

46. Über die Spezifität der Cholinesterase der Schlangengifte¹⁾.

6. Mitteilung über die Biochemie tierischer Gifte²⁾

von E. A. Zeller und D. C. Utz.

(2. XII. 48.)

In der vorangehenden Mitteilung wurde anhand eines umfangreichen Materials die Zugehörigkeit der Cholin-esterase (ChE) der Elapidengifte zum e-Typ bewiesen. Da diese e-ChE nur die Hydrolyse einiger Cholin-ester beschleunigen soll³⁾, wurde sie auch als „echte“³⁾, „spezifische“⁴⁾ oder als Cholinesterase schlechthin⁵⁾ bezeichnet, der die s-ChE⁶⁾ als „Pseudo“-ChE³⁾, „unspezifische“⁴⁾ ChE oder als „unspecified esterase“⁵⁾ gegenübergestellt wurde, weil diese auch Neutralester anzugreifen vermag.

Kürzlich wies *E. Bovet-Nitti*⁷⁾ auf die Fähigkeit des Kobra-Giftes hin, die Hydrolyse von Essigsäureäthylester und anderer Neutral-ester zu katalysieren. Ein experimenteller Beweis für die Behauptung, dass das dafür verantwortliche Agens mit der Cholin-esterase dieses Giftes identisch sei, wurde nicht vorgelegt. *O. Bodansky* dagegen liess die Frage offen, ob ein oder zwei Fermente vorliegen, als es ihm gelang, mit Hilfe einer teilweise gereinigten e-ChE (aus Erythrozyten) Triacetin zu spalten⁸⁾.

Wenn sich die eben erwähnte Vermutung als richtig erweisen würde, so wäre eine tiefgreifende Änderung der bisherigen Vorstellungen über die Spezifität der e-ChE die Folge. Es schien uns deshalb angezeigt, diese Frage experimentell abzuklären. Schlangengifte als die reichste bekannte ChE-Quelle⁹⁾ waren für derartige Untersuchungen besonders gut geeignet, weil mit ihrer Hilfe geringste Spuren von Umsatzbeschleunigung und damit kleinste Affinitätsbeträge verschiedener Stoffe zum Enzym nachweisbar sind.

Wir wiederholten und bestätigten die erwähnten Versuche mit Essigsäureäthylester für zwei Elapidengifte. Mit Hilfe von Kon-

¹⁾ Vorläufige Mitteilung: *E. A. Zeller*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **6**, C 36 (1948), vorgetragen an der 32. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen am 31. Januar 1948.

²⁾ 5. Mitteilung: *E. A. Zeller*, *Helv.* **32**, 94 (1949).

³⁾ *B. Mendel*, *D. B. Mundell* und *H. Rudney*, *Biochem. J.* **37**, 473 (1943).

⁴⁾ *D. Glick*, *Science* **102**, 100 (1945).

⁵⁾ *D. Nachmansohn* und *M. A. Rothenberg*, *J. Biol. Chem.* **158**, 653 (1945).

⁶⁾ *E. A. Zeller* und *A. Bissegger*, *Helv.* **26**, 1619 (1943).

⁷⁾ *Exper.* **3**, 283 (1947).

⁸⁾ *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **47**, 521 (1946).

⁹⁾ 5. Mitteilung, l. c.

kurrenzversuchen konnte auch gezeigt werden, dass die ChE der Schlangengifte die Hydrolyse dieses Esters katalysiert. Doch war die Sicherheit der Schlussfolgerung durch die geringe Abbaugeschwindigkeit des Neutralestere beeinträchtigt, die weniger als 1 Prozent derjenigen von Acetylcholin betrug. In der Folge führte die Analyse über die Ursachen dieses Verhaltens zur Verwendung neuer Substrate der ChE, mit deren Hilfe die Frage, ob eine e-ChE ausser Cholin- auch Neutralester anzugreifen vermöge, eindeutig entschieden werden konnte.

Experimentelles.

