

Aus der Medizinischen Univ. Klinik (Ludolf Krehl-Klinik) Heidelberg (Direktor:  
Prof. Dr. K. MATTHES)

## **Zur Hemmung der L-Glutaminsäure- und L-Dopadecarboxylase durch D-Cycloserin und andere Isoxazolidone\***

Von

**HANS J. DENGLE**R

unter Mitarbeit von **E. RAUCHS** und **W. RUMMEL**

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 5. April 1962)*

Aus verschiedenen Streptomyces-Arten wurde 1955 von drei Arbeitsgruppen (HIDY et al.; KUEHL et al. und SHULL u. SARDINAS) ein Antibioticum isoliert (Cycloserin, Oxamycin), dessen chemische Struktur als D-4-Amino-isoxazolidin-3-on erkannt wurde und das sich mit dem schon 1952 von KUROSWA gefundenen Orientomycin identisch erwies.

Obwohl Cycloserin (abgekürzt CS) ein breites antibakterielles Wirkungsspektrum sowohl in vitro wie im Tierversuch hat, stand von Anfang an im Mittelpunkt des Interesses seine Verwendung als Tuberculostaticum, auf die EPSTEIN, NAIR u. BOYD (1955) hingewiesen hatten. Während seine Wirksamkeit in dieser Indikation heute noch umstritten ist, auch wenn sich neuerdings sehr positive Stellungnahmen finden (HEIN u. BERTHOLD 1959), stimmen die meisten Beobachter darin überein, daß die CS-Therapie in relativ hohem Maße mit dem Auftreten zentralnervöser Nebenwirkungen belastet ist (Literatur bei MURRAY 1956; DE SIMONE u. NANNARELLI 1957; VALLADE et al. 1959; FREERKSEN, KRÜGER-THEIMER u. ROSENFELD 1959; DENGLE 1961). Diese äußern sich am dramatischsten im generalisierten Krampfanfall, dessen Häufigkeit mit dem ungewöhnlich hohen Prozentsatz von 1,7—8,7% angegeben wird, sowie in nicht minder eindrucksvollen psychotischen Störungen (somatogene Depressionen, halluzinatorische Syndrome, Erregungszustände, Schizophrenie-ähnliche Bilder u. a.), die ebenfalls in ähnlicher Häufigkeit vorkommen.

Wir gingen bei unseren Untersuchungen zur Neuro- und Psycho-toxizität des CS von der Arbeitshypothese einer Hemmung Pyridoxal-5-phosphat-abhängiger Aminosäurendecarboxylasen aus, da einerseits chemisch eine Reaktion des CS oder seiner Metaboliten mit Pyridoxal-5-phosphat (abgekürzt PD-5-P) möglich erschien und zum anderen eine Hemmung des PD-5-P-abhängigen Umsatzes der  $\gamma$ -Aminobuttersäure Relationen zum cerebralen Krampfgeschehen aufweist. Eine Hemmung der Monoaminoxidase, an die besonders die excitatorischen und anti-depressiven (CRANE 1957) Wirkungen des CS denken ließen, konnten wir

---

\* Herrn Prof. Dr. P. HOLTZ zum 60. Geburtstag gewidmet.

ausschließen (Dissertation RAUCHS). Wir fanden dagegen eine eindeutige Hemmung der L-Glutamat- und L-Dopadecarboxylase, die wir als Vertreter  $B_6$ -abhängiger Decarboxylasen mit einer Beziehung zum Aminstoffwechsel des Gehirns untersuchten (DENGLER 1961). Gleichzeitig wurde von japanischen Autoren (AOKI 1957 a, b, c; YAMADA et al. 1957) auch eine Hemmung  $B_6$ -abhängiger Bakterienenzyme durch CS beschrieben.

Eine eingehende Analyse der Hemmungskinetik führte zur Formulierung eines für die L-Dopadecarboxylase bisher noch nicht bekannten Hemmungstyps, der dem entspricht, den McCORMICK u. SNELL (1959) für die Hemmung der Pyridoxal-Kinase durch Carbonylreagentien beschrieben haben.

## Methodik

### Enzympräparate

1. Dopadecarboxylasepräparate aus Schweinenieren: Schlachtfrische Nieren von Schweinen wurden tiefgefroren, in Scheiben geschnitten und in gefrorenem Zustand in Mark und Rinde geteilt. Die Rindenanteile wurden im Waring-Blendor in drei Volumen 0,15 M NaCl-Lösung zerkleinert und bei  $+4^\circ\text{C}$  1 Std extrahiert. Nach Abtrennung der größeren Partikel bei etwa 1000 g in einer Kühlzentrifuge wurde der Überstand 60 min bei  $37000 \cdot g$  (Spinco Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Der partikelfreie Überstand wurde bei  $+4^\circ\text{C}$  40–48 Std gegen destilliertes Wasser dialysiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen, der Überstand in einzelnen kleineren Portionen eingefroren und bei  $-18^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Der Proteingehalt der einzelnen Präparate wurde mit der Biuret-Methode bestimmt und schwankte zwischen 1,60–1,77 g-%.

Die Haltbarkeit der Präparate war unter der Voraussetzung gut, daß wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden wurde. Der Aktivitätsverlust betrug im Mittel nach 20 Tagen 15–18%, nach 36 Tagen 45%.

2. Zur Untersuchung der L-Glutaminsäuredecarboxylase verwendeten wir Homogenate aus Rattenhirn 1:4 in 0,067 M Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 6,8. Die Homogenate wurden unter Kühlung in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator hergestellt.

### Warburg-Versuche

Die Aktivität der L-Dopa- und L-Glutaminsäuredecarboxylase wurde manometrisch in der Warburg-Apparatur bestimmt.

### Ansätze

1. Ohne Vorinkubation. Hauptraum: 1,0 ml Enzympräparat, 0,1  $\mu\text{Mol}$  Pyridoxal-5-phosphat, Inhibitor in wäßriger Lösung, 0,133 M Phosphatpuffer pH 6,8 zu einem Endvolumen von 3,3 ml.

Anhang: 10  $\mu\text{Mol}$  Substrat —  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{N}_2$ -Atmosphäre. Ablesung der gebildeten  $\text{CO}_2$  in 5 min-Abständen bis 60 min. Eine Korrektur für retinierte  $\text{CO}_2$  wurde nicht durchgeführt.

2. Mit Vorinkubation. a) Vorinkubation. 0,1  $\mu\text{Mol}$  PD-5-P, Inhibitor in wäßriger Lösung, 0,133 M Phosphatpuffer pH 6,8 zu einem Endvolumen von 1,0 ml.  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{N}_2$ -Atmosphäre, Zeit 3 Std. Die Vorinkubation fand im Hauptraum der Warburg-Gefäße statt.

b) Hauptversuch. Zu dem Inkubat wurden in den Hauptraum zugegeben 1,0 ml Enzympräparat, 0,133 M Phosphatpuffer pH 6,8 zu einem Endvolumen von 3,3 ml.

