

## 16. Über die Cholinesterase der Schlangengifte<sup>1)</sup>.

### 5. Mitteilung

#### über die Biochemie der tierischen Gifte<sup>2)</sup>

von E. Albert Zeller.

(5. XI. 48.)

In einer frühern, gemeinsam mit *A. Bissegger* durchgeführten Untersuchung wurde gezeigt, dass durch die Bezeichnung Cholinesterase (ChE) zwei verschiedene Fermente erfasst werden<sup>3)</sup>. Die von uns damals vorgeschlagenen Methoden zur Differenzierung der ChE wurden seither in verschiedenen Laboratorien angewandt. Zu dem gleichen Ergebnis gelangten fast zu derselben Zeit und auf verschiedenem Weg *D. Richter* und *P. G. Croft*<sup>4)</sup> und *B. Mendel* und *H. Rudney*<sup>5)</sup>.

*N. K. Iyengar*, *K. B. Sehra*, *B. Mukerji* und *R. N. Chopra* stellten vor 10 Jahren eine beträchtliche ChE-Aktivität im Kobra-Gift fest<sup>6)</sup>. Ihre Ergebnisse wurden von *B. N. Ghosh*, *P. K. Dutt* und *D. K. Chowdhury*<sup>7)</sup> und später von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt und erweitert<sup>8)</sup>. Eine Zuordnung zu einer der beiden ChE-Typen wurde hingegen nicht unternommen.

Ein erster Vorstoss in dieser Richtung wurde von *E. A. Zeller* und *A. Maritz* gemacht und dabei gefunden, dass die ChE des Kobragiftes zwar dem e-Typ (auch als „spezifische“ oder „echte“ ChE bezeichnet) nahestehe, dass sie aber mit der e-ChE des Gehirns und der Erythrozyten keine völlige Übereinstimmung aufweise<sup>9)</sup>. Um eine endgültige Entscheidung treffen zu können, wurden — wie in der vorliegenden Mitteilung dargelegt wird — weitere Verfahren und zahlreiche Schlangengifte herangezogen. Eine Klarstellung war um so notwendiger, als es sich gezeigt hatte, dass die ChE der Schlangengifte nicht-basische Ester zu spalten vermag<sup>10)</sup><sup>11)</sup> und sich in dieser Hinsicht dem s-Typ nähert („unspezifische“ ChE, „Pseudo“-ChE).

<sup>1)</sup> Vorläufige Mitteilung: *E. A. Zeller*, *Exper.* **3**, 375 (1947).

<sup>2)</sup> 4. Mitteilung: *E. A. Zeller*, *B. Iselin* und *A. Maritz*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **4**, 233 (1946).

<sup>3)</sup> *E. A. Zeller* und *A. Bissegger*, *Helv.* **26**, 1619 (1943).

<sup>4)</sup> *Biochem. J.* **36**, 746 (1942).

<sup>5)</sup> *Biochem. J.* **37**, 59 (1943).

<sup>6)</sup> *Current Science (India)* **7**, 51 (1938).

<sup>7)</sup> *J. Indian Chem. Soc.* **16**, 75 (1939).

<sup>8)</sup> Zusammenfassungen: *K.-B. Augustinsson*, *Acta Physiologica Scandinavica* **15**, Suppl. 52 (1948); *E. A. Zeller*, *Advances in Enzymology* **8**, 459 (1948); pag. 469.

<sup>9)</sup> *Helv. physiol. pharmacol. acta* **3**, C 19 (1945).

<sup>10)</sup> *E. A. Zeller*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **6**, 36 (1948).

<sup>11)</sup> Vgl. 6. Mitteilung dieser Reihe, *Helv.* **32**, 338 (1949).

Wie es sich bald herausstellte, enthalten nicht alle Schlangengifte eine ChE<sup>1</sup>). Aus vergleichend-biochemischen Überlegungen heraus war es von Interesse zu erfahren, ob das Vorkommen der ChE mit der systematischen Stellung der betreffenden Schlangenart in Zusammenhang zu bringen wäre. Gleichzeitig sollten günstige ChE-Quellen aufgefunden und ein Beitrag an die Frage der Bedeutung einzelner Giftkomponenten für die Vergiftungserscheinungen geliefert werden, indem die ChE möglichst vieler Schlangengifte bestimmt wurde, damit diese quantitativen Ergebnisse mit den mehr oder minder gut bekannten toxischen und pharmakologischen Eigenschaften der Gifte verglichen werden könnten.

### Experimentelles.

Die getrockneten Gifte waren mehrere Jahre bis Jahrzehnte alt<sup>2</sup>). Da unter den wenigen Giften, die ein paar Tage nach der Gewinnung untersucht werden konnten, keines von Colubriden-Arten stammte, konnte keine sichere Aussage über die Haltbarkeit der ChE in Schlangengiften gemacht werden. Immerhin besteht eine grosse Wahrscheinlichkeit, dass in den Giften mit hohem  $Q_{ACh}$  die ChE ebenso beständig ist wie viele andere Giftkomponenten.

