_{\text{O}_2}$  und Libetinagift, die schwarzen Säulen auf  $\text{NH}_3\text{-N}$  und Aspisgift.

Mit *l*-Glutamin erhielten wir die gleichen Resultate. Auch mit diesem Substrat trat erst bei höheren Konzentrationen an Gift und Substrat eine deutliche oxydative Desaminierung auf, die aber unter sonst gleichen Verhältnissen grösser als beim *l*-Asparagin war. Es ist damit wohl zum erstenmal gelungen, diese beiden Säure-amide unter Mitwirkung eines Enzyms oxydativ zu desaminieren.

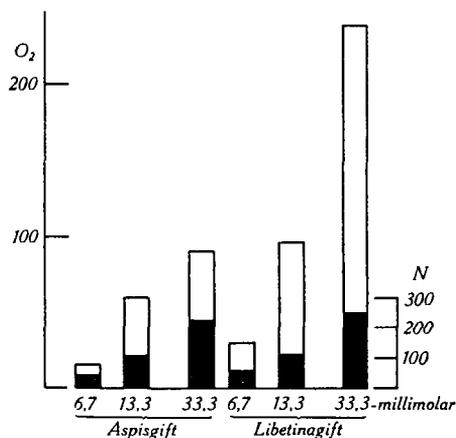


Fig. 3.

Enzymatischer Abbau von *l*-Glutamin.

Ferment: 0,5 mg Aspis-, resp. 0,5 mg Libetinagift. Volumen der Reaktionslösung: 1,5 cm<sup>3</sup>.

Versuchsdauer: 30 Minuten ( $\text{O}_2$ -Verbrauch), resp. 5 Stunden ( $\text{NH}_3$ -Bildung).

Abszisse: millimolare Konzentration des *l*-Glutamins.

Ordinate:  $\text{Q}_{\text{O}_2}$  (ganze Höhe der Säule), resp.  $\gamma\text{NH}_3\text{-N}$  (schwarze Säule).

Auch mit einem schon früher untersuchten Cobragiftpräparat<sup>1)</sup> konnten *l*-Asparagin und *l*-Glutamin der Oxydation zugänglich gemacht werden. Die Umsetzungen waren jedoch, wie bei allen andern Aminosäuren<sup>1)</sup>, kleiner als mit Aspis- und Libetinagift.

2. Inhibitoren der Ophio-*l*-aminosäure-oxydase.

I. Ammoniumsalze.

Die „Säuger-Oxydase“ wird durch Ammoniumsulfat sehr stark beeinflusst. Eine 0,12-molare Lösung schaltet die Wirkung des Enzyms vollständig aus, während noch bei einer 0,012-molaren Konzentration eine Hemmung von 69% gemessen wird<sup>2)</sup>. Bei der „Ophio-oxydase“ dagegen wirkt Ammoniumsulfat in einer noch höheren Dosierung (0,016-molar) überhaupt nicht auf die „Ophio-oxydase“. Erst eine weitere Steigerung der Konzentration lässt für den Leucinabbau eine Hemmung erkennen (Tabelle 5).

Tabelle 5.

Hemmung der enzymatischen Oxydation von *l*-Aminosäuren durch Ammoniumsulfat.

Ferment: 1 mg Cobragift pro Ansatz. Konzentration der Substrate: 0,0067-m. Leerwerte: Die Ergebnisse der Versuche ohne Substrat sind von denen mit Substrat subtrahiert worden. Versuchsdauer: 20 Minuten.

Substrat	Konzentr. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>Inhib.</sup>	Hemmung in Proz.
Leucin . . . .	0,017-m.	108	117	- 8%
	0,033-m.		102	6%
	0,050-m.		87	19%
Phenylalanin .	0,017-m.	132	135	- 2%
	0,033-m.		141	- 7%
	0,050-m.		165	- 25%

Diese geringfügige Hemmung, die zudem nur bei dem von den beiden angeführten Substraten mit der kleineren Affinität zum Enzym (vgl. Abschnitt über Dimedonhemmung) auftritt, ist möglicherweise gar nicht auf das Ammonium-Ion, sondern auf das Sulfat-Ion zurückzuführen.

Dafür sprechen auch Versuche, in denen neben 0,033-molarem Ammoniumsulfat auch eine gleich konzentrierte Natriumsulfatlösung bei dem enzymatischen Abbau von 0,0033-molarem Leucin zur Einwirkung gelangte. Die Hemmung für Natriumsulfat betrug nach 20 Minuten 25%, während die Hemmung mit Ammoniumsulfat nicht mit Sicherheit ausserhalb der Streubreite paralleler Ansätze ohne Sulfate lag (10%). In diesem Zusammenhang sei auf die

<sup>1)</sup> II, Tabelle 2.

<sup>2)</sup> M. Blanchard c. s., l. c., Table VIII.

Hemmung der „Ophio-oxydase“ durch eine Reihe von aromatischen Sulfosäuren hingewiesen<sup>1)</sup>.