Anhang: 10  $\mu$ Mol Substrat. Das Substrat wurde erst 15 min nach der Zugabe des Enzympräparates zugekippt. 37° C, N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Ablesung wie oben.

### Bestimmung des $(I)_{50\%}$ .

Zum Vergleich verschiedener Inhibitoren wurde die Konzentration des Inhibitors während der Vorinkubation bestimmt, die eine Hemmung der nachfolgenden Fermentreaktion um 50% verursacht. Die Hemmung wurde ausgedrückt als Hemmungskoeffizient  $h = \frac{v - v_i}{v}$  ( $\cdot 100 =$  prozentuale Aktivitätsminderung), wobei  $v$  die Anfangsgeschwindigkeit ohne Inhibitor,  $v_i$  diejenige in Gegenwart des Inhibitors bedeutet. Diese prozentuale Hemmung wurde für eine Reihe von Inhibitorkonzentrationen bestimmt, wodurch man eine Kurve wie in Abb. 3b erhält. Trägt man die prozentuale Hemmung als Ordinate gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration als Abszisse auf, so erhält man eine S-förmig gekrümmte Kurve, aus deren Schnittpunkt mit der Ordinate für 50% Hemmung die zugehörige Inhibitorkonzentration abgelesen werden kann. Diese ist im folgenden als  $(I)_{50}$  bezeichnet.

### Substanzen

L-Glutaminsäure (Merck), L-Dopa, Pyridoxal-5-Phosphat-Monohydrat, D-Cycloserin (4-Amino-isoxazolidin-3-on), L-Cycloserin, DL-cis-5-methyl-isoxazolidin-3-on, DL-trans-methyl-isoxazolidin-3-on, 2-5-Bis-(aminoxymethyl)-3,6-dioxopiperazin, Isoniazid (alle Hoffmann-La Roche), Pyridoxal-hydrochlorid (Nutr. Biochemicals Co.), Conteben (p-Acetylaminobenzaldehyd-thiosemicarbazon) (Bayer), Cyanessigsäurehydrazid (Sanabo, Wien).

### Ergebnisse

#### L-Glutaminsäure-Decarboxylase

Abb. 1 zeigt die Decarboxylierung von L-Glutamat durch Rattenhirnhomogenat unter Zusatz von PD-5-P. Wie aus Kurve 1 zu ersehen

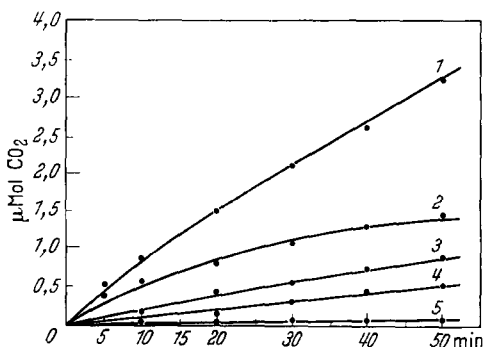


Abb. 1. Hemmung der L-Glutaminsäuredecarboxylase durch D-Cycloserin. Ansätze: Hauptraum: Homogenat aus Rattenhirn 1:4 in 0,067 M-Phosphatpuffer 2,0 ml, Pyridoxal-5-Phosphat 0,02  $\mu$ Mol, D-Cycloserin 0, 5, 10, 20  $\mu$ Mol; Anhang: L-Glutamat 10  $\mu$ Mol; Endvolumen 3,3 ml, 37° C, N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Messung der gebildeten CO<sub>2</sub>. Abszisse: Zeit in min., Ordinate: CO<sub>2</sub> in  $\mu$ Mol. 1 Kontrolle ohne Zusatz von Cycloserin; 2 Homogenat ohne Substratzusatz; 3–5 Ansätze mit steigenden Mengen von Cycloserin

ist, verläuft die CO<sub>2</sub>-Entwicklung nahezu linear über mehr als 50 min. Die hohen Leerwerte im Ansatz ohne Substratzusatz (Kurve 2) beruhen

auf der Anwesenheit von erheblichen Mengen L-Glutamat in Gehirnhomogenaten. Zugabe von D-Cycloserin (Kurven 3—5) zu den Homogenaten reduziert die  $\text{CO}_2$ -Bildung in Abhängigkeit von der Cycloserinkonzentration ( $1,5\text{--}6,0 \cdot 10^{-3}$  M). Dabei wird nicht nur die Decarboxylierung der zugegebenen, sondern auch der endogenen Glutaminsäure gehemmt, was dadurch zum Ausdruck kommt, daß in Gegenwart von Cycloserin die  $\text{CO}_2$ -Entwicklung unter der des Leerwertes liegt. Die zu einer 50%igen Hemmung notwendige Cycloserinkonzentration wurde in anderen Versuchen zu  $3 \cdot 10^{-3}$  M bestimmt.

Bei Vorinkubation des Coenzym mit Cycloserin für 3 Std und nachfolgendem Zusatz von Gehirnhomogenat und Substrat war ebenfalls eine Inhibition zu beobachten, die quantitativ genau der entsprach, die in Versuchen ohne Vorinkubation gemessen wurde. So betrug die Hemmung durch  $1,52 \cdot 10^{-3}$  M D-Cycloserin in einem Experiment ohne Vorinkubation 23%, mit Vorinkubation 20%.

### *L-Dopadecarboxylase*

Der Einfluß des Cycloserin auf die Aktivität der Dopadecarboxylase wurde zuerst an Homogenaten aus Schweinenieren untersucht. Wie aus

Tabelle 1. *Einfluß des D-Cycloserin auf die Aktivität der Dopadecarboxylase verschiedener Enzympräparate*

Ansatz: Homogenat in 0,067 M-Phosphatpuffer pH 6,8 1 ml, Pyridoxal-5-Phosphat und D-Cycloserin wie angegeben, L-Dopa 10  $\mu\text{Mol}$ , 0,067 M-Phosphatpuffer pH 6,8 zu einem Endvolumen von 3,3 ml 37° C,  $\text{N}_2$ -Atmosphäre

	$\mu\text{ Mol CO}_2/10\text{ min}$
Nierenhomogenat, frisch	0,40
Nierenhomogenat, frisch + 0,04 $\mu\text{Mol}$ Pyridoxal-5-Phosphat	6,25
Nierenhomogenat, frisch + 0,04 $\mu\text{Mol}$ Pyridoxal-5-Phosphat + 10 $\mu\text{Mol}$ Cycloserin	6,85
Nierenhomogenat, alt	0,26
Nierenhomogenat, alt + 0,04 $\mu\text{Mol}$ Pyridoxal-5-Phosphat	3,40
Nierenhomogenat, alt + 0,04 $\mu\text{Mol}$ Pyridoxal-5-Phosphat + 10 $\mu\text{Mol}$ Cycloserin	2,72

Tab. 1 zu ersehen ist, wird ohne Zusatz von PD-5-P nur eine kleine Menge  $\text{CO}_2$  entwickelt, Zugabe des Kofementes führt zu einer mehrere 100% betragenden Aktivierung. Die Decarboxylierung verläuft bekanntlich sehr schnell, bereits in den ersten 5 min sind  $> 90\%$  der im gesamten Verlauf entstehenden  $\text{CO}_2$  freigesetzt. Unter diesen Bedingungen hemmte Cycloserin in Konzentrationen bis zu  $1 \cdot 10^{-2}$  M die Gasentwicklung nicht. Wurde jedoch ein infolge Alterung weniger aktives Homogenat verwendet, dann war durch  $3,0 \cdot 10^{-3}$  M D-Cycloserin eine geringe (22%) Hemmung

der Dopadecarboxylase festzustellen. Bei frischen Nierenhomogenaten ließ sich eine Hemmung durch Cycloserin auch dann nicht erzielen, wenn die zugesetzte PD-5-P-Menge von 0—0,1  $\mu\text{Mol}$ /Ansatz variiert wurde.

