

die an zwei durch eine Doppelbindung verbundenen C-Atomen je eine Oxy-Gruppe trägt. Analoge Struktur haben z. B. Ascorbinsäure und Brenzcatechin, beides Verbindungen, deren leichte Oxydierbarkeit bekannt ist.

Es ist von vorneherein zu erwarten, dass die Verbindung nicht in der Diketon-, sondern in der Dienolform vorliegt; denn man weiss, dass die Tendenz zur Ausbildung der sehr stabilen Thiophen-Struktur ausserordentlich gross ist. Diese Annahme wurde auch dadurch bestätigt, dass es unmöglich war, ein Dioxim darzustellen. Es liegt somit das 2- $[\beta$ -Propionsäure]-3,4-dioxy-thiophen (XVII) vor.

$C_7H_8O_4S$ Ber. H aktiv 1,59 Gef. H aktiv 1,42%

Die Substanz gibt mit Eisen(III)-chlorid-Lösung eine blau-grüne Färbung.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

17. Zur Kenntnis des Abbaues der Aminosäuren im tierischen Organismus.

I. *L*-Alanin

von S. Edlbacher und H. Grauer.

(22. XII. 43.)

Neubauer und Mitarbeiter¹⁾ haben vor 35 Jahren durch Fütterungsversuche am Hunde nachgewiesen, dass *d,l*-Phenyl-aminoessigsäure und *d,l*-p-Oxyphenyl-aminoessigsäure im Organismus teilweise in die entsprechenden α -Ketosäuren übergehen und im Harn nachgewiesen werden können. Diese Umwandlung betraf jedoch nur die natürlichen Aminosäuren, während die unnatürlichen grösstenteils unversehrt wieder ausgeschieden wurden. In gewissen Fällen kam es ausserdem zu einer geringen Ausscheidung der entsprechenden Oxy-säuren. Kurz darauf teilte *Knoop*²⁾ den ersten Nachweis der Synthese einer Aminosäure, β -Benzyl-alanin, durch den tierischen Organismus nach Verfütterung von β -Benzyl-brenztraubensäure mit. Sie war am Stickstoff acetyliert und gehörte ebenfalls den natürlichen Formen an. *Knoop* nahm auf Grund seiner und *Neubauer's* Befunde an, dass der erste Abbau der Aminosäuren eine oxydative Desaminierung und reversibel sei. Gleichzeitig wiesen *Embsen* und *Schmitz*³⁾ im Leberdurchblutungsversuch die Bildung von Tyrosin und Alanin aus dem Ammoniumsalz der p-Oxyphenyl-brenztraubensäure resp. der Brenztraubensäure nach.

25 Jahre später erbrachte *Krebs*⁴⁾ im Gewebsschnittversuch einen weiteren Beweis für die oxydative Desaminierung der Aminosäuren. Er isolierte beim Abbau von *d,l*-Alanin, *d,l*- α -Aminobuttersäure, *d,l*-Valin, *d,l*-Norleucin, *d,l*-Phenylalanin, *l*-Glutaminsäure und *l*-Asparaginsäure durch Nierenschnitte die entsprechenden α -Ketosäuren als

¹⁾ Literatur am Schluss.

Dinitro-phenylhydrazone. Bei der *l*-Asparaginsäure gelang nur der Nachweis der Brenztraubensäure als Phenylhydrazon, da die entstandene Oxalessigsäure spontan rasch decarboxyliert wird.

Für alle weiteren Arbeiten über den oxydativen enzymatischen Abbau von Aminosäuren war die Entdeckung der *d*-Aminosäure-oxydase von *Krebs*⁵⁾ von grosser Bedeutung. Sie führte *Krebs* zu folgendem Schluss:

„Die optisch nicht natürlichen Formen der meisten Aminosäuren werden viel schneller (bis zu 25 mal schneller) in der Niere vieler Tiere desaminiert als die optisch natürlichen Formen.“

Krebs ist zu diesem Resultat ausschliesslich durch Versuche gelangt, die er mit Organschnitten und -Extrakten ausgeführt hat. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Beobachtungen von *E. Abderhalden* und *Tezner*⁶⁾, welche zeigen konnten, dass bei Verabreichung von racemischem Alanin der grösste Teil des unnatürlichen *d*-Alanin unverändert im Harn wieder gefunden wurde. Sie stehen auch im Gegensatz zu Beobachtungen von *S. Edlbacher* und Mitarbeitern⁷⁾, welche ebenfalls zeigen konnten, dass bei Injektion von *d*-Histidin der allgrösste Teil des *d*-Histidins im Harn unverändert ausgeschieden wird. Wir weisen auch auf die oben angeführten Arbeiten von *Neubauer*¹⁾ und *Knoop*³⁾ in dieser Hinsicht hin. Die Ergebnisse von *Krebs* beziehen sich also nur auf in vitro Versuche. Die Ursache, welche diese Diskrepanz zwischen in vitro und in vivo Versuchen hervorruft, ist noch nicht bekannt. Alle Resultate, die in vitro Versuchen mit *d,l*-Aminosäuren erhalten werden, sind demnach in den meisten Fällen auf den Abbau durch die *d*-Aminosäure-oxydase zu beziehen, während auf einen Abbau durch *l*-Aminosäure-oxydasen nur geschlossen werden darf, wenn mit optisch reinen Aminosäuren gearbeitet wird. Die von *Krebs* isolierten Ketosäuren beim Abbau von *d,l*-Aminosäuren sind darum ebenfalls als Abbauprodukte der unnatürlichen Formen aufzufassen.

Die ausgesprochene optische Spezifität beim Aminosäureabbau im tierischen Organismus zeigt sich nicht nur beim oxydativen Abbau, sondern auch bei der hydrolytischen Spaltung von Arginin und Histidin, bei der Decarboxylierung von Histidin, Dioxyphenyl-alanin, Tyrosin und Tryptophan und ferner bei den Umaminierungsreaktionen. Bei all diesen Reaktionen werden normalerweise nur die natürlichen Formen angegriffen. Ausnahmen bilden die von uns⁸⁾ in der Rattenleber gefundene *d,l*-Histidin-oxydase, sowie die Arginase, bei der *S. Edlbacher* und *Zeller*⁹⁾ zeigen konnten, dass bei hoher Fermentkonzentration auch die unnatürliche Modifikation hydrolytisch gespalten wird. Endlich gibt *K. Lang*¹⁰⁾ an, dass auch bei der Prolinoxydase die *l*- und *d*-Formen vom gleichen Enzym abgebaut werden sollen.

Tabelle 1.

Enzymatischer Abbau von *l*-Aminosäuren im tierischen Organismus.

Amino- säure	Material	Enzym	O ₂ - Ver- brauch	NH ₃ - Bil- dung	CO ₂ - Bil- dung	Reak- tions- Produkte	Hemm- sub- stanzen	Autor
Alanin	Ratten- Nieren- schnitte	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	+			(As ₂ O ₃ 0,001-m. hemmt nicht)	<i>Krebs</i> ⁴⁾
	Ratten- Leber- Extrakt	<i>l</i> -Alanin- oxydase	+	+				<i>Lang</i> ¹⁰⁾ ¹²⁾
	Ratten- Nieren- schnitte u. -brei	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	+			(As ₂ O ₃ 0,003-m. u. Brom- acetat 1:5000 hemmen nicht)	<i>Cedran- golo</i> ¹³⁾
Valin	Ratten- Nieren- schnitte	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	+				<i>Krebs</i> ⁴⁾
Leucin	Ratten- Nieren- schnitte	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	+				<i>Krebs</i> ⁴⁾
	Ratten- Leber- extrakt		+	+				<i>Lang</i> u. <i>West- phal</i> ¹²⁾
Isoleu- cin	Ratten- Nieren- schnitte	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	+				<i>Krebs</i> ⁴⁾
Phenyl- alanin	Ratten- Nieren- schnitte	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	+				<i>Krebs</i> ⁴⁾
	Schweine- Nieren- u. Leber- brei		+	(+)				<i>Felix</i> ¹⁴⁾
	Ratten- Leber- extrakt	<i>l</i> -Phenyl- alanin- oxydase	+	—			(HCN 0,001-m. hemmt nicht)	<i>Lang</i> u. <i>West- phal</i> ¹²⁾
Tyrosin	Ratten- Nieren- schnitte	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	+				<i>Krebs</i> ⁴⁾
	Ratten- Leber- schnitte	<i>l</i> -Amino- säure- oxydase	+	—				<i>Krebs</i> ⁴⁾

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Aminosäure	Material	Enzym	O ₂ -Verbrauch	NH ₃ -Bildung	CO ₂ -Bildung	Reaktions-Produkte	Hemm-substanzen	Autor
Tyrosin	Nieren- u. Leberbrei verschiedener Tiere	Tyrosin-oxydase	+	—			HCN 0,002-m.	Bernheim u. Bernheim ¹⁵⁾
	Leberextrakte verschiedener Tiere	Tyrosin-oxydase	+	—			HCN 0,002-m.	Bernheim ¹⁶⁾
	Leber- u. Nierenbrei von Schweinen		+	—	+	Aceton		Felix ¹⁴⁾
	Schweine-Leberbrei		+	—	+	Acet-essig-säure, Alanin		Felix u. Zorn ¹⁷⁾
Tryptophan	Ratten-Nierenschnitte	<i>l</i> -Aminosäure-oxydase	+	+				Krebs ⁴⁾
	Leberbrei verschiedener Tiere	Tryptophan-pyrrrolase	+			Kynurenin		Kotake u. Masayama ¹⁸⁾
Prolin	Ratten-Leberextrakt		+	—			(HCN 0,002-m. hemmt nicht)	Bernheim u. Bernheim ¹⁹⁾
	Nierenschnitte verschiedener Tiere	<i>l</i> -Prolindehydrase oder <i>l</i> -Aminosäure-oxydase ?	+	—		<i>l</i> -Glutaminsäure	(As ₂ O ₃ 0,002-m. hemmt nicht)	Weil-Malherbe und Krebs ²⁰⁾ Neber ²¹⁾
	Ratten-Leberbrei	Prolin-oxydase	+	—			(HCN hemmt nicht)	Lang ¹⁰⁾
Histidin	Ratten-Nierenschnitte	<i>l</i> -Aminosäure-oxydase	+	+				Krebs ⁴⁾
	Ratten-Leberextrakt	<i>d, l</i> -Histidin-oxydase	+	(+)			HCN 0,001-m.	Edlbacher u. Grauer ⁸⁾

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Aminosäure	Material	Enzym	O ₂ -Verbrauch	NH ₃ -Bildung	CO ₂ -Bildung	Reaktions-Produkte	Hemm-substanzen	Autor
Ornithin	Ratten-Nieren- u. Leberschnitte	<i>l</i> -Aminosäure-oxydase	+	+				<i>Krebs</i> ⁴⁾
Lysin	Ratten-Nierenschnitte	<i>l</i> -Aminosäure-oxydase	+	+				<i>Krebs</i> ⁴⁾
Asparaginsäure	Ratten-Nierenschnitte	<i>l</i> -Aminosäure-oxydase	+	+		Oxal-essigsäure, Brenztraubensäure	HCN 0,001-m. (As ₂ O ₃ 0,001-m. hemmt nicht)	<i>Krebs</i> ⁴⁾
	Ratten-Nierenbrei	<i>l</i> -Aminosäure-oxydase		+				
	Ratten-Nierenschnitte		+	(+)	+			<i>Felix</i> u. <i>Naka</i> ²²⁾
Glutaminsäure	Ratten-Nierenschnitte	<i>l</i> -Aminosäure-oxydase	+	+		α-Ketoglutar-säure	HCN 0,001-m. (As ₂ O ₃ 0,001-m. hemmt nicht)	<i>Krebs</i> ⁴⁾
	Ratten-Nierenbrei	<i>l</i> -Aminosäure-oxydas		+				
	Leber-Nierenextrakte	<i>l</i> -Glutaminsäure-lehydrase	+	+		α-Ketoglutar-säure	HCN 0,001-m.	<i>v. Euler</i> ²³⁾
	Ratten-Nierenschnitte		+	(+)	+			<i>Felix</i> u. <i>Naka</i> ²²⁾

Aus Versuchen von *P. Karrer* und *Frank*¹¹⁾ geht hervor, dass zwar nicht alle *d*-Aminosäuren durch das gleiche gereinigte Lactoflavin-Adenin-Nucleotid und das Apoferment aus Hammelniere abgebaut werden, sondern es führen diese Versuche die genannten Autoren zu der Schlussfolgerung, dass wahrscheinlich verschiedene Fermente am Werk sind. Es ist aber anzunehmen, dass diese verschiedenen *d*-Aminosäure-oxydasen wahrscheinlich alle dem Typus der speziellen *d*-Alanin-oxydase nahe verwandt sind. Im Gegensatz dazu sind bereits eine ganze Anzahl weitgehend verschiedener Enzymsysteme bekannt, welche ausschliesslich den oxydativen Abbau der *l*-Aminosäuren besorgen.

