

die berechnete Menge von 310 cm<sup>3</sup> Wasserstoff aufgenommen wird. Die Lösung wird durch Filtration vom Katalysator befreit und Alkohol und überschüssiges Diäthylamin abdestilliert. Der Ester wird mit 20 cm<sup>3</sup> Äther aufgenommen und vom ausgeschiedenen Diäthylaminhydrobromid abfiltriert. Dasselbe wird noch zweimal mit je 10 cm<sup>3</sup> Äther gut ausgewaschen. Der Äther wird auf dem Wasserbad abdestilliert und das gelbliche Öl der Destillation im Vakuum unterworfen. Bei der Temperatur von 122—123° und dem Druck von 11 mm geht der Thiazol-4-essigsäure-äthylester als farbloses Öl über.

5,420; 5,657 mg Subst. gaben 0,382; 0,404 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (21°, 743 mm; 18°, 740 mm)  
C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>NS Ber. N 8,19 Gef. N 8,00; 8,15%

#### Thiazol-4-essigsäure VIII.

2 g Thiazol-4-essigsäure-äthylester werden zur Verseifung mit 0,7 g Kaliumhydroxyd, gelöst in 10 cm<sup>3</sup> Alkohol, versetzt. Nach einigem Stehen scheidet sich das Kaliumsalz aus. Dasselbe löst man in 10 cm<sup>3</sup> Wasser und versetzt vorsichtig mit konz. Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion. Nach kurzer Zeit krystallisiert die Thiazol-4-essigsäure in schönen farblosen Krystallen aus. Aus Alkohol umkrystallisiert, zeigt sie einen Smp. von 139°.

3,611; 3,075 mg Subst. gaben 0,322; 0,273 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (24°, 743 mm; 23°, 741 mm)  
C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>NS Ber. N 9,79 Gef. N 10,01; 9,98%

Thiazol-4-essigsäure wird sowohl beim Erhitzen über den Schmelzpunkt als auch in wässriger saurer Lösung über 70° decarboxyliert.

Universität Basel, Anstalt für Anorganische Chemie.

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

2. Mitteilung

von E. A. Zeller und A. Maritz.

(10. II. 45.)

In der ersten Mitteilung dieser Untersuchungsreihe<sup>1)</sup> wurde ein im Gift der Juraviper (*Vipera aspis*) vorkommendes Ferment beschrieben, das die Oxydation fast aller bisher untersuchten *l*-Mono-amino-monocarbonsäuren, des *l*-Arginins und *l*-Histidins katalysiert. Die *l*-Iminosäuren (Proline), *l*-Diamino-monocarbonsäuren, *l*-Mono-amino-dicarbonsäuren, *d*-Aminosäuren und *l*-Peptide werden in Gegenwart des als *Ophio-l*-aminosäure-oxydase — abgekürzt *Ophio*-oxydase — bezeichneten Enzyms nicht angegriffen.

Wie in der ersten Mitteilung angedeutet und in der vorliegenden näher ausgeführt wird<sup>2)</sup>, findet sich die *Ophio*-oxydase in sehr verschiedenen Schlangengiften und zeigt in diesen allen eine Aktivität,

<sup>1)</sup> E. A. Zeller und A. Maritz, Helv. **27**, 1888 (1944), im folgenden mit I bezeichnet.

<sup>2)</sup> Die Ergebnisse der Untersuchungen über das Vorkommen der *Ophio*-oxydase in verschiedenen Schlangengiften wurde am 3. September 1944 an der 124. Tagung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft (E. A. Zeller und A. Maritz, Verhandl. Schweiz. med.-biologischen Gesellschaft und Verh. Schweiz. Naturf. Ges., im Druck) vorgetragen.

die weit über alles hinaus geht, was die bisher bekannten *d*- und *l*-Aminosäure-oxydasen leisten. Diese hohe Oxydationsgeschwindigkeit, die die Aminosäuren erleiden, verbunden mit einer im Vergleich zu den tierischen Zellen oder Zellextrakten grossen Einfachheit der Zusammensetzung der Gifte, macht das System Schlangengift-Aminosäure geradezu zu einem Modell für das Studium der natürlichen Aminosäuren, das möglicherweise für die Untersuchung der analogen Fermente in den tierischen Zellen herangezogen werden kann<sup>1)</sup>.

Um weitere Einblicke in die Bindung zwischen Ferment und Substrat zu erhalten, wurden mit Hilfe weiterer Aminosäuren und Aminosäurederivaten die Eigenschaften näher festgelegt, die eine Verbindung besitzen muss, um von der Ophio-oxydase abgebaut werden zu können. Dem gleichen Zwecke diente die Analyse verschiedener Hemmungsreaktionen, deren Mechanismus im Gegensatz zu dem der entsprechenden Versuche an Aminosäure-oxydasen tierischer Organe leichter aufklärbar ist.

#### 1. Abbau von *l*-Aminosäuren durch verschiedene Schlangengifte.

Es war für uns wichtig, zu erfahren, ob die Ophio-oxydase nur im Aspisgift und im Gift einiger nahverwandter Arten, oder ob sie im ganzen Bereich der Giftschlangen nachzuweisen sei. Aus naheliegenden Gründen ist die gegenwärtige Zeit für solche Untersuchungen nicht günstig. Immerhin standen uns im ganzen 5 (in der Tabelle 1 zusammengestellte) Gifte zur Verfügung, die sich, wenn auch ungleichmässig, auf die beiden Hauptgruppen der Giftschlangen verteilen.

Tabelle 1.

Die zu den untersuchten Giften gehörigen Schlangenarten.

Familie	Genus und Art		Herkunft
Colubridae	Naja,	Brillenschlange, Cobra	
Viperidae	Bothrops atrox L.,	Lanzenschlange	Südamerika
	Vipera aspis L.,	Juraviper	Schweizer Jura, Tessin, Alpen
	Vipera latastei Boscà,	Stülpnasen-Otter	Iberische Halbinsel
	Vipera libetina L.,	Levante-Viper	Kykladen

Neben der Substratspezifität wurden — soweit das Material ausreichte — einige charakteristische Eigenschaften des in Frage stehenden Enzyms geprüft.