Die angewandte Giftmenge war um so kleiner, je grösser die Aktivität war. Sie betrug zuweilen pro Ansatz 5  $\gamma$ . Es hätten eigentlich noch geringere Quantitäten nachweisbar sein sollen; doch nahm die Aktivität rascher ab, als es der Verdünnung entsprach, was wahrscheinlich wie bei der Katalase durch die Adsorption der minimalen Fermentmengen an die Wand des gläsernen Reaktionsgefässes zu deuten ist.

Bis auf wenige Ausnahmen lösten sich die Gifte in aq. dest. oder in physiologischer Kochsalzlösung ohne Rückstand auf. Die Lösungen waren für einige wenige Tage ohne Aktivitätsverlust haltbar, wenn sie im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

In Anbetracht der grossen ChE-Aktivität der Elapiden-Gifte hätte für die Bestimmungen irgend eine der gebräuchlichen ChE-Messmethoden herangezogen werden können. Am geeignetsten erwies sich — besonders für die im zweiten Abschnitt der „Ergebnisse“ beschriebenen Versuche — das manometrische Verfahren, das auf der Freisetzung von Kohlendioxyd aus einer Hydrogencarbonat-haltigen Lösung durch die bei der Hydrolyse entstehende Essigsäure beruht<sup>3</sup>). Neben Manometergefässen von üblicher Form und Grösse (Flüssigkeitsvolumen: 2 cm<sup>3</sup>) wurden für die Untersuchung von Giften, die nur in minimalen Mengen zur Verfügung standen, Gefässe mit einem Rauminhalt von 4–5 cm<sup>3</sup> (Flüssigkeitsvolumen: 0,8 cm<sup>3</sup>) verwendet.

Alle Agentien, mit Ausnahme der Gifte, wurden in *Ringer-30* gelöst. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Gesamtvolumen. Die substratlosen Kontrollen wiesen so geringe Ausschläge auf, dass diese neben denjenigen der substrathaltigen bedeutungslos waren, sofern es sich nicht um Viperiden-Gifte und Elapiden-Gifte mit geringer ChE-Aktivität handelte. Es war deshalb meistens nicht nötig, die Giftlösungen zu dialy-

<sup>1</sup>) *N. K. Iyengar et al.*, l. c.; *B. N. Ghosh*, Öster. Chem. Ztg. **43**, 158 (1940); *E. A. Zeller*, *V. Kocher* und *A. Maritz*, Helv. physiol. pharmacol. acta **2**, C 63 (1944).

<sup>2</sup>) Die Untersuchungen wurden durch die Überlassung zahlreicher und wertvoller Giftpräparate durch die Herren Dr. *O. Rier* (Butantan), Dr. *H. E. Essex* (Rochester, Minn.), Prof. Dr. *E. Grasset* (Genève), Dr. *K. Haas* (Basel), Prof. Dr. *H. Hediger* (Basel), Dr. *C. H. Kellaway* (London), *H. Schweizer* (Basel), *P. Seiler* (Basel), Prof. Dr. *F. Roulet* (Basel), *C. Stemmler-Morath* (Basel), Prof. Dr. *P. Stern* (Zagreb), Prof. Dr. *J. Tréjoulet* (Paris), Dr. *Wansson* (Léopoldville) und Dr. *P. C. Zamecnik* (Boston) ermöglicht. Ich bin den Donatoren zu größtem Dank verpflichtet.

<sup>3</sup>) *R. Ammon*, Arch. ges. Physiol. **233**, 468 (1933).

sieren. (Damit war auch ausgeschlossen, dass in den Elapiden-Giften Acetyl-cholin oder andere Substrate der ChE vorhanden sind, Stoffe, die in Giften von Wirbellosen auftreten.)

Die Reaktion verlief in den ersten Minuten mit konstanter Geschwindigkeit, wobei gelegentlich nach der Vereinigung von Enzym und Substrat kleine Schwankungen auftraten. Die Phase mit konstanter Geschwindigkeit wurde für die Berechnung von  $Q_{ACH}$ ,  $Q_{MCh}$  usw. benützt. Das Symbol Q gibt die Anzahl der mm<sup>3</sup> Kohlendioxyd an, die pro mg Trockengift und pro Stunde bei der Hydrolyse von Acetyl-cholin, Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin usw. entwickelt worden wären<sup>1)</sup>.

### Ergebnisse.

#### 1. Vorkommen der Cholinesterase in Schlangengiften.

##### a) Viperidae und Crotalidae.

In keiner der nachstehend angeführten Giftarten fand sich eine messbare ChE-Aktivität, obwohl grosse Giftmengen (bis zu 1 mg) und nahezu optimale Acetyl-cholin-Konzentrationen (0,0025-m., vgl. Abschnitt 2/IV) zur Anwendung gelangten. Der Wert einer allenfalls doch vorhandenen ChE müsste weit unter  $Q_{ACH} = 10$  liegen.