Gifte¹⁾, Messmethode und Darstellung der Ergebnisse sind dieselben, die in der vorangehenden Mitteilung²⁾ beschrieben wurden. Auf eine Wiederholung wird daher verzichtet. Q_{ACH} stellt die aus der Hydrogencarbonat-Ringer-Lösung in Freiheit gesetzte Menge Kohlensäure in mm³ dar, die von 1 mg Gift in einer Stunde unter den vorgegebenen Bedingungen entwickelt worden wären. Der Index bezeichnet das Substrat.

Für die vorliegende Arbeit wurden fast ausnahmslos Proben der gleichen Giftpräparate verwendet. Trotzdem wiesen nicht alle Lösungen genau dieselbe Aktivität auf, weil nicht alle Partikelchen die gleiche Enzymmenge enthielten, was besonders bei der Einwaage kleiner Mengen (0,5–2 mg) deutlich wurde. Die Unterschiede waren glücklicherweise recht gering. Bei der Prüfung der entsprechenden Verhältnisse einer andern Giftkomponente, Ophio-L-aminosäure-oxydase³⁾, wurde seinerzeit versucht, diese Schwierigkeit durch schonende Zerkleinerung der Giftkörner zu umgehen, um so für eine bestimmte Experimentalperiode ein einheitliches Material zu erhalten. Doch wurde dadurch die Haltbarkeit der Oxydase im Trockengift wesentlich vermindert, so dass fortan auf dieses Verfahren verzichtet wurde.

Die Substrate wurden teilweise aus dem Handel bezogen, teilweise wurden sie synthetisiert⁴⁾. Häufig verhinderte deren beschränkte Löslichkeit die Durchmusterung aller gewünschter Konzentrationsbereiche. Einige Ester, vor allem die Halogenessigsäureester, und unter diesen hauptsächlich der Chloressigsäureäthylester, erfuhren in Hydrogencarbonat-Ringer und bei 38° Temperatur eine erhebliche Hydrolyse auch in Abwesenheit von ChE. Es müssen deshalb für alle derartigen Versuche und für alle Konzentrationen entsprechende enzymfreie Kontrollen eingesetzt werden. Um wirklich die gewünschte Substratkonzentration zu erhalten und um möglicherweise störende Reaktionsprodukte auszuschalten, wurden die Ester erst in Lösung gebracht, nachdem die Reaktionsgefässe mit allen übrigen Reaktionsteilnehmern beschickt waren. Die Zunahme der nichtenzymatischen Hydrolyse von Chloressigsäureäthylester erfolgt mit steigendem Logarithmus der Substratkonzentration linear.

Eine weitere Besonderheit dieser Versuche bildete die grosse Geschwindigkeit der Umsätze, wenn aus verschiedenen Gründen unverhältnismässig grosse Giftmengen angewandt werden mussten. Die Zahl der gleichzeitig eingesetzten Manometer wurde beschränkt und die Ansätze mit der grössten zu erwartenden Geschwindigkeit an den Anfang der Reihe genommen. Es wurde weiterhin darauf geachtet, dass das Einkippen der Lösungen aus den seitlichen Anhängen und die Ablesungen in den gleichen Zeitabständen erfolgten.

1) Es sei erneut den in der vorangehenden Mitteilung erwähnten Donatoren für die Überlassung zahlreicher wertvoller Giftpräparate gedankt.

2) 5. Mitteilung, l. c.

3) Zusammenfassung: E. A. Zeller, Enzymes of Snake Venoms, *Advances in Enzymology* **8**, 459 (1948).

4) Es ist uns eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. phil. et med. h. c. P. Läufer, Basel, für die Synthese und Überlassung zahlreicher Ester unsern besten Dank auszusprechen.

In der vorliegenden Untersuchungsreihe wurde vom Konkurrenzversuch in extensiver Weise Gebrauch gemacht, so dass es angezeigt erscheint, auf einige Punkte der Technik dieses Verfahrens aufmerksam zu machen.