Eine dreistündige anaerobe Vorinkubation des PD-5-P mit  $1 \cdot 10^{-2}$  M Cycloserin hemmte die nachfolgende Decarboxylierung des Dopa durch Nierenhomogenat um 54%, während — wie oben erwähnt — die gleiche

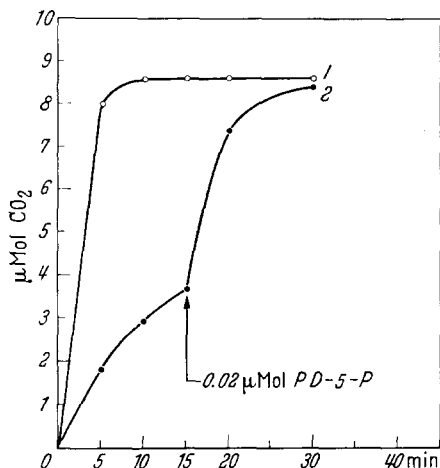


Abb. 2. Aufhebung der Cycloserinhemmung durch Pyridoxal-5-Phosphat. Ansätze: Vorinkubation: 0,02  $\mu\text{Mol}$  Pyridoxal-5-Phosphat, 0 bzw. 10  $\mu\text{Mol}$  D-Cycloserin, 0,067 M-Phosphatpuffer pH 6,8 ad 1,0 ml  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{N}_2$ -Atmosphäre, 3 Std. Hauptversuch: Schweinenierenhomogenat 1:4 in 0,067 M-Phosphatpuffer pH 6,8 2,0 ml, 1. Anhang: 10  $\mu\text{Mol}$  L-Dopa, 2. Anhang: 0,02  $\mu\text{Mol}$  Pyridoxal-5-Phosphat bzw. 0,2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Abszisse: Zeit in min, Ordinate: entwickelte  $\text{CO}_2$  in  $\mu\text{Mol}$ . 1 Vorinkubation ohne, 2 mit Cycloserin. Bei der durch Pfeil gekennzeichneten Zeit Einkippen des PD-5-P

Cycloserinkonzentration ohne Vorinkubation die Fermentreaktion nicht beeinträchtigte. Enthielt unter sonst gleichen Bedingungen der Vorinkubationsansatz neben PD-5-P und Cycloserin auch Nierenhomogenat, war die resultierende Hemmung etwas geringer (45%).

Einen weiteren Hinweis für eine Reaktion des Cycloserin mit dem Coenzym liefert der Versuch der Abb. 2. Hier wurde PD-5-P ohne (Kontrolle 1) und in Gegenwart von  $1,0 \cdot 10^{-2}$  M D-Cycloserin (Kurve 2) vorinkubiert. Es resultierte eine 78,7% betragende Hemmung der Dopadecarboxylase, die durch Einkippen von 0,02  $\mu\text{Mol}$  PD-5-P fast vollständig aufgehoben werden konnte. Der Anstieg

der Zeitumsatzkurve nach Reaktivierung des Enzyms war nahezu identisch mit dem der ungehemmten Reaktion.

Die weiteren Untersuchungen zum Mechanismus und zur Kinetik der Dopadecarboxylasehemmung durch D-Cycloserin wurden mit einem teilweise gereinigten Enzympräparat aus Schweinenieren durchgeführt. Die Warburg-Ansätze entsprachen denen in Methodik unter „Ansätze mit Vorinkubation“ bezeichneten, lediglich der Parameter, dessen Einfluß geprüft werden sollte, wurde variiert.

**1. Reaktionszeit des Pyridoxal-5-phosphat mit Cycloserin.** Mit der Dauer der Vorinkubation des PD-5-P mit Cycloserin nimmt die Hemmung der nachfolgenden Dopadecarboxylierung zu. Dabei besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Fermenthemmung und der

Vorinkubationsdauer in dem geprüften Bereich von 0,5–3 Std, wie sie von DAVISON (1956) auch bei der Inhibition der Dopadecarboxylase durch Isoniazid gefunden wurde.

**2. Cycloserin-Konzentration.** Der Einfluß der Cycloserin-Konzentration während der Vorkinubation bei einer konstant gehaltenen PD-5-P-Kon-

zentration von  $1 \cdot 10^{-4}$  M ist aus Abb. 3a und b ersichtlich. In diesen Versuchen ist die Enzymaktivität der Kontrollansätze (oberste Kurve) so eingestellt, daß die Zeit-Umsatzkurve über die ersten 10–15 min linear verläuft. Cycloserin hemmt in Konzentrationen von  $1 \cdot 10^{-3}$  M bis  $2 \cdot 10^{-2}$  M die nachfolgende Decarboxylierung des Dopa in steigendem Maße. Eine vollständige Hemmung der Gasentwicklung ist auch durch beträchtlich höhere Cycloserin-Konzentrationen nicht möglich. Trägt man die prozentuale Fermenthemmung gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration auf, erhält man eine S-förmig gekrümmte Kurve. Diese Art der Darstellung wird später zum Vergleich verschiedener Inhibitoren und zu kinetischen Berechnungen benützt. Die Kurve der Abb. 3a ist aus den Ergebnissen von sieben Experimenten mit verschiedenen Enzympräparaten berechnet.