<sup>1)</sup> Nach einem Referat von A. Maritz und E. A. Zeller an der 26. Tagung (27. Januar 1945) des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen (Helv. physiol. pharmacol. acta 3, (1945), im Druck) wurde in der Lunge und Leber von Ringelnattern ein Ferment mit den Eigenschaften der Ophio-oxydase nachgewiesen.

I. Spezifität der Ophio-oxydasen verschiedener Herkunft.

Alle 5 untersuchten Giftarten bauen in gleicher Weise die *l*-Aminosäuren ab. Die Monoamino-monocarbonsäuren *l*-Leucin, *l*-Methionin, *l*-Phenylalanin, *l*-Tyrosin und *l*-Tryptophan werden nicht nur durch Aspispgift, sondern auch durch die übrigen Gifte am raschesten angegriffen, während *l*-Histidin mit einer sehr viel geringeren und *l*-Alanin nur dann mit einer messbaren Geschwindigkeit oxydiert wird, wenn die Substratkonzentration um das Vielfache erhöht wird<sup>1)</sup> oder wenn das Ferment eine sehr grosse Aktivität aufweist (*Vipera libetina*). *l*-Prolin, *l*-Glutaminsäure und *l*-Lysin wurden von keinem der Gifte abgebaut, obwohl natürlich von vornherein die Möglichkeit bestand, dass neben der Ophio-oxydase etwa ein *l*-Prolin oder ein Dicarbonsäuren oxydierendes System aufträte.

Tabelle 2.

Oxydation von *l*-Aminosäure durch verschiedene Schlangengifte.

Gift je 0,25 mg, Substrat 3,3-milli-m., Gesamtvolumen: 3,0 cm<sup>3</sup>. Ermittlung von Q<sub>O<sub>2</sub></sub> (Zahl der verbrauchten Kubikmillimeter Sauerstoff pro mg Trockengift und pro Stunde) innerhalb von 5—30 Minuten, für die Substrate ein und desselben Giftes zu gleicher Zeit. Die Werte für *Vipera aspis* sind zu Vergleichszwecken von Tabelle 9 der 1. Mitteilung entnommen. Die Konzentration des *l*-Alanins betrug bei diesen 33-milli-m., die der übrigen Aminosäuren 3,3-milli-m.

	V. aspis	V. libetina	V. latastei	Bothrops	Cobra
<i>l</i> -Alanin . . . . .	30	96	1	10	0
<i>l</i> -Leucin . . . . .	612	1570	624	678	176
<i>l</i> -Methionin . . . . .	390	1489	376	496	192
<i>l</i> -Phenylalanin . . . . .	780	1503		432	208
<i>l</i> -Tyrosin . . . . .	402	1552	400	472	192
<i>l</i> -Tryptophan . . . . .	540	1610	120	588	136
<i>l</i> -Histidin . . . . .	78	272	24	36	4

Die Quotienten zwischen den einzelnen Q<sub>O<sub>2</sub></sub> eines Schlangengifts für die verschiedenen Aminosäuren sind von Gift zu Gift ziemlich ähnlich. Abweichungen, wie das kleine Q<sub>O<sub>2</sub></sub> für das *l*-Tryptophan beim Gift der *Vipera latastei* und der Cobra, könnten dadurch bedingt sein, dass die Oxydation des Tryptophans häufig über den Verbrauch von 2 Atomen Sauerstoff hinausgeht. Es wirken somit weitere Faktoren ausser der Ophio-oxydase und des von dieser gebildeten Peroxyds<sup>2)</sup> mit, die von Giftart zu Giftart wechseln könnten. Weiterhin muss mit ähnlichen Unterschieden gerechnet werden, wie sie beispielsweise

<sup>1)</sup> Nach den Ergebnissen der 1. Mitteilung (S. 1898) wird bei der oxydativen Desaminierung des *l*-Alanins durch die Aspisp-Oxydase das zehnfache der üblichen Substratkonzentration benötigt, um eine gut messbare Reaktionsgeschwindigkeit zu erzielen.

<sup>2)</sup> I, S. 1891.

zwischen den krystallisierten Pepsinen, die von nicht nahe verwandten Säugerarten stammen, bestehen.

Ausser den bisher angeführten Substraten wurden noch einige weitere herangezogen, die wegen der geringen Giftmenge nicht bei allen Ophio-oxydase geprüft wurden. Glücklicherweise konnte gerade das einzige Colubridengift, das Cobratoxin, in dieser Hinsicht genauer untersucht werden. Von diesem wurden *l*-Dijodtyrosin ( $Q_0$ , 112), *l*-Dioxy-phenylalanin ( $Q_0$ , 84)<sup>1)</sup>, Cystein ( $Q_0$ , 53)<sup>1)</sup> und *l*-Arginin ( $Q_0$ , 48) abgebaut, hingegen Glycyl-*l*-tyrosin, *d*, *l*-Serin und Kynurensäure nicht. Es besteht somit zwischen Aspis- und Cobragift, hinsichtlich der Spezifität, eine völlige Übereinstimmung, die sich auch auf das Glykokoll erstreckt, das weder vom Gift der *Vipera latastei*, *Vipera aspis*, *Bothrops atrox* noch der *Cobra* oxydiert wird.

Schliesslich wurde *d*-Leucin, Cadaverin (mit Ausnahme von *Vipera latastei*) und Tyramin (nur bei *Vipera aspis* und *Cobra*) der Einwirkung der angeführten Schlangengifte unterworfen, ohne dass unter den üblichen Bedingungen ein Abbau festgestellt wurde. In diesen Schlangengiften sind somit keine wesentlichen Mengen von *d*-Aminosäure-oxydase, Mono- und Diamin-oxydase nachweisbar.