## II. Carbonylreagentien.

In der ersten Mitteilung<sup>2)</sup> wurde festgestellt, dass Carbonylreagentien nur in geringem Ausmass oder gar nicht die durch die „Ophio-oxydase“ katalysierte Reaktion zu hemmen vermochten. Wenn die Konzentration dieser Verbindungen erhöht wird, dann lässt sich eine deutliche Hemmung erzielen. Sie ist abhängig von der Konzentration der angewandten Aminosäuren (Tabelle 6), so dass es nahe liegt, an eine Konkurrenzerscheinung zu denken.

**Tabelle 6.**

Hemmung der enzymatischen Oxydation von *l*-Leucin.

Ferment: 0,25 mg Aspisgift pro Ansatz. Konzentration des Inhibitors: 0,0067-m. (Dinitrophenylhydrazin: 0,00166-m.). Versuchsdauer: 30 Minuten.

Inhibitor	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> Leucin 0,0033	Hemmung	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> Leucin 0,0133	Hemmung
—	396	—	400	—
Semicarbazid-HCl . . . .	288	27%	344	14%
Hydroxylamin-HCl . . . .	184	54%	296	26%
2,4-Dinitro-phenylhydrazin	232	41%	352	12%

Die in der voranstehenden Tabelle 6 angeführten Carbonylreagentien können in mehrfacher Weise auf die „Ophio-oxydase“ einwirken. Um verschiedene Möglichkeiten auszuschalten, wurde der Einfluss von Dimethyl-cyclohexan-dion (Dimedon) einer genauen Analyse unterworfen. Bei diesem Aldehydreagens liegt keine Amino-gruppe vor, die mit derjenigen der Aminosäuren konkurrieren könnte. Es besteht auch nur eine geringe Möglichkeit, dass dieser Stoff mit der  $\alpha$ -Ketonsäure, dem Produkt der „Ophio-oxydase“-Reaktion, sich verbindet.

In zahlreichen Versuchen trat eine Hemmung der „Ophio-oxydase“ verschiedener Schlangengifte durch Dimedon ein. Durch Variation der Konzentration des Substrates und des Inhibitors konnte gezeigt werden, dass es sich um eine typische „competitive inhibition“ handelte (Tabelle 8). Wie bei der Hemmung der „Ophio-oxydase“ durch *l*-Prolin (Fig. 1) nahm die Umsatzgeschwindigkeit mit zunehmender Inhibitor- und abnehmender Substratkonzentration ab. Diesen Versuchen konnte weiterhin entnommen werden, dass beim Aspisgift *l*-Leucin ungefähr dieselbe Affinität zur Enzym-molekel wie Dimedon aufweist, da bei gleicher Konzentration dieser beiden Stoffe die Hemmung jedesmal ungefähr 50% betrug. Zur Hemmung des *l*-Phenylalanin-Abbaues war die doppelt so hohe, Konzentration von Dimedon für eine 50-proz. Hemmung erforderlich,

<sup>1)</sup> I, Tabellen 7 und 8.      <sup>2)</sup> I, S. 1896.

was die schon aus anderen Versuchen (vgl. beispielsweise Tabelle 5) gezogene Schlussfolgerung bestätigt, dass *l*-Phenylalanin eine deutlich höhere Affinität zur „Ophio-oxydase“ besitzt.

Um die Verhältnisse einfacher zu gestalten und um die zweite Oxydationsstufe auszuschalten, die als Oxydation der gebildeten  $\alpha$ -Ketonsäure durch das entstehende Peroxyd gekennzeichnet ist, wurde bei mehreren Dimedon-Versuchen den Ansätzen Katalase in Form von gewaschenen und hämolysierten Erythrocyten zugefügt<sup>1</sup>). Das Ergebnis blieb dasselbe (Tabelle 7).

Tabelle 7.

Hemmung der enzymatischen Oxydation von *l*-Leucin durch Dimedon. Fermente: 0,25 mg Aspisgift, dazu in jedes Gefäß 0,1 cm<sup>3</sup> einer gegenüber dem ursprünglichen Blutvolumen 1:10 verdünnten Erythrocyten-Lösung. Die Erythrocyten wurden auf der Zentrifuge gewaschen, mit aq. dest. hämolysiert und mit Phosphatpuffer verdünnt. Versuchsdauer: 60 Minuten.