**3. Konzentration des PD-5-P.** Bei einer Cycloserinkonzentration von  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M in den Vorinkubationsansätzen nimmt die Hem-

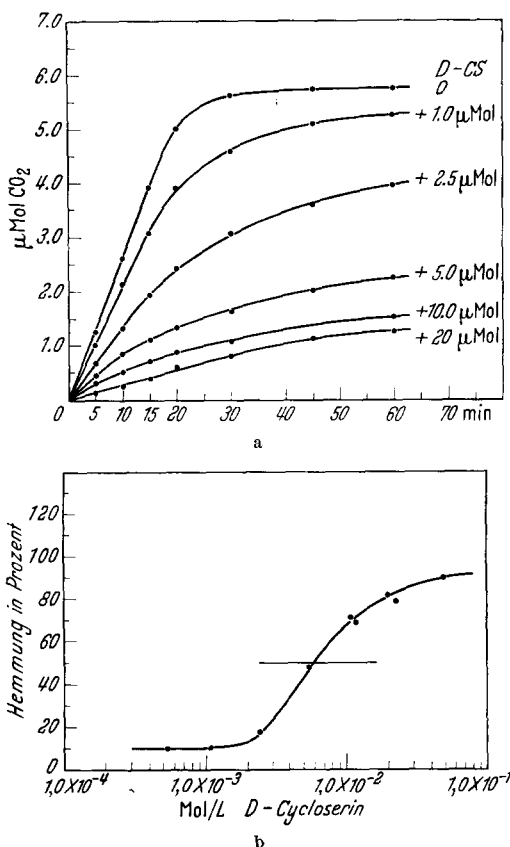


Abb. 3a und b. Hemmung der Dopadecarboxylase in Abhängigkeit von der Konzentration des D-Cycloserins während der Vorinkubation. a Zeit-Umsatzkurven bei wachsenden Zusätzen von D-Cycloserin (1,0–20,0 µMol) 0-Kontrolle ohne Cycloserin. Abszisse: Zeit in min, Ordinate: entwickelte CO<sub>2</sub> in µMol. Ansätze siehe S. 367. — b Diagramm zur Bestimmung des I<sub>50</sub>. Abszisse: Konzentration des D-Cycloserins während der Vorinkubation, Ordinate: Hemmkoeffizient. Ansätze wie in 3a

mung der Dopadecarboxylase mit steigenden Konzentrationen an PD-5-P ab.

PD-5-P	Hemmung
$0,4 \cdot 10^{-5}$ M	72%
$0,2 \cdot 10^{-4}$ M	45%
$1,0 \cdot 10^{-4}$ M	6,4%

4. **Enzymmenge.** Eine Lösung von  $1,0 \cdot 10^{-4}$  M PD-5-P wurde allein und in Gegenwart von  $1,0 \cdot 10^{-2}$  M Cycloserin für 3 Std bei 37° C in N<sub>2</sub>-Atmosphäre vorinkubiert und anschließend mit steigenden Mengen des gereinigten Dopadecarboxylase-Präparates und 10  $\mu$ Mol Dopa versetzt. Die CO<sub>2</sub>-Entwicklung verlief im linearen Bereich der Zeit-Umsatzkurve, wie theoretisch zu erwarten war, der Enzymmenge proportional. Wie nebenstehende Tabelle zeigt, war die Hemmung in den Ansätzen mit Cycloserin, wieder als prozentuale Hemmung ausgedrückt, unabhängig von der Enzymmenge.

Enzymmenge	Hemmung
0,3 ml	58%
0,6 ml	70%
0,9 ml	64%
1,5 ml	64%

5. **Substratmenge.** Werden nach der Vorinkubation von  $1,0 \cdot 10^{-4}$  M PD-5-P mit  $1,0 \cdot 10^{-2}$  M Cycloserin (bzw. H<sub>2</sub>O in den Kontrollen) und Enzym den Ansätzen verschiedene Mengen von L-Dopa als Substrat zugefügt, dann ist in den Kontrollansätzen bis zu 10  $\mu$ Mol Dopa die entwickelte Gasmenge dem Substrat proportional. Bei höheren Substratmengen, macht sich die bekannte Überschußhemmung geltend. Die aus nebenstehender Tabelle ersichtliche Hemmung (Mittelwerte aus drei Versuchen) ist im Bereich von 2,5–10  $\mu$ Mol vom Substrat unabhängig.

Substratmenge	Hemmung
2,5 $\mu$ Mol L-Dopa	50%
5,0 $\mu$ Mol L-Dopa	64%
10,0 $\mu$ Mol L-Dopa	64%

6. **pH während der Vorinkubation.** Der Einfluß des pH während der Vorinkubation des PD-5-P (Konzentration  $1,0 \cdot 10^{-4}$  M) mit Cycloserin wurde aus zwei Gründen untersucht: Einmal kann die Reaktion des Cycloserin mit PD-5-P selbst pH-abhängig sein und zum anderen hängt die Stabilität des Cycloserin vom pH des Mediums ab. Im Bereich von pH 5,0 bis 8,1 war die Fermenthemmung von pH jedoch unabhängig. Sie betrug bei pH 5,0 75%, pH 6,8 70%, pH 8,1 75%.

*Hemmung der Dopadecarboxylase durch Derivate des Isoxazolidon*

Zur Klärung des Hemmungsmechanismus wurden auch einige andere Derivate des Isoxazolidon untersucht. Als Vergleichsbasis diente die zur 50%igen Hemmung der Dopadecarboxylase benötigte Inhibitor-konzentration ( $= I_{50}$ ).

Wie aus Tab. 2 ersichtlich, sind die optischen Isomeren des Cycloserins als Inhibitoren der Dopadecarboxylase gleich wirksam. Von den 5-Methylisoxazolidonen, denen im Vergleich zum Cycloserin die Aminogruppe

Tabelle 2. *Hemmung der L-Dopadecarboxylase durch verschiedene Derivate des Isoxazolidon*

Substanz	( $I_{50}$ ) <sup>1</sup>
L-Cycloserin (4-Amino-isoxazolidin-3-on)	$5,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
D-Cycloserin	$6,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
DL-cis-5-methyl-isoxazolidin-3-on	$1,6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
DL-trans-5-methyl-isoxazolidin-3-on	$3,4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
2,5-Bis-(aminoxymethyl)-1,4-dioxopiperazin	$2,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

<sup>1</sup> Inhibitorkonzentration für 50%ige Hemmung des Enzyms.

an C 4 fehlt, benötigt man für eine gleich starke Hemmung die 2—3,5fache Konzentration. Es ist schwer zu entscheiden, ob zwischen den cis- und trans-Formen ein echter Unterschied besteht, da wegen der Schwerlöslichkeit der trans-Verbindung mit einem Lösungsvermittler gearbeitet werden mußte. Das als Abbauprodukt des Cycloserin untersuchte 2,5-Bis-(aminoxymethyl)-dioxopiperazin ist etwa 20mal wirksamer als Cycloserin und reicht damit an das Hydroxylamin heran, dessen  $I_{50}$   $0,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  beträgt. Mit dieser letzteren Verbindung gelang es in orientierenden Versuchen, auch in vivo eine fast vollständige Hemmung der Dopadecarboxylase zu erreichen.

*Kinetik der Hemmung der Dopadecarboxylase durch D-Cycloserin*

Die kinetische Analyse in der Darstellung nach LINEWEAVER u. BURK (1934) gestattet es im allgemeinen, einen Inhibitor in der Gruppe der kompetitiven oder nicht-kompetitiven Hemmstoffe einzureihen. Entsprechende Versuche mit Cycloserin führten jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis: Die Hemmung der Dopadecarboxylase durch D-Cycloserin ließ sich weder als kompetitiv noch als nicht-kompetitiv beschreiben.

