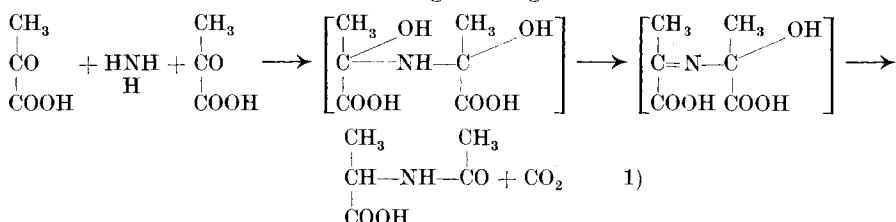


15. Über das Verhalten des Octopins zu Fermenten

von P. Karrer, H. Koenig und R. Legler.

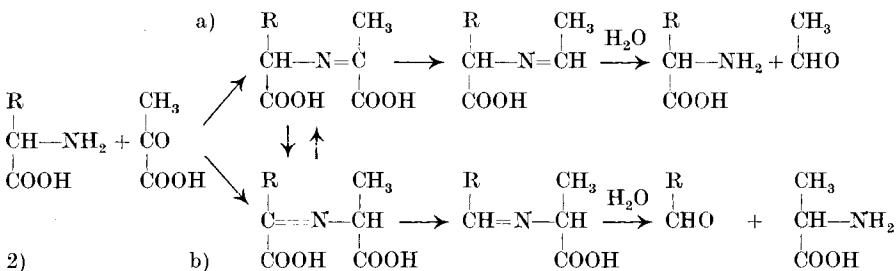
(16. IX. 40.)

E. Erlenmeyer jun. und Kunlin¹⁾ sowie de Jong²⁾ haben vor 40 Jahren gezeigt, dass beim gelinden Erwärmen von α -Ketocarbon-säuren mit Ammoniumcarbonat acylierte Aminosäuren in guter Ausbeute entstehen. Die Reaktion lässt sich bei Verwendung von Brenztraubensäure als Ketoverbindung in folgender Weise formulieren:



Im Endeffekt führt die Reaktionsfolge somit zur Aminierung von 1 Mol der Ketosäure, während eine zweite Ketonsäuremolekel reduzierend wirkt und die Acetylgruppe liefert.

Lässt man statt Ammoniak eine α -Aminosäure mit einer α -Ketosäure in der Hitze (Kochen) reagieren, so bilden sich nach Herbst³⁾ Aldehyde; diese sind Spaltprodukte intermediär auftretender Schiff'scher Basen. Eine Reduktion findet bei dieser Umsatzfolge offensichtlich nicht statt:



Da zwei verschiedene Aldehyde gebildet werden, scheint nach Herbst unter den Bedingungen des Umsatzes eine Umlagerung der Schiff'schen Base a) in b) und vice versa möglich zu sein.

Nach den Arbeiten von Braunstein⁴⁾ finden in der Zelle Ummaminierungen von Aminosäuren statt. Diese Reaktionen spielen

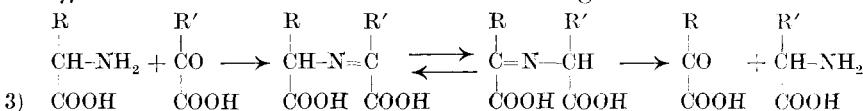
¹⁾ A. 307, 146 (1899); B. 35, 2438 (1902).

²⁾ R. 19, 259 (1900).

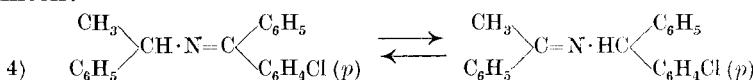
³⁾ Am. Soc. 58, 2239 (1936); J. Biol. Chem. 107, 505 (1934).