Tabelle 1 gibt eine Zusammenstellung der uns bekannten Arbeiten über den oxydativen Abbau der *l*-Aminosäuren. Es ergibt sich daraus, dass der Abbau der einfachen *l*-Monoamino-monocarbonsäuren noch kaum bekannt ist, dass aber auch über den Abbau gewisser cyclischer Aminosäuren bedeutende Widersprüche und Unklarheiten bestehen.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit mit der Klärung des Abbaues von *l*-Alanin begonnen. Zunächst stellen wir fest, dass viele *l*-Aminosäuren, im speziellen *l*-Alanin, auch durch sehr konzentrierte Extrakte von Nieren und Lebern verschiedener Tiere nicht deutlich messbar oxydiert oder desaminiert werden. Als Mass für den *l*-Alanin-Abbau diente uns immer das gebildete Ammoniak. Im Gewebsbrei ist ein Abbau feststellbar, doch ergeben nur Gewebsschnitte günstige Versuchsbedingungen. Da unter solchen Umständen eine Abtrennung von anderen Enzymen kaum erfolgen kann, haben wir die Desaminierung des *l*-Alanins durch Hemmsubstanzen näher zu charakterisieren und gegenüber dem Abbau anderer Substrate zu differenzieren versucht.

Diese, wie auch verschiedene Konkurrenzversuche, machen es wahrscheinlich, dass *l*-Alanin und *l*-Valin vom gleichen, *l*-Asparaginsäure dagegen durch ein anderes Enzymsystem angegriffen werden. Ferner zeigt sich im Verhalten gegenüber Hemmsubstanzen eine sehr ausgesprochene Verwandtschaft des *l*-Alanin abbauenden Systems mit dem Zellatmungssystem. Alle Substanzen, welche die Zellatmung hemmen, hindern auch den *l*-Alanin-Abbau in hohem Masse. Neben der Ammoniakbildung beim *l*-Alanin-Abbau wiesen wir sodann kolorimetrisch Brenztraubensäurebildung nach. Schliesslich gelang es uns im Grossversuch, die gebildete Brenztraubensäure als 2,4-Dinitrophenylhydrazon zu isolieren und damit den Reaktionsverlauf sicherzustellen. Ausser dieser Isolierung der Brenztraubensäure gelang es uns auch, durch Äther-Extraktion der Reaktionsflüssigkeit das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Acetaldehyds zu isolieren und den Beweis zu führen, dass dieser Acetaldehyd durch nachträgliche Decarboxylierung der Brenztraubensäure entstanden war.

Methodisches.

Herstellung des Organbreis:

Sofort nach Tötung des Tieres wird das betreffende Organ entnommen, von Bindegewebe befreit, in der gekühlten *Latapie*-Mühle gemahlen, und der erhaltene Brei mit dem doppelten Volumen eiskühlten 0,067-m. Phosphatpuffers $p_H = 7,73$ durchmischt.

Herstellung des Organextraktes:

Der Organbrei wird durch Zerdrücken der kleinsten Gewebspartikel mittels Glaspestill noch weiter homogenisiert, sodann 15 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit bildet den Extrakt.

Herstellung der Nierenschnitte:

Das frisch entnommene Organ wird rasch in Puffer gekühlt und mit dem Rasiermesser von der Nierenrinde höchstens 0,5 mm dicke Schnitte hergestellt, die in eisgekühltem Puffer aufbewahrt werden.

Puffer: Phosphat-Ringer nach *Krebs*¹⁾, $p_H = 7,4$.

Herstellung der Lösungen:

Extrakte und Breie werden immer mit dem genannten Phosphatpuffer weiter verdünnt, die Schnitte im Phosphat-Ringer suspendiert. Die Aminosäuren werden im entsprechenden Puffer gelöst und auf das entsprechende p_H mit n. HCl oder n. NaOH gebracht, ebenfalls die Hemmsubstanzen. Nur bei höherer Konzentration der Hemmsubstanzen wurden diese in destilliertem Wasser gelöst.

Messung des Sauerstoffverbrauches:

Offene *Warburg*-Manometer. In den Hauptraum der kegelförmigen Gefässe kommt der frisch bereitete Extrakt, Brei oder die Schnitte mit dem entsprechenden Puffer und eventl. Hemmsubstanzen, in die seitliche Birne die Aminosäurelösung, in den Einsatz 0,2 cm³ 10-proz. Kalilauge. Bei Schwerlöslichkeit der Aminosäure wurde diese in Substanz direkt in den Hauptraum gegeben. Im Gasraum Sauerstoff. Versuchstemperatur des Thermostaten 38°. Nach 10 Minuten Temperaturengleich wird die Aminosäurelösung in den Hauptraum gekippt und die entstehenden Druckdifferenzen alle 15 Minuten abgelesen. Versuchsdauer 1—2 Stunden. Nach Versuchsende werden bei Gewebsschnittversuchen die Schnitte aus dem Hauptraum gefischt, auf kleine Uhrgläschen gebracht, bei 100° getrocknet und dann auf der Mikrowaage auf 10 γ genau gewogen und der verbrauchte Sauerstoff pro mg Gewebe pro Stunde (Q_{O_2}) berechnet.

Ammoniakbestimmung nach *Conway*²⁴⁾.

Nach Versuchsende werden 2 cm³ der Hauptraumflüssigkeit in den Aussenraum der „unit“ gebracht. Im Gegensatz zu früher verwenden wir als Innenflüssigkeit der „units“ jetzt 1 cm³ einer bereits den Indikator (Methylrot + Methylenblau) enthaltenden 0,01-n. HCl und titrieren nach der Diffusion die nicht durch Ammoniak neutralisierte Salzsäure mit 0,01-n. Ba(OH)₂ mittels einer Mikrobürette besonderer Konstruktion*), die praktischer ist als die von *Conway* beschriebene Horizontalbürette, zurück. Bei Gewebsschnittversuchen wird wiederum die Ammoniakbildung pro mg Gewebe pro Stunde (Q_{NH_3}) berechnet.

Brenztraubensäurebestimmung nach *Straub*²⁵⁾.

Nach Versuchsende werden 2 cm³ der Hauptraumflüssigkeit mit 0,25 cm³ 10-proz. Schwefelsäure und 0,25 cm³ 10-proz. Natriumwolframatlösung enteiwesst und filtriert. Zu 1 cm³ des Filtrates wird 1 cm³ Kalilauge (100 g KOH in 60 cm³ Wasser) und 0,5 cm³ Salicylaldehyd (2 Vol. % in 100 cm³ 96-proz. Alkohol) gegeben und 10 Minuten bei 38° belassen, dann abgekühlt und am Stufenphotometer von *Pulfrich* kolorimetriert unter Verwendung von Lichtfilter S 47 mit der mittleren Wellenlänge 470 m μ . Da wir Brenztraubensäure nur in relativ eiweissarmen Suspensionsflüssigkeiten der Gewebsschnitte bestimmt haben, traten keine Verluste auf, wie wir in Vorversuchen ermittelt hatten. *Straub*, der Brenztraubensäure im Muskelbrei bestimmte, gibt dagegen Verluste bis zu 40% der zugesetzten Brenztraubensäure an. Er nimmt als Grund dafür Adsorption der Brenztraubensäure an das gefällte Eiweiss an. Die gefundene Menge Brenztraubensäure in γ wird in m μ m³ pro mg Trockengewebe pro Stunde ($Q_{\text{Brenztraubensäure}}$) umgerechnet, damit die Werte direkt mit Q_{NH_3} und Q_{O_2} verglichen werden können.

*) Hersteller: Glastechnische Werkstätte *E. Keller & Co.*, Basel.

Abbau von *l*-Aminosäuren durch Extrakte und Breie von Lebern und Nieren verschiedener Tiere.

Ausgehend von den Angaben von *Krebs*⁵⁾, dass auch für den Abbau der *l*-Aminosäuren nicht die intakte Zellstruktur, sondern nur eine bestimmte Protoplasmakonzentration notwendig sei, hofften wir mit Hilfe von leicht fraktionierbaren Organextrakten einen weiteren Einblick in den Wirkungsmechanismus der von *Krebs* postulierten *l*-Aminosäure-oxydase zu erhalten. Seine Angaben beruhen jedoch nur auf Versuchsdaten mit der *l*-Asparagin- und der *l*-Glutaminsäure, welche er auf alle anderen *l*-Aminosäuren übertragen zu können glaubte. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, sind seither mit Leber- und Nierenextrakten bereits verschiedene andere Arbeiten ausgeführt worden, die diese Annahme von *Krebs* teilweise in Frage stellen. Wir wollten uns deshalb als Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen zunächst ein eigenes Bild über die Grösse des Abbaues verschiedener *l*-Aminosäuren durch Extrakte und Breie machen. Dabei haben wir uns an die Vorschriften von *Krebs*⁵⁾ über die Verdünnungen der Organbreie oder -Extrakte gehalten. Die Endverdünnung des Breies oder Extraktes war in allen Versuchen ungefähr 1:6, die Aminosäurekonzentration 0,02-m. Unter diesen Umständen sollte der Abbau der *l*-Aminosäuren nach *Krebs* immer noch ungefähr gleich gross wie in Schnitten sein.

In den allermeisten Fällen konnten wir aber weder im Brei- noch im Extraktversuch einen grösseren Sauerstoffmehrverbrauch oder eine Ammoniakmehrbi- dung gegenüber dem Ansatz ohne Aminosäurezusatz feststellen. Hie und da drückte der Aminosäurezusatz die Leer-Atmung etwas herunter, was vielleicht für eine gewisse Affinität mancher *l*-Aminosäuren zum Atmungsfermentsystem spricht. Nur in wenigen Fällen

Tabelle 2.

Abbau von *l*-Aminosäuren durch Extrakt und Brei von Niere und Leber verschiedener Tiere.

Verdünnung von Extrakt und Brei 1:6. Aminosäureendkonzentration 0,02-m.

Aminosäure	Ratte				Meer- schweinchen				Schwein				Kalb				Katze			
	Niere		Leber		Niere		Leber		Niere		Leber		Niere		Leber		Niere		Leber	
	O ₂ *	NH ₃ ⁺	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃	O ₂	NH ₃
Alanin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenyl- alanin...	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-
Tyrosin ...	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	++	-	(+)	-	++	(+)	+	+	-	-
Tryptophan	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
Prolin	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Histidin ...	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithin ..	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asparagin- säure ...	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glutamin- säure ...	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Sauerstoff-Verbrauch. + Ammoniak-Bildung.

++ Verbrauch von Sauerstoff oder Bildung von Ammoniak = stark.

+ Verbrauch von Sauerstoff oder Bildung von Ammoniak = mässig.

(+) Verbrauch von Sauerstoff oder Bildung von Ammoniak = unregelmässig.

wies ein merklicher Sauerstoffmehrerbrauch oder eine Ammoniakmehrbildung auf einen deutlichen Abbau der Aminosäure hin. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über diese mehrmals mit Extrakt und Brei wiederholten Versuche. Es werden dabei nur solche Abbauwerte angegeben, deren Q_O , resp. Q_{NH} , grösser als 0,5 ist, da die Fehlergrenzen sonst zu gross werden. Wir haben darum absichtlich den kleinen, unter bestimmten Bedingungen sichergestellten oxydativen Abbau von *l*-Phenyl-alanin¹²⁾ und von *l*-Histidin⁸⁾ weggelassen, der grössenordnungsweise bedeutend hinter den angegebenen zurücksteht. Ein deutlicher Unterschied zwischen Versuchen mit Extrakt und mit Brei konnte nicht festgestellt werden, ebenfalls änderten sich die Abbauverhältnisse der Aminosäuren auch beim fastenden Tier kaum.

Werden die Extrakte während 5 Stunden gegen oft erneuertes eisgekühltes destilliertes Wasser dialysiert, so nimmt die Abbaufähigkeit nicht nur gegenüber Glutaminsäure, sondern auch gegenüber Prolin, Tyrosin und Tryptophan bei den meisten Tieren um mindestens 50% ab, was wohl eine Folge der leichten Dissozilierbarkeit der betreffenden Enzyme in Apo- und Coferment ist.

