

Natur so tun, denn welche Katastrophe würde eintreten, wenn die natürlichen Insektengifte stabil wären. Die Natur ist eben auf Leben und nicht auf Tod eingestellt! Aber welche ungeheure Phantasie und welche Mittel ihr zur Verfügung stehen, um irgendeinen bestimmten Zweck zu erreichen, macht immer wieder von neuem tiefsten Eindruck.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind, sofern sie technisches Interesse haben, in Form von Anwendungspatenten und Herstellungsverfahren geschützt oder es ist ihr Schutz nachgesucht worden.

Basel, Wissenschaftliche Laboratorien der *J. R. Geigy A.G.*

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

II. Über die Spezifität der „*l*-Aminosäure-oxydase“

von S. Edlbacher und H. Grauer.

(28. IV. 44.)

In den meisten zusammenfassenden Darstellungen über den Abbau der Aminosäuren im tierischen Organismus wird angegeben, dass alle natürlichen optischen Isomeren durch ein einziges Enzym, die *l*-Aminosäure-oxydase, oxydativ desaminiert werden. Diese Angaben beruhen auf der grundlegenden Arbeit über die Desaminierung der Aminosäuren von *H. A. Krebs*¹⁾, in der dieser Autor die oxydative Desaminierung der *l*-Asparagin- und *l*-Glutaminsäure in Organschnitten auf die Anwesenheit einer *l*-Aminosäure-oxydase zurückgeführt hat. *Krebs* selbst hat jedoch in dieser Arbeit die Möglichkeit der Existenz mehrerer *l*-Aminosäure-oxydasen bereits in Erwägung gezogen. Unsere Untersuchungen über den Abbau von *l*-Alanin durch Nierenschnitte²⁾ haben ergeben, dass *l*-Alanin und *l*-Valin wahrscheinlich von demselben, *l*-Asparaginsäure dagegen von einem anderen Fermente oxydativ desaminiert werden. Folgende Tatsachen führten uns zu diesem Schlusse: Die Ammoniakbildung beim Abbau von *l*-Alanin und *l*-Valin durch Nierenschnitte wird durch Zusatz von 0,001-m. arseniger Säure stark gehemmt, durch Zusatz von 0,02-m. Pyrophosphorsäure nicht verändert, während beim Abbau von *l*-Asparaginsäure Zusatz von 0,001-m. arseniger Säure die Ammoniakbildung meist sogar fördert, Zusatz von 0,02-m. Pyrophosphorsäure diese jedoch deutlich hemmt; ferner summieren sich im Konkurrenzversuch zwischen *l*-Alanin und *l*-Asparaginsäure die Ammoniakwerte, während dies im Versuche mit *l*-Alanin und *l*-Valin nicht der Fall ist.

¹⁾ Biochem. J. 29, 6120 (1935).

²⁾ Helv. 27, 151 (1944).

Nachdem es uns auf diese Weise gelungen war, einen deutlichen Hinweis für die Existenz vorerst zweier verschiedener *l*-Aminosäureoxydases zu erbringen, haben wir nun unsere Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit auf den Abbau zweier weiterer *l*-Aminosäuren, *l*-Phenylalanin und *l*-Glutaminsäure, ausgedehnt.