Konkurrenzversuche sollten naturgemäss bei der „Sättigung“ des Ferments mit jedem einzelnen Substrat angestellt werden. Doch ist diese Forderung beispielsweise dann nicht erfüllbar, wenn die Löslichkeit des Substrats ungenügend ist. Gelegentlich muss auch wegen der zu grossen Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeiten von diesem Ziel abgewichen werden. Es kann unter diesen Umständen eintreten, dass

$$Q_1 + Q_2 = Q_{1+2}$$

wird, ohne dass zwei Fermente vorliegen. Die Entscheidung — ein oder zwei Fermente — kann unter diesen Umständen nur dann gefällt werden, wenn das Resultat unter den verschiedensten Bedingungen dasselbe bleibt. Einfacher liegen die Verhältnisse, wenn eine eindeutige „competitive inhibition“ vorliegt. Die Sicherheit der Interpretation — Vorhandensein nur eines wirkenden Enzyms — ist ebenfalls nicht absolut. Es blieb daher auch hier nur übrig, die Experimente mit den verschiedensten Substratkonzentrationen zu wiederholen. Auf diese Weise wurden nicht nur die günstigsten Bedingungen für klare Ergebnisse gewonnen, sondern auch nützliche Daten über die Affinitätsverhältnisse ermittelt. Stets wurde angestrebt, die Reaktionsgemische so zusammenzustellen, dass

$$Q_{1+2} \leq Q_1, \text{ wenn } Q_1 > Q_2,$$

um eine zweifelsfreie Konkurrenz der beiden Substrate um das gleiche Ferment annehmen zu können. Wie die Ergebnisse dartun, wurde dieses Ziel fast immer erreicht.

Ergebnisse.

1. Essigsäureäthylester.

Die Gifte von *Naja melanoleuca* und *Bungarus fasciatus* beschleunigen die Hydrolyse von Essigsäureäthylester. Doch ist die Reaktionsgeschwindigkeit, verglichen mit derjenigen des Acetylcholins, klein. Bei einer Konzentration des neutralen Esters, die die optimale Acetylcholin-Konzentration um das Zehnfache übertrifft, beträgt seine Spaltungsgeschwindigkeit weniger als 1 Prozent derjenigen von Acetylcholin. Diese geringe Umsatzgeschwindigkeit könnte entweder durch eine geringe Affinität des Substrats zum Ferment oder durch einen langsamen Zerfall des Ferment-Substrat-Komplexes bedingt sein¹⁾. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration deutete darauf hin, dass die erstere Annahme zutrifft. Die Umsatzgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Substrat-Konzentration so hoch, dass sie schliesslich 10 bis 15 Prozent derjenigen des Acetylcholins (optimale Konzentration) erreicht.

Aus der nachstehenden Fig. 1 kann entnommen werden, dass die *Michaelis*'sche Konstante grösser als 0,2 ist.

Die Prüfung der Frage, ob Acetylcholin und Essigsäureäthylester durch das gleiche Ferment angegriffen werden, wofür der Konkurrenzversuch herangezogen wurde, bot einige Schwierigkeiten

¹⁾ *D. D. van Slyke*, The Kinetics of Hydrolytic Enzymes and Their Bearing on Methods for Measuring of Enzyme Activity, *Advances in Enzymology* **2**, 33 (1942).

wegen des grossen Unterschieds der entsprechenden Hydrolyse-Geschwindigkeiten. Doch gelang es, Bedingungen zu finden, bei denen die gleichzeitige Zugabe beider Ester zu dem Ferment eine Umsatzgeschwindigkeit zur Folge hatte, die deutlich geringer als die Summe der Geschwindigkeiten war, die bei Verwendung von nur einem Substrat auftraten (Tabelle 1).