Wenn man zellfreie Nieren- und Leberextrakte auf optisch reines *l*-Alanin von einer spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20} = 10,03^\circ$ einwirken lässt, so erhält man weder Ammoniakbildung noch Sauerstoffverbrauch nach Abzug der entsprechenden Leerwerte der Extrakte. Wir machen ausdrücklich darauf aufmerksam, dass fast alle käuflichen *l*-Alaninpräparate geringe Mengen von *d*-Alanin enthalten. Die Aminosäure muss durch mehrmaliges Umkrystallisieren gereinigt werden, damit sie den richtigen spezifischen Drehungswinkel gibt. Schon *E. Fischer* hat in seiner ersten Arbeit auf diese Tatsache hingewiesen. Wir bezweifeln deshalb, dass die Angaben von *Cedrangolo*¹³⁾ und *K. Lang*¹⁰⁾ wirklich den Abbau des *l*-Alanin betreffen. Ebenso muss darauf hingewiesen werden, dass Leberextrakt, der noch kleinste geformte Gewebsbestandteile enthält, aus reinem *l*-Alanin messbare Mengen von Ammoniak frei machen kann.

Diese Voruntersuchungen zeigen, dass zur Abklärung des *l*-Aminosäure-Abbaues Extrakte und Breie im allgemeinen wenig geeignet sind.

l-Alanin-Abbau durch Nierenschnitte verschiedener Tiere.

Während also das reine *l*-Alanin durch Extrakte nicht, durch Breie nur wenig und unregelmässig abgebaut wird, tritt im Gewebsschnittversuch regelmässig eine deutliche Mehrbildung von Ammoniak gegenüber dem Ansatz ohne Aminosäurezusatz ein. Auch der Sauerstoffverbrauch pro mg Trockengewebe pro Stunde nimmt in den meisten Fällen nach Alaninzusatz deutlich zu. Auf Tabelle 3 sind einige dieser Resultate wiedergegeben. Im Falle einer oxydativen Desaminierung von *l*-Alanin sollte das Verhältnis Q_O/Q_{NH} gleich $\frac{1}{2}$ sein, falls die entstehende Brenztraubensäure nicht weiter abgebaut wird. Dies ist jedoch in Versuchen mit Gewebsschnitten nicht anzunehmen. Wir haben festgestellt, dass Brenztraubensäure, in einer unseren Versuchen entsprechenden Grössenordnung zu Nierenschnitten zugesetzt, nach einer Stunde Schütteln bei 38° in Sauerstoffatmosphäre praktisch vollständig verschwunden ist. Da der Sauerstoffverbrauch im Gewebsschnittversuch in keinem festen Verhältnis zum gebildeten Ammoniak steht, der weitere Abbau des ersten Reaktionsproduktes demnach sehr verschieden weit verläuft, haben wir in den folgenden Versuchen immer nur die Ammoniakmehrbildung bei Zugabe von *l*-Alanin als Mass für dessen Abbau genommen. Ob der Ammoniakleerwert im Ansatz ohne Aminosäure von der Desaminierung im Gewebe vorhandener Aminosäuren oder Adenylsäuren herrührt, oder ob es sich nur um eine Diffusion von im Gewebe präformiertem Ammoniak in die Suspensionsflüssigkeit handelt, haben wir nicht untersucht. Dagegen haben wir die Frage geprüft, ob zu einem Ansatz von Nierenschnitten zugesetzte kleine Ammoniakmengen in Form von Ammoniumsulfat weiter verarbeitet werden. Die zugesetzten Mengen waren ungefähr gleich gross wie die beim Alaninzusatz erhaltenen. Wir konnten die zugesetzte Ammoniakmenge nach einer Stunde Schütteln im *Warburg*-Apparat in Sauerstoffatmosphäre zum grössten Teil wieder nachweisen. Wir sind darum berechtigt, die gefundenen Ammoniakmengen im Abbauversuch von *l*-Alanin durch Nieren-Schnitte als ein Mass für den oxydativen Abbau dieser Aminosäure anzusehen.

Tabelle 3.

Abbau von *l*-Alanin durch Nierenschnitte verschiedener Tiere.
Nierenschnitte in Phosphat-*Ringer* suspendiert. Im Einsatz KOH. Im Gasraum Sauerstoff.
l-Alanin-Endkonzentration 0,04-m.

Tier	Versuch Nr.	Zusatz	Q _{O₂}	Q _{O₂} für Alanin- Abbau	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Alanin- Abbau
Meer- schwein- chen	45	— <i>l</i> -Alanin	12,7 15	2,3	1,5 4,4	2,9
	46	— <i>l</i> -Alanin	12,0 15,0	3,0	1,7 3,4	1,7
	47	— <i>l</i> -Alanin	9,1 11,5	2,4	2,7 3,4	0,7
	48	— <i>l</i> -Alanin	11,1 12,4	1,3	1,0 2,3	1,3
	55	— <i>l</i> -Alanin	11,9 14,9	3,0	0,3 2,0	1,7
	56	— <i>l</i> -Alanin	10,4 16,5	6,1	0,7 3,3	2,6
	62	— <i>l</i> -Alanin	10,8 11,9	1,1	0,7 2,1	1,4
	63	— <i>l</i> -Alanin	10,8 12,0	1,2	0,4 1,6	1,2
	65	— <i>l</i> -Alanin	15,7 16,4	0,7	1,0 2,1	1,1
	67	— <i>l</i> -Alanin	12,5 14,0	1,5	0,8 2,2	1,4
Schwein	42	— <i>l</i> -Alanin	8,1 8,2	0,1	1,9 4,6	2,7
	75	— <i>l</i> -Alanin	4,9 6,4	1,5	0,5 1,1	0,6
	141	— <i>l</i> -Alanin	9,4 11,9	2,5	1,1 3,8	2,7
	154	— <i>l</i> -Alanin	8,9 10,8	1,9	0,7 1,7	1,0
	163	— <i>l</i> -Alanin	10,2 12,7	2,5	0,3 1,5	1,2
Ratte	73	—	7,5		2,0	
		<i>l</i> -Alanin	6,8	-0,7	3,6	1,6

Einfluss verschiedener Hemmsubstanzen auf den Abbau von *l*-Alanin, *l*-Valin, *l*-Asparaginsäure, *p*-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure durch Nierenschnitte.

Eine Abtrennung des *l*-Alanin-abbauenden Fermentes von anderen Enzymen durch Reinigungsversuche kommt vorläufig nicht in Frage, da die Aktivität an die Zellstruktur gebunden scheint und bei der Zerstörung der Zelle oder Extraktionsversuchen bisher verloren ging. Unter diesen Umständen kann eine Charakterisierung des Enzyms nur durch Anwendung von Hemmsubstanzen erfolgen.

Wir suchten zunächst unter den bekannten Atmungsgiften nach einer Hemmsubstanz, die nur die Schnittleeratmung, nicht die Ammoniakbildung aus *l*-Alanin hemmt, konnten aber keine solche finden. Der *l*-Alanin-Abbau erwies sich im Gegenteil gegenüber den untersuchten Hemmkörpern meist gleich, hie und da sogar mehr empfindlich als die Eigenatmung der Zelle. Es stellte sich darum die Frage, ob zwischen dem *l*-Alanin-Abbau und der Zellatmung irgend welche Beziehungen bestehen. *Krebs*⁵⁾ nimmt solche anhand von Konkurrenzversuchen, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird, für den *l*-Asparaginsäure- und den *l*-Glutaminsäure-Abbau als wahrscheinlich an.

Im allgemeinen werden als die Hauptsubstrate der Eigenatmung Triosephosphate, ferner Brenztraubensäure und Milchsäure angesehen, die bei der Glykolyse entstehen. Der, teils direkt, teils vielleicht über den Zitronensäurezyklus durch Dehydrasen aus diesen Substraten abgelöste Wasserstoff gelangt über die Codehydrasen und Diaphorasen oder andere Überträger an die Cytochrome, die ihn ihrerseits an die Cytochrom-oxydase weitergeben, welche ihn mit dem an ihr aktivierten Sauerstoff reagieren lässt. Nun könnte möglicherweise *l*-Alanin wie ein Atmungssubstrat durch ein spezifisches Enzym dehydriert werden, der frei gewordene Wasserstoff auf dem gleichen Wege wie der Atmungssubstratwasserstoff an den Sauerstoff gelangen und die entstandene Iminosäure in Brenztraubensäure und Ammoniak übergehen. Die Hemmung eines einzelnen für den Wasserstofftransport notwendigen Gliedes dieser Enzymkette würde in diesem Falle nicht nur die Hemmung der Atmung, sondern auch die Hemmung der Dehydrierung und damit der Desaminierung von *l*-Alanin zur Folge haben.

In der grossen Reihe der Atmungsgifte gibt es aber nur wenige, über deren Angriffsort Genauerer bekannt ist. Blausäure hemmt nach *O. Warburg*²⁶⁾ die Cytochrom-oxydase durch Komplexbildung mit der oxydierten Form des Hämeisens. Im Falle der Diaminoxydase dagegen soll Blausäure nach *Zeller*²⁷⁾ als Ketonreagens durch Bildung einer *Schiff'schen* Base mit einer für die Wirkung unentbehrlichen Carbonylgruppe des Fermentes hemmen. Malonsäure hemmt nach *Quastel* und *Wooldridge*²⁸⁾ spezifisch die Succino-dehydrase gewisser Bakterien. Die Tatsache, dass auch die Zellatmung durch Malonsäure stark gehemmt wird, hat zur Annahme geführt, dass der Wasserstofftransport bei der Atmung von den Codehydrasen über das Succino-dehydrase-System zum Cytochrom-System führe, wofür von *Szent-György*²⁹⁾ die Hypothese des Fumarsäurezyklus, von *Knoop*, *Martius*³⁰⁾ und *Krebs*³¹⁾ die des Zitronensäurezyklus aufgestellt wurde. Wäre die Malonsäurehemmung wirklich spezifisch auf die Succino-dehydrase eingestellt, so wäre damit ein weiteres Wegstück des Wasserstofftransportes bei der Gewebsatmung gekennzeichnet. *Weil-Malherbe*³²⁾ fand dagegen, dass Malonsäure in höheren Konzentrationen auch andere an der Gehirnatmung beteiligte Enzymsysteme ausser der Succino-dehydrase hemmt. Gegen die Spezifität der Malonsäurehemmung sprechen ferner auch unsere weiter unten angeführten Versuche. Jodessigsäure hemmt nach *Quastel* und *Wheatley*³³⁾, *Lohmann*³⁴⁾, *Hopkins* und *Morgan*³⁵⁾, *Rapkins*³⁶⁾ in gewissen Fällen durch Blockierung von Sulfhydrylgruppen, in den meisten Fällen ist aber weder Ort noch Art ihres Hemmmechanismus sichergestellt. Eine ähnliche Wirkung wird von *Voegelin*³⁷⁾ der arsenigen Säure zugeschrieben, über deren Hemmungsmechanismus aber sonst noch weniger bekannt ist als über den der Jodessigsäure. Die Spezifität der genannten Atmungsgifte ist demnach relativ, ihr Angriffsort ebenfalls nicht eindeutig bestimmt. Eine gleichartige Hemmung durch diese Substanzen beweist also noch nicht die Identität des Weges der Wasserstoff-

übertragung für die Substrate der Zellatmung und für *l*-Alanin nach ihrer Dehydrierung. Sie spricht nur für eine sehr nahe Verwandtschaft beider Enzymsysteme.

Weiterhin haben wir den Einfluss von Fluorid, Pyrophosphat, Semicarbazid und Hydrazin geprüft. Fluorid hemmt die Gärung und Glykolyse, dabei speziell die Enolase schon in sehr niedrigen Konzentrationen, nach Warburg³⁸⁾ infolge von Komplexbildung mit zweiwertigen Metallionen. In unserem Falle werden Atmung und *l*-Alanin-Abbau jedoch erst durch hohe Konzentrationen Fluorid gehemmt. Pyrophosphat wird ebenfalls zu den Komplexbildnern gezählt, seine Wirkung auf die Atmung hängt sehr von der Gewebsart und vom Puffer ab. Leloir und Dixon³⁹⁾ haben den Einfluss von Pyrophosphat auf verschiedene Dehydrasen geprüft und nur eine Hemmung der Succino-dehydrase gefunden. Semicarbazid und Hydrazin endlich sollen in ihrer Eigenschaft als Ketonreagentien hemmen. Auch durch diese Substanzen wurde der *l*-Alanin-Abbau, meist auch die Zellatmung gehemmt.

Wir haben ferner den Einfluss der genannten Hemmsubstanzen auf die Desaminierung von *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure, auf die Oxydation gewisser intermediärer Stoffwechselprodukte wie Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure und auf die Oxydation von *p*-Phenylendiamin durch Nierenschnitte untersucht, um dadurch einen besseren Einblick in die Art und die Spezifität der Hemmungen zu erlangen und um die sogenannte *l*-Aminosäure-oxydase auf ihre Einheitlichkeit zu prüfen.