Agkistrodon mokasen	Crotalus lucasensis
„ piscivorus	„ ruber
Bitis arietans	„ terrificus terrificus
„ gabonica	„ terrificus basiliscus
Bothrops alternatus	„ viridis viridis
„ atrox	„ viridis oreganus
„ cotiara	Echis carinatus
„ jararaca	Sistrurus catenatus
„ jararacussu	Trimeresurus gramineus
„ itapetiningae	Vipera ammodytes
„ neuwiedii	„ aspis
„ nummifera	„ aspis (Dép. du Gers, France)
Crotalus adamanteus	„ aspis Hugyi
„ cinereus (atrox)	„ lebetina
„ horridus	„ russelli

Für die Arten *Crotalus terrificus*<sup>2)</sup>, *Echis carinatus*<sup>2)</sup>, *Vipera aspis*<sup>3)</sup> und *Vipera Russellii*<sup>2)4)</sup> wurde schon früher die Abwesenheit von ChE in den betreffenden Giften festgestellt. In der obenstehenden Liste sind von den 15 bekannten Gattungen nahezu zwei Drittel (9) vertreten. Von den wichtigen Gattungen fehlen *Lachesis* und *Causus*, während die ebenfalls fehlenden Gattungen *Atheris*, *Atractaspis*, *Azemiops* und *Pseudocerastes* entweder hinsichtlich Artenzahl oder Verbreitung und praktischer Bedeutung den übrigen an Rang nachstehen.

<sup>1)</sup> Weitere technische Einzelheiten finden sich in den voranghenden Mitteilungen über die ChE und besonders in der Mitteilung *H. Birkhäuser*, *Helv.* **23**, 1071 (1940).

<sup>2)</sup> *B. N. Ghosh*, l. c.

<sup>3)</sup> *E. A. Zeller*, *V. Kocher* und *A. Maritz*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **2**, C 63 (1944).

<sup>4)</sup> *N. K. Iyengar et al.*, l. c.

## b) Elapidae.

Die ChE-Werte für die Gifte von 20 Arten und Unterarten dieser Schlangengruppe wurden in der Tabelle 1 zusammengefasst. Wie aus den Angaben derselben hervorgeht, waren die Messbedingungen nicht bei allen Giften dieselben. Die an sich geringfügigen Unterschiede sind auf den Umstand zurückzuführen, dass wegen der Kostbarkeit des Materials die Aktivitätsbestimmungen häufig mit andern Versuchen kombiniert wurden.

**Tabelle 1.**  
Cholinesterase-Werte für Elapidae-Gifte.

Spezies	Gift- menge	ACh- Konzentrat.	$Q_{ACh}$
<i>Acanthophis antarcticus</i> , death adder, Australien . . . . .	mg 0,1	$7,5 \cdot 10^{-3}$ -mol	9240
<i>Bungarus coeruleus</i> , common krait, Südasien . . . . .	0,02	2,0	35100
<i>Bungarus fasciatus</i> , banded krait, Südasien . . . . .	0,04	3,0	25000
<i>Demansia textilis</i> , brown snake, Australien	0,1	7,5	140
<i>Dendraspis</i> , Mamba, Afrika . . . . .	0,1	5,0	80
<i>Denisonia superba</i> , copperhead, Australien	0,04	7,7	11000
<i>Denisonia superba</i> , Varietät aus höhern Gebirgslagen . . . . .	0,02	7,5	3300
<i>Elaps corallinus</i> , coral snake, Amerika . .	0,5	10	680
<i>Naia bungarus</i> , king cobra, Südasien . . .	0,1	2	6800
<i>Naia flava</i> , Cape cobra, Afrika . . . . .	0,2	10	7250
<i>Naia haie</i> , Uräus-Schlange, Afrika . . . . .	0,25	4	1020*)
<i>Naia melanoleuca</i> , Afrika . . . . .	0,04	1,1	30800
<i>Naia naia</i> , Indian cobra, Südasien . . . . .	0,05	10	4900
<i>Naia nigricollis</i> , spitting cobra, Afrika . .	0,3	3,3	37
<i>Notechis scutatus</i> , tiger snake, Australien	0,1	7,5	3300
<i>Notechis scutatus</i> var. <i>niger</i> . . . . .	0,1	7,5	3180
<i>Notechis scutatus</i> , Varietät mit weissem Gift	0,1	7,5	4260
<i>Pseudechis australis</i> , Australien . . . . .	0,1	7,5	90
<i>Pseudechis porphyriacus</i> , black snake, Australien . . . . .	0,1	7,5	140
<i>Sepedon haemachates</i> , Ringhals, Afrika .	0,08	4	10200

\*) Von dieser Schlange gelangte nicht das reine Gift, sondern ein Extrakt aus den getrockneten Giftdrüsen zur Anwendung.

Aus den Zahlen der Tabelle 1 geht hervor, dass die ChE-Aktivität der Gifte kein Gattungsmerkmal darstellt, da beispielsweise die Kobra-Arten Gifte mit sehr hohen, mittleren und sehr geringen  $Q_{ACh}$ -Werten besitzen. Andere Giftbestandteile, wie beispielsweise die Ophio-L-aminosäure-oxydase, zeigen dagegen innerhalb einer Gattung

eine gewisse Konstanz<sup>1)</sup>). Die allgemeine Giftigkeit geht mit der ChE-Aktivität nicht parallel, da geringe und grosse  $Q_{\text{Ach}}$ -Werte mit hoher Giftwirksamkeit verbunden sind.