⁴⁾ A. E. Braunstein, M. G. Kritzmann, Enzymologia 2, 129 (1937); Braunstein, Gorky, Nature 143, 609 (1939); Braunstein, Enzymologia 7, 25 (1939).

sich zwischen α -Aminocarbonsäuren und Ketosäuren ab (wobei die eine oder andere Komponente nach *Braunstein* eine Dicarbonsäure sein muss) und verlaufen nach der Theorie *Braunstein's* über *Schiff'sche* Basen; es wird angenommen, dass in der *Schiff'schen* Base unter der Wirkung eines Ferments „*Aminopherase*“ eine Verlagerung der Doppelbindung eintritt, worauf die hydrolytische Spaltung der neuen *Schiff'schen* Base eine neue Aminosäure ergibt:

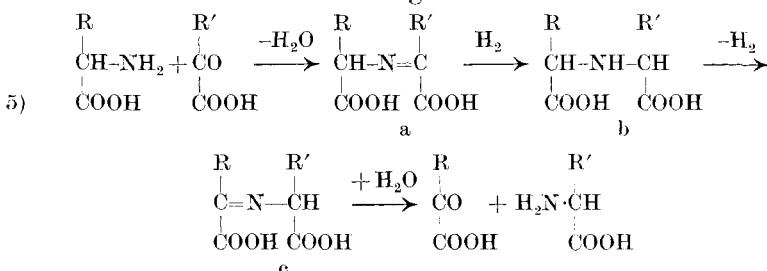


Dass solche Umlagerungen *Schiff'scher* Basen möglich sind, wird durch die oben erwähnten *in vitro*-Versuche von *Herbst* bewiesen, sowie durch Beobachtungen von *Ingold* und *Wilson*¹⁾, die eine gegenseitige Umlagerung der beiden nachstehenden Ketimide erzielen konnten:



Sowohl in den Versuchen von *Herbst* wie jenen von *Ingold* und *Wilson* erfordert die Umlagerung allerdings längeres Erhitzen, evtl. Zusatz von Natriumäthylat²⁾.

Es schien uns möglich, dass sich Uraminierungen von Aminosäuren noch auf andere Weise vollziehen könnten, und zwar durch primäre Hydrierung und darauffolgende Dehydrierung *Schiff'scher* Basen im Sinn der Reaktionsfolge:



Wenn man diesen Reaktionen biologische Bedeutung beimesse will, muss gezeigt werden, dass α, α' -Imido-dicarbonsäuren vom Typus b) durch die Zelle dehydriert und *Schiff'sche* Basen der Struktur a) und c) hydriert werden können.

Letztere Reaktion, d. h. die Hydrierung, wird z. Z. in unserem Laboratorium untersucht; dass diese Umsetzung tatsächlich biologischer Natur ist, geht aber schon aus der Bildung des Octopins³⁾

¹⁾ Soc. 1933, 1493; 1934, 93.

²⁾ K. Morizawa, Acta Scholae med. Univ. imp. Rioto 9, 285 (1927). Vgl. Suzuki, Yoshimura, Yamakawa, Jrie, Z. physiol. Ch. 62, 1 (1909) und S. Akasi, C. 1938, I, 1131.

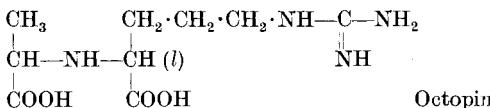
³⁾ Z. physiol. Ch. 217, 191 (1933); 218, 157 (1933); Biochem. J. 29, 1620, 1951 (1935).

im Octopodenmuskel hervor, die man sich nicht anders als durch Hydrierung einer *Schiff'schen* Base, die aus Arginin und Brenztraubensäure entstand, vorstellen kann.

Nach den bekannten Untersuchungen von *Krebs*¹⁾ gibt es ein lösliches Oxydationsferment, welches die Antipoden der natürlichen Aminosäuren, die *d*-Aminosäuren, oxydativ desaminiert. Nach neueren Feststellungen²⁾ dürften sogar mehrere solche Fermente existieren, die auf verschiedene Aminosäuren abgestimmt sind³⁾. Die prosthetische Gruppe eines auf *d*-Alanin, *d*-Prolin, *d*-Methionin, *d*-Leucin, *d*-Isoleucin, *d*-Phenylalanin u. a. m. eingestellten Fermentes ist das Lactoflavin-adenin-nucleotid⁴⁾. *Keilin* und *Hartree*⁵⁾ zeigten hierauf, dass auch N-Monoalkyl-aminoäuren der *d*-Reihe durch *d*-Aminosäure-oxydase unter Bildung von Aminen oxydiert werden und *Krebs*⁶⁾ wies nach, dass das Ferment auch *d*(+)-Prolin angreift und zur α -Keto- δ -aminovaleriansäure aufspaltet.