Während bei den Aminosäuren immer die Ammoniakbildung gemessen wurde, die bei *l*-Alanin und *l*-Valin ohne weiteres, bei *l*-Asparaginsäure nach Zusatz von 0,001- bis 0,0005-m. arseniger Säure (wie aus den unten angeführten Versuchen hervorgeht), als Mass für die Desaminierung der Aminosäure angenommen werden darf, wurde bei den übrigen Substraten der Sauerstoffverbrauch gegenüber der Leeratmung gemessen und als Mass für den Abbau des betreffenden Substrates angenommen. Es kann aus diesen Versuchen allein nicht gesagt werden, wo eine Hemmung im oxydativen Abbau des Substrates einsetzt. So könnte eine Hemmsubstanz z. B. den weiteren Abbau des ersten Reaktionsproduktes und die Anhäufung dieses Reaktionsproduktes den Verlauf der ersten Oxydation hemmen. Trotz dieser Einschränkung schienen uns solche vergleichende Hemmversuche aber doch wichtig, vor allem als Ergänzung zu den Versuchen über die Einwirkung von Hemmsubstanzen auf die Aminosäure-Desaminierung und auf die Leeratmung der Schnitte.

Hemmung durch Arsen(III)-oxyd.

Krebs⁵⁾ fand, dass 0,001-m. arsenige Säure wohl die Leeratmung, nicht aber die Desaminierung von *l*-Asparaginsäure und *l*-Glutaminsäure durch Nierenbrei hemmt. Da er annahm, dass alle *l*-Aminosäuren durch das gleiche Enzym, die *l*-Aminosäure-oxydase, oxydativ desaminiert werden, glaubte er, auch der Abbau der übrigen *l*-Aminosäuren werde durch arsenige Säure nicht gehemmt. Die Resultate unserer Versuche sind in Tabelle 4—6 wiedergegeben. Der Abbau von *l*-Alanin und *l*-Valin wird ungefähr gleich stark gehemmt wie die Leeratmung, während der Abbau von *l*-Asparaginsäure oft scheinbar stark gefördert wird. Wir erklären diese scheinbare Förderung in folgender Weise: Das beim Asparaginsäure-Abbau freigewordene Ammoniak wird sofort wieder für Synthesen verwendet, die jedoch durch Arsen(III)-oxyd gehemmt werden. Möglicherweise handelt es sich um eine Asparagin-Bildung aus Asparaginsäure und Ammoniak, wie Krebs⁴⁰⁾ eine Glutaminbildung aus Glutaminsäure und Ammoniak beim Glutaminsäure-Abbau nachgewiesen hat. Auf Grund dieses Befundes haben wir in allen Experimenten mit *l*-Asparaginsäure die Ammoniakbildung nur bei Gegenwart von arseniger Säure als Mass für den *l*-Asparaginsäure-Abbau angenommen. Das verschiedene Verhalten des Abbaues von *l*-Alanin, *l*-Valin einerseits und *l*-Asparaginsäure andererseits gegenüber arseniger Säure ist die erste Tatsache, die gegen die Einheitlichkeit der *l*-Aminosäure-oxydase spricht.

Tabelle 4.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Alanin durch arsenige Säure.

Nierenschnitte in Phosphat-Ringer.

l-Alanin-Endkonzentration 0,04-m.

Ver- such Nr.	Tier	<i>l</i> -Ala- nin- zu- satz	As ₂ O ₃ - Endkon- zentra- tion m.	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Alanin- Abbau	% Hem- mung der Leer- Atmung	% Hem- mung des Alanin- Abbaues
84	Meer- schwein- chen	—	—	10,8	0,7			
		+	—	18,3	2,7	2,0		
		—	0,001	3,3	0,7		70%	
		+	0,001	3,5	0,9	0,2		91%
89	Meer- schwein- chen	—	—	12,2	0,8			
		+	—	12,9	2,1	1,3		
		—	0,001	3,6	0,8		71%	
		+	0,001	3,7	1,5	0,7		47%
91	Meer- schwein- chen	—	—	14,1	0,4			
		+	—	13,7	2,1	1,7		
		—	0,001	3,5	0,3		75%	
		+	0,001	3,0	1,0	0,7		59%
154	Schwein	—	—	8,9	0,7			
		+	—	10,8	1,7	1,0		
		—	0,001	2,6	0,5		70%	
		+	0,001	2,5	0,8	0,3		70%
138	Meer- schwein- chen	—	—	11,4	0,9			
		+	—	14,1	2,8	1,9		
		—	0,0005	7,3	0,9		37%	
		+	0,0005	7,4	1,9	1,0		49%
139	Meer- schwein- chen	—	—	13,4	0,9			
		+	—	14,9	2,5	1,6		
		—	0,0005	6,9	0,9		40%	
		+	0,0005	7,5	1,8	0,9		44%
176	Meer- schwein- chen	—	—		0,5			
		+	—		1,4	0,9		
		—	0,0005		0,7			
		+	0,0005		1,2	0,5		45%
154	Schwein	—	—	8,9	0,7			
		+	—	10,8	1,7	1,0		
		—	0,0005	6,2	0,6		30%	
		+	0,0005	5,8	1,6	1,0		0%

Tabelle 5.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Valin durch arsenige Säure.

Nierenschnitte in Phosphat-Ringer. *l*-Valin-Endkonzentration 0,04-m.
As₂O₃-Endkonzentration 0,001-m.

Ver- such Nr.	Tier	<i>l</i> -Va- lin- Zu- satz	As ₂ O ₃ - Zu- satz	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Valin- Ab- bau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Valin- Abbaues
69	Meer- schwein- chen	—	—	10,7	0,4			
		+	—	12,2	1,0	0,6		
		—	+	3,3	0,5		69%	
		+	+	3,3	0,7	0,2		66%

Tabelle 6.

Einfluss von arseniger Säure auf Leeratmung und *l*-Asparaginsäure-Abbau.
Nierenschnitte in Phosphat-Ringer. *l*-Asparaginsäure-Endkonzentration 0,04-m.

As₂O₃-Endkonzentration 0,001-m.

Ver- such Nr.	Tier	<i>l</i> -As- para- gin- säure- zusatz	As ₂ O ₃ - Zu- satz	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Aspara- ginsäure- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Aspara- ginsäure- Abbaues
89	Meer- schwein- chen	—	—	12,2	0,8			
		+	—	18,7	2,6	1,8		
		—	+	3,6	0,8		71%	
		+	+	4,2	2,3	1,5		17%
91	Meer- schwein- chen	—	—	14,1	0,4			
		+	—	17,7	1,7	1,3		
		—	+	3,6	0,3		75%	
		+	+	6,6	2,7	2,4		Steigerung
117	Meer- schwein- chen	—	—	10,7	0,4			
		+	—	18,6	0,9	0,5		
		—	+	3,3	0,5		69%	
		+	+	7,5	2,3	1,8		Steigerung
122	Meer- schwein- chen	—	—	13,2	0,4			
		+	—	21,6	0,5	0,1		
		—	+	4,4	0,5		67%	
		+	+	8,2	1,9	1,4		Steigerung

Der Einfluss der arsenigen Säure auf den oxydativen Abbau von *p*-Phenylen-
diamin, Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronen-
säure ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Es geht daraus hervor, dass auch im Gewebe-
schnittversuch das Cytochrom- und das Succinat-System durch arsenige Säure nicht
beeinflusst werden, der Brenztraubensäure-Abbau ganz spezifisch gehemmt wird und
die übrigen Substrate sich ungefähr gleich wie die Leeratmung verhalten.

Tabelle 7.

Hemmung der Leeratmung und der Oxydation von p-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, l-Äpfelsäure, d,l-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure durch 0,001-m. arsenige Säure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Ver- such Nr.	Substrat- Endkonzentration	As ₂ O ₃ - Zusatz	Q _O	Q _O für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
140	—	—	10,9			
	p-Phenylendiamin 0,02-m.	—	30,1	19,2		
	—	+	3,5		68%	
	p-Phenylendiamin	+	25,0	21,5		0%
118	—	—	14,4			
	Bernsteins. 0,02-m.	—	28,9	14,5		
	—	+	4,2		71%	
	Bernsteins.	+	18,7	14,5		0%
124	—	—	10,7			
	l-Äpfels. 0,02-m. ...	—	22,6	11,9		
	—	+	3,5		67%	
	l-Äpfels.	+	10,0	6,5		45%
95	—	—	11,3			
	d,l-Milchs. 0,04-m.	—	15,9	4,6		
	—	+	2,0		82%	
	d,l-Milchs.	+	3,0	1,0		79%
132	—	—	14,3			
	Brenztraubens. *) 0,04-m.	—	11,0	— 3,3		
	—	— **)	3,2			
	Brenztraubens. ...	— **)	6,4	3,2		
	—	— **)	0,6		96%	
	Brenztraubens. ...	— **)	0,6	0		100%
125	—	—	13,2			
	Zitronens. 0,02-m. ...	—	20,3	7,1		
	—	+	4,0		70%	
	Zitronens.	+	6,3	2,3		68%

*) Ein oxydativer Brenztraubensäure-Abbau ist erst nach Fluoridvergiftung der Leeratmung messbar. **) Zusatz von NaF, Endkonzentration 0,1-m.

Hemmung durch Blausäure.

Bei allen Versuchen wurde nach den Angaben von Krebs⁵⁾ in den Einsatz der Warburg-Gefäße ein Gemisch von Kaliumcyanid und Kaliumhydroxyd gegeben. Die Angabe von Krebs, dass der l-Aminosäure-Abbau schon durch niedere Konzentrationen von Blausäure gehemmt werde, können wir für l-Alanin, l-Valin und l-Asparaginsäure bestätigen, siehe Tabelle 8. Die Werte für den Abbau von l-Valin sind bisweilen weniger überzeugend, doch sind hier die Messungen infolge der relativ hohen Leerwerte und des geringen Abbaues der Aminosäure ungenau. Die Hemmungen des oxydativen Abbaues aller übrigen Substrate brauchen hier nicht angeführt zu werden, wir haben sie alle zwischen 80—100% liegend gefunden.

Tabelle 8.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure durch Blausäure.

Nierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Aminosäure-Endkonzentration 0,04-m.

Ver- such Nr.	Tier	Substrat	HCN Endkon- zentra- tion m.	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
159	Meer- schwein- chen	—	—	10,9	1,2			
		<i>l</i> -Alanin ..	—	14,8	2,1	0,9		
		—	0,001	7,9	1,8		27%	
		<i>l</i> -Alanin ..	0,001	7,3	2,4	0,6		33%
161	Meer- schwein- chen	—	—	12,3	0,4			
		<i>l</i> -Alanin ..	—	20,5	1,5	1,1		
		—	0,01	2,3	1,2		81%	
		<i>l</i> -Alanin ..	0,01	2,2	1,4	0,2		82%
163	Schwein	—	—	10,2	0,3			
		<i>l</i> -Alanin ..	—	12,7	1,5	1,2		
		—	0,001	4,2	0,5		59%	
		<i>l</i> -Alanin ..	0,001	5,6	1,1	0,6		50%
		—	0,01	1,8	0,4		83%	
		<i>l</i> -Alanin ..	0,01	2,1	0,7	0,3		75%
159	Meer- schwein- chen	—	—	10,9	1,2			
		<i>l</i> -Valin ..	—	12,2	1,6	0,4		
		—	0,001	7,9	1,8		27%	
		<i>l</i> -Valin ..	0,001	6,8	2,3	0,5		0%
161	Meer- schwein- chen	—	—	12,3	0,4			
		<i>l</i> -Valin ..	—	13,7	0,5	0,1		
		—	0,01	2,3	1,2		31%	
		<i>l</i> -Valin ..	0,01	2,2	1,2	0		100%
163	Schwein	—	—	10,2	0,3			
		<i>l</i> -Valin ..	—	11,5	1,0	0,7		
		—	0,001	4,2	0,5		59%	
		<i>l</i> -Valin ..	0,001	5,1	0,8	0,3		57%
		—	0,01	1,8	0,4		83%	
		<i>l</i> -Valin ..	0,01	1,9	0,4	0		100%
157	Meer- schwein- chen	—	—	15,3	0,9			
		<i>l</i> -Aspara- ginsäure .	—	6,7	2,2	1,3		
		—	0,004*)	2,1	0,9		86%	
		<i>l</i> -Aspara- ginsäure .	0,004*)	1,5	1,1	0,2		85%

*) As₂O₃-Zusatz, Endkonzentration 0,001-m.

Hemmung durch Malonsäure und Pyrophosphorsäure.

Tabelle 9 zeigt den Einfluss verschiedener Malonsäure-Konzentrationen auf die Leeratmung und den Abbau von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure. Die Desaminierung dieser Aminosäuren wird durchschnittlich etwas stärker gehemmt wie die Leeratmung der Schnitte. Würde die Malonsäure nur spezifisch die Succino-dehydrase hemmen, so wären diese Ergebnisse ein Beweis dafür, dass der Wasserstofftransport bei der dehydrierenden Desaminierung dieser Aminosäuren über das Succino-dehydrase-System zum aktivierten Sauerstoff verlaufen muss. Dass dem aber nicht so ist, zeigt ein Vergleich der

Tabelle 9.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure durch Malonsäure.