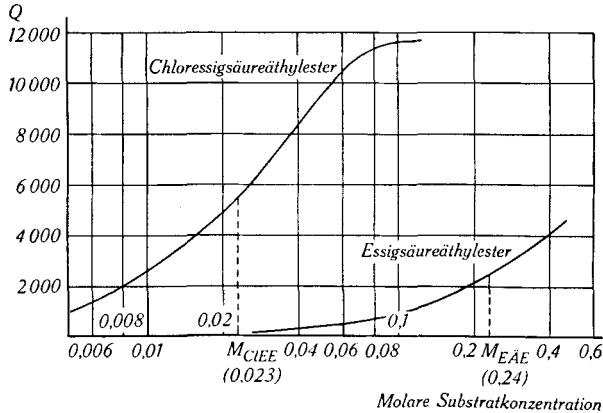


Fig. 1,

Abhängigkeit der Hydrolyse-Geschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Abszisse: Logarithmus der Substratkonzentration (molar). Ordinate: $Q_{\text{Ester}} = \text{mm}^3 \text{CO}_2$ pro mg Gift (*Naia melanoleuca*) pro Stunde.

M_{EAE} resp. M_{CIEE} : Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte der maximalen erreicht (*Michaelis'sche* Konstante). Da das Maximum für den Essigsäureäthylester nicht bekannt ist, so bildet der eingezeichnete Wert die untere Grenze des Intervalls, in dem der wahre Wert liegt.

Tabelle 1.

Gemeinsame Hydrolyse von Essigsäureäthylester und Acetyl-cholin (0,4 mg Gift von *Bungarus fasciatus*).

Substrate	Q
Essigsäureäthylester 0,204-m.	1080
Acetyl-cholin 0,025-m.	13220
Essigsäureäthylester + Acetyl-cholin	9150

Wenn die ChE für die Hydrolyse des Neutralestere allein verantwortlich zu machen ist, dann darf keine enzymatische Hydrolyse desselben in Gegenwart von Schlangengiften gefunden werden, die keine ChE enthalten. Wie in der vorangehenden Mitteilung¹⁾ gezeigt wurde, sind alle Viperiden-Gifte ChE-frei. Einige derselben wurden daher auf ihre Fähigkeit geprüft, die Hydrolyse von Essigsäure-

¹⁾ 5. Mitteilung, I. c.

äthylester zu beschleunigen. So wurde beispielsweise zu je 0,4 Milligramm des Gifts von *Bitis arietans* (Puffotter) der Ester in 5 geometrisch ansteigenden Konzentrationen (0,026 bis 0,418-m.) gegeben, ohne dass eine Hydrolyse eingetreten wäre, die über diejenigen der Kontrollen hinausging. Den gleichen negativen Erfolg brachten die Versuche, in denen 0,2-m. Essigsäureäthylester der Wirkung von Giften der Arten *Vipera aspis* (Jura-Viper) und *Crotalus horridus* (timber rattle snake) ausgesetzt wurde.

Diese Ergebnisse bilden eine experimentelle Stütze für die erwähnte Vermutung von *F. Bovet-Nitti*, dass im Schlangengift ein und dasselbe Ferment für die Hydrolyse von Cholin- und Neutralestern verantwortlich ist. Ferner deuten sie darauf hin, dass in den angeführten Viperiden-Giften keine sogenannte Ali-esterase vorhanden ist.

2. Substituierte Essigsäureäthylester.

Aus den Ergebnissen des vorangehenden Abschnitts scheint hervorzugehen, dass der Komplex Enzym-Essigsäureäthylester, wenn er erst einmal gebildet ist, rasch zerfällt. Der Zusammentritt der Komponenten hingegen erfolgt verhältnismässig langsam, so dass exzessiv hohe Konzentrationen des Esters verwendet werden müssen, um gut messbare Umsätze zu erzielen. Durch Steigerung der Affinität müssten somit geeignetere Substrate entstehen, die schon bei geringeren Konzentrationen als Essigsäureäthylester einen raschen enzymatischen Zerfall erleiden. Eine solche Verbesserung wurde durch die Einführung von Halogenen und Pseudohalogenen zu erreichen versucht, wobei die Vorstellung leitend war, dass die durch diese Atome und Atomgruppen hervorgerufenen Dipole den gewünschten Dienst leisten könnten.

Chloressigsäureäthylester (ClEE) wird tatsächlich durch Schlangengift bei sehr viel kleineren Konzentrationen als Essigsäureäthylester angegriffen (Figur 1). Da die *Michaelis'sche* Konstante ungefähr den Wert von 0,023 besitzt, wie aus der Figur hervorgeht, so ist die Affinität des Chloresters mindestens zehnmal grösser als die des unsubstituierten Esters.