Bei einer Reihe von Ringelnattern (*Tropidonotus natrix* L.<sup>2)</sup>) wurden die als giftig geltenden Speicheldrüsen, die den Giftdrüsen der eigentlichen Giftschlangen entsprechen, auf das Vorhandensein der Ophio-oxydase geprüft, ebenso das Gift der Bienen<sup>2)</sup> und eines Skorpions (mehrere Exemplare von *Euscorpio germanicus*, C. L. Koch, aus dem Tessin), ohne dass es bisher gelang, einen Abbau der zugesetzten *l*-Aminosäuren zu erkennen.

## II. Eigenschaften der Ophio-oxydasen verschiedener Herkunft.

Wie die Aspis-oxydase setzen auch die *l*-Aminosäure-oxydase der andern Gifte aus *l*-Aminosäure Ammoniak frei. Auch in diesen Fällen braucht es immer mindestens ein Atom Sauerstoff, um eine Molekel Ammoniak abzuoxydieren. Das Verhältnis der Zahl der verbrauchten Atome Sauerstoff zu der Zahl der gebildeten Molekeln Ammoniak liegt meistens zwischen 1 und 2, in einzelnen Fällen über 2. Als Beispiel sei das Bothropsgift (in Tabelle 3) angeführt.

Der einzige Vertreter der Gifte der Colubriden, das Cobragift, zeigt für den Abbau von Aminosäuren die gleiche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration wie das Aspisgift: Nach Erreichung einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit

<sup>1)</sup> Der durch die Substrate bedingte Sauerstoffverbrauch bei Abwesenheit des Gifts subtrahiert.

<sup>2)</sup> Für die Überlassung von Ringelnattern, Bienen und Skorpionen danken wir den Herren Prof. Dr. H. Hediger, P.-D. Dr. O. Morgenthaler (Bern-Liebefeld), P. Seiler, C. Stemmler-Morath und Dr. E. Undritz.

nimmt diese mit weiter zunehmender Substratkonzentration wieder ab. Für beide Gifte liegt das Optimum bei der gleichen Leucinkonzentration (6,7-milli-m.<sup>1)</sup>). Beim Cobragift ist das Optimum schärfer als beim früher untersuchten Gift ausgeprägt. Für die Cobra-oxydase kann somit ebenfalls auf eine doppelte Bindung zwischen Enzymteilchen und Substrat geschlossen werden<sup>2)</sup>.

**Tabelle 3.**

Ammoniakbildung aus *l*-Aminosäuren durch das Gift von *Bothrops atrox*. Gleiche Bedingungen wie die Versuche von Tabelle 2. Ammoniakbildung nach 940 Minuten Inkubationsdauer gemessen.

	NH <sub>3</sub> -N in % der zugesetzten Aminosäure	verbrauchte Atome O gebildete Molekel NH <sub>3</sub>
<i>l</i> -Alanin . . . . .	17%	1,06
<i>l</i> -Methionin . . . . .	111%	1,55
<i>l</i> -Leucin . . . . .	71%	2,48
<i>l</i> -Phenylalanin . . . . .	92%	2,09
<i>l</i> -Tyrosin . . . . .	105%	1,85
<i>l</i> -Tryptophan . . . . .	80%	1,15
<i>l</i> -Histidin . . . . .	2%	2,62
<i>l</i> -Lysin . . . . .	0%	—
<i>l</i> -Glutaminsäure . . . . .	0%	—
<i>l</i> -Prolin . . . . .	0%	—

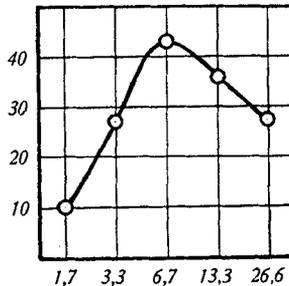


Fig. 1.

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Leucinkonzentration. Cobragift 0,5 mg, Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>, Versuchsdauer 30 Minuten. Abszisse: Logarithmus der milli-molaren Leucinkonzentration. Ordinate: Q<sub>O<sub>2</sub></sub>.

Die Ophio-oxydase lässt sich weiterhin durch aromatische Sulfosäuren, einer neuen, in der ersten Mitteilung behandelten Gruppe von Inhibitoren, charakterisieren. Wie aus der Tabelle 4 hervorgeht, wird bei gleicher Konzentration vom Substrat und Inhibitor sowohl die Aspis- wie auch die *Bothrops*-oxydase zu ungefähr 75 % gehemmt.

<sup>1)</sup> I, Fig. 3.

<sup>2)</sup> I, S. 1895.

Tabelle 4.

Hemmung der Oxydase von *l*-Leucin durch 4-Nitro-2-toluolsulfosäure.  
 Giftmenge 0,25 mg, Versuchsdauer 30 Minuten.

Gift	Konzentration von Substrat und Inhibitor	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>Inhb.</sup>	Hemmung
<i>Vipera aspis</i> . . .	3,0-milli-m.	1970	408	79%
<i>Bothrops atrox</i> . .	3,3 „	756	144	75%

Unter den gleichen Bedingungen wird der Abbau von Leucin durch Cobragift nur um 29 % gehemmt. Es wurden deshalb die Versuche wiederholt, indem das Cobragift mit frisch gewonnenem *Aspis*- und *Libetinagift* verglichen wurde. Da die letzteren viel aktiver als das erstere waren, von dem uns nur ein mehrere Jahre altes Präparat zur Verfügung stand, wurde von *Aspis*- und *Libetinagift* viel weniger den Fermentlösungen zugesetzt, um den Unterschied des Sauerstoffverbrauchs nicht zu gross werden zu lassen.

Tabelle 5.

Hemmung der Oxydation von *l*-Leucin durch 4-Nitro-2-toluolsulfosäure.  
 Konzentration von Leucin und Inhibitor 3,3-milli-m., Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>.  
 Versuchsdauer 30 Minuten.