Meerschweinchenierschnitte in Phosphat-Ringer.

Aminosäure-Endkonzentration 0,04-m.

Ver- such Nr.	Aminosäure- Zusatz	Malon- säure- Endkon- zentra- tion m.	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Amino- säure- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Amino- säure- Abbaues
82	—	—	6,4	0,5			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	5,3	1,4	0,9		
	—	0,1	2,8	0,7		56%	
	<i>l</i> -Alanin.....	0,1	1,2	0,8	0,1		89%
185	—	—	11,2	0,6			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	18,9	1,5	0,9		
	—	0,05	7,2	0,9		36%	
	<i>l</i> -Alanin.....	0,05	6,5	1,15	0,25		72%
111	—	—	13,6	0,3			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	14,9	1,8	1,5		
	—	0,01	8,9	0,2		34%	
	<i>l</i> -Alanin.....	0,01	10,0	0,6	0,4		73%
126	—	—	12,4	0,5			
	<i>l</i> -Valin	—	13,7	1,0	0,5		
	—	0,05	4,3	0,4		65%	
	<i>l</i> -Valin	0,05	3,9	0,5	0,1		80%
116	—	—	10,7	0,4			
	<i>l</i> -Valin	—	12,2	1,0	0,6		
	—	0,01	9,7	0,7		10%	
	<i>l</i> -Valin	0,01	9,7	1,1	0,4		33%
122	—	—	13,2	0,4			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	—	21,6	0,1	0,1		
	—	—*)	4,4	0,5		67%	
	<i>l</i> -Asparagins. ...	—*)	8,2	1,9	1,4		
	—	0,05*)	2,8	0,6		79%	
	<i>l</i> -Asparagins. ...	0,05*)	3,7	0,9	0,3		79%

*) As₂O₃-Zusatz, Endkonzentration 0,001-m.

Tabelle 10.

Hemmung der Leeratmung und des oxydativen Abbaues von p-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, l-Äpfelsäure, d,l-Milchsäure, Brenztraubensäure, Zitronensäure, durch verschiedene Konzentrationen Malonsäure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Ver- such Nr.	Substrat- Endkonzentration	Malon- säure- Endkon- zentra- tion	Q _{O₂}	Q _{O₂} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
140	—	—	10,9			
	p-Phenylendiamin 0,02	—	30,1	19,2		
	—	0,05	5,1		53%	
	p-Phenylendiamin	0,05	23,8	18,7		3%
172	—	—	13,1			
	Bernsteins. 0,02 ...	—	32,0	18,9		
	—	0,002	9,7		26%	
	Bernsteins.	0,002	26,5	16,8		11%
	—	0,01	9,4		28%	
	Bernsteins.	0,01	20,9	11,5		39%
124	—	—	10,7			
	Äpfels. 0,02	—	22,6	11,9		
	—	0,05	4,5		58%	
	Äpfels.	0,05	12,1	7,6		36%
178	—	—	12,4			
	Milchs. 0,04	—	14,7	2,3		
	—	0,002	14,3		0%	
	Milchs.	0,002	16,2	1,9		18%
	—	0,01	11,6		6%	
	Milchs.	0,01	13,0	1,4		39%
130	—	—	14,2			
	Brenztraubens. 0,04	—	12,6	- 1,6		
	—	0,05	5,2		63%	
	Brenztraubens.	0,05	11,2	6,0		Steigerung
125	—	—	13,2			
	Zitronens. 0,02	—	20,3	7,1		
	—	0,05	5,1		62%	
	Zitronens.	0,05	12,6	7,5		0%

Tabelle 11.

Hemmung der Leeratmung und des oxydativen Abbaues von Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure durch 0,02-m. Pyrophosphorsäure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Ver- such Nr.	Substrat- Endkonzentration	Pyrophos- phorsäure- zusatz	Q _{O₂}	Q _{O₂} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
142	—	—	11,8			
	Bernsteins. 0,02	—	31,0	19,2		
	—	+	13,1		0%	
	Bernsteins.	+	18,8	5,7		70%
145	—	—	14,1			
	Äpfels. 0,02	—	21,0	6,9		
	—	+	14,2		0%	
	Äpfels.	+	21,2	7,0		0%
142	—	—	11,8			
	Milchs. 0,04	—	15,3	3,5		
	—	+	13,1		0%	
	Milchs.	+	18,6	5,5		0%
145	—	— **)	3,1			
	Brenztraubens. 0,04*)	— **)	8,7	5,6		
	—	+ **)	2,6		16%	
	Brenztraubens. . . .	+ **)	7,0	4,4		21%
187	—	—	13,2			
	Zitronens. 0,02	—	21,6	8,4		
	—	+	13,6		0%	
	Zitronens.	+	22,2	9,0		0%

*) Oxydativer Abbau von Brenztraubensäure erst nach NaF-Zusatz messbar.

**) NaF-Zusatz, Endkonzentration 0,1-m.

Tabellen 10 und 11. Tabelle 10 gibt eine Zusammenfassung über die Hemmung des oxydativen Abbaues von *p*-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure, Tabelle 11 eine Übersicht über die Hemmungen des oxydativen Abbaues der gleichen Substrate durch Pyrophosphorsäure. Beide Hemm-substanzen sollten in gleicher Weise spezifisch die Succino-dehydrase blockieren. Nach unseren Versuchen ist dies tatsächlich für die Pyrophosphorsäure der Fall; sie hemmt spezifisch den oxydativen Abbau von Bernsteinsäure, während die Leeratmung sowie die Oxydation von Äpfelsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure durch Zugabe von 0,02-m. Pyrophosphorsäure nicht oder kaum beeinflusst werden. Versuche mit 0,05-m. Pyrophosphorsäure, die wir hier nicht wiedergeben, ergaben die gleichen Resul-tate. Demgegenüber weist die Hemmung durch Malonsäure eine geringere Spezifität auf. Der oxydative Abbau von Bernsteinsäure und von Milchsäure wird in gleicher Weise intensiv gehemmt, etwas weniger ausgesprochen, aber immer noch sehr deutlich ist die Hemmung der Leeratmung und die des Äpfelsäure-Abbaues, während der Abbau von Zi-tronensäure unbeeinflusst bleibt. Der oxydative Abbau von Brenztraubensäure kommt

meistens überhaupt erst nach Malonsäurezusatz zum Vorschein. Die Verhältnisse scheinen also folgendermassen zu liegen, dass man die Malonsäurehemmung allein nicht als vollwertigen Beweis für den Ablauf des Zitronensäure-Zyklus oder der Fumarsäure-Katalyse annehmen kann. Unsere Versuche wurden nur mit Nierenschnitten ausgeführt und sind deshalb nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in anderen Organen übertragbar. Die Einfügung der Tatsache der Pyrophosphat-Hemmung in die bisherige Vorstellung über den Zitronensäure-Zyklus bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Den Einfluss von 0,02-m. Pyrophosphorsäure auf den Abbau von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure gibt Tabelle 12 wieder. Die Spaltung von *l*-Alanin und *l*-Valin wird nicht gehemmt, auch für sie kann deshalb ein obligater Transport des abgelösten Wasserstoffs über das Succino-dehydrase-System ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass die Spaltung von *l*-Asparaginsäure ebenso stark wie diejenige von Bernsteinsäure durch Pyrophosphorsäure gehemmt wird, ist sehr auffallend. Es ergibt sich daraus eine nahe Verwandtschaft der Succino-dehydrase mit dem *l*-Asparaginsäure desaminierenden Ferment: Beide werden stark durch Pyrophosphorsäure gehemmt, während arsenige Säure keinen hemmenden Einfluss auf sie ausübt; da die Asparaginsäure eine α -Aminobernsteinsäure ist, ist diese Verwandtschaft sehr wahrscheinlich strukturell zu erklären. Wir glauben daher auch in diesem Falle nicht, dass für den *l*-Asparaginsäure-Abbau das Succino-dehydrase-System notwendig ist. Das verschiedene Verhalten des Abbaues von *l*-Alanin, *l*-Valin einerseits und *l*-Asparaginsäure andererseits gegenüber Pyrophosphorsäure ist ferner die zweite Tatsache, die gegen die Einheitlichkeit der *l*-Aminosäure-oxydase spricht.

Tabelle 12.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure durch 0,02-m. Pyrophosphorsäure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Aminosäure-Endkonzentration 0,04-m.

Ver- such Nr.	Substratzusatz	Pyrophos- phorsäure- Zusatz	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
142	—	—	11,8	0,5			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	16,1	2,1	1,6		
	—	+	13,1	0,8		0%	
	<i>l</i> -Alanin.....	+	14,2	2,8	2,0		0%
146	—	—	13,6	0,8			
	<i>l</i> -Valin	—	15,3	0,9	0,1		
	—	+	12,8	0,6		6%	
	<i>l</i> -Valin	+	15,1	1,1	0,5		0%
145	—	—	14,1	1,0			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	—	6,7	3,5	2,5		
	—	+)*)	3,4	1,0			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	+)*)	4,4	1,9	0,9		64%
151	—	— *)	3,9	0,8			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	— *)	6,5	2,2	1,4		
	—	+)*)	3,2	0,8			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	+)*)	4,5	1,3	0,5		64%

*) As₂O₃-Zusatz, Endkonzentration 0,001-m.

Hemmung durch Jodessigsäure.

Tabelle 13 enthält die Ergebnisse der Hemmung der Leeratmung und der Bildung von Ammoniak aus *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure, Tabelle 14 die Resultate der Hemmung des oxydativen Abbaues von p-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure. Die Leeratmung sowie alle genannten Substrate ausser p-Phenylendiamin und Bernsteinsäure werden stark durch

Tabelle 13.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure durch Jodessigsäure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Aminosäure-Endkonzentration 0,04-m. Jodessigsäurekonzentration 0,001-m.

Ver- such Nr.	Substrat- zusatz	Jod- essig- säure- zusatz	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
113	—	—	13,9	0,6			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	15,1	1,3	0,7		
	—	+	3,0	0,6		78%	
	<i>l</i> -Alanin.....	+	3,2	0,9	0,3		57%
126	—	—	12,4	0,5			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	12,9	1,6	1,1		
	—	+	2,5	0,5		80%	
	<i>l</i> -Alanin.....	+	2,6	0,6	0,1		91%
185	—	—	11,2	0,6			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	18,9	1,5	0,9		
	—	+	4,3	1,2		62%	
	<i>l</i> -Alanin.....	+	4,8	1,4	0,2		78%
117	—	—	10,7	0,4			
	<i>l</i> -Valin	—	12,2	1,0	0,6		
	—	+	2,7	0,5		75%	
	<i>l</i> -Valin	+	2,9	0,5	0		100%
126	—	—	12,4	0,5			
	<i>l</i> -Valin	—	13,7	1,0	0,5		
	—	+	2,5	0,5		80%	
	<i>l</i> -Valin	+	2,7	0,4	— 0,1		100%
122	—	—*)	4,4	0,5			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	—*)	8,2	1,9	1,4		
	—	+)*)	2,6	0,6			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	+)*)	2,9	0,9	0,3		79%
188	—	—*)	4,3	1,0			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	—*)	7,1	2,9	1,9		
	—	+)*)	3,2	1,2			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	+)*)	4,0	1,6	0,4		79%

*) As₂O₃-Zusatz, Endkonzentration 0,001-m.

0,001-m. Jodessigsäure gehemmt. Die Jodessigsäurehemmung gleicht demnach in vielen, jedoch nicht in allen Beziehungen der Hemmung durch arsenige Säure. Der oxydative Abbau von Brenztraubensäure wird durch 0,001-m. arsenige Säure vollständig aufgehoben, während 0,001-m. Jodessigsäure ihn nur zu ungefähr 70% hemmt. Besonders deutlich ist der Unterschied beim Abbau der *l*-Asparaginsäure. Während Jodessigsäure ihn ziemlich stark hemmt, bleibt er bei Zusatz von arseniger Säure unverändert. Succinodehydrase und das *l*-Asparaginsäure abbauende Ferment unterscheiden sich demnach durch ihr Verhalten gegenüber Jodessigsäure; es handelt sich also um zwei verschiedene Fermente.

Tabelle 14.

Hemmung der Leeratmung und des oxydativen Abbaues von p-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure durch Jodessigsäure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Jodessigsäurekonzentration 0,001-m.