Bisher wurde kein Elapiden-Gift gefunden, das nicht die Spaltung von Acetyl-cholin katalysiert hätte. Allerdings ist die Liste der untersuchten Arten und Gattungen noch weniger vollständig als bei den Viperiden und Crotaliden, so dass noch keine endgültige Aussage darüber gemacht werden kann, ob die ChE einen obligaten Bestandteil der Elapiden-Gifte darstellt. Immerhin sind alle grossen und gefährlichen Elapiden-Arten in der Zusammenstellung vertreten, mit Ausnahme des vor nicht allzu langer Zeit entdeckten riesigen australischen Taipans (*Oxyurans macleannani*).

Von anderer Seite wurden bisher nur die Gifte von *Naiia naiia*<sup>2)</sup> und *Bungarus fasciatus*<sup>3)</sup> untersucht.

Vergleichshalber seien einige andere  $Q_{\text{Ach}}$ -Werte angegeben:

Menschenserum 4,5

Nucleus caudatus (Gehirn Mensch) 45<sup>4)</sup>

Elektrisches Organ von *Torpedo marmorata* 450<sup>5)</sup>.

Das elektrische Organ einiger Fische wies die höchsten ChE-Aktivität auf, die bisher in irgend einem Material gefunden wurde. Die meisten Elapiden-Gifte dagegen weisen das Vielfache dieser Werte auf. Diese Aussage bleibt selbst dann zu Recht bestehen, wenn berücksichtigt wird, dass die obigen Angaben sich auf frische, wasserhaltige Gewebe beziehen und nicht wie bei den Giften auf die Trockensubstanz. Der Wassergehalt der Schlangengifte beträgt 33 bis 88 Prozent, im Mittel etwa 70 bis 80 Prozent<sup>6)</sup>.

### c) Hydrophiidae.

Bis jetzt konnte nur das Gift einer einzigen Art, *Enhydrina schistosa*, untersucht werden. Der Abbau von Acetyl-cholin wurde durch dasselbe nicht beschleunigt. Das Material, das der bekannten Sammlung von Major *Lamb* entstammte, war über 50 Jahre alt. Es hatte aber seine grosse Giftigkeit noch nicht verloren, da 10 Mikrogramm eine 20 Gramm schwere Maus in einer Stunde töteten.

## 2. Charakterisierung der Cholinesterase der Schlangengifte.

Die Kriterien, die für die Feststellung des ChE-Typs der Schlangengifte gewählt wurden, sind die folgenden: Beschleunigung der

<sup>1)</sup> *E. A. Zeller*, Verhandl. Schweiz. Naturforsch. Ges. **127**, 113 (1947).

<sup>2)</sup> *N. K. Iyengar* et al., l. c.

<sup>3)</sup> *B. N. Ghosh*, l. c. In dieser Publikation findet sich ein sinnstörender Fehler, der in mehrere Referatenorgane übergegangen ist, indem *Boa fasciatus* statt *Bungarus fasciatus* angeführt wird.

<sup>4)</sup> *H. Birkhäuser*, Helv. **23**, 1071 (1940).

<sup>5)</sup> *A. Marnay*, Compt. rend. Soc. Biol. **126**, 573 (1937).

<sup>6)</sup> *N. H. Fairley* und *B. Splatt*, Medical J. Australia **1929**, 34.

Hydrolyse von Benzoyl-cholin und Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin und Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch hohe Substratkonzentration und Coffein.

#### a) Benzoyl-cholin.

*B. Mendel, D. B. Mundell* und *H. Rudney*<sup>1)</sup> zeigten als erste, dass Benzoyl-cholin wohl von der s-ChE, aber nicht von der e-ChE angegriffen wird, was inzwischen mehrfach bestätigt wurde<sup>2)</sup>.

Es wurden die Gifte folgender Arten auf ihre Fähigkeit, die Zerlegung von 0,07-m. Benzoyl-cholin zu beschleunigen, untersucht:

<i>Acanthophis antarctica</i>	<i>Naia haie</i>
<i>Bungarus coeruleus</i>	<i>Naia naia</i>
<i>Bungarus fasciatus</i>	<i>Naia melanoleuca</i>
<i>Dendraspis</i>	<i>Notechis scutatus</i>
<i>Denisonia superba</i>	<i>Pseudechis porphyriacus</i>
<i>Naia bungarus</i>	<i>Sepedon haemachates</i>

Bei keinem der zwölf erwähnten Gifte konnte eine messbare Hydrolyse des Benzoyl-cholins festgestellt werden. Dieses Verhalten teilt die ChE der Schlangengifte mit den typischen e-ChE-asen.

#### b) Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin.

*G. A. Alles* und *R. C. Hawes* zeigten in ihrer grundlegenden Arbeit, dass wohl die Erythrozyten-ChE, aber nicht die Serum-ChE (Mensch) imstande ist, die Spaltung von Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin (MCh) zu katalysieren<sup>1)</sup>. *B. Mendel* et al.<sup>3)</sup> erweiterten den Anwendungsbereich dieser Substanz als eines Substrates der „echten“ ChE, das von der „Pseudo“-ChE nicht angegriffen wird. Dieses Merkmal wurde seither vielfach zur Differenzierung der ChE-asen benutzt<sup>2)</sup>.

Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin wurde in Gegenwart aller 10 untersuchten Elapidengifte hydrolysiert (Tabelle 2). Darüber hinaus zeigte es sich, dass die Zerlegung dieses Substrates ziemlich genau parallel derjenigen von Acetyl-cholin verlief. Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit von Gift zu Gift bis über das Zweihundertfache schwankte, änderte sich das Verhältnis der beiden Hydrolysegeschwindigkeiten nur innerhalb des Bereiches von 1,1 bis 2,9 (Tabelle 2). Dabei muss man noch berücksichtigen, dass die Versuchsbedingungen aus den im voranstehenden Abschnitt angegebenen Gründen nicht überall dieselben waren.

Die in Tabelle 2 zusammengefassten Ergebnisse lassen sich wohl kaum anders als durch die Annahme deuten, dass ein und dasselbe Ferment an der Zerlegung beider Substrate beteiligt ist. Die Sicherheit wird noch verstärkt durch den Nachweis einer Konkurrenz von

<sup>1)</sup> Biochem. J. **37**, 473 (1943).

<sup>2)</sup> Vgl. erwähnte Zusammenfassungen.

<sup>3)</sup> J. Biol. Chem. **133**, 375 (1940).

**Tabelle 2.**Hydrolyse von Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin in Gegenwart von Elapidae-Giften.

Spezies	Gift- menge mg	MCh- Konz.	Q <sub>MCh</sub>	$\frac{Q_{ACh}^*)}{Q_{MCh}}$
Acanthophis antarcticus	0,1	0,026-m.	7080	1,3
Bungarus coeruleus . .	0,02	0,026-m.	15300	2,3
Bungarus fasciatus . .	0,04	0,0075	22000	1,1
Denisonia superba . . .	0,04	0,026	9000	1,2
Naia bungarus . . . . .	0,1	0,026	4740	1,4
Naia melanoleuca . . . .	0,04	0,005	25500	1,2
Naia naia . . . . .	0,05	0,01	1700	2,9
Notechis scutatus . . . .	0,06	0,003	2900	1,1
Pseudechis porphyriacus	0,1	0,026	105	1,3
Sepedon haemachates .	0,04	0,026	4350	2,3

\*) Die Q<sub>ACh</sub>-Werte wurden der Tabelle 1 entnommen.

Acetyl-cholin und Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin um das Ferment, wenn beide Substrate gleichzeitig zur Schlangengift-Lösung zugesetzt werden (Tabelle 3).

**Tabelle 3.**Gleichzeitige enzymatische Hydrolyse von Acetyl-cholin und Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin.

Gift von Naia melanoleuca, 0,04 mg; Versuchsdauer 10 Minuten.

Substrate	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>
ACh 0,0025-m.	112
MCh 0,0025-m.	39
ACh + MCh 0,0025-m.	108
ACh 0,005-m.	163
MCh 0,005-m.	55
ACh + MCh 0,005-m.	162

Somit sprechen auch diese Versuche mit Acetyl- $\beta$ -methyl-cholin für das Vorhandensein einer e-ChE in den Schlangengiften.

## c) III. Hemmung durch Coffein.

Coffein war der erste Stoff, von dem gezeigt werden konnte, dass er ausschliesslich die e-ChE hemmt<sup>1)</sup>. Er wurde deshalb häufig zur Entscheidung von Differenzierungsproblemen herangezogen<sup>2)</sup>. Erst vor kurzem wurde bekanntgegeben, dass  $\beta\beta'$ -Dichlordiäthyl-N-methylamin-hydrochlorid, ein Glied der Senfgasgruppe, die gleichen Inhibitor-Eigenschaften aufweist<sup>3)</sup>.

1) E. A. Zeller und A. Bissegger, l. c.

2) Vgl. erwähnte Zusammenfassungen.

3) D. H. Adams und R. H. S. Thompson, Biochem. J. **42**, 170 (1948).

In zahlreichen Versuchen über die Beeinflussbarkeit der Schlangengift-ChE durch Coffein trat keine Hemmung ein. Es wurden deshalb in systematischer Weise die Konzentration von Substrat und Inhibitor variiert und mehrere Gifte und Substrate verwendet. Ein Teil der Ergebnisse ist in der Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4.**  
Hemmung von Schlangengift-Cholinesterasen durch Coffein.