Die Reaktivierbarkeit eines durch Cycloserin gehemmten Fermentansatzes durch PD-5-P (siehe S. 370) sowie die starke Abhängigkeit der Hemmung von der Konzentration des PD-5-P und der Einwirkungs-dauer des Cycloserin auf das Coenzym während der Vorinkubation machten



andererseits einen Angriff des Cycloserin am Coenzym sehr wahrscheinlich. Wäre die Reaktivierbarkeit durch PD-5-P noch mit einer Konkurrenz des PD-5-P und Inhibitors um das Apoenzym zu erklären, so weist die Abhängigkeit der Hemmung vom Logarithmus der Reaktionszeit des PD-5-P mit dem Cycloserin unmittelbar auf eine chemische Reaktion des Inhibitors mit dem Coenzym hin. Diese könnte im einfachsten Fall freies PD-5-P aus dem Gleichgewicht entfernen. Daneben bestünde noch die Möglichkeit, daß die Inhibitor-PD-5-P-Verbindung, ohne selbst coenzymatisch wirksam zu sein, mit dem freien PD-5-P um das Apoenzym konkurriert, dieses teilweise besetzt und in einem enzymatisch unwirksamen Komplex abfängt.

Für die beiden analogen Fälle, in denen ein Inhibitor chemisch mit dem Substrat reagiert und dadurch entweder nur dessen Konzentration vermindert (Fall a) oder als Substrat-Inhibitor-Komplex um das Enzym konkurriert (Fall b), ist von REINER (1959) eine theoretische Behandlung gegeben worden. Diese kann für die hier vorliegenden Verhältnisse angewandt werden, wenn für die Enzymkonzentration diejenige des Apoenzyms (A) und an Stelle der Substratkonzentration (S) die des Coenzym (C) eingesetzt wird, da die zugrunde liegenden Annahmen und die formale mathematische Behandlung dieselben sind.

Eine Entscheidung, ob einer der eben erwähnten Hemmungsmechanismen und welcher von beiden vorliegt, läßt sich am einfachsten aus einer graphischen Darstellung treffen, in der  $I_t$  gegen  $\frac{i}{1-i}$  aufgetragen wird, wobei

$I_t$  = Totalkonzentration des Inhibitors (die gleich der Initialkonzentration desselben ist) und

$$i = \frac{V_0 - V_t}{V_0}$$

( $V_0$  = Anfangsgeschwindigkeit ungehemmt,  $V_t$  = Anfangsgeschwindigkeit gehemmt) ist.

*Fall a).* Bei bloßer Verminderung des freien Coenzym durch chemische Reaktion mit dem Inhibitor resultiert eine aus dem 0-Punkt entspringende, nach oben konvexe Kurve, die später in eine Gerade übergeht, deren Verlängerung nicht durch 0 geht.

*Fall b).* Wenn die Konkurrenz des Coenzym-Inhibitor-Komplexes mit dem freien Coenzym der entscheidende Mechanismus ist, so ergibt die graphische Darstellung eine durch den 0-Punkt gehende Gerade.

Wie Abb. 4, die aus Abb. 3a, b durch bloße Umformung erhalten wurde, zeigt, entspricht die Hemmung der Dopadecarboxylase durch D-Cycloserin dem Fall b. Es sei besonders darauf hingewiesen, daß die von der Theorie zu fordernde lineare Abhängigkeit über einen sehr weiten Konzentrationsbereich des Inhibitors gefunden wurde (wieweit die Abweichungen bei kleinen Inhibitor-Konzentrationen reell oder durch die hier größere Streuung der Einzelversuche bedingt sind, läßt sich nicht entscheiden). Damit scheint folgender Hemm-Mechanismus bewiesen zu sein: D-Cycloserin reagiert in nicht-enzymatischer Reaktion mit PD-5-P

und das sich bildende Reaktionsprodukt konkurriert mit dem restierenden freien PD-5-P um das Apoenzym. Die verminderte Bildung des enzymatisch wirksamen Holoenzym ist die Ursache für die „scheinbare“ Aktivitätsminderung der Dopadecarboxylase.

Die der obigen graphischen Darstellung zugrunde liegende Gleichung ist:

$$I_t = \frac{(K_a + C)(K_c + C)K_i}{K_a C} \cdot \frac{i}{1-i} \quad (1)$$

(Bedeutung der zusätzlichen Symbole, siehe auch S. 374:  $C$  Konzentration des Coenzym,  $K_a$  Gleichgewichtskonstante der Reaktion Apoenzym + PD-5-P  $\rightleftharpoons$  Holoenzym,  $K_c$  Gleichgewichtskonstante der Reaktion Coenzym + Inhibitor  $\rightleftharpoons$  Coenzym-Inhibitor,  $K_i$  Gleichgewichtskonstante Apoenzym + Coenzym-Cycloserin  $\rightleftharpoons$  inaktives Enzym.)

Von den in der Gleichung enthaltenen Konstanten wurde  $K_a$  zu  $0,45 \cdot 10^{-6}$  M bestimmt<sup>1</sup>. Die Gleichgewichtskonstante  $K_i$  der Reaktion  $A + CI \rightleftharpoons ACI$  ließe sich berechnen, wenn diejenige der Reaktion  $C + I \rightleftharpoons CI$  bekannt wäre. Es wurde deshalb versucht, (siehe unten), diese Konstante zu bestimmen und dabei ein Wert von  $2,2 \cdot 10^{-3}$  M gefunden. Durch Umformung der Gleichung (1) ergibt sich:

$$K_i = \frac{I_t}{\frac{i}{1-i}} \cdot \frac{K_a C}{(K_a + C)(K_c + C)} \quad (2)$$

Das Verhältnis von  $I_t / \frac{i}{1-i}$  kann aus den Daten der Abb. 4 berechnet werden und beträgt im Mittel 50. Unter Einsetzen der Coenzym-

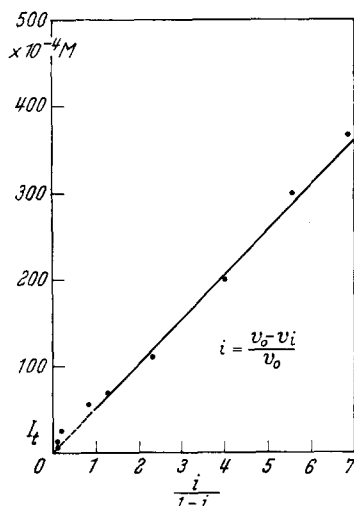


Abb. 4. Graphische Darstellung nach REINER zum Nachweis der Inhibitoreigenschaft der Cycloserin-Pyridoxal-5-Phosphat-Verbindung. Erklärung siehe Text