Ver- such Nr.	Substrat- Endkonzentration m.	Jod- essig- säure- zusatz	Q _{O₂}	Q _{O₂} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
140	—	—	10,9			
	p-Phenylendiamin 0,02	—	30,1	19,2		
	—	+	4,0		63%	
	p-Phenylendiamin .	+	27,0	23,0		0%
118	—	—	14,4			
	Bernsteins. 0,02	—	28,9	14,5		
	—	+	3,7		74%	
	Bernsteins.	+	16,7	14,0		3%
124	—	—	10,7			
	Äpfels. 0,02	—	22,6	11,9		
	—	+	2,7		76%	
	Äpfels.	+	5,3	2,6		78%
118	—	—	14,4			
	Milchsäure 0,04	—	21,7	7,3		
	—	+	3,7		74%	
	Milchsäure	+	4,2	0,5		93%
132	—	— **)	3,2			
	Brenztraubens. 0,04*)	— **)	6,4	3,2		
	—	+ **)	1,8		87%	
	Brenztraubens.	+ **)	2,7	0,9		72%
125	—	—	13,2			
	Zitronens. 0,02	—	20,3	7,1		
	—	+	3,3		75%	
	Zitronens.	+	6,2	2,9		59%

*) Brenztraubensäure-Abbau erst nach Zusatz von NaF messbar.

**) NaF-Zusatz, Endkonzentration 0,1-m.

Hemmung durch Natriumfluorid.

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist, ist der Abbau von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure durch 0,1-m. Natriumfluorid in ungefähr gleichem Masse hemmbar wie die Leeratmung der Gewebsschnitte. Am wenigsten überzeugend sind die Werte für *l*-Valin; wie bei früheren Versuchen mit dieser Aminosäure sind daran der geringe Abbau von *l*-Valin und die darum hohen Fehlerbreiten schuld. Niedrigere Konzentrationen von

Tabelle 15.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure durch Natriumfluorid.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Aminosäure-Endkonzentration 0,02-m.

Ver- such Nr.	Substrat- Zusatz	NaF- Endkon- zentra- tion m.	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
112	—	—	14,0	0,6			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	16,9	2,1	1,5		
	—	0,1	3,3	0,7		76%	
	<i>l</i> -Alanin.....	0,1	3,2	0,4	- 0,3		100%
126	—	—	12,4	0,5			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	12,9	1,6	1,1		
	—	0,1	2,9	0,4		77%	
	<i>l</i> -Alanin.....	0,1	1,1	0,9	0,5		55%
116	—	—	10,7	0,4			
	<i>l</i> -Alanin.....	—	13,4	2,3	1,9		
	—	0,01	10,7	1,1		0%	
	<i>l</i> -Alanin.....	0,01	10,3	0,9	- 0,2		100%
121	—	—	12,0	0,3			
	<i>l</i> -Valin	—	14,2	0,6	0,3		
	—	0,1	4,4	0,6		63%	
	<i>l</i> -Valin	0,1	4,3	1,0	0,4		0%
126	—	—	12,4	0,5			
	<i>l</i> -Valin	—	13,7	1,0	0,5		
	—	0,1	2,9	0,4		77%	
	<i>l</i> -Valin	0,1	2,5	0,4	0		100%
116	—	—	10,7	0,4			
	<i>l</i> -Valin	—	12,2	1,0	0,6		
	—	0,01	10,7	1,1		0%	
	<i>l</i> -Valin	0,01	10,3	0,8	- 0,3		100%
122	—	—	4,4	0,5			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	—	8,2	1,9	1,4		
	—	+))	1,9	0,8			
	<i>l</i> -Asparagins. ...	+))	3,2	1,4	0,6		57%

*) As₂O₃-Zusatz, Endkonzentration 0,001-m.

Natriumfluorid (0,01-m.) hemmen noch den Aminosäure-Abbau, nicht mehr die Leeratmung, auch wenn der Magnesium- und Calciumionenzusatz zum Puffer weggelassen wird. Über die Hemmung des oxydativen Abbaues von p-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, l-Äpfelsäure, d,l-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure gibt Tabelle 16 Aufschluss. Die Oxydation von p-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, Milchsäure und Zitronensäure wird kaum beeinflusst, die von Brenztraubensäure kommt durch Fluoridzusatz (wie durch Malonsäurezusatz) überhaupt erst messbar zum Vorschein, während die von Äpfelsäure gehemmt wird, wenn auch nicht in gleich ausgesprochener Weise wie die Leeratmung und der Aminosäure-Abbau. Dass die Hemmungen tatsächlich durch die Fluorid- und nicht durch die Natrium-Ionen verursacht werden, haben wir durch hier nicht wiedergegebene Vergleichsversuche mit 0,1-m. NaCl bewiesen. Diese ergaben keine Hemmungen.

Tabelle 16.

Hemmung der Leeratmung und des oxydativen Abbaues von p-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, l-Äpfelsäure, d,l-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure durch 0,1-m. Natriumfluorid.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Ver- such Nr.	Substrat- Endkonzentration m.	NaF- Zu- satz	Q _{O₂}	Q _{O₂} für Substrat- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Substrat- Abbaues
140	—	—	10,9			
	p-Phenylendiamin 0,02	—	30,1	19,2		
	—	+	4,3		61%	
	p-Phenylendiamin	+	19,6	15,3		20%
120	—	—	15,7			
	Bernsteinsäure 0,02	—	27,9	12,2		
	—	+	7,2		54%	
	Bernsteins.	+	17,1	9,9		19%
124	—	—	10,7			
	Äpfels. 0,02	—	22,6	11,9		
	—	+	3,4		68%	
	Äpfels.	+	9,6	6,2		48%
125	—	—	13,2			
	Milchs. 0,04	—	17,4	4,2		
	—	+	4,0		70%	
	Milchs.	+	8,2	4,2		0%
130	—	—	14,2			
	Brenztraubens. 0,04	—	12,6	— 1,6		
	—	+	3,8		73%	
	Brenztraubens. ...	+	8,4	4,6		Steigerung
125	—	—	13,2			
	Zitronens. 0,02 ...	—	20,3	7,1		
	—	+	4,0		70%	
	Zitronens.	+	13,6	9,6		0%

Hemmung durch Carbonylreagentien.

Wir haben schliesslich noch die Hemmung der Leeratmung und des *l*-Alanin-Abbaues durch Semicarbazid und Hydrazin 0,01-m. untersucht (Tabelle 17). Semicarbazid hemmt die Leeratmung kaum, den *l*-Alanin-Abbau mässig, während Hydrazin erstere mässig, letztere ziemlich stark hemmt.

Tabelle 18 gibt eine abschliessende Übersicht über die Wirkung der verschiedenen Hemmsubstanzen auf den Abbau der untersuchten Substrate. Sie zeigt deutlich die Verwandtschaft der für die Leeratmung und für den Abbau von *l*-Alanin und *l*-Valin nötigen Enzymsysteme, den Unterschied in der Hemmbarkeit des Abbaues von *l*-Alanin und *l*-Valin einerseits, von *l*-Asparaginsäure andererseits, die Beziehungen zwischen Succino-dehydrase und *l*-Asparaginsäure-abbauendem Ferment, endlich die Spezifitätsunterschiede der Malon- und Pyrophosphorsäurehemmungen.

Tabelle 17.

Hemmung der Leeratmung und des *l*-Alanin-Abbaues durch 0,01-m. Semicarbazid und 0,01-m. Hydrazin.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

l-Alanin-Endkonzentration 0,04-m.

Ver- such Nr.	<i>l</i> -Ala- nin- Zusatz	Hemm- substanz	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Alanin- Abbau	% Hem- mung der Leer- atmung	% Hem- mung des Alanin- Abbaues
113	—	—	13,9	0,6			
	+	—	15,1	1,3	0,7		
	—	Semicarbazid ..	13,0	0,5		6%	
	+	Semicarbazid ..	12,4	0,9	0,4		43%
	—	Hydrazin	7,2	0,5		48%	
	+	Hydrazin	6,0	0,7	0,2		71%

Tabelle 18.

Übersicht über die Wirkung der untersuchten Hemmsubstanzen.

Die Hemmung ist durch + bezeichnet.

Hemm- substanz m.	p-Phe- nylen- di- amin	Bern- stein- säure	<i>l</i> -As- para- gin- säure	Brenz- trau- ben- säure	Zitro- nen- säure	<i>d, l</i> - Milch- säure	<i>l</i> -Äp- fel- säure	Leer- at- mung	<i>l</i> -Ala- nin	<i>l</i> -Va- lin
HCN 0,001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jodessig- säure 0,001	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
As ₂ O ₃ 0,001	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
Malonsäure 0,05	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+
Pyrophos- phorsäure 0,02	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
NaF 0,1....	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+

Konkurrenzversuche zwischen *l*-Alanin, *l*-Valin und *l*-Asparaginsäure.

Nach den Hemmversuchen werden *l*-Alanin und *l*-Valin durch das gleiche, *l*-Asparaginsäure dagegen durch ein verschiedenes Enzym abgebaut. Die Konkurrenzversuche bestätigen diese Ergebnisse. In Tabelle 19 wird je einer der mehrmals mit dem gleichen

Resultat ausgeführten Konkurrenzversuche zwischen *l*-Alanin und *l*-Valin einerseits, *l*-Alanin und *l*-Asparaginsäure andererseits wiedergegeben. Die Aminosäurekonzentrationen wurden so gewählt, dass eine weitere Erhöhung der Konzentration keinen stärkeren Abbau ergab. Da der *l*-Asparaginsäure-Abbau nur in Gegenwart von arseniger Säure gemessen werden kann, diese aber den *l*-Alanin-Abbau beträchtlich hemmt, wurde eine Konzentration an arseniger Säure gewählt, die die Desaminierung von *l*-Alanin nur zu ungefähr 50% hemmt und für die Messung der Ammoniakbildung aus *l*-Asparaginsäure gerade noch ausreicht. Dies ist bei einer Konzentration von 0,0005-m. der Fall.

Tabelle 19.

Beispiel eines Konkurrenzversuches zwischen *l*-Alanin und *l*-Valin und zwischen *l*-Alanin und *l*-Asparaginsäure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Aminosäure-Endkonzentration 0,04-m.

As₂O₃-Endkonzentration 0,0005-m.

Ver- such Nr.	Aminosäure-Zusatz	As ₂ O ₃ -Zusatz	Q _{NH₄} für Substrat- Abbau
57	<i>l</i> -Alanin.....	—	1,6
	<i>l</i> -Valin	—	0,5
	<i>l</i> -Alanin + <i>l</i> -Valin	—	1,3
179	<i>l</i> -Alanin.....	+	0,4
	<i>l</i> -Asparaginsäure	+	1,4
	<i>l</i> -Alanin + <i>l</i> -Asparaginsäure	+	1,8

Einfluss von Bernsteinsäure und *d,l*-Milchsäure auf den Abbau von *l*-Alanin.

Die Desaminierung von *l*-Asparaginsäure und *l*-Glutaminsäure durch Rattennierenschnitte wird nach *Krebs*⁵⁾ durch gleichzeitige Zugabe von *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure oder α -Ketoglutarinsäure gehemmt. Wird anstelle von *l*-Asparaginsäure ein Ammoniumsalz zusammen mit dem zweiten Substrat zu den Schnitten gegeben, so verschwindet bedeutend weniger Ammoniak als der Desaminierungshemmung von *l*-Asparaginsäure durch das betreffende Substrat entsprechen würde. Daraus wird geschlossen, dass es sich bei der Hemmung der Desaminierung der beiden Aminosäuren durch „oxydierbare Substrate“ nicht um einen Verbrauch des gebildeten Ammoniaks zu Synthesezwecken handelt. Die Hemmung wird als Konkurrenz um den aktivierten Sauerstoff durch zwei verschiedene Fermentsysteme aufgefasst. Mit anderen Worten, das *l*-Asparaginsäure und das *l*-Glutaminsäure abbauende Ferment sind Dehydrasen, der beim Abbau freiwerdende Wasserstoff hat den gleichen Weg über verschiedene Überträger zum aktivierten Sauerstoff zurückzulegen wie der z. B. aus Milchsäure durch die Lactico-dehydrase abgespaltene Wasserstoff. Kann nun ein Überträger in der Zeiteinheit nur eine beschränkte Menge Wasserstoff weitergeben, so werden die beiden Substrate mittels des abgelösten Wasserstoffs um diesen Überträger konkurrieren und beide entsprechend weniger abgebaut werden.

Wir konnten bei gleichzeitigem Zusatz von *l*-Alanin und Bernsteinsäure zu Nierenschnitten keine, bei Zusatz von *l*-Alanin und *d,l*-Milchsäure eine deutlich verminderte Ammoniakbildung beobachten. Das Ammoniak-Defizit könnte aber in unseren Versuchen auch auf einem Verbrauch des gebildeten Ammoniaks zu Synthesezwecken beruhen, da bei gleichzeitiger Zugabe von kleinen Ammoniumchloridmengen und Succinat oder Lactat ungefähr gleichviel Ammoniak verschwindet wie aus *l*-Alanin bei Anwesenheit von Bernsteinsäure oder Milchsäure weniger gebildet wird. Versuche siehe Tabelle 20 und 21.