Spezies	Substrat	Q	Coffein-Konzentr.	Q <sub>Ceff.</sub>	Hemmung
Sepedon haemachates .	ACh 0,006-m.	9100	0,024-m.	7750	15%
Bungarus fasciatus . .	ACh 0,008-m.	22800	0,04-m.	16000	30%
	ACh 0,002-m.	22100	0,04-m.	22100	0%
Naia melanoleuca . . .	MCh 0,01-m.	18600	0,04-m.	12000	35%
	MCh 0,005-m.	25500	0,0075-m.	22500	12%
	MCh 0,005-m.	25500	0,02-m.	17650	31%

Es besteht somit kein Zweifel, dass unter geeigneten Bedingungen die Schlangengift-ChE durch Coffein gehemmt werden kann. Das Ausmass der Reaktion ist recht gering, verglichen mit der Hemmung von 40–42 Prozent, die Hirn- und Erythrozyten-ChE-Asen durch eine geringere Coffeinkonzentration (0,006-m.) erfuhren<sup>1)</sup>. Die inhibitorische Wirkung nimmt im allgemeinen zu, je grösser die Substratkonzentration ist. Eine ähnliche merkwürdige Erscheinung wurde bei der Hemmung der Diaminoxidase durch Blausäure festgestellt<sup>2)</sup>.

#### d) Hemmung durch hohe Acetyl-cholin-Konzentration.

Die Hydrolyse von Acetyl-cholin wird durch hohe Substratkonzentrationen verschieden beeinflusst, je nachdem der e- oder s-Typ vorliegt<sup>3)4)</sup>. Während bei der s-ChE die Beziehung zwischen Umsatzgeschwindigkeit und Substratkonzentration sich durch die *Michaelis-Menten*'sche Beziehung darstellen lässt, nimmt bei der e-ChE die Reaktionsgeschwindigkeit nach Überschreitung einer optimalen Konzentration ständig ab. *E. A. Zeller* und *A. Bissegger* brachten diese Erscheinung in Zusammenhang mit der Theorie von *J. B. S. Haldane*<sup>5)</sup> und schlugen entsprechende Modelle für die beiden Typen vor<sup>3)</sup>. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen wird mit der Bildung von Komplexen gedeutet, die aus je einer Enzym- und zwei Substratmolekeln zu-

<sup>1)</sup> *E. A. Zeller* und *A. Bissegger*, l. c.

<sup>2)</sup> *E. A. Zeller*, *Helv.* **23**, 1418 (1940).

<sup>3)</sup> *E. A. Zeller* und *A. Bissegger*, l. c.

<sup>4)</sup> *G. A. Alles* und *R. C. Hawes*, l. c.; *B. Mendel* und *H. Rudney*, l. c.; *K.-B. Augustinsson*, l. c.

<sup>5)</sup> *J. B. S. Haldane*, *Enzymes*, London 1930, pag. 84.



sammengesetzt sind. Bei *Planaria dorocephala* wurde eine ChE gefunden, die dem e-Typ nahestand, aber durch grosse Acetyl-cholin-Konzentrationen nicht gehemmt wurde<sup>1</sup>).

Bei allen sechs näher untersuchten Schlangengiften dagegen setzte Acetyl-cholin die Reaktionsgeschwindigkeit herab, wenn die Konzentration über 0,001 bis 0,003-m. hinausging (Tabelle 5 und Figur 1). Das Optimum der Gehirn- und Erythrozyten-ChE liegt dagegen im Gebiet von 0,004 bis 0,0045-m. Acetyl-cholin-Konzentrationen<sup>2</sup>).

**Tabelle 5.**

Einfluss der Acetyl-cholin-Konzentration auf die Hydrolysegeschwindigkeit.

Spezies	$Q_{ACh}$ suboptimal	$Q_{ACh}$ optimal	$Q_{ACh}$ überoptimal
Bungarus coeruleus . .		0,002-m. : 35100	0,004-m. : 33200 0,016-m. : 23400
Bungarus fasciatus . .	0,001-m. : 20000	0,003-m. : 25000	0,009-m. : 18700 0,018-m. : 15000
Naia bungarus . . . .		0,002-m. : 6800	0,008-m. : 4800 0,016-m. : 4400
Notechis scutatus . . .		0,005-m. : 3120	0,01-m. : 2310
Sepedon haemachates .		0,004-m. : 10200	0,016-m. : 8500

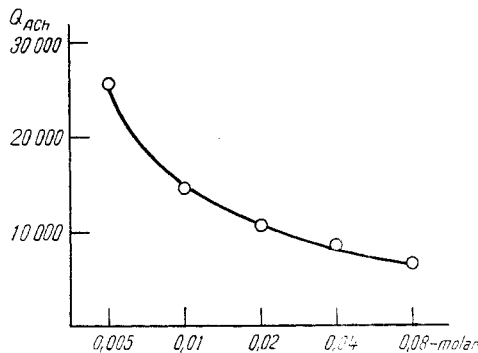


Fig. 1.

Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Gift: *Naia melanoleuca* 0,01 mg.

Abszisse: Konzentration des Acetyl-cholins (Logarithmus).

Ordinate:  $Q_{ACh}$

Die Reduktion der Hydrolysegeschwindigkeit kann ein beträchtliches Ausmass erreichen, wie aus der Figur 1 hervorgeht.

<sup>1</sup>) R. D. Hawkins und B. Mendel, J. Cellular Comp. Physiol. **27**, 69 (1946).

<sup>2</sup>) E. A. Zeller und A. Bisegger, loc. cit.