<sup>1</sup> Warburg-Ansätze. Dopadecarboxylase-Präparat 1,0 ml, PD-5-P 0–0,1  $\mu$ Mol, 0,067 M Phosphatpuffer pH 6,8 zu einem Endvolumen von 3,3 ml. Anhang: 10  $\mu$ Mol L-Dopa.  $N_2$ -Atmosphäre, 37,0° C. Zur Bestimmung des  $K_a$  wurde nach LINEWEAVER-BURK  $1/V$  ( $V$  = Anfangsgeschwindigkeit der Decarboxylierung) gegen  $1/$ PD-5-P aufgetragen. Eine Schwierigkeit liegt darin, daß das Dopadecarboxylase-Präparat („Apoenzym“) auch ohne PD-5-P-Zusatz eine gewisse Restaktivität aufweist. Für die Berechnung der tatsächlichen PD-5-P-Konzentration war deshalb auf eine 0-Aktivität extrapoliert und durch Koordinatentransformation dieser 0-Punkt mit der Coenzymkonzentration = 0 zur Deckung gebracht worden. Die umgeformten Meßwerte liegen dann ausgezeichnet auf einer Geraden.

konzentration ( $1,0 \cdot 10^{-4}$  M) ergibt sich für  $K_i$  (= Gleichgewichtskonstante des Apoenzym-Inhibitor-Komplexes) ein Wert von  $0,32 \cdot 10^{-5}$  M.

Auf Grund dieser Vorstellungen werden auch die Unterschiede in der Hemmbarkeit der Dopa- und Glutaminsäurecarboxylase und die Bedeutung der Vorinkubation erklärbar. Die Bildungsgeschwindigkeit des Cycloserin-PD-5-P-Komplexes ist (siehe S. 370) relativ langsam verglichen mit der Reaktion Apoenzym + PD-5-P  $\rightleftharpoons$  E und der nachfolgenden Decarboxylierung des Dopa. Wird deshalb einem Ansatz von Apoenzym + PD-5-P + Cycloserin unmittelbar das Dopa zugesetzt, so ist die

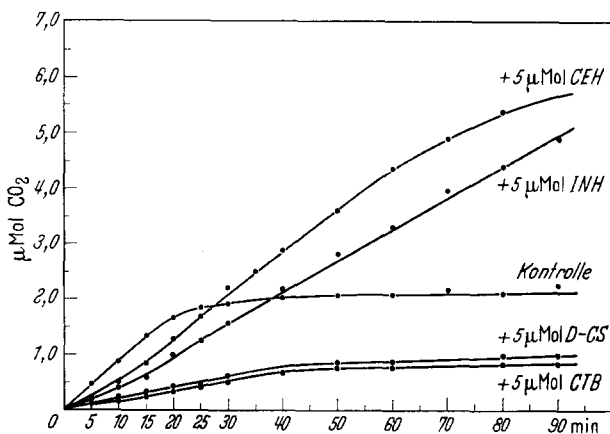


Abb. 5. Vergleich der Hemmung der Dopadecarboxylase durch D-Cycloserin, INH, Cyanessigsäurehydrazid und Conteben. Abszisse: Zeit in min, Ordinate:  $\text{CO}_2$ -Entwicklung in  $\mu\text{Mol}$ . Ansätze: Vorinkubation: Pyridoxal-5-Phosphat 0,02  $\mu\text{Mol}$ , Inhibitor 5  $\mu\text{Mol}$ , 0,067 M-Phosphatpuffer pH 6,8 ad 1,0 ml,  $\text{N}_2$ -Atmosphäre,  $37^\circ\text{C}$ , Zeit 3 Std. Hauptversuch: Dopadecarboxylase-Präparat 0,4 ml 0,067 M-Phosphatpuffer pH 6,8 zu einem Endvolumen von 3,3 ml, L-Dopa 10  $\mu\text{Mol}$

Decarboxylierung des Dopa weit schneller als die Bildung des tatsächlichen Hemmstoffes aus PD-5-P und Cycloserin und eine Hemmung deshalb nicht nachzuweisen, während bei der Vorinkubation sich genügende Mengen des Inhibitors bilden können. Ohne Vorinkubation sind es demnach nicht nur die Gleichgewichtsbeziehungen der verschiedenen Reaktionen zwischen A, C und I, die das Ausmaß der Hemmung bestimmen, sondern in erster Linie die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion  $C + I \rightleftharpoons CI$ . Die Bindung des CI-Komplexes an das Apoenzym scheint ebenso wie die des freien PD-5-P so schnell zu erfolgen, daß sie nicht zum rate-limiting-Schritt wird. Die Decarboxylierung der Glutaminsäure dagegen verläuft so langsam, daß schon während dieser Zeit genügend CI gebildet werden kann, um die Konzentration des Coenzym und die Enzymaktivität zu vermindern. Für die Glutaminsäuredecarboxylase wurde keine kinetische Analyse durchgeführt und es ist deshalb noch unentschieden, ob auch hier der für Cycloserin geforderte Hemmungs-

mechanismus vorliegt oder ob lediglich die Verminderung der Coenzymkonzentration der maßgebende Faktor ist.

Der weitere zeitliche Verlauf der Cycloserinhemmung ist aus den Versuchen der Abb. 5 zu erkennen, in denen die Hemmwirkung des D-Cycloserin mit der anderer Inhibitoren der Dopadecarboxylase verglichen wurde. Im Gegensatz zu den Hydraziden, die nach einer Phase anfänglicher Hemmung die Decarboxylierung des Dopa aktivieren, wirkt D-Cycloserin ebenso wie das Thiosemicarbazon-Derivat Conteben über die gesamte Versuchsdauer inhibitorisch. Dies ist nicht durch die stärkere Hemmung äquimolarer Konzentrationen der Substanzen der zweiten Gruppe bedingt, da auch Cycloserin-Konzentrationen, die zu einer wesentlich schwächeren Hemmung führen, niemals die zweiphasische Wirkung mit späterer Aktivierung zeigten. Daraus läßt sich schließen, daß die Verbindung des PD-5-P mit Cycloserin wesentlich stabiler ist als die PD-5-P-Hydrazone, auf deren hydrolytischer Spaltung die Aktivierungsphase des Isoniazids auf die Dopadecarboxylase beruht (PALM 1958).

#### *Bestimmung der Gleichgewichtskonstante $K_e$ der Reaktion des Cycloserin mit PD-5-P*

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante  $K_e$  der Reaktion des PD-5-P mit Cycloserin ist in einem gegebenen Ansatz die Kenntnis der Konzentrationen des unveränderten PD-5-P und Cycloserin sowie des Reaktionsproduktes nötig. Bei Annahme einer bimolekularen Reaktion, die dadurch gerechtfertigt ist, daß aus den Ansätzen äquimolare Mengen von PD-5-P und Cycloserin verschwinden, kann die Konzentration des Reaktionsproduktes dem Schwund an PD-5-P bzw. Cycloserin gleichgesetzt werden. Dadurch war eine Bestimmung dieser Konstante möglich, da die Konzentration des PD-5-P spektrophotometrisch bei 390 m $\mu$ , die des Cycloserin nach der Methode von JONES (1956) colorimetrisch gemessen werden konnte.