Tabelle 20.

Einfluss von 0,02-m. Bernsteinsäure und 0,04-m. *d,l*-Milchsäure auf die Ammoniakbildung aus 0,04-m. *l*-Alanin durch Meerschweinchennierenschnitte.

Ver- such Nr.	Substratzusätze	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Alanin- Abbau	Q _{NH₃} Verbrauch durch Milch- säure oder Bernstein- säure
93	—	13,0	0,6		
	<i>l</i> -Alanin.....	15,5	2,0	1,4	
	<i>d,l</i> -Milchsäure	17,1	0		
	<i>l</i> -Alanin + <i>d,l</i> -Milchsäure .	18,8	1,0	1,0	- 0,4
175	—	14,4	1,0		
	<i>l</i> -Alanin.....	14,2	2,0	1,0	
	Bernsteinsäure	26,4	0,1		
	<i>l</i> -Alanin + Bernsteins. ...	21,9	0	0	- 1,0

Tabelle 21.

Verbrauch von Ammoniak beim Abbau von 0,02-m. Bernsteinsäure und 0,04-m. *d,l*-Milchsäure durch Meerschweinchennierenschnitte in Gegenwart von kleinen Mengen Ammoniumchlorid.

Ver- such Nr.	Substrat- zusatz	NH ₃ in mm ³ bei Versuchs- Beginn	NH ₃ in mm ³ nach 60 Min. Versuch	mg Trocken- Gewebe	Q _{NH₃}	Q _{O₂}
182	—	—	20,8	23,1	0,8	13,1
	Bernsteinsäure	—	15,7	23,6	0,7	31,7
	—	170	170	21,2	0	13,2
	Bernsteinsäure	170	139,8	16,7	- 1,3	35,5
192	—	—	34,2	53,1	0,6	12,9
	Milchsäure	—	26,6	56,5	0,5	18,7
	—	170	146,6	56,8	- 0,4	12,9
	Milchsäure	170	120,3	54,0	- 0,9	18,2

Wir sind daran, die Frage des Ammoniakschwundes weiter zu klären und werden in einer späteren Arbeit darüber berichten.

Es ist aber trotzdem wahrscheinlich, vor allem aus dem Verhalten der Substrate gegenüber verschiedenen Hemmsubstanzen, dass es sich auch beim *l*-Alanin abbauenden Ferment um eine Dehydrase handelt. Ihr Verhalten gegenüber Hemmsubstanzen steht dem der Malico- und Lactico-dehydrase am nächsten, was am ehesten aus der ähnlichen chemischen Struktur der Substrate zu erklären ist.

Bildung von Brenztraubensäure aus *l*-Alanin.

1. Bestimmung der Brenztraubensäure nach *Straub*²³⁾.

Wird die Suspensionsflüssigkeit der Nierenschnitte nach Versuchsende auf Brenztraubensäure untersucht, so findet man regelmässig eine geringe Brenztraubensäuremenge in den Ansätzen mit *l*-Alanin, die aber nur 10—20% der theoretisch aus den Ammoniak-

werten zu erwartenden Menge beträgt. Die Leerwerte der Ansätze ohne *l*-Alanin betragen meist null. Da, wie wir festgestellt haben, zu Nierenschnitten zugesetzte kleine Brenztraubensäuremengen im Laufe einer Stunde in Sauerstoffatmosphäre bei 38° restlos verschwinden, sind die mitgeteilten niedrigen Brenztraubensäurewerte leicht zu verstehen. Aus den Hemmversuchen war jedoch hervorgegangen, dass der Brenztraubensäure-Abbau durch arsenige Säure stärker gehemmt wird als der *l*-Alanin-Abbau. Wir führten deshalb die Versuche mit Zusatz von 0,0005-m. arseniger Säure aus und erhielten nun, bei einer Hemmung des *l*-Alanin-Abbaues von ca. 50%, 70 bis 100% der zu erwartenden Menge Brenztraubensäure. Tabelle 22 gibt einen dieser zahlreich ausgeführten Versuche wieder.

Tabelle 22.

Beispiel der Brenztraubensäurebildung aus *l*-Alanin mit und ohne Zusatz von 0,0005-m. arseniger Säure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.
l-Alanin-Endkonzentration 0,04-m.

Ver- such Nr.	Ala- nin- Zu- satz	As ₂ O ₃ - Zu- satz	Q _{NH₂}	Q _{NH₂} aus Alanin	Q _{Brenz- traubensäure}	Q _B aus Alanin	% des theoret. Wertes für Brenztrauben- säure
139	—	—	0,9		0,29		
	+	—	2,5	1,6	0,58	0,29	$\frac{0,29 \times 100}{1,6} = 18\%$
	—	+	0,9		0,28		
	+	+	1,8	0,9	0,96	0,68	$\frac{0,68 \times 100}{0,9} = 76\%$

2. Isolierung der Brenztraubensäure als Dinitro-phenylhydrazon des Acetaldehyds im Ätherextrakt.

Nachdem die Brenztraubensäure als Reaktionsprodukt des *l*-Alanin-Abbaues kolorimetrisch nachgewiesen war, versuchten wir auch den chemischen Nachweis als Dinitro-phenylhydrazon.

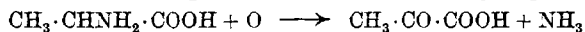
Zu diesem Zwecke wurden Grossversuche in folgender Art angestellt: in sechs 200 cm³ Erlenmeyer-Kolben wurden je 30 cm³ Phosphat-Ringer enthaltend 0,02-m. *l*-Alanin und 0,0005-m. As₂O₃ gegeben, dazu Schweine-Nierenschnitte (Gesamtrockengewicht ca. 5 g). Schütteln bei 38° unter Sauerstoffdurchleitung während einer Stunde. Hernach Enteiweissung der Suspensionsflüssigkeit durch den achten Teil des Volumens 30-proz. Trichloressigsäure. Obwohl wir nach der *Straub'schen* Bestimmung in der enteiweissten Lösung einen für unsere Verhältnisse recht hohen Brenztraubensäurewert (Q Brenztraubensäure = 1,4) erhielten, gelang es uns nicht, aus dieser Lösung die gebildete Brenztraubensäure als 2,4-Dinitro-phenylhydrazon auszufällen. Extrahiert man die mit Trichloressigsäure enteiweisste Lösung während 8 Stunden im Flüssigkeits-Extraktionsapparat mit Äther, dampft man dann die ätherische Lösung nach Zusatz und Durchschütteln mit einigen cm³ Wasser ein, so lässt sich aus dem wässrigen Rückstand mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin ein rotbraunes Hydrazon ausfällen, das in schönen, langen Nadeln krystallisiert und einen Schmelzpunkt von 147° zeigt, der auch bei mehrmaligem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol konstant bleibt. Wie Parallelversuche ergaben, verhält sich Brenztraubensäure in gleicher Weise. Man erhält hier ebenfalls das in langen Nadeln krystallisierende 2,4-Dinitro-phenylhydrazon vom Schmelzpunkt ca. 150°. Eine Mischschmelzpunktsbestimmung ergab keine Schmelzpunktserniedrigung. Es handelt sich hier um das Dinitro-phenylhydrazon des Acetaldehyds, denn ein auf gleiche Weise dargestelltes Dinitro-phenylhydrazon des Acetaldehyds ergab denselben Schmelzpunkt. Durch die lange dauernde Ätherextraktion der Suspensionsflüssigkeit wird also die Brenztraubensäure zum grössten Teil zum Acetaldehyd decarboxyliert.

3. Isolierung der Brenztraubensäure als 2,4-Dinitro-phenylhydrazon.

Die Tatsache, dass wir in der enteieissten Suspensionsflüssigkeit der Grossversuche die Brenztraubensäure nicht direkt als Dinitro-phenylhydrazon nachweisen konnten, führten wir auf die Anwesenheit von kolloiden, die Fällung verhindernden Bestandteilen zurück. Wir dialysierten daher die enteieisste Lösung im Cellophanschlauch 12 Stunden im Eisschrank gegen das gleiche Volumen destilliertes Wasser und gaben hernach zur Aussenflüssigkeit den dritten Teil des Volumens in 2-n. HCl gesättigter Dinitro-phenylhydrazinlösung zu. In kurzer Zeit fiel ein feiner, zitronengelber Niederschlag aus, der sich als das Brenztraubensäure-phenylhydrazon erwies. Gewicht des getrockneten Niederschlags 35 mg, entsprechend ungefähr 12 mg Brenztraubensäure. Aus der kolorimetrischen Bestimmung zu erwartende Menge Brenztraubensäure 15 mg. Schmelzpunkt des ungereinigten Niederschlags 211—213°, Mischschmelzpunkt 214—215°. Nach Umkrystallisation aus Alkohol Schmelzpunkt 215° (unkorrigiert). Die Mikroelementaranalyse, ausgeführt von der Firma *Sandoz A.G.*, für die wir auch an dieser Stelle bestens danken, ergab einen Stickstoffgehalt von 20,79 (20,64)%, was mit der berechneten Menge 20,89% gut übereinstimmt.

Besprechung der Ergebnisse.

Die wichtigste Tatsache, die aus den vorliegenden Untersuchungen hervorgeht, ist wohl der Nachweis der Bildung von Brenztraubensäure aus *l*-Alanin in Gegenwart von Nierenschnitten verschiedener Tiere. Während die Menge Sauerstoff, die pro Mol desaminiertes *l*-Alanin verbraucht wird, infolge der ungefähr 20mal höheren Leeratmung nicht genau zu bestimmen ist, kann pro Mol gebildetes Ammoniak annähernd 1 Mol gebildete Brenztraubensäure festgestellt werden. Der erste Abbau von *l*-Alanin in der tierischen Niere erfolgt demnach in gleicher Weise wie derjenige von *d*-Alanin.



Im Gegensatz zu *d*-Alanin wird *l*-Alanin aber nur durch überlebende, intensiv atmende Zellaggregate abgebaut. Extrakte oder gar Trockenpräparate spalten diese *l*-Aminosäure nicht.

Als weiterer Unterschied im Abbau von *l*- und *d*-Aminosäuren tritt mehr und mehr die Vielheit und engere Spezifität der *l*-Aminosäure-oxydasen gegenüber der geringeren Spezifität der *d*-Aminosäure-oxydasen hervor. Ein Beitrag dafür bildet die hier nachgewiesene Trennung der *l*-Alanin-oxydase, die vielleicht noch andere aliphatische Monoamino-monocarbonsäuren anzugreifen vermag, von der *l*-Asparaginsäure-oxydase, die noch von *Krebs* als *l*-Aminosäure-oxydase schlechthin dargestellt wurde, obwohl auch dieser Autor schon die Möglichkeit der Existenz mehrerer *l*-Aminosäure-oxydasen in Erwägung gezogen hat. Die beiden Enzyme, *l*-Alanin-oxydase und *l*-Asparaginsäure-oxydase, unterscheiden sich durch ihr Verhalten gegenüber Zusatz von arseniger Säure und von Pyrophosphorsäure. Arsenige Säure hemmt die *l*-Alanin-, aber nicht die *l*-Asparaginsäure-oxydase, Pyrophosphorsäure hemmt die *l*-Asparaginsäure-, aber nicht die *l*-Alanin-oxydase. Ferner spricht der Konkurrenzversuch eindeutig für ihre Verschiedenheit.

Der *l*-Alanin-Abbau zeigt in seiner Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Zellgiften eine ganz ausgesprochene Ähnlichkeit mit der Eigenatmung und dem oxydativen Abbau von *l*-Äpfelsäure und *d,l*-Milchsäure durch Nierenschnitte. Blausäure, arsenige Säure, Jodessigsäure, Malonsäure hemmen alle diese Prozesse in gleicher Weise, Natriumfluorid alle mit Ausnahme des Milchsäure-Abbaues. Wir vermuten deshalb, dass es sich auch bei der *l*-Alanin-oxydase um ein ganzes Fermentsystem handeln könnte, zusammengesetzt aus *l*-Alanin-dehydrase, Wasserstoffüberträgern und Cytochromsystem. Da das beim *l*-Alanin-Abbau gebildete Ammoniak in Gegenwart von *d,l*-Milchsäure oder *l*-Äpfelsäure sehr wahrscheinlich zu Synthesen verbraucht wird, ist es uns bisher noch nicht gelungen, die Dehydrasenatur durch den Konkurrenzversuch zu beweisen. Wir sind daran, diese Verhältnisse abzuklären. Dass es sich dabei nicht einfach um eine mit der Zellatmung gekoppelte Reaktion handelt, glauben wir daraus schließen zu dürfen, dass der Abbau von *l*-Alanin fluoridempfindlicher ist als die Leeratmung, dass er ferner durch Semicarbazid gehemmt wird, das die Leeratmung kaum beeinflusst. Aus der Blausäurehemmung, die für die Leeratmung und den *l*-Alanin-Abbau gleich verläuft, schließen wir auf die wahrscheinliche Mitbeteiligung der Cytochrom-oxydase bei der oxydativen Desaminierung des *l*-Alanins. Ob die Hemmbarkeit durch arsenige Säure und durch Jodessigsäure auf die Blockierung für die Aktivität des Fermentsystems notwendiger Sulfhydrylgruppen schliessen lässt, kann noch nicht entschieden werden, ebenfalls nicht, ob die Natriumfluoridhemmung für die Notwendigkeit eines zweiwertigen Metalls als Coferment spricht. Möglicherweise zeigt die Hemmung des *l*-Alanin-Abbaues durch Carbonylreagentien an, dass auch Carbonylgruppen für die Wirkung des Fermentsystems nötig sind.