### Diskussion der Ergebnisse.

Alle vier Verfahren, die für die Charakterisierung der ChE in Schlangengiften benützt wurden, deuten darauf hin, dass es sich hier um den e-Typ handelt, der im Gehirn, in den Erythrozyten, im Muskel von Säugern, im Blut von *Helix* und in der „Leber“ von *Sepia* vorkommt. Da die Speicheldrüsen verschiedener Tierarten entweder den s-Typ, oder den e-Typ, oder eine Mischung beider ChE-Typen aufweisen, konnte kein a priori-Schluss auf die ChE der Schlangengifte, die Produkte von spezialisierten Speicheldrüsen darstellen, gezogen werden. Beim Vergleich der ChE-Aktivitäten der Organe der Juraviper (*Vipera aspis*) wiesen die Giftdrüsen einen der höchsten Werte auf<sup>2)</sup>, ohne dass, wie bei allen übrigen untersuchten Viperiden, die ChE in das Sekret übergeht.

Es mag auffallen, dass die Festlegung des Typus der ChE der Schlangengifte mit so grosser Ausführlichkeit und unter Heranziehung vieler Gifte und verschiedener Methoden durchgeführt wurde. Die Versuche bildeten jedoch den Ausgangspunkt einer Reihe von Arbeiten, die die Spezifität der ChE-asen in einem neuen Licht erscheinen lassen, und für die die zweifelsfreie Diagnostizierung der Gift-ChE die unerlässliche Voraussetzung bildete. Es konnte gezeigt werden, dass die e-ChE („echte“ oder „spezifische“ ChE), nicht-basische Ester zu hydrolysieren vermag<sup>3)</sup>. Diese Eigenschaft ist, entgegen der ursprünglichen Annahme<sup>4)</sup>, keine Besonderheit der Gift-ChE, sondern findet sich auch bei der ChE der Erythrozyten des Menschen<sup>5)</sup>.

Bald nach der Postulierung von zwei ChE-Typen wurde erkannt, dass damit nicht alle Unterschiede der ChE-asen erfasst worden sind. Die Analyse der ChE der Sera mehrerer Tierarten zwang *E. A. Zeller*<sup>6)</sup> 1944 zur Annahme, dass der s-Typ eine Gruppenbezeichnung darstelle. Dasselbe wurde gemeinsam mit *A. Maritz* für den e-Typ behauptet, wofür die ersten Versuche über die ChE der Schlangengifte die Unterlage bildeten<sup>7)</sup>. Da die Schlangengift-ChE sich durch das Ausmass der Coffeinhemmung und durch die Lage der optimalen Substratkonzentration vom e-Typ der Erythrozyten und des Gehirns deutlich abhebt, wie die Ergebnisse der vorliegenden Publikation dartun, so liegt hier tatsächlich eine Gruppe von e-ChE-asen vor, deren einzelne Glieder unter sich nicht identisch sind, im ganzen sich aber klar vom s-Typ abheben. Ähnliche Gedankengänge wurden in

1) Vgl. erwähnte Zusammenfassungen.

2) *A. Kaswin* und *A. Serfaty*, C. r. Soc. Biol. **139**, 1070 (1945).

3) *E. A. Zeller*, Helv. physiol. pharmacol. acta **6**, C 36 (1948).

4) *E. A. Zeller*, Enzymes of Snake Venoms, I. c.

5) Unveröffentlichte Versuche.

6) Helv. physiol. pharmacol. acta **2**, C 23 (1944).

7) Helv. physiol. pharmacol. acta **3**, C 19 (1945).

der Folge von *O. Bodansky*<sup>1)</sup> und von *K.-B. Augustinsson*<sup>2)</sup> bekanntgegeben, wobei der letztere durch seine umfangreichen Arbeiten über die ChE zahlreicher Tierarten wichtiges Material zur Abklärung der Gruppennatur der ChE-Typen beitrug.

Die Curare-artige Wirkung der Schlangengifte wurde in Zusammenhang mit der ChE-Aktivität derselben gebracht<sup>3)</sup>; Acetylcholin, das den Reiz vom Nerv auf den Muskel übertragen soll, würde demnach durch die ChE des Gifts so rasch inaktiviert, dass der Ester seine physiologische Funktion nicht erfüllen kann. Die im ersten Abschnitt niedergelegten Resultate unterstützen teilweise diese Annahme, da sie die Abwesenheit von ChE in Viperiden-Giften, die keine eigentliche Curare-artige Wirkung besitzen<sup>4)</sup>, zu erkennen geben. Möglicherweise ist es auch kein Zufall, dass die ChE des Nervensystems und die ChE der Schlangengifte vom gleichen Typus sind. Auf der andern Seite widersprechen unsere Ergebnisse dieser Hypothese, da keine Parallelität zwischen der Curare-artigen Aktivität und den ChE-Werten der Schlangengifte besteht.