Gift	Giftmenge	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>Inhb.</sup>	Hemmung
<i>Cobra</i> . . .	0,5 mg	68	40	41%
<i>Aspis</i> . . .	0,1 mg	800	240	70%
<i>Libetina</i> . .	0,1 mg	2020	540	76%

Auch in diesem Versuch erweist sich also die *Cobra*-oxydase viel weniger beeinflussbar als die beiden andern Oxydasen, obwohl das Ausmass der Hemmung eher zu gross herauskam, da die kleinere Aktivität unter sonst gleichen Bedingungen zu einer stärkeren Hemmung führen müsste. Dieser einzige deutliche Unterschied zwischen den *Ophio*-oxydasen verschiedener Herkunft genügt in Anbetracht der übrigen Befunde nicht, um die *Cobra*-oxydase von den andern *Ophio*-oxydasen abzugrenzen. Diese Abweichung, die vielleicht nicht zufälligerweise das einzige *Colubridengift* betrifft, ist wohl eher ein Ausdruck der Tatsache, dass die Oxydasen von weit auseinanderliegenden Arten stammen. Das Fermenteiweiss nimmt, wie das schon seit einiger Zeit für krystallisierte Proteinase des Verdauungskanals bewiesen wurde<sup>1)</sup>, an der Artspezifität teil und ist für die Affinität, für Hemmungsreaktionen, die auf einer „competitive inhibition“ beruhen, und für die Reaktionsgeschwindigkeit verantwortlich. Ein Unterschied der Hemmbarkeit des gleichen, aber von weit ausein-

<sup>1)</sup> C. Ten Broeck, J. Biol. Chem. 106, 729 (1934).

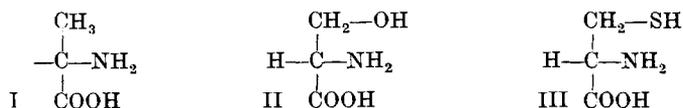
anderliegenden Arten stammenden Ferments bei Hemmungsversuchen ist deshalb verständlich. In analoger Weise wurde früher die verschiedene Hemmbarkeit der s-Cholinesterase von Menschen- und Pferdeserum durch verschiedene Inhibitoren gedeutet<sup>1)</sup>.

In allen 5 untersuchten Schlangengiften tritt somit ein Ferment auf, das alle Eigenschaften der im Aspisgift genauer charakterisierten Ophio-*l*-aminosäure-oxydase aufweist.

## 2. Zur Spezifität der Ophio-*l*-aminosäure-oxydase.

### I. *d, l*-Serin.

Unter den Ergebnissen der ersten Mitteilung fällt die Nichtangreifbarkeit des *d, l*-Serins (II) durch die Ophio-oxydase auf, da die nahe verwandten Aminosäuren *l*-Cystein (III) und *l*-Alanin (I)



abgebaut werden. Das letztere besitzt allerdings, wie im vorhergehenden Abschnitt dargelegt wurde, eine äusserst geringe Affinität zur Ophio-oxydase. Die Anwesenheit der *d*-Form wird kaum einen ungünstigen Einfluss auf die Oxydation des *l*-Serins ausüben, weil eine solche Konkurrenz der beiden optischen Antipoden von Aminosäuren um die Ophio-oxydase bisher nicht festgestellt werden konnte<sup>2)</sup>. Wahrscheinlicher war die Annahme einer noch geringeren Affinität des *l*-Serins als des *l*-Alanins. Es mußte deshalb die Substratkonzentration nochmals erhöht werden.

Durch die Steigerung der Serinkonzentration auf das Vierhundertfache (1,33-m.) und des Aspisgiftes auf das Achtfache (2 mg pro Ansatz) konnte eine gut messbare Oxydationsgeschwindigkeit registriert werden (26 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> pro Stunde), die aber auch unter diesen extremen Bedingungen im Vergleich mit denjenigen von andern Aminosäuren immer noch klein blieb (Q<sub>O<sub>2</sub></sub> = 10). Wie bei allen Versuchen wurden auch hier die entsprechenden Kontrollansätze mitgeführt. Bei der Libetina-oxydase, die eine viel grössere Affinität zum *l*-Alanin als die Aspis-oxydase aufweist (Tabelle 2), konnte mit einer nur zehnfachen Zunahme der Serinkonzentration (0,25 mg Gift pro Ansatz, *d, l*-Serin 33-milli-m.) eine eben noch erkennbare Oxydation und Desaminierung wahrgenommen werden.

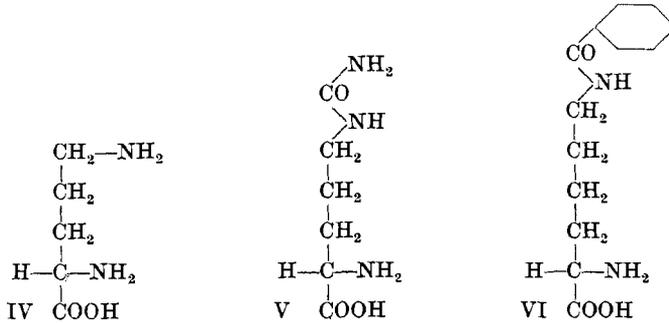
Serin zeichnet sich somit vor den andern *l*-Aminosäuren durch eine ungewöhnlich geringe Affinität zur Ophio-oxydase aus. Mit dem erzwungenen Serinabbau ist es nun gelungen, alle bisher untersuchten *l*- $\alpha$ -Monoamino-monocarbonsäuren, die ein asymmetrisches  $\alpha$ -Kohlenstoffatom besitzen, anzugreifen.

<sup>1)</sup> E. A. Zeller, Helv. physiol. pharmacol. acta 2, C 24 (1944).

<sup>2)</sup> I, S. 1899.