Nach *Krebs*¹⁾ wird *l*-Phenylalanin durch Rattennierenschnitte oxydativ desaminiert; ein Reaktionsprodukt wurde beim Abbau des natürlichen optischen Isomeren nicht isoliert. Der Abbau von *l*-Phenylalanin wird nach *Krebs* ebenfalls durch die „*l*-Aminosäureoxydase“ katalysiert. Neben diesem Abbaumechanismus besteht nach *Lang* und *Westphal*²⁾ in der Rattenleber noch die Möglichkeit der reinen Oxydation, wobei kein Ammoniak gebildet wird. Auch für diese Reaktion wurde das aus *l*-Phenylalanin gebildete Reaktionsprodukt nicht isoliert. Das für den Ablauf der Reaktion notwendige Enzym wurde von den Autoren *l*-Phenylalanin-oxydase benannt. Wir haben nun wie in der ersten Mitteilung (l. c.) den Einfluss verschiedener Hemmsubstanzen auf die oxydative Desaminierung von *l*-Phenylalanin durch Meerschweinchennierenschnitte untersucht. Dabei ergab sich, dass der Abbau von *l*-Phenylalanin wieder in anderer Weise gehemmt wird als derjenige von *l*-Alanin und von *l*-Asparaginsäure: Die Bildung von Ammoniak aus *l*-Phenylalanin wird bei Gegenwart von 0,001-m. arseniger Säure leicht gesteigert, während diejenige aus *l*-Alanin durch Zusatz von arseniger Säure gehemmt wird; während weiter die Ammoniakbildung beim Abbau von *l*-Phenylalanin durch 0,02-m. Pyrophosphorsäure nur schwach gehemmt wird, tritt beim Abbau von *l*-Asparaginsäure nach Pyrophosphorsäurezusatz eine starke Hemmung der Ammoniakbildung auf. 0,05-m. Malonsäure, 0,001-m. Blausäure, 0,1-m. Natriumfluorid und 0,001-m. Jodessigsäure hemmen dagegen den Abbau aller drei Aminosäuren in gleicher Weise.

Diese Hemmversuche weisen darauf hin, dass die oxydative Desaminierung von *l*-Phenylalanin durch Nierenschnitte wahrscheinlich wieder durch ein anderes Enzym erfolgt, das weder mit dem das *l*-Alanin noch mit dem die *l*-Asparaginsäure oxydativ desaminierenden Ferment identisch ist. Im gleichen Sinne sprechen Konkurrenzversuche zwischen *l*-Phenylalanin und *l*-Alanin einerseits und zwischen *l*-Phenylalanin und *l*-Asparaginsäure andererseits; sie ergeben, wenn auch nicht in allen Versuchen ganz eindeutig, bei gleichzeitiger Zugabe zweier *l*-Aminosäuren die Summe der beim Einzelzusatz beider Aminosäuren erhaltenen Ammoniakwerte.

Die Sonderstellung der *l*-Glutaminsäure unter den *l*-Aminosäuren ist schon sehr lange bekannt. Im Gegensatz zu den anderen

¹⁾ Z. physiol. Ch. 217, 191 (1933).

²⁾ Z. physiol. Ch. 276, 179 (1942).

erwähnten *l*-Aminosäuren wird sie auch durch zellfreie, frische Organextrakte oxydativ desaminiert, sowie durch Auszüge aus Organ-trockenpräparaten. Das den Abbau katalysierende Ferment ist demnach viel widerstandsfähiger. Es ist eine der am längsten bekannten, typischen Dehydrasen, die neuerdings durch *von Euler* und Mitarbeiter und durch *Dewan*¹⁾ bearbeitet worden ist. Die Arbeiten von *A. E. Braunstein* und *M. G. Kitzmann*²⁾ über die Umaminierungsreaktionen, die durch die Untersuchungen von *R. Schönheimer*³⁾ mit isotopem N¹⁵ bestätigt wurden, liessen den Sinn dieser Sonderstellung der *l*-Glutaminsäure als einer Zentralstelle im Auf-, Ab- und Umbau der Eiweissbausteine erst richtig einschätzen. Eine Sonderstellung gegenüber der Einwirkung von Hemmsubstanzen war deshalb hier von vornherein zu erwarten.