Eine Steigerung der Konzentration des Chloressigsäureäthylesters über die in Fig. 1 angegebene Grenze liess keine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, d. h. ein Substratoptimum, erkennen; doch machte sich bei diesen hohen Konzentrationen die erhebliche nichtenzymatische Hydrolyse störend bemerkbar.

Brom- und Jodessigsäureäthylester werden ebenfalls durch die Schlangengifte enzymatisch zerlegt. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei gleicher Substratkonzentration nimmt in der gleichen Reihenfolge ab, in der die durch die Halogene induzierten Dipole kleiner werden. Die Hydrolysegeschwindigkeit von Cyanessigsäureäthylester liegt zwischen derjenigen von Brom- und Jodessigsäureäthylester (Tabelle 2).

Tabelle 2.

Enzymatische Hydrolyse von substituierten Essigsäureäthylestern. Konzentration der Ester: 0,025-m. Nichtenzymatische Hydrolyse von den Ergebnissen subtrahiert. ClEE, BrEE, CyEE, JEE = Chlor-, Brom-, Cyan- und Jodessigsäureäthylester.

Spezies	Giftmenge	Substrat	Q
Sepedon haemachates . .	0,5 mg	ClEE	1260
		BrEE	480
		JEE	60
Naia melanoleuca . . .	0,25 mg	ClEE	4850
		BrEE	2060
		JEE	48
Naia melanoleuca . . .	0,2 mg	ClEE	4380
		CyEE	1050
		ClEE + CyEE	3020

Obwohl die aussergewöhnlich grossen Mengen von 2 bis 2,5 mg Gift von *Naia melanoleuca* ($Q_{Ach} = 30800$) zur Anwendung gelangten, konnte eine Beschleunigung der Hydrolyse weder bei Di- und Trichloressigsäureäthylester, noch bei Glykokolläthylester und Cysteinäthylester beobachtet werden. Mit dem gleichen negativen Erfolg wurden Glykokolläthylester und Gift von *Bungarus fasciatus* zusammengebracht ($Q_{Ach} = 25000$).

3. Vergleich der enzymatischen Hydrolyse von Acetylcholin und Halogenessigsäureäthylestern.

Der Entscheid, ob Halogenessigsäure- und Cholin-ester durch ein oder durch zwei Fermente angegriffen werden, wurde auf zwei Wegen zu erreichen versucht:

In der vorangehenden Mitteilung wurde gezeigt, dass die ChE-Aktivität der von verschiedenen Arten stammenden Gifte recht unterschiedlich gross ist. Wenn diese ChE auch für die beschleunigte Hydrolyse von Choresigsäureäthylester verantwortlich ist, dann muss die Abbaugeschwindigkeit des letztern für die gleichen Gifte ähnliche Unterschiede aufweisen. Das ist, wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, nun tatsächlich der Fall. Das Verhältnis der beiden Geschwindigkeiten ist bei allen Giften annähernd dasselbe, während die absoluten Werte um mehr als das Zweihundertfache schwanken.

Diese Ergebnisse lassen sich durch die unwahrscheinliche, aber nicht unmögliche Annahme deuten, dass in den untersuchten Giften zwei verschiedene Esterasen vorhanden sind, die stets im gleichen Verhältnis zu einander auftreten. Es musste deshalb der Konkurrenzversuch den Ausschlag geben. Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, war die Geschwindigkeit, die durch die gleichzeitig der Giftlösung zuge-

fügten Ester hervorgerufen wurde (Q_{1+2}), kleiner als die Summe der durch die einzelnen Substrate bedingten Umsatzgeschwindigkeiten ($Q_1 + Q_2$).

Tabelle 3.

Gemeinsame Hydrolyse von Acetyl-cholin und Halogenessigsäureäthylester.