II. *l*-Citrullin.

Diamino-monocarbonsäuren, wie das *l*-Ornithin (IV) und Lysin, werden von der Ophio-oxydase nicht oxydiert<sup>1)</sup>. Aus naheliegenden Gründen kann auf eine ungünstige Wirkung der endständigen, verhältnismässig stark basischen Aminosäuregruppen ( $p_{K'} = 10,53$ ) auf die Bildung des Fermentsubstratkomplexes geschlossen werden. Wenn daher die Reaktionsfähigkeit dieser Gruppe herabgesetzt würde,



müsste *l*-Ornithin in ähnlicher Weise wie eine Monoamino-monocarbonsäure abgebaut werden. Das ist tatsächlich der Fall, wenn diese endständige Amino- durch eine Ureidogruppe ersetzt wird, d. h. wenn an Stelle des *l*-Ornithins (IV) das *l*-Citrullin (V) tritt.

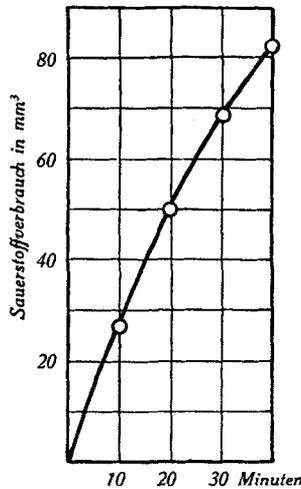


Fig. 2.

Oxydation von *l*-Citrullin in Gegenwart von Aspisgift.

Pro Ansatz 0,25 mg Aspisgift, Citrullin  $10^{-5}$  Mol, Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>. Nach 16 Stunden betrug der Sauerstoffverbrauch 222 mm<sup>3</sup> (Theorie 224 mm<sup>3</sup>) und die Ammoniakbildung 145  $\gamma$  N (Theorie 140  $\gamma$  N).

<sup>1)</sup> I, S. 1898.

Die Oxydationsgeschwindigkeit (für den in Fig. 2 dargestellten Versuch  $Q_{O_2} = 500$ ) ist von der gleichen Grössenordnung wie die von *l*-Leucin, *l*-Phenylalanin usw.

Für das System Citrullin/Ophio-oxydase fand sich als Besonderheit ein Substratoptimum, das nach einer sehr geringen Citrullinkonzentration verschoben war. Schon der Übergang von der 1,7-milli-molaren Citrullinkonzentration auf die übliche 3,3-milli-molare führt zu einer deutlichen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit (Tabelle 6).

Tabelle 6.

*l*-Citrullinkonzentration und Oxydationsgeschwindigkeit.  
Getrocknetes Aspisgift 0,25 mg, Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>. Bestimmung von  $Q_{O_2}$  nach 12 Minuten.

Konzentration des Citrullins	$Q_{O_2}$
1,7-milli-m.	740
3,3 „	400
6,7 „	300
13,3 „	140

Trotz der nahen Beziehung zum nichtoxydierbaren *l*-Ornithin gehört das *l*-Citrullin zu den am raschesten durch die Ophio-oxydase angreifbaren Aminosäuren. Eine in diesem Ausmass erfolgende enzymatische Oxydation des *l*-Citrullins scheint in der Literatur bisher nicht bekannt geworden zu sein.

### III. $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-lysin.

Ähnliche Überlegungen wie für das Citrullin gelten für den Übergang von *l*-Lysin in  $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-lysin (VI). Durch Verwandlung der endständigen Amino- in eine Säureamidgruppe verhält sich das Lysin der Ophio-oxydase gegenüber wie eine Monoamino-monocarbonsäure.

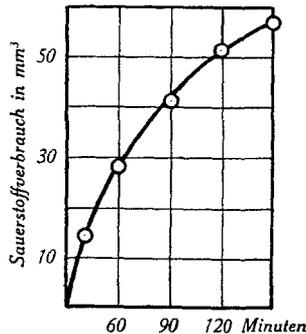


Fig. 3.

Oxydation von  $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-lysin durch Aspisgift.

Getrocknetes Aspisgift 0,25 mg,  $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-lysin  $0,5 \times 10^{-5}$  Mol, Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>.

Die Oxydation des  $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-lysins erfolgt mit mässiger bis mittlerer Geschwindigkeit ( $Q_{O_2} = 148$  für den in Figur 3 dargestellten Versuch). In einem andern Versuch waren von den zugesetzten  $0,5 \times 10^{-5}$  Mol des Benzoyl-lysins 51% nach 2 Stunden oxydiert ( $Q_{O_2} = 336$ ) und 53% des Ammoniaks in Freiheit gesetzt.

Vor kurzem wurde mit *d*-Aminosäure-oxydasen<sup>1) 2)</sup> ein analoges Resultat erhalten<sup>3)</sup>. Diese Fermente oxydierten  $\epsilon$ -Benzoyl-*d*-lysins, aber nicht das freie *d*-Lysin. Ebenso soll nach einer persönlichen Mitteilung von *Green* an die zitierten Autoren<sup>3)</sup> die *l*-Aminosäure-oxydase, die von *Green*<sup>4)</sup> kürzlich beschrieben wurde, wohl  $\epsilon$ -Acetyl-*l*-lysins, aber nicht das *l*-Lysin angreifen.

### 3. Weitere Inhibitoren der *Ophio-l*-aminosäure-oxydase.

Es wurden mehrere Verbindungen auf ihre Fähigkeit, als Inhibitoren der *Ophio*-oxydase zu dienen, geprüft, um die Vergleichsmöglichkeiten mit den entsprechenden Fermentsystemen der tierischen Organe zu erweitern. Auch Stoffe, die die ungünstige Wirkung von Schlangenbissen verhindern, wurden zu diesen Versuchen herangezogen. Schliesslich sollte der Mechanismus des Hemmungsvorganges und damit gleichzeitig die zwischen Enzym und Substrat sich abspielenden Vorgänge — soweit als möglich — aufgeklärt werden.