Inhibitor Konzentr.	O <sub>2</sub> -Verbr. ohne Leucin mm <sup>3</sup>	0,0017-m. Leucin		0,0033-m. Leucin		0,0066-m. Leucin	
		O <sub>2</sub> -Verbr. mm <sup>3</sup>	Hemmung	O <sub>2</sub> -Verbr. mm <sup>3</sup>	Hemmung	O <sub>2</sub> -Verbr. mm <sup>3</sup>	Hemmung
—	— 11	41	—	71	—	93	—
0,0033-m.	— 2	26	46%	48	39%	88	12%
0,0066-m.	— 5	19	54%	39	46%	65	33%
0,0133-m.	— 8	14	58%	27	57%	47	47%

Die schon nach 20 und 30 Minuten gemachten Ablesungen ergaben eine stärkere Abstufung der prozentualen Hemmungen, als sie in der voranstehenden Tabelle (60 Minuten) dargestellt wurden. Die Ausschläge sind aber nach dieser kurzen Inkubationszeit bei den grösseren Inhibitor-Konzentrationen so gering, dass sie in den Bereich der Substratfreien Ansätze gelangen.

#### Diskussion der Ergebnisse.

Das experimentelle Material, das in der vorliegenden Arbeit dargestellt wurde, lässt mit Sicherheit eine Abgrenzung der Ophio-*l*-aminosäure-oxydase („Ophio-oxydase“) von der *l*-Aminosäure-oxydase, wie sie von *Green* und Mitarbeitern charakterisiert wurde, durchführen. Die erstere greift keine *N*-substituierten Aminosäuren an und wird durch Ammoniumsulfat kaum beeinflusst, während die letztere die Oxydation von *l*-Prolin, *l*-Oxyprolin und *N*-Methyl-*l*-leucin besonders leicht katalysiert und durch Ammoniumsulfat sehr stark gehemmt wird. Diese Reaktionen können dazu dienen, die in der Natur vorkommenden *l*-Aminosäure-oxydasen experimentell zu identifizieren. So gelang es, u. a. in *Vipernorganen* die „Ophio-oxydase“ nachzuweisen<sup>2</sup>).

<sup>1</sup>) Dieses Verfahren wurde schon früher bei Konkurrenzversuchen benützt, I., S. 1900.

<sup>2</sup>) Vorläufige Mitteilung: *E. A. Zeller* und *B. Iselin*, 124. Tagung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft, 2. 9. 45. Verhandl. Schweiz. med. biol. Gesellschaft (im Druck).

Die Versuche mit N-substituierten Aminosäuren scheinen auch dafür zu sprechen, dass eine *l*-Aminosäure nur dann als Substrat der „Ophio-oxydase“ dienen kann, wenn sie eine freie Aminogruppe aufweist. Der im wesentlichen negative Ausfall der Hemmungsversuche mit Ammoniumsalzen zeigt, dass die Aminogruppe nicht einfach als positiv geladener Ammonium-Komplex zur Reaktion gelangt. Die Versuche mit den Carbonylreagentien, die nach dem Ergebnis der Konkurrenzversuche an der gleichen Stelle wie die Substrate an der Fermentmolekel angreifen, lassen sich möglicherweise als eine Verknüpfung der  $\alpha$ -Aminogruppe mit einer Carbonylgruppe des Ferments deuten.

Ausser der Amino- und der Carboxylgruppe, deren Beteiligung an der Bildung des Ferment-Substrat-Komplexes durch zahlreiche Hemmungsversuche mit den verschiedensten Säuren schon früher wahrscheinlich gemacht wurde, spielt der übrige Teil der Aminosäuremolekel für die „Ophio-oxydase“-Reaktion eine wichtige Rolle. Das ging schon aus der früher mitgeteilten Tatsache hervor, dass die Abbaugeschwindigkeit umso kleiner wird, je kürzer die Kettenlänge ist, was sich jetzt auch für *l*-Asparagin und *l*-Glutamin zeigen liess.

#### Zusammenfassung.

1. Die Oxydation von *l*-Prolin, *l*-Oxyprolin, N-Methyl-*l*-leucin, N-Methyl-*l*-phenylalanin wird durch die *l*-Aminosäure-oxydase der Schlangengifte (Ophio-*l*-aminosäure-oxydase) auch unter extremen Versuchsbedingungen nicht katalysiert.

2. *l*-Asparagin und *l*-Glutamin sind geeignete Substrate der Ophio-*l*-aminosäure-oxydase, in deren Gegenwart die  $\alpha$ -Aminogruppe oxydativ abgespalten wird.

3. Die Ophio-*l*-aminosäure-oxydase-Reaktion wird durch Ammoniumsalze bis zu sehr hohen Konzentrationen nicht beeinflusst.

4. Mehrere Carbonylreagentien hemmen bei höherer Konzentration die Ophio-*l*-aminosäure-oxydase-Reaktion. Der mit Dimethylcyclohexan-dion genauer studierte Mechanismus entspricht dem einer „competitive inhibition“.

5. Durch die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich eindeutig beweisen, dass die Ophio-*l*-aminosäure-oxydase von der *l*-Aminosäure-oxydase der Säugerorgane verschieden ist. Mehrere näher beschriebene Reaktionen können künftighin zur experimentellen Unterscheidung der beiden Fermente in tierischen Organen verwendet werden.

Aktiengesellschaft *Aligena*, Wissenschaftliche Laboratorien,  
Basel.