Das die natürlichen Aminosäuren desaminierende Ferment scheint fester an die Gewebe gebunden zu sein. Schnitte und Brei von Leber und Niere können nach den Befunden von *Krebs*⁷⁾ *l*-Aminosäuren oxydativ desaminieren. Die Wirkung ist aber schwächer als diejenige der *d*-Aminosäure-oxydase. *H. v. Euler*⁸⁾ hat in wichtigen Untersuchungen gezeigt, dass diese Desaminierung im Fall der *l*(+)-Glutaminsäure reversibel ist und dass Dihydro-cozymase Iminoglutarsäure zu Glutarsäure hydriert.

Zum Studium der Dehydrierung von α , α' -Imino-dicarbonsäuren haben wir zuerst das Octopin, für dessen Überlassung wir Herrn Prof. *Knoop* und Herrn Dr. *Martius* wiederholt verbindlichst danken, der Einwirkung der *d*-Aminosäure-oxydase ausgesetzt. Octopin (Formel nachstehend) besitzt in seinem Argininteil unzweifelhaft



l-Konfiguration, da es aus natürlichem *l*-Ornithin dargestellt worden ist. Über die Konfiguration der Alaninkomponente besteht dagegen keine Sicherheit, da die beiden bekannten Octopinsynthesen (aus *l*-Ornithin und α -Brompropionsäure [*Akasi*⁹⁾] und aus *l*-Ornithin und Brenztraubensäure [*Knoop* und *Martius*¹⁰⁾]) darüber nicht Auf-

¹⁾ Z. physiol. Ch. **217**, 191 (1933); **218**, 157 (1933); Biochem. J. **29**, 1620, 1951 (1935).

²⁾ P. Karrer, H. Frank, Helv. **23**, 948 (1940). ³⁾ Helv. **23**, 948 (1940).

⁴⁾ O. Warburg, W. Christian, Bioch. Z. **298**, 150 (1938); P. Karrer, Frei, Ringier, Bendas, Helv. **21**, 826 (1938).

⁵⁾ Proc. Roy. Soc. [B] **119**, 114 (1936).

⁶⁾ Enzymologia **7**, 53 (1939). ⁷⁾ Biol. J. **29**, 1620 (1935).

⁸⁾ H. v. Euler, E. Adler, G. Günther, N. B. Das, Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1938).

⁹⁾ J. Biochemistry **25**, 281, 291 (1937); C. **1938** I, 1133, 1134.

¹⁰⁾ Z. physiol. Ch. **258**, 238 (1939).

schluss geben können. Akasi vermutet allerdings aus dem Studium des optischen Verhaltens (Ermittlung von Drehwertskurven), dass auch die Alaninkomponente des Octopins *l*-Konfiguration besitzt, doch ist diese Schlussfolgerung nicht unbedingt sicher.

Octopin wird durch *d*-Aminosäure-dehydrase auch nicht spurenweise angegriffen; dagegen lässt es sich durch Leberbrei, der die *l*-Aminosäure-dehydrase enthält, dehydrieren. Unter der Voraussetzung, dass in dem hier wirksamen Ferment eine *l*-Aminosäure-dehydrase vorliegt, wird dadurch sehr wahrscheinlich gemacht, dass auch die Alaninkomponente dieser Verbindung *l*-Konfiguration besitzt.

Als *l*-Aminosäure-oxydasepräparat haben wir ganz frischen Leberbrei verwendet. In parallelen Ansätzen wurde die Wirkung des Ferments auf *l*(+)-Alanin und *l*(-)-Asparaginsäure untersucht.

Das Resultat dieser Messungen ist das, dass Octopin eben so schnell wie *l*(+)-Alanin und *l*(-)-Asparaginsäure dehydriert wird.

Versuchsanordnung.