Gibt man nun zu Meerschweinchennierenschnitten *l*-Glutaminsäure, so kann man trotz intensiven Abbaues keine Ammoniakbildung feststellen, da dieses nach *Krebs*⁴⁾ mit der überschüssigen *l*-Glutaminsäure sofort zur Synthese von *l*-Glutamin aufgebraucht wird. Zur Untersuchung der oxydativen Desaminierung von *l*-Glutaminsäure und der Einwirkung von Inhibitoren auf diese Reaktion eignet sich aber nur die Messung der Ammoniakbildung. Deshalb muss für unsere Untersuchungen die Glutaminsynthese spezifisch gehemmt werden, ohne dass gleichzeitig auch die oxydative Desaminierung behindert wird. Dies kann nach *Krebs* durch Zusatz 0,001-m. arseniger Säure erreicht werden, nach unseren Untersuchungen aber regelmässiger durch Zusatz von 0,001-m. Jodessigsäure, am besten jedoch bei Gegenwart von 0,1-m. Natriumfluorid. Diese drei Enzymgifte hemmen also die oxydative Desaminierung von *l*-Glutaminsäure nicht. Wird nun neben dem Natriumfluoridzusatz noch 0,05-m. Malonsäure oder 0,02-m. Pyrophosphorsäure zugefügt, so tritt keine Hemmung der nach Zusatz von Natriumfluorid aufgetretenen Ammoniakbildung ein; einzig Zusatz von 0,001-m. Blausäure neben Natriumfluorid hat eine deutliche Hemmung der Ammoniakbildung bei der oxydativen Desaminierung der *l*-Glutaminsäure zur Folge. Die Tatsache, dass die oxydative Desaminierung von *l*-Glutaminsäure nur durch 0,001-m. Blausäure, dagegen durch keines der übrigen untersuchten Enzymgifte gehemmt wird, zeigt wiederum die grosse Resistenz dieses Enzymsystems und seine Sonderstellung unter den übrigen bisher in gleicher Weise untersuchten *l*-Aminosäureoxydasen an.

¹⁾ Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1933); Biochem. J. **32**, 1378 (1938).

²⁾ Enzymologia **2**, 219 (1937); **5**, 44 (1938); **7**, 25 (1939).

³⁾ J. Biol. Chem. **127**, 333 (1939).

⁴⁾ Biochem. J. **29**, 1951 (1935).

Nach den Untersuchungen von *Dewan* (l. c.) sind für die oxydative Desaminierung der *l*-Glutaminsäure folgende Enzyme und Wasserstoffüberträger notwendig: *l*-Glutaminsäure-apodehydrase, Codehydrase I oder II, Coenzym-Faktor, Cytochrom-System oder an Stelle des Cytochrom-Systems eventuell das Flavin-enzym. Die Tatsache, dass die oxydative Desaminierung der *l*-Glutaminsäure weder durch Malonsäure oder Pyrophosphorsäure, noch durch arsenige Säure, Jodessigsäure oder Natriumfluorid beeinflusst wird, spricht dagegen, dass die Codehydrasen, der Coenzym-Faktor, das Cytochrom-System oder das Flavin-enzym in unserer Versuchsanordnung durch diese Inhibitoren gehemmt werden.

Falls die übrigen *l*-Aminosäure-oxydasen sich ebenfalls aus einer substratspezifischen Apodehydrase, Wasserstoffüberträgern und dem Cytochrom-System zusammensetzen sollten, was *Krebs* (l. c.) für die *l*-Asparaginsäure-oxydase wahrscheinlich gemacht hat, und wir in der 1. Mitteilung auch für die *l*-Alanin-oxydase vermutet haben, so müssten demnach die genannten Inhibitoren die betreffenden Apodehydrasen hemmen, falls sie überhaupt eine hemmende Wirkung ausüben.