Spezies	Giftmenge	Substrat	Q	$Q_{ACh} + Q_{HaEE}$	$Q_{ACh+HaEE}$
Bothrops neuwiedii	1,0 mg	ACh 0,005-m.	0	0	0
		CIEE 0,025-m.	0		
Naia nigricollis . . .	1,0 mg	ACh 0,005-m.	72	78	42
		CIEE 0,025-m.	6*)		
Notechis scutatus . .	0,5 mg	ACh 0,005-m.	2470	3010	2330
		CIEE 0,05-m.	540		
Naia flava	0,4 mg	ACh 0,01-m.	3550	4375	3860
		CIEE 0,025-m.	825		
Sepedon haemachates	0,08 mg	ACh 0,005-m.	11050	12920	7270
		CIEE 0,005-m.	1870		
Naia melanoleuca . .	0,1 mg	ACh 0,01-m.	17300	21740	17200
		CIEE 0,025-m.	4440		
Naia melanoleuca . .	0,1 mg	ACh 0,01-m.	19200	21000	19080
		BrEE 0,025-m.	1800		

*) Dieser Wert ist, verglichen mit denjenigen der Gift-freien Kontrollen, so gering, dass er nicht die gleiche Zuverlässigkeit wie die übrigen Resultate besitzt.

Ähnliche Versuche, wie sie mit *Bothrops neuwiedii* (Tabelle 3) angestellt wurden, wurden auch auf andere Viperiden-Gifte ausgedehnt. Obwohl eine noch grössere, 1,6-fache Gift-Konzentration angewandt wurde, lösten die Gifte von *Crotalus horridus* und *Vipera aspis* keine Hydrolyse von Chloressigsäureäthylester (und Triacetin) aus, die grösser als die der enzymfreien Kontrollansätze war. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer von 10 bis 30 Minuten, wie sie für die Elapiden-Gifte üblich war, auf mehrere Stunden, änderte nichts an diesem Ergebnis.

Alle diese Resultate lassen wohl keinen andern Schluss zu, als dass die e-ChE der Gifte auch die Hydrolyse gewisser Neutralester zu beschleunigen vermag. Sie schliessen natürlich nicht die Möglichkeit des Vorhandenseins anderer Esterasen aus, die nur Neutralester angreifen; für die in Tabelle 3 erwähnten Gifte ist diese Annahme wenig wahrscheinlich.

4. Inhibitoren.

Physostigmin, der klassische Inhibitor der ChE, hemmt nicht nur die ChE von *Cobra*¹⁾ und andern Elapidae-Giften (Tabelle 4),

¹⁾ F. Bovet und D. Bovet, Ann. Inst. Pasteur **69**, 309 (1943).

sondern auch die Hydrolyse von Neutralestern (Tabelle 4). Dasselbe gilt für Prostigmin. Beide Stoffe übten bei den angeführten Konzentrationen eine so kräftige Wirkung aus, dass die Ansätze, die neben Gift und Neutralester die Inhibitoren enthielten, weniger Kohlendioxyd als die entsprechenden Kontrollen produzierten.

Coffein, ein spezifischer Inhibitor der e-ChE der tierischen Gewebe¹⁾ und der Schlangengifte²⁾, hemmt in ähnlichem Ausmass auch den Abbau von Chloressigsäureäthylester (Tabelle 4). Alle drei Inhibitoren wirken somit in gleicher Weise auf den durch die Schlangengifte katalysierten Abbau von Acetyl-cholin und Neutralestern.

Tabelle 4.

Hemmung des enzymatischen Abbaues von Cholin- und Neutralestern.

Spezies	Substrat	Q	Inhibitor	Q _{Inh.}
Sepedon haemachates	ACh 0,005-m.	9410	Physostigmin 0,2-milli-m.	120
Naiia melanoleuca . .	ACh 0,005-m.	18750	„ 0,2-milli-m.	80
Bungarus fasciatus .	CIEE 0,013-m.	1300	„ 0,2-milli-m.	0
Naiia melanoleuca . .	CIEE 0,033-m.	4000	„ 0,2-milli-m.	0
„ „ . .	CIEE 0,083-m.	4800	„ 0,2-milli-m.	0
„ „ . .	BrEE 0,033-m.	2200	„ 0,2-milli-m.	0
„ „ . .	BrEE 0,033-m.	2200	Prostigmin 0,1-milli-m.	0
„ „ . .	CIEE 0,05-m.	7860	„ 0,1-milli-m.	0
„ „ . .	CIEE 0 008-m.	3600	Coffein 0,017-m.	2700
„ „ . .	CIEE 0,008-m.	3600	„ 0,033-m.	1800