Während für das *l*-Alanin-angreifende Ferment, das der Lactico- und Malico-dehydrase sehr nahe steht, die Dehydrasenatur noch nicht ausser Zweifel steht, hat *Krebs* durch seine oben angeführten Konkurrenzversuche dies für das *l*-Asparaginsäure abbauende Ferment sichergestellt. Unsere Hemmversuche zeigen nun für diese *l*-Asparaginsäure-dehydrase, dass sie eine gewisse Verwandtschaft zur Succino-dehydrase aufweist. Beide werden durch arsenige Säure nicht beeinflusst und beide werden durch Pyrophosphat gehemmt, während alle anderen von uns untersuchten Dehydrasen bei unseren Versuchsbedingungen das umgekehrte Verhalten zeigen. Sie werden durch arsenige Säure gehemmt, durch Pyrophosphorsäure nicht beeinflusst. Die Succino-dehydrase unterscheidet sich jedoch von der *l*-Asparaginsäure-dehydrase durch ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Jodessigsäure und Natriumfluorid, die beide die *l*-Asparaginsäure-dehydrase stark hemmen. Wie beim *l*-Alanin-Abbau stellt sich auch

beim *l*-Asparaginsäure-Abbau die Frage der Beteiligung von aktiven Sulfhydrylgruppen und eines zweiwertigen Metalls am Fermentsystem.

Die Unspezifität der Malonsäurehemmung gegenüber der Spezifität der Pyrophosphorsäurehemmung ist bereits besprochen worden. Zum Schluss muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass diese Ergebnisse mit Nierenschnitten erhalten wurden und nicht auf Organextrakte übertragen werden dürfen.

Zusammenfassung.

1. *l*-Alanin wird in der Niere der Ratte, des Meerschweinchens und des Schweines zu Brenztraubensäure oxydativ desaminiert. Pro Mol gebildetes Ammoniak kann unter geeigneten Bedingungen annähernd 1 Mol gebildete Brenztraubensäure festgestellt werden. Die Brenztraubensäure wurde kolorimetrisch nach der Methode von *Straub* und präparativ als 2,4-Dinitro-phenylhydrazon nachgewiesen.

2. Der Abbau des *l*-Alanins ist an die intakte Zellstruktur gebunden. Er erfolgt am intensivsten im Organschnitt, bedeutend geringer im Organbrei, der noch kleinste Gewebsbröckchen enthält, er fehlt im zellfreien Organextrakt.

3. Jede Einwirkung, die die Gewebsatmung herabsetzt, hemmt in gleicher Weise auch den *l*-Alaninabbau, so 0,001-m. Blausäure, 0,001-m. arsenige Säure, 0,001-m. Jodessigsäure, 0,05-m. Malonsäure und 0,1-m. Natriumfluorid. Ausserdem hemmen deutlich auch 0,01-m. Natriumfluorid, 0,01-m. Semicarbazid und 0,01-m. Hydrazin, die die Gewebsatmung nur wenig beeinflussen.

4. Der Abbau von *l*-Valin durch Nierenschnitte wird ebenfalls durch die genannten Konzentrationen Blausäure, arsenige Säure, Jodessigsäure, Malonsäure und Natriumfluorid gehemmt. Diese Ergebnisse sowie Konkurrenzversuche zwischen *l*-Alanin und *l*-Valin sprechen dafür, dass beide *l*-Aminosäuren durch das gleiche Ferment angegriffen werden.

5. Der Abbau von *l*-Asparaginsäure durch Nierenschnitte wird dagegen durch arsenige Säure nicht gehemmt, während Blausäure, Jodessigsäure, Malonsäure und Natriumfluorid, ferner auch 0,02-m. Pyrophosphorsäure hemmen. Diese Resultate sowie Konkurrenzversuche zwischen *l*-Alanin und *l*-Asparaginsäure zeigen, dass der Abbau von *l*-Alanin und von *l*-Asparaginsäure durch zwei verschiedene Fermente erfolgt.

6. Es wurde ferner der Einfluss der genannten Hemmsubstanzen auf den oxydativen Abbau von *p*-Phenylendiamin, Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure, Brenztraubensäure und Zitronensäure durch Nierenschnitte untersucht. Auf Grund dieser vergleichenden Versuche wird die Möglichkeit diskutiert, dass der *l*-Alanin-Abbau

durch ein Fermentsystem erfolgt, das sich aus einer *l*-Alanin-dehydrogenase, Wasserstoffüberträgern und einem Cytochromsystem zusammensetzt. Weiter wird auf die Verwandtschaft des *l*-Alanin abbauenden Fermentes mit dem Milch- und Apfelsäure abbauenden Fermentensystem einerseits, des *l*-Asparaginsäure abbauenden Fermentsystems mit der Succin-oxydase andererseits hingewiesen.

7. Die Tatsache, dass 0,05-m. Malonsäure die Leeratmung und den Abbau von *l*-Alanin, *l*-Valin, *l*-Asparaginsäure, Bernsteinsäure, *l*-Äpfelsäure und *d,l*-Milchsäure hemmt, 0,02-m. Pyrophosphorsäure dagegen nur den Abbau von Bernsteinsäure und *l*-Asparaginsäure, spricht gegen die Spezifität der Malonsäurehemmung für die Succin-dehydrogenase.

Fräulein G. Schönborg sei auch an dieser Stelle für wertvolle Mithilfe bei vielen Versuchen bestens gedankt.

Diese Arbeit wurde dem einen (G.) von uns durch ein Stipendium von der *Stiftung für biologisch-medizinische Stipendien der Schweizerischen Akademie der medizinischen Wissenschaften* ermöglicht, für das er auch hier seinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Basel, im Dezember 1943
Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

Literatur.

- 1) Neubauer, Mediz. Habil., München 1908; D. Arch. Klin. Med. **95**, 211 (1909); Neubauer und Fromherz, Z. physiol. Ch. **70**, 326 (1911); Fromherz, Z. physiol. Ch. **70**, 351 (1911).
- 2) F. Knoop, Z. physiol. Ch. **67**, 489 (1910).
- 3) G. Embden und Schmitz, Bioch. Z. **29**, 423 (1910).
- 4) H. A. Krebs, Z. physiol. Ch. **217**, 191 (1933); **218**, 157 (1933).
- 5) H. A. Krebs, Biochem. J. **29**, 1620 (1935).
- 6) E. Abderhalden und Tezner, Z. physiol. Ch. **232**, 79 (1935).
- 7) S. Edlbacher, H. Baur und H. R. Staehelin, Z. physiol. Ch. **270**, 165 (1941).
- 8) S. Edlbacher und H. Grauer, Helv. **26**, 864 (1943).
- 9) S. Edlbacher und A. Zeller, Z. physiol. Ch. **242**, 253 (1936).
- 10) K. Lang, Klin. Woch. **22**, 529 (1943).
- 11) P. Karrer und H. Frank, Helv. **23**, 948 (1940).
- 12) K. Lang und U. Westphal, Z. physiol. Ch. **276**, 179 (1942).
- 13) F. Cedrangolo, Enzymologia **11**, 1 (1941).
- 14) K. Felix, K. Zorn und H. Dirr-Kaltenbach, Z. physiol. Ch. **247**, 141 (1937).
- 15) F. Bernheim und M. L. C. Bernheim, J. Biol. Chem. **107**, 275 (1934).
- 16) F. Bernheim, J. Biol. Chem. **111**, 217 (1935).
- 17) K. Felix und K. Zorn, Z. physiol. Ch. **268**, 257 (1941).
- 18) Kotake und Masayama, Z. physiol. Ch. **243**, 237 (1936).
- 19) F. Bernheim und M. L. C. Bernheim, J. Biol. Chem. **96**, 325 (1932).
- 20) H. Weil-Malherbe und H. A. Krebs, Biochem. J. **29**, 2077 (1935).
- 21) M. Neber, Z. physiol. Ch. **240**, 70 (1936).
- 22) K. Felix und S. Naka, Z. physiol. Ch. **264**, 123 (1940).
- 23) H. von Euler, Adler, Günther und Das, Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1938).
- 24) Conway, Biochem. J. **27**, 419 (1933).
- 25) F. B. Straub, Z. physiol. Ch. **244**, 117 (1936).
- 26) O. Warburg, Biochem. Z. **189**, 354 (1927).

- 27) E. A. Zeller, *Helv.* **21**, 1645 (1938).
- 28) Quastel und Wooldridge, *Biochem. J.* **22**, 689 (1928).
- 29) Gözy und Szent-Györgyi, *Z. physiol. Ch.* **224**, 1 (1934).
- 30) F. Knoop und Martius, *Z. physiol. Ch.* **242**, I (1936).
- 31) H. A. Krebs und Johnson, *Enzymologia* **4**, 148 (1937).
- 32) H. Weil-Malherbe, *Biochem. J.* **31**, 297 (1937).
- 33) Quastel und Wheatley, *Biochem. J.* **26**, 2169 (1932).
- 34) K. Lohmann, *Bioch. Z.* **262**, 152 (1933).
- 35) Hopkins und Morgan, *Biochem. J.* **32**, 611 (1938).
- 36) Rapkine, *Biochem. J.* **32**, 1729 (1938).
- 37) Voegtlin, Rosenthal und Johnson, *Publ. Health Report* **46**, 339 (1931).
- 38) O. Warburg, *Bioch. Z.* **310**, 384 (1942).
- 39) Leloir und Dixon, *Enzymologia* **9**, 81 (1937).
- 40) H. A. Krebs, *Biochem. J.* **29**, 1951 (1935).

18. Zur Kenntnis der Triterpene.

(86. Mitteilung¹⁾).

Über das Birkenteeröl

von L. Ruzicka, A. G. Boer und Ed. Rey.

(24. XII. 43.)

K. A. Vesterberg und F. Nydahl²⁾ erhielten bei der fraktionierten Destillation der neutralen Bestandteile des Birkenteeröls von 244–260° siedende Anteile, die sie als Sesquiterpene bezeichneten, da die Analysenwerte ungefähr auf die Formel $C_{15}H_{24}$ stimmten. Die physikalischen Daten zweier Fraktionen des Kohlenwasserstoffgemisches waren: $d_4^{20} = 0,890$ und $0,897$, $n_D^{20} = 1,500$ und $1,502$, $[\alpha]_D = +8,3^0$ und $+13,1^0$. Diese Kohlenwasserstoffe gaben keine kristallisierten Hydrochloride, lieferten aber beim Erhitzen mit Schwefel ein Dehydrierungsprodukt, woraus die Autoren ein Pikrat vom Smp. 127° erhalten konnten, dessen Analysenwerte dem Pikrat eines Naphthalinkohlenwasserstoffs $C_{13}H_{14}$ entsprachen. Der aus dem Pikrat regenerierte Kohlenwasserstoff siedete bei 252° und zeigte $n_D^{22} = 1,587$. Da dieses Pikrat nach den Analysenwerten und dem Schmelzpunkt auf Sapotalin-pikrat (Smp. 129°) hinweist, die Lichtbrechung dagegen von jener des Sapotalins³⁾ ($n_D^{15} = 1,609$) beträchtlich abweicht, war eine genauere Untersuchung des Dehydrierungsproduktes von Vesterberg und Nydahl wünschenswert. Wir hatten diese Arbeit schon 1928 in Utrecht begonnen, bevor noch die erste Dehydrierung eines Triterpens zu Sapotalin⁴⁾ und anderen Naphthalin-Kohlenwasserstoffen⁵⁾ durchgeführt war.

¹⁾ 85. Mitt. *Helv.* **26**, 2283 (1943).

²⁾ *Svensk. Kem. Tidskr.* **39**, 117 (1927); nach C. **1927**, II, 1103.

³⁾ Ruzicka, Huyser, Pfeiffer und Seidel, A. **471**, 37 (1929).

⁴⁾ Ruzicka und van Veen, R. **48**, 1018 (1929).

⁵⁾ Vgl. besonders *Helv.* **15**, 431 (1932).