In Experimenten mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen beider Komponenten wurde für  $K_e$  ein Mittelwert von  $2,2 \cdot 10^{-3}$  M bestimmt.

#### **Besprechung der Ergebnisse**

1. Die Hemmung der Dopadecarboxylase durch Carbonylreagentien wurde bisher wie die anderer PD-5-P-abhängiger Enzyme dadurch erklärt, daß durch die Reaktion der Aldehydgruppe des PD-5-P mit dem Inhibitor entweder ein Teil des bereits gebildeten Holoenzym inaktiviert wird, oder daß infolge dieser Reaktion weniger Coenzym zur Bildung des Holoenzym zur Verfügung steht. Bei der Durchsicht der Literatur fällt auf, wie wenige diesbezügliche kinetische Studien vorliegen (DAVISON 1956;

PALM 1958). Nach unseren Untersuchungen beruht die Hemmung der Dopadecarboxylase durch CS darauf, daß zwar der Inhibitor ebenfalls mit PD-5-P reagiert, daß aber die eigentliche Hemmung auf die Konkurrenz dieses Reaktionsproduktes, das in einer folgenden Mitteilung chemisch näher charakterisiert wird, mit dem freien PD-5-P um das Apoenzym zurückzuführen ist. Es erscheint möglich, daß dieser für CS gefundene Hemmungstyp auch für andere, bisher kinetisch nicht untersuchte Beispiele einer Hemmung des als Dopadecarboxylase nicht mehr ganz ausreichend bezeichneten Enzyms (WESTERMANN, BALZER u. KNELL 1958; UDENFRIEND, LOWENBERG u. WEISSBACH 1960) und auch für andere Aminosäuredecarboxylasen zutrifft. In diesem Sinne sprächen kinetisch nicht näher analysierte Einzelbefunde, wie die Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylase durch Inkubate aus PD-5-P mit verschiedenen Aminen (HOLTZ u. WESTERMANN 1958) sowie die Hemmung der Dopadecarboxylase durch das aus Dopamin und PD-5-P entstehende Tetrahydroisochinolin-Derivat (WERLE u. AURES 1959).

2. Die an sich schon schwierige Frage eines Zusammenhanges zwischen biochemischen Befunden und Wirkungen auf das Zentralnervensystem wird beim CS noch dadurch erschwert, daß wegen der ungewöhnlich großen Speziesabhängigkeit der Verweildauer dieser Substanz im Organismus (CONZELMAN 1956; COLETOS et al., 1957) Untersuchungen an den üblichen Laboratoriumstieren nicht repräsentativ für die Klärung der am Menschen beobachteten Phänomene — Krämpfe und Psychosen — sein können. Immerhin läßt sich zumindest näherungsweise berechnen, ob beim Menschen mit CS in therapeutischer Dosis eine intravitale Enzymhemmung möglich ist. Nimmt man die Konzentration des CS im Gehirn zu ungefähr 20  $\gamma$ /g an, wie sie bei Primaten (COLETOS et al. 1957) gemessen wurden, die hinsichtlich der biologischen Halbwertszeit des CS dem Menschen am ehesten entsprechen und die Konzentration des PD-5-P zu  $4,1 \cdot 10^{-6}$  M/g (BAIN u. WILLIAMS 1960), so errechnet sich unter Einsetzen der Konstanten für  $K_a$ ,  $K_c$  und  $K_d$  in die üblichen Formeln für kompetitive Inhibition eine Hemmung der Dopadecarboxylase im Gehirn von ungefähr 80%. Eine entsprechende Berechnung läßt sich für die Glutamatdecarboxylase vorerst noch nicht durchführen, doch dürfte die Hemmung aus verschiedenen Gründen eher noch größer sein. Dies erscheint insofern wichtig, als sich damit die nach CS-Verabreichung in so großer Häufigkeit beobachteten generalisierten Krampfanfälle auf eine Störung des Glutaminsäure/ $\gamma$ -Aminobuttersäurestoffwechsels beziehen ließen.

Wenn auch heute der GABA-Spiegel im Gehirn nicht mehr direkt mit der cerebralen Krampfschwelle korreliert werden darf, so weist doch andererseits eine Hemmung des GABA-Umsatzes kausale Beziehungen zur Krampfbereitschaft auf (BALZER, HOLTZ u. PALM 1960; ROBERTS 1960; TOWER 1960; DENGLER 1961). Die Hemmung der  $B_6$ -abhängigen Glutaminsäuredecarboxylase als Teilursache der nach

CS beobachteten Krampfanfälle würde außerdem erklären, daß diese bevorzugt bei schwerkranken Patienten sowie nach einiger Latenz auftreten und bei Trinkern, da hier schon an sich ein relativer  $B_6$ -Mangel bestehen kann, und daß andererseits gleichzeitige Verabreichung von Pyridoxin während der Cycloserintherapie die Krampfhäufigkeit eindeutig senkt (DUMONT 1957; ROBITZEK u. a. 1957; EPSTEIN u. Mitarb. 1958/59).

Bei einigen Patienten führten wir unter der Cycloserintherapie (1,25 g/die) eine Tryptophanbelastung (10 g per os) durch, und fanden keine vermehrte Ausscheidung von Xanthurensäure (Methode WACHSTEIN u. GUDAITE 1952). Dies darf jedoch nicht als Gegenbeweis gegen einen Angriff des CS an  $B_6$ -abhängigen Enzymen gewertet werden, da auch beim Isoniazid, dessen Polyneuritis auf einem lokalen  $B_6$ -Mangel beruht, dieser Test negativ sein kann.

Wieweit die psychopharmakologischen Wirkungen des CS auf einer Hemmung der mit den biogenen Aminen des Gehirns korrelierten Aktivität der Dopadecarboxylase beruhen können, läßt sich vorerst noch nicht entscheiden.

### Summary

1. D-Cycloserine, an antibiotic produced by different strains of *Streptomyces*, to which frequent side effects on the central nervous system—particularly seizures and psychotic reactions—are attributed, inhibits the pyridoxal-5-phosphate dependent enzymes L-glutamic acid- and L-dopadecarboxylase in vitro. Additional data for some structurally related isoxazolidones are presented, among which 2,5-bis-(aminoxymethyl)-1,4-dioxopiperazine, a spontaneous degradation product of D-cycloserine, was the most active compound.

2. It can be demonstrated by kinetic analysis, that the inhibition of the L-dopadecarboxylase is due to competition of the coenzymatically inactive (pyridoxalphosphate-cycloserine)-complex with the free pyridoxal-5-phosphate for the apoenzyme thus diminishing the formation of the active holoenzyme. Numerical figures for the different equilibrium constants are given.