#### I. Sulfanilamide.

Entsprechend dem in der ersten Mitteilung zur Darstellung gebrachten Modell der *Ophio*-oxydase<sup>5)</sup> müssen elektronegative Gruppen mit den Aminosäuren um das Ferment konkurrieren können. Das ist beispielsweise bei mehreren aromatischen Sulfosäuren der Fall, die deshalb eine sehr starke Hemmung ausüben<sup>5)</sup>. Diese neue Gruppe von Inhibitoren ist auch vorzüglich geeignet, die *Ophio*-oxydase und verwandte Fermente zu charakterisieren.

Ausser den Sulfosäuren sind auch die entsprechenden Sulfonamide von ausgeprägter elektronegativer Natur. Von der grossen Zahl der gegenwärtig als *Therapeutica* zur Verfügung stehenden Sulfonamide wählten wir u. a. die in Tabelle 7 angeführten aus.

Der Grundkörper der Sulfanilamide, das *p*-Aminobenzol-sulfonsäure-amid, lässt, im Gegensatz zu mehreren seiner Abkömmlinge, in der angegebenen Konzentration keine Hemmung erkennen. Neben der Elektronegativität der Amide spielen offenbar bei dieser Reaktion auch die übrigen Teile der Inhibitormolekel eine Rolle, da sehr nahe verwandte Stoffe sehr abweichende Effekte auslösen<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> *H. A. Krebs*, *Biochem. J.* **29**, 1620 (1935).

<sup>2)</sup> *E. Negelein* und *H. Broemel*, *Bioch. Z.* **300**, 225 (1939).

<sup>3)</sup> *A. Neuberger* und *F. Sanger*, *Biochem. J.* **38**, 119 (1944).

<sup>4)</sup> *D. E. Green*, *V. Nocito* und *S. Ratner*, *J. Biol. Chem.* **148**, 461 (1943).

<sup>5)</sup> *I.*, S. 1896.

<sup>6)</sup> Über die Wirkung der Sulfanilamide auf die *Ophio*-oxydase werden wir in einer späteren Mitteilung ausführlicher berichten.

**Tabelle 7.**

Hemmung der *l*-Leucin-oxydation durch Sulfanilamide.  
Trockenes Aspisgift 0,25 mg, Leucin  $10^{-5}$  Mol., Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>.  
Ermittlung von  $Q_{O_2}$  nach 30 Minuten.

Inhibitor	Konzentration des Inhibitors	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}^{Inhib.}$	Hemmung
<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)N)cc1</chem>	3,3-milli-m.	696	728	- 4%
<chem>CN(C)C(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)N)cc1</chem>	3,3 „	696	320	46%
<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)NC(=O)N)cc1</chem>	33,3 „	480	160	67%
	3,3 „	480	360	25%
	0,3 „	480	472	2%

Zusammen mit den Ergebnissen der ersten Mitteilung geben die vorliegenden einen wohl eindeutigen Beweis, dass die aromatischen Sulfosäuren und die Sulfanilamide mit den Aminosäuren um die Enzymteilchen konkurrieren. Damit liegt ein einfaches Modell für das Studium des Mechanismus von Antibiotica vor, in denen Carboxyl- durch Sulfonsäure- und Sulfonsäure-amidgruppen ersetzt worden sind.

## II. Carbonsäuren.

Wenn die Elektronegativität der Sulfonsäuren und deren Amide die wesentliche Voraussetzung für ihre Funktion als Inhibitoren ist, müssen auch die Carbonsäuren die gleiche Wirkung ausüben. Die in Tabelle 8 dargestellten Versuche bestätigen diese Annahme.

**Tabelle 8.**

Hemmung der Phenylalanin-oxydation durch Carbonsäuren.  
(Variation der Inhibitorkonzentration.)  
Trockenes Aspisgift 0,25 mg, *l*-Phenylalanin  $10^{-5}$  Mol., Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>.  
Ermittlung des  $Q_{O_2}$  nach 30 Minuten.

Inhibitor	Konzentration des Inhibitors	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}^{Inhib.}$	Hemmung
Benzoesäure . . . . .	3,3-milli-m.	248	96	61%
	0,3 „	248	232	7%
Salicylsäure . . . . .	3,3 „	488	192	61%
	0,3 „	488	512	- 5%
Jodessigsäure . . . . .	3,3 „	488	256	47%
	0,3 „	488	376	23%

Es besitzen nicht nur die aromatischen Säuren, sondern auch die aliphatische Jodessigsäure eine gut messbare Affinität zur Ophio-

oxydase. Je höher die Inhibitorkonzentration steigt, desto grösser ist die Hemmung. Es kann aber auch durch Zunahme der Substratkonzentration die Hemmung verkleinert werden<sup>1)</sup>.

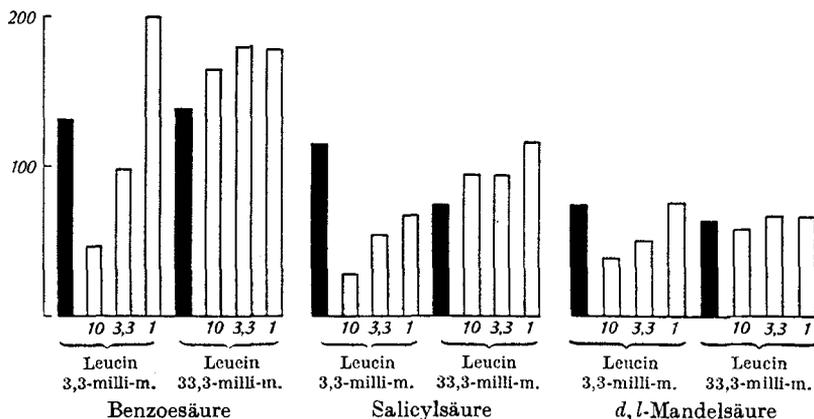


Fig. 4.

Hemmung des Leucinabbaues durch aromatische Carbonsäuren.  
(Variation der Substrat- und Inhibitorkonzentration.)