Die vollständige Ausschaltung der enzymatischen Hydrolyse von Neutralestern durch 0,0002-m. Physostigmin spricht gegen die Anwesenheit einer zweiten Esterase, die wohl Neutralester, aber nicht Acetyl-cholin angreifen könnte, da derartige Ali-esterasen erst durch höhere Physostigmin-Konzentrationen (0,01-m.) gehemmt werden³⁾.

Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen der voranstehenden Abschnitte überein und stehen im Einklang mit den dort gezogenen Schlussfolgerungen.

Diskussion der Ergebnisse.

In der vorliegenden Mitteilung wurde mit Hilfe verschiedener Verfahren die Fähigkeit mehrerer Elapiden-Gifte, neben Acetylcholin auch Neutralester anzugreifen, aufgedeckt. Da dieses Enzym eine typische e-Cholin-esterase (e-ChE) darstellt⁴⁾, so ist damit zum

¹⁾ E. A. Zeller und A. Bissegger, l. c.; D. Nachmansohn und H. Schmeemann, J. Biol. Chem. **159**, 239 (1945); K.-B. Augustinsson, Acta physiol. scand. **15**, Suppl. 52 (1948).

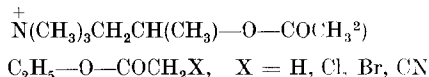
²⁾ 5. Mitteilung, l. c.

³⁾ D. Richter und P. G. Croft, Biochem. J. **36**, 746 (1942).

⁴⁾ 5. Mitteilung, l. c.

ersten Male¹⁾ der vollständige experimentelle Beweis für die Ausdehnung des Spezifitätsbereiches einer e-ChE auf Ester ohne Trimethylammonium-Gruppe geliefert worden.

Mit Sicherheit können neben Acetyl-cholin die folgenden Ester als Substrate der e-ChE der Gifte dienen:



Für den Cyanessigsäureäthylester wurde gezeigt (Tabelle 2), dass er mit dem Chloressigsäureäthylester um eine Esterase konkurriert. Da sich im Lauf der Untersuchungen keine Anhaltspunkte für die Existenz einer zweiten Esterase (neben der ChE) vom Charakter der Ali-esterase³⁾ in Schlangengiften ergaben, kann der Cyanessigester zu den gesicherten Substraten der e-ChE gezählt werden.

Mit grosser Wahrscheinlichkeit kann die gleiche Substrat-Eignung auch dem Jodessigsäureäthylester und den von *F. Bovet-Nitti*⁴⁾ angewandten Estern zugebilligt werden. Zu diesen gehören die Essigsäureester der aliphatischen Mono-alkohole (C₁ bis C₅), des Glykols und Glycerins⁵⁾. Die Ester, deren Hydrolyse durch Schlangengifte nicht merklich beschleunigt werden, sind die folgenden: Propion-säureäthylester²⁾, Benzoyl-cholin⁴⁾, Aminosäureäthylester und Polychloressigsäureäthylester.

Nach *D. Glick*⁶⁾ wird der Abbau von Chloressigsäureäthylester durch Pferdeserum katalysiert und deren ChE dafür verantwortlich gemacht. Doch wurden keine experimentellen Beweise zur Entscheidung der Frage vorgelegt, ob die s-ChE⁷⁾ oder die im Pferdeserum reichlich vorkommende Ali-esterase⁸⁾ oder beide Enzyme für die Katalyse verantwortlich zu machen sind.