Die Messungen wurden im Warburg-Apparat ausgeführt.

Im Seitenansatz: 0,3 cm³ 30-proz. Kalilauge.

Im Hauptgefäß: 5,0 mg Aminosäure in 2,0 cm³ Phosphatpuffer p_H 7,6

+ 0,5 g frischer Schweineleberbrei in 2,0 cm³ Phosphatpuffer (p_H ~ 7,6)

+ einige Körnchen Thymol

Reaktionstemperatur 38,9°.

Da bei Verwendung von Organbrei als *l*-Aminosäure-oxydase die Sauerstoffabsorption auch bei den Blindversuchen beträchtlich ist, muss die Einwage des Leberbreies sehr genau erfolgen, andernfalls inkonstante Resultate erhalten werden. Auch ist der gleichzeitige Ansatz mehrerer Blindwerte empfehlenswert.

Diese Versuchsergebnisse, die wir nach verschiedenen Richtungen zu erweitern beabsichtigen, erlauben vorläufig folgende Schlussfolgerungen:

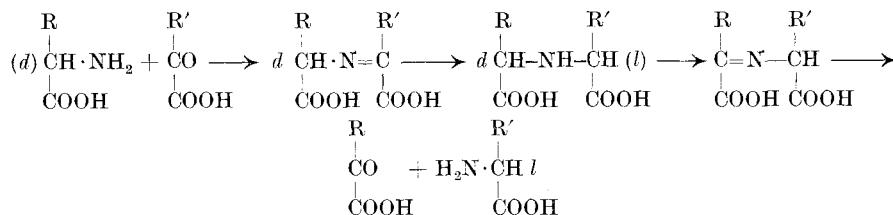
Octopin wird durch ein im Leberbrei vorkommendes Ferment, wahrscheinlich *l*-Aminosäure-oxydase, dehydriert; von *d*-Aminosäure-oxydase wird es dagegen nicht angegriffen. Daraus ergibt sich, dass Octopin nicht nur in seiner Ornithin-, sondern wahrscheinlich auch in der Alanin-Komponente *l*-Konfiguration besitzt.

Da das Beispiel des Octopins beweist, dass solche α, α' -Imino-dicarbonsäuren von den Zellen gebildet werden können, muss mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass unter natürlichen Bedingungen Umaminierungen auch über α, α' -Imino-dicarbonsäuren entsprechend Reaktionsfolge 5 vor sich gehen können. Damit soll selbstverständlich nicht bestritten werden, dass sich Umaminierungen auch durch Umlagerung primär gebildeter Schiff'scher Basen im Sinne der Theorie von Braunstein (Reaktionsfolge 4)) abspielen; die weitere Forschung wird aufklären müssen, wie weit der eine und wie weit der andere Reaktionsmechanismus in der Zelle Verwendung findet.

Tabelle 1.

| Fermentative Dehydrierungen, gemessen durch O ₂ -Absorption. | | | | | |
|---|--|------------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| Zeit in Minuten | 5,0 mg l-Alanin 0,5 g Leberbrei | 5,0 mg l-Alanin 0,5 g Leberbrei | — 0,5 g Leberbrei | — 0,5 g Leberbrei | |
| 0 | 0 mm ³ | | 0 mm ³ | | 0 mm ³ |
| 15 | 5 .. | | 6 .. | | 2 .. |
| 30 | 12 .. | | 18 .. | | 8 .. |
| 60 | 38 .. | | 40 .. | | 26 .. |
| 90 | 53 .. | | 62 .. | | 38 .. |
| | 5,0 mg l-Asparaginsäure 0,5 g Leberbrei | | 5,0 mg l-Asparaginsäure 0,5 g Leberbrei | | — 0,5 g Leberbrei |
| 0 | 0 mm ³ | | 0 mm ³ | | 0 mm ³ |
| 15 | 12 .. | | 9 .. | | 2 .. |
| 30 | 23 .. | | 16 .. | | 9 .. |
| 60 | 44 .. | | 34 .. | | 26 .. |
| 90 | 60 .. | | 51 .. | | 40 .. |
| | 0,5 g Leberbrei | | 0,5 g Leberbrei | | 0,5 g Leberbrei |
| 0 | 0 mm ³ | | 0 mm ³ | | 0 mm ³ |
| 15 | 0 .. | | 1 .. | | 5 .. |
| 30 | 3 .. | | 4 .. | | 8 .. |
| 60 | 23 .. | | 24 .. | | 29 .. |
| 90 | 35 .. | | 36 .. | | 41 .. |
| | 5,0 mg Octopin 0,5 g Leberbrei | | 5,0 mg Octopin 0,5 g Leberbrei | | — 0,5 g Leberbrei |
| 0 | 0 mm ³ | | 0 mm ³ | | 0 mm ³ |
| 15 | 9 .. | | 8 .. | | 8 .. |
| 30 | 25 .. | | 22 .. | | 22 .. |
| 45 | 35 .. | | 31 .. | | 29 .. |
| 60 | 49 .. | | 45 .. | | 41 .. |
| 90 | 74 .. | | 71 .. | | 64 .. |