Trockenes Aspisgift 0,25 mg, Leucin 10<sup>-5</sup> Mol (linke Seite) resp. 10<sup>-4</sup> Mol (rechte Seite). Versuche ohne Inhibitor sind durch schwarze, Versuche mit Inhibitor durch weisse Stäbe dargestellt. Die Höhe der Stäbe gibt den Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimetern nach 60 Minuten Versuchsdauer an. Unter den weissen Stäben ist die Konzentration des Inhibitors angegeben (milli-m.)

Mit einem Blick auf die Fig. 4 ist zu erkennen, dass die Hemmung bei der kleinen Leucinkonzentration viel stärker ist, und dass sie bei der grössern Leucinmenge sogar in eine Aktivierung umschlagen kann. Die gleichen Versuche wurden mit demselben Ergebnis für das Phenylalanin durchgeführt. Diese Resultate stimmen mit denen überein, die mit Benzoesäure für den Abbau von *l*-Aminosäuren durch Nierenschnitte erhalten wurden<sup>2)</sup>. Bei diesen Versuchen hemmte eine 2,5-milli-molare Benzoesäurelösung die Oxydation einer 2,5-milli-molaren *l*-Leucinlösung um 50 %. Auch hier fand sich die gleiche Abhängigkeit der Inhibitorwirkung von der Substratkonzentration wie bei der Ophio-oxydase. Nur ist bei dieser die Hemmung durch Benzoesäure unter den gleichen Bedingungen wesentlich grösser.

Anorganische elektronegative Gruppen, wie Cl', F', N<sub>3</sub>', H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>', HPO<sub>4</sub>'', üben mit den in den vorstehenden Versuchen angewandten Konzentrationen keine Hemmung aus. Es ist also eine elektronegative Gruppe und ein organischer Rest notwendig, damit eine Molekel die *l*-Aminosäure von der Ophio-oxydase verdrängen kann.

<sup>1)</sup> Vgl. auch I, Tabelle 8.

<sup>2)</sup> B. Hernes, Acta physiol. Scand. 8, Suppl. XXIII (1944).

### III. *l*-Tyrosin-äthylester.

Das früher entwickelte Modell der Ophio-oxydase verlangt nicht nur die Existenz elektronegativer, sondern auch elektropositiver Inhibitoren. Zur Prüfung dieser Frage schienen uns Aminosäure-ester passende Stoffe zu sein, weil bei diesen die negativ geladene Gruppe durch Esterbildung eliminiert ist und nur die positive übrigbleibt. Die Molekel als Ganzes scheint geeignet zu sein, die Bildung des Inhibitor-Enzym-Komplexes zu begünstigen. Wir wählten den *l*-Tyrosin-äthylester, weil dieser imstande ist, bei Applikationen der zweifachen tödlichen Dosis von Habugift<sup>1)</sup> den Tod des Versuchstieres zu verhindern<sup>2)</sup>.

Tabelle 9.

Hemmung des *l*-Leucinabbaues durch *l*-Tyrosin-äthylester.  
Getrocknetes Aspisgift 0,25 mg, Leucin  $10^{-5}$  Mol, Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>. Bestimmung von Q<sub>O<sub>2</sub></sub> nach 20 Minuten.

<i>l</i> -Leucin	Konzentration Tyrosin-ester	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Hemmung
3,3-milli-m.	0 -milli-m.	672	
0 „	3,3 „	208	
3,3 „	3,3 „	416	53%
0 „	16,7 „	264	
3,3 „	16,7 „	312	67%

Der *l*-Tyrosin-äthylester wird während des Versuchs hydrolytisch gespalten und das freiwerdende Tyrosin oxydiert. Die in 20 Minuten gebildete Menge ist verhältnismässig klein und erhöht die Gesamtmenge der vorhandenen freien Aminosäure (Leucin plus Tyrosin) nicht derart, dass es zu einer Hemmung durch überoptimale Konzentration kommt<sup>3)</sup>. Es muss sich deshalb um eine echte Hemmung handeln, wenn in den Ansätzen mit Leucin und Tyrosin-ester die Umsatzgeschwindigkeit viel kleiner ist, als die Summe der Umsatzgeschwindigkeiten von Leucin plus teilweise hydrolysiertem Tyrosin-ester ausmacht. Dabei ist noch zu berücksichtigen, dass im Zeitpunkt der Ablesung ein Teil des Esters schon hydrolysiert ist und somit nicht mehr als Inhibitor wirkt. Die äusserst kleinen Mengen des in Freiheit gesetzten Alkohols beeinflussen die Fermentreaktion nicht.

Die Versuche mit *l*-Tyrosin-äthylester bilden eine weitere Bestätigung des aufgestellten Modells der Ophio-oxydase und bieten möglicherweise eine Erklärung für die erwähnte günstige therapeutische Wirkung gegen Schlangengift. Da weder K<sup>+</sup> noch Na<sup>+</sup> den Amino-

<sup>1)</sup> *Lachesis flavoviridis* Hallow.

<sup>2)</sup> Zitiert nach *Th. A. Maas*, Tab. Biol. IX, S. 138.

<sup>3)</sup> I, Tabelle 10.

säureabbau hemmend beeinflussen, muss auch hier zu der positiven Ladung noch ein geeigneter organischer Rest hinzukommen, damit die Aminosäuren von der Ophio-oxydase verdrängt werden können.

### Experimentelles.

Die Gifte<sup>1)</sup> von *Vipera aspis* (grössere Zahl von Exemplaren), *Vipera latastei* (1 Exemplar) und *Vipera libetina* (2 Exemplare) wurden in üblicher Weise frisch gewonnen und nach Trocknung im Vakuumexsikkator verwendet. Das Bothropsgift stammte von einem in Basel befindlichen Tier und war mehrere Monate alt. Das Cobragift wurde aus Melbourne erhalten und war mehrere Jahre alt.