Der in der vorliegenden Mitteilung beschriebene Spezifitätsbereich könnte eine Eigentümlichkeit der e-ChE der Schlangengifte darstellen, die bei andern Cholinesterasen dieses Typs nicht auftritt. Diese Vermutung drängte sich unter dem Einfluss der bisherigen Anschauung über die Spezifität der e-ChE vorerst auf⁹⁾. Doch wurde inzwischen bewiesen, dass die teilweise gereinigte e-ChE der menschlichen Erythrocyten ebenfalls die Hydrolyse von Chloressigsäure-

¹⁾ Vgl. das Datum der zu der vorliegenden Publikation gehörenden vorläufigen Mitteilung, l. c.

²⁾ 5. Mitteilung, l. c.

³⁾ *D. Richter* und *P. G. Croft*, l. c. ⁴⁾ l. c.

⁵⁾ Für Cobra-Gift und Triacetin wurde inzwischen der experimentelle Beweis geleistet: *P. Holton*, *Biochem. J.* **43**, XIII (1948); mitgeteilt am 29. Mai 1948 (267th Meeting of the Biochemical Society, Oxford).

⁶⁾ *J. Biol. Chem.* **130**, 527 (1939).

⁷⁾ *K.-B. Augustinsson*, l. c.

⁸⁾ *D. Richter* und *P. G. Croft* l. c.

⁹⁾ *E. A. Zeller*, *Enzymes of Snake Venoms*, l. c.

äthylester und andern Neutralestern zu beschleunigen vermag¹⁾. Zu ähnlichen Schlüssen gelangten *D. H. Adams* und *V. P. Whittaker*²⁾, die, ausgehend von den Untersuchungen von *O. Bodansky*³⁾, die e-ChE der menschlichen Erythrocyten als für die Hydrolyse zahlreicher Neutralester mit grösster Wahrscheinlichkeit („in all probability“) verantwortlich bezeichneten.

Zusammenfassung.

1. Alle untersuchten Elapiden-Gifte beschleunigen die Hydrolyse von Essigsäureäthylester, Chlor-, Brom-, Cyan- und Jodessigsäureäthylester, während der Abbau der Äthylester von Glykokoll, Cystein und Di- und Trichloressigsäure durch die gleichen Gifte nicht merklich beeinflusst wird.

2. Alle geprüften Viperiden-Gifte erwiesen sich als unfähig, Neutralester anzugreifen.

3. Die Hydrolyse-Geschwindigkeit der Neutralester in Gegenwart verschiedener Gifte verläuft parallel derjenigen von Acetylcholin. Bei gleichzeitigem Zusatz von Acetylcholin und Neutralestern tritt eine ausgesprochene Konkurrenz ein.

4. Physostigmin, Prostigmin und Coffein üben einen hemmenden Einfluss auf den enzymatischen Abbau der Neutral-ester in Giftlösungen aus.

5. Alle Ergebnisse können durch die Annahme gedeutet werden, dass die Cholin-esterase der Schlangengifte die Eigenschaft besitzt, neben Acetylcholin auch Neutralester abzubauen.

6. Die Einführung eines Chlor-Atoms in den Acetylrest steigert die Affinität des Essigsäureäthylesters zur Cholin-esterase der Schlangengifte um mehr als das Zehnfache.

7. Das Verhalten der Cholin-esterase-aktiven (Elapidae) und der Cholin-esterase-freien (Viperidae) Schlangengifte spricht gegen das Vorhandensein einer Ali-esterase, die für die Hydrolyse von Neutralestern teilweise verantwortlich gemacht werden könnte.

Ein erheblicher Teil der Versuche wurde in der Pathologisch-anatomischen Anstalt der Universität Basel durchgeführt. Der eine von uns ist deren Direktor, Herrn Prof. Dr. *A. Werthemann*, zu grossem Dank verpflichtet, ebenso Fr. *I. Muhr* für die wertvolle Mitarbeit.

Pathologisch-anatomische Anstalt der Universität Basel und
Department of Biochemistry, Mayo Clinic, Rochester (Minnesota).

¹⁾ *R. A. McNaughton* und *E. A. Zeller*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. (im Druck).

²⁾ Biochem. J. **43**, XIV (1948).

³⁾ l. c.