#### Zusammenfassung.

1. Die Gifte von 30 Arten und Unterarten der zur Familie der Viperidae zu zählenden Gattungen *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Echis*, *Sistrurus*, *Trimeresurus* und *Vipera* weisen keine Cholin-esterase auf. Die Gifte aller 20 Arten und Unterarten der zur Familie der Colubridae und Unterfamilie Elapidae gehörenden Gattungen *Acanthophis*, *Bungarus*, *Demansia*, *Dendraspis*, *Denisonia*, *Elaps*, *Naia*, *Notechis*, *Porphyriacus* und *Sepedon* enthalten dieses Enzym, während das Gift der der Unterfamilie Hydrophiidae zugehörigen Art *Enhydrina schistosa* frei von Cholin-esterase ist.

2. Die Höhe der ChE-Aktivität schwankt von Art zu Art, selbst innerhalb der gleichen Gattung; sie erreicht in den meisten Giften sehr viel höhere Werte als in irgend einer andern ChE-Quelle.

3. Keines der untersuchten 12 Elapiden-Gifte war imstande, die Hydrolyse von Benzoylcholin zu beschleunigen.

4. Alle 10 geprüften Elapidae-Gifte greifen Acetyl- $\beta$ -methylcholin an. Untersuchungen über die Verteilung des für diese Spaltung verantwortlichen Enzyms und Konkurrenzversuche zeigen, dass es sich um die Cholin-esterase handelt.

5. Die Cholin-esterasen mehrerer Elapidae-Arten werden durch Coffein und durch hohe Acetylcholin-Konzentrationen gehemmt.

<sup>1)</sup> Ann. N. Y. Acad. Sci. **47**, 521 (1946).

<sup>2)</sup> L. c.

<sup>3)</sup> *N. K. Iyengar et al.*, l. c.

<sup>4)</sup> *C. H. Kellaway*, Bull. Johns Hopkins Hosp. **60**, 18 (1937).

6. Alle Ergebnisse sprechen eindeutig für die Annahme, dass in den Elapidae-Giften der e-Typ („echte“, „spezifische“ ChE) vorliegt. Die Übereinstimmung mit dem e-Typ des Gehirns und der Erythrozyten ist keine vollkommene. Der e-Typ stellt damit, wie es früher für den s-Typ gezeigt wurde, eine Gruppenbezeichnung dar.

Herrn Prof. Dr. A. Werthemann danke ich bestens für die Erlaubnis zur Durchführung der Versuche in seinem Institut, und Fr. I. Muhr für die wertvolle Mitarbeit.

Pathologisch-anatomische Anstalt der Universität Basel.

## 17. Untersuchungen über das Wal-myoglobin<sup>1)</sup>

von Karl Schmid<sup>2)</sup>.

(7. XII. 48.)

Die rote Farbe des Muskels wurde erstmals von *Kölliker*<sup>3)</sup> im Jahre 1850 einem dem Muskel eigenen Farbstoff — dem Myoglobin — zugeschrieben. Diese Annahme fand später ihre Bestätigung durch die von *Mörner*<sup>4)</sup> gemachte Beobachtung, dass das spektroskopische Verhalten des Myoglobins von dem des Hämoglobins verschieden ist. Auf Grund des verschiedenen Gehaltes der Muskulatur an Myoglobin unterscheidet man in der Muskelphysiologie zwischen rotem und weissem Muskel. Die dabei — in chemischer und physiologischer Hinsicht — zu beobachtenden Unterschiede wurden eingehend von *Needham*<sup>5)</sup> studiert. Erst 1932 gelang es *Theorell*<sup>6)</sup>, das Myoglobin aus dem Muskel des Pferdeherzens in krystallisierter Form darzustellen. Damit war die Möglichkeit gegeben, die Verschiedenheit dieser beiden Chromoproteide endgültig zu beweisen. In der Folge wurden auch die Eigenschaften des Myoglobins<sup>7)</sup><sup>8)</sup> weiter erforscht und von *Millikan*<sup>9)</sup> und *Wyman*<sup>10)</sup> zusammenfassend beschrieben. In den letzten Jahren wurden Muskelhämoglobine von verschiedenen Tierarten in krystallisiertem Zustand bereitet und von den vielen

<sup>1)</sup> Vorläufige Mitteilung: *Joan Keilin* und *K. Schmid*, *Nature* **162**, 496 (1948).

<sup>2)</sup> Gegenwärtige Adresse: Department of Physical Chemistry, Harvard Medical School, Boston 15.

<sup>3)</sup> *Kölliker*, *Mikroskop, Anatomie*, II, Bd. 1, S. 248 (1850).

<sup>4)</sup> *K. A. H. Mörner*, *Nord. Med. Arkiv, Festband* (1897).

<sup>5)</sup> *M. D. Needham*, *Physiol. Rev.* **6**, 1 (1926).

<sup>6)</sup> *H. Theorell*, *Biochem. Z.* **252**, 1 (1932).

<sup>7)</sup> *H. Theorell*, *Biochem. Z.* **268**, 46, 55, 64, 73 (1934).

<sup>8)</sup> *V. E. Morgan*, *J. Biol. Chem.* **112**, 557 (1935).

<sup>9)</sup> *G. A. Millikan*, *Physiol. Rev.* **19**, 503 (1939).

<sup>10)</sup> *J. Wyman*, *Adv. Protein Chem.* **4**, 407 (1948).