3. The implications of these findings for the central nervous toxicity of D-cycloserine are discussed.

Herrn Dr. J. R. GILLETTE, Nat. Inst. of Health, Bethesda, USA, danke ich für die anregende Diskussion kinetischer Probleme.

### Literatur

- AOKI, T.: Experimental studies on the mode of action of cycloserin. *Kekkaku* **32**, 418, 544, 605 (1957).  
BAIN, J. A., and H. L. WILLIAMS: Concentration of  $B_6$ -vitamers in tissues and tissue fluids. In: Roberts, E. (1960).  
BALZER, H., P. HOLTZ u. D. PALM: Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der konvulsiven Wirkung von Hydraziden. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **238**, 520 (1960).

- COLETOS, P. J., J. BRETEY, M. J. LAROCHE, E. ORIOU et N. DE REGEL: Répartition de la cycloserine dans le sérum et les viscères chez le chimpanzé, le rhésus, le cynocéphale, le papion, le lapier, le cobaye et la poule. *Ann. Inst. Pasteur* **93**, 563 (1957).
- CONZELMAN, G. M. J.: The physiologic disposition of cycloserine in the human subject. *Amer. Rev. Tuberc.* **74**, 739 (1956).
- CONZELMAN, G. M. J., and R. K. JONES: On the physiologic disposition of cycloserine in experimental animals. *Amer. Rev. Tuberc.* **74**, 802 (1956).
- CRANE, G. E.: Cycloserine as an antidepressant agent. *Amer. J. Psychiat.* **115**, 1025 (1957).
- DAVISON, A. N.: The mechanism of the inhibition of decarboxylases by isonicotinylhydrazide. *Biochim. biophys. Acta* **19**, 131 (1956).
- DENGLER, H. J.: Die biochemischen Grundlagen der Neuro- und Psychotoxizität des D-Cycloserin und anderer Tuberculostatika. *Habil.-Arbeit. Heidelberg* 1961.
- DE SIMONE, G., u. V. NANNARELLI: Sui disturbi del sistema nervoso da cicloserina. *Lotta c. Tuberc.* **27**, 1250 (1957).
- DUMON, M. G.: Nouveaux antibiotiques et tuberculose pulmonaire. *Presse méd.* **65**, 1765 (1957).
- EPSTEIN, I., K. G. S. NAIR and L. J. BOYD: Cycloserine, a new antibiotic in the treatment of human pulmonary tuberculosis. *Antibiot. Med.* **1**, 30 (1955).
- EPSTEIN, I. G., K. G. NAIR, M. G. MULINOS and A. HABER: Pyridoxine and its relation to cycloserine neurotoxicity, a pharmacological and clinical study. *Antibiot. Ann.* **1958/59**, 472.
- FREERKSEN, E., E. KRÜGER-THIEMER and M. ROSENFELD: Cycloserin (D-4-Amino-isoxazolidin-3-on). *Antibiot. et Chemother. (Basel)* **6**, 303 (1959).
- FREERKSEN, E., R. BÖNICKE u. B. LISBOA: Über das Verhalten von Cycloserin in vivo. *Tuberk.-Arzt* **12**, 39 (1958).
- HEIN, J., u. H. BERTHOLD: Zur Cycloserin-Therapie. *Schweiz. Z. Tuberk.* **16**, 292 (1959).
- HIDY, PH. H., E. B. HODGE, V. V. YOUNG, R. L. HARNED, G. A. BREWER, W. F. PHILLIPS, W. F. RUNGE, H. E. STAVELY, A. POHLAND, H. BOAZ and H. R. SULLIVAN: Structure and reactions of Cycloserine. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 2345 (1955).
- HOLTZ, P., u. E. WESTERMANN: Hemmung der Glutaminsäuredecarboxylase des Gehirns durch Brenzkatechinderivate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **231**, 311 (1957).
- JONES, L. R.: Colorimetric determination of cycloserin, a new antibiotic. *Analyt. Chem.* **28**, 39 (1956).
- KUEHL, F. A., F. J. WOLF, N. K. TRENNER, R. L. PECK, R. P. BUHS, I. PUTTER, R. ORMOND, J. E. LYONS, L. CHATET, B. D. HUNNEWELL, G. DOWNING, E. NEWSTEAD and K. FOLKERS: D-4-Amino-3-isoxazolidone, a new antibiotic. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 2344 (1955).
- LINEWEAVER, H., and D. BURK: *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
- MCCORMICK, D. B., and E. E. SNELL: Pyridoxal kinase of human brain and its inhibition by hydrazine derivatives. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 1371 (1959).
- MURRAY, F. J.: A pilot study of cycloserine toxicity. A United States PHS Cooperative Clinical Investigation (1956).
- PALM, D.: Über die Hemmung der Dopa-decarboxylase durch Isonicotinsäurehydrazid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **234**, 206 (1958).
- REINER, J. M.: Behavior of enzyme systems. Minneapolis; Burges Publishing. Comp. 1959.

- ROBERTS, E.: Inhibition in the nervous system and  $\gamma$ -aminobutyric acid. London: Pergamon 1960.
- ROBITZEK, E. H., e P. K. NENASHER: Toxicidad de la cicloserina en el tratamiento de la tuberculosis en humanos, con referencia al uso de la piridoxina. *Rev. mex. tuberc.* **18**, 553 (1957).
- SHULL, G. M., and J. L. SARDINAS: PA-94, an antibiotic identical with D-4-amino-isoxazolidinon (cycloserine, oxamycin). *Antibiot. and Chemother.* **5**, 389 (1955).
- TOWER, D. B.: Neurochemistry of epilepsy. Springfield: Ch. C. Thomas Publ. 1960.
- UDENFRIEND, S., W. M. LOVENBERG and H. WEISSBACH: L-amino acid decarboxylase activity in mammalian tissues and its inhibition by  $\alpha$ -methyldopa. *Fed. Proc.* **19**, 7 (1960).
- VALLADE, L., H. HUGONENQ et J. P. JUDE: La neurotoxicité de la cyclosérine mise au point de ses manifestations cliniques et électroencéphalographiques d'après 30 publications françaises. *Presse méd.* **67**, 138 (1959).
- WACHSTEIN, M., and A. GUDAITIS: Detection of vitamin B<sub>6</sub> deficiency. *Amer. J. clin. Path.* **22**, 652 (1952).
- WERLE, E., u. D. AURES: Über die Reinigung und Spezifität der Dopa-Decarboxylase. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **316**, 45 (1959).
- WESTERMANN, E., H. BALZER u. J. KNELL: Hemmung der Serotoninbildung durch  $\alpha$ -Methyl-Dopa. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **234**, 194 (1958).
- YAMADA, K., S. SAWAKI and S. HAYAMI: Inhibition effects of cycloserine on some enzyme activities related to vitamin B<sub>6</sub>. *J. Vitaminol.* **3**, 68 (1957).

Privatdozent Dr. HANS J. DENGLER, Ludolf Krehl-Klinik, 69 Heidelberg,  
Bergheimer Str. 58