*l*-Leucin, *l*-Phenylalanin, *l*-Tyrosin und *l*-Lysin wurde aus Eiweiss in bekannter Weise isoliert. Das  $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-Lysin wurde aus *l*-Lysin über das Kupfersalz desselben gewonnen<sup>2)</sup>. Das Cu<sup>++</sup> blockiert die  $\alpha$ -ständigen Aminogruppen durch Chelatbildung, so dass bei der Benzoylierung mit Benzoylchlorid nur die endständige Gruppe reagiert, Smp.: 240°—243°, nach *J. C. Eck* und *C. S. Marvel*<sup>3)</sup> 240° und nach *A. C. Kurtz*<sup>2)</sup> 247—260°. Das *l*-Tyrosin-äthylester-hydrochlorid wurde aus Tyrosin in üblicher Weise mit Salzsäure und Alkohol dargestellt. Smp.: 162°—164°, nach *F. Röhmman*<sup>4)</sup> 166°, Stickstoff nach *Kjeldahl*: 6,05% (Theorie 5,72%). Die übrigen Aminosäurepräparate bezogen wir von der Firma *Hoffmann-La Roche*, Basel.

4-Nitro-2-toluolsulfosaures Natrium wurde uns von der Firma *J. R. Geigy*, Basel, geliefert und zur Reinigung aus Wasser mit Tierkohle umkrystallisiert. Von der gleichen Firma erhielten wir Sulfanilamid und *N*-Dimethylacroyl-*p*-aminosulfonsäure-amid (*Irgamid*)<sup>5)</sup>.

Wir führten die Versuche in der in der ersten Mitteilung skizzierten Weise<sup>6)</sup> durch. Neue Substrate wurden kontrolliert, ob und wie weit sie ohne Fermentzusatz einen Sauerstoffverbrauch oder eine Ammoniakbildung verursachten, ebenso die Inhibitoren und andern Zusätze.

Der Inhalt der Manometergefässe wurde am Ende des Versuchs in *Conway*-Schalen pipettiert und zur Kontrolle eine Ammoniakbestimmung angeschlossen. Die auf diese Weise erzielten Ergebnisse bestätigen diejenigen, die wir mit den *Warburg*-Manometern erhielten; trotzdem wurden sie nur zu einem kleinen Teil angeführt, weil sie nichts Neues boten, und weil uns vor allem der Verlauf der Reaktion in den ersten 10—60 Minuten interessierte.

### Zusammenfassung.

1. Auf verschiedene Weise konnte gezeigt werden, dass in den Giften von *Naja*, *Bothrops atrox*, *Vipera aspis*, *Vipera latastei* und *Vipera libetina* das in der ersten Mitteilung als *Ophio-l*-aminosäure-oxydase (*Ophio-oxydase*) bezeichnete Ferment auftritt. Geringe Unterschiede gehen nicht über die auch sonst bei Fermenten bekannten artspezifischen Eigentümlichkeiten hinaus.

2. *d, l*-Serin weist eine sehr geringe Affinität zur *Ophio-oxydase* auf. Ein Abbau konnte nur unter extremen Versuchsbedingungen erzwungen werden.

<sup>1)</sup> Wir danken den Herren Prof. Dr. *H. Hediger*, *C. Stemmler-Morath*, *P. Seiler* und *J. Schweizer* für die freundliche Überlassung der Giftpräparate.

<sup>2)</sup> *A. C. Kurtz*, *J. Biol. Chem.* **140**, 705 (1941).

<sup>3)</sup> *J. C. Eck* und *C. S. Marvel*, *J. Biol. Chem.* **106**, 387 (1934).

<sup>4)</sup> *F. Röhmman*, *B.* **30**, 1979 (1897).

<sup>5)</sup> Wir danken Herrn Dr. phil. Dr. med. h. c. *P. Läger* für die beiden uns zur Verfügung gestellten Präparate. <sup>6)</sup> *I*, S. 1901.

3. Im Gegensatz zu den Diamino-monocarbonsäuren, *l*-Ornithin und *l*-Lysin, wird *l*-Citrullin und  $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-lysin durch die Ophio-oxydase oxydativ desaminiert.

4. Abkömmlinge des *p*-Amino-benzolsulfonsäure-amids, Benzoesäure, *d,l*-Mandelsäure, Salicylsäure, Jodessigsäure und *l*-Tyrosin-äthylester, hemmen die Ophio-oxydase. Es wird damit die Oxydation aller der bisher untersuchten  $\alpha$ -Monoamino-monocarbonsäuren mit asymmetrischem  $\alpha$ -Kohlenstoffatom durch die Ophio-oxydase katalysiert. In allen Fällen handelt es sich um eine „competitive inhibition“. Die Verbindung von organischem Rest und elektrischer Ladung (positiv und negativ) scheint für die Inhibitorwirkung günstig zu sein.

5. Die Gesamtheit der bisherigen Versuche führt zu einer exakteren Vorstellung über die Eigenschaften, die eine Molekel besitzen muss, um als Substrat von der Ophio-oxydase angegriffen zu werden. Neben der freien Carboxyl- und  $\alpha$ -Aminogruppe in der üblichen *l*-Konfiguration kann noch eine weitere schwach elektronegative Gruppe, wie die Säureamidgruppe (Citrullin,  $\epsilon$ -Benzoyl-*l*-lysin) oder phenolische Hydroxyle (*l*-Tyrosin, *l*-Dioxyphenyl-alanin) vorhanden sein, während eine sehr ausgeprägt elektropositive (*l*-Lysin, *l*-Ornithin) oder elektronegative Gruppe (Monoamino-dicarbonsäuren) das Zustandekommen oder den Zerfall des Ferment-Substrat-Komplexes verhindert.

#### Errata.

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

S. 1897, Tabelle 7, zweitunterste Linie: statt „ $\alpha$ -Chlortoluol-4-sulfosäure“ lies „*o*-Chlortoluol-4-sulfosäure“.

S. 1901, Zusammenfassung, Abschnitt 3: statt „die Sauerstoffproduktion“ lies „der Sauerstoffverbrauch“.

Aktiengesellschaft Aligena,  
Wissenschaftliche Laboratorien, Basel.

---