Der Weg über die α,α' -Imino-dicarbonsäuren bietet theoretisch offenbar auch die Möglichkeit, eine Aminosäure der einen sterischen Reihe u. U. in eine solche entgegengesetzter Konfiguration zu verwandeln:



Ob diese Möglichkeit von der Zelle ausgenutzt wird, werden ebenfalls weitere Untersuchungen zu zeigen haben.

In diesem Zusammenhang ist die grosse Unbeständigkeit mancher Imino-dicarbonsäuren bemerkenswert. Bereits *Ciamician* und *Silber*¹⁾ fanden, dass bei der Verseifung von Imino-dipropionitril mit Bariumhydroxyd teilweise Spaltung unter Alaninbildung erfolgt. Wir haben festgestellt, dass dieses Nitril durch Barytwasser schon bei 37° praktisch vollständig zu Alanin und Milchsäure aufgespalten wird. Die hydrolytische Zersetzung dieser Imino-dicarbonsäure erfolgt auffallend leicht.

Bei der von *Braunstein* studierten Umaminierungsreaktion reagieren nach diesem Autor nur die natürlichen *l*-Formen der Aminosäuren als NH₂-Donatoren und die neuen Aminosäuren, welche als Reaktionsprodukte auftreten, gehören ebenfalls der *l*-Aminosäurereihe an²⁾. *S. Ratner, R. Schoenheimer* und *D. Rittenberg*³⁾ haben aber gezeigt, dass auch *d*(+)-Leucin den Aminostickstoff für viele andere *l*-Aminosäuren im Organismus liefern kann.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

Schweizerische chemische Gesellschaft.

Protokoll

der Generalversammlung am 29. September 1940, 8 Uhr
Locarno, Palazzo Comunale Scolastico.

Eröffnung der Sitzung durch den Präsidenten: 8.15 Uhr.

Protokoll: *Elsy Goetz*.

A. Geschäftlicher Teil.

Der Präsident, Prof. *Ruggli*, begrüßt die anwesenden Mitglieder der Gesellschaft.

Da das Protokoll der letzten Generalversammlung vom 3. III. 40 in den Helvetica chimica acta (23, 562—63 (1940)) publiziert worden ist, wird es nicht mehr verlesen.

Traktanden:

1. Revision der Statuten.

Der Präsident teilt mit, dass die Neufassung der Statuten im wesentlichen die Niederlegung der seit 1918 erfolgten kleinen Änderungen, denen Generalversammlungsbeschlüsse zugrunde lagen, sowie die textliche Abänderung einzelner Bestimmungen zum Ziele hat. Die Neufassung ist vom Vorstand durchberaten worden; er empfiehlt sie zur Annahme. Der Probendruck der revidierten Statuten liegt zur Einsicht auf.

Ausgehend von den ursprünglichen heute gültigen Statuten von 1918/19 wird folgende Fassung in Vorschlag gebracht:

Artikel 1: erfährt keine Änderung.

¹⁾ B. 39, 3952 (1906). ²⁾ *Braunstein, Gorky*, Nature 143, 609 (1939).

³⁾ J. Biol. Chem. 134, 653 (1940).