Als Ergänzung zu unseren früheren Untersuchungen über die Hemmung der oxydativen Desaminierung von *l*-Alanin durch verschiedene Enzymgifte prüften wir noch den Einfluss von Kohlenmonoxyd auf den Abbau von *l*-Alanin durch Meerschweinchennierenschnitte. *Warburg*¹⁾ fand die Atmung der Bäckerhefe bei Glucosezusatz in einem Gemisch von 80 % Kohlenmonoxyd und 20 % Sauerstoff um 36 % gehemmt, verglichen mit dem gleichen Ansatz in einem Gemisch von 80 % Stickstoff und 20 % Sauerstoff. Er führte diese Hemmung auf Blockierung des Cytochrom-oxydase-eisens im zweiseitigen Zustand zurück. *H. Laser*²⁾, der diese Befunde besonders an der Retina, Allantois, am Chorion und an Leberschnitten nachprüfte, konnte keine Kohlenmonoxydhemmung der Atmung dieser Gewebe feststellen. Wir erhielten mit Meerschweinchennierenschnitten wohl eine Atmungshemmung von 20–35 % in einem Gasgemisch von 85 % Kohlenmonoxyd und 15 % Sauerstoff, verglichen mit den Sauerstoff-Verbrauchswerten des gleichen Gewebes in einem Gemisch von 85 % Stickstoff und 15 % Sauerstoff, die Ammoniakbildung aus *l*-Alanin war jedoch im Kohlenmonoxyd-haltigen Gasgemisch nur um 15–20 % geringer als im Stickstoff-haltigen Gemisch. Die Resultate dieser Versuche erlauben uns nicht, die Notwendigkeit des Cytochrom-Systems für die oxydative Desaminierung von *l*-Alanin nachzuweisen oder auszuschliessen.

¹⁾ Bioch. Z. 189, 354 (1927).

²⁾ Biochem. J. 31, 1677 (1937).

Experimenteller Teil.

Methodisches.

Die Herstellung der Nierenschnitte und der Lösungen, die Messung des Sauerstoff-Verbrauchs und der Ammoniak-Bildung ist bereits in der ersten Mitteilung (l.c.) ausführlich beschrieben worden. Die Flüssigkeitsmenge im Hauptaum der Warburg-Gefäße betrug in allen Ansätzen nach dem eventuellen Einkippen der Substratlösung ($0,5 \text{ cm}^3$) aus der Birne immer $2,5 \text{ cm}^3$. Die Versuche mit Kohlenmonoxyd wurden im Dunkeln ausgeführt, unter sonst genau gleichen Bedingungen wie in allen übrigen Versuchen.

Tabelle 1.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Phenylalanin durch Blausäure, arsenige Säure und Jodessigsäure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Endkonzentrationen: *l*-Phenylalanin 0,04 -m.

Blausäure 0,001-m.

Arsenige Säure 0,001-m.

Jodessigsäure 0,001-m.

<i>l</i> -Phenylalanin-Zusatz	Hemmkörper-Zusatz	Q_{O_2}	Q_{NH_3}	Q_{NH_3} für Phenylalanin-Abbau	% Hemmung der Leeratmung	% Hemmung des <i>l</i> -Phenylalanin-Abbaues
—	—	14,9	1,1	0,5	67%	60%
	—	13,8	1,6			
	Blausäure ¹⁾	5,1	1,1			
	Blausäure	5,8	1,3			
—	—	13,2	0,5	0,3	60%	100%
	—	12,8	0,8			
	Blausäure	5,3	0,7			
	Blausäure	2,7	0,7			
—	—	15,7	0,5	1,2	70%	Steigerung
	—	13,0	1,7			
	arsenige Säure	4,7	0,5			
	arsenige Säure	5,0	2,4			
—	—	15,7	0,6	1,0	69%	Steigerung
	—	15,2	1,6			
	arsenige Säure	4,9	1,3			
	arsenige Säure	5,2	2,7			
—	—	15,7	0,6	1,0	65%	40%
	—	15,2	1,6			
	Jodessigsäure	5,4	1,5			
	Jodessigsäure	5,5	2,1			
—	—	14,8	0,5	0,7	65%	43%
	—	14,5	1,2			
	Jodessigsäure	5,2	1,3			
	Jodessigsäure	5,5	1,7			

¹⁾ Bei allen Versuchen mit Blausäure kamen in die Einsätze der Warburg-Gefäße die von Krebs (l. c.) angegebenen Gemische von KCN und KOH.

Einfluss von 0,001-m. Blausäure, 0,001-m. arseniger Säure, 0,001-m. Monojodessigsäure, 0,02-m. Pyrophosphorsäure, 0,05-m. Malonsäure und 0,1-m. Natriumfluorid auf den Abbau von *l*-Phenylalanin.

Aus den in Tabelle 1 und 2 zusammengestellten Versuchen geht zunächst hervor, dass bei Zusatz von *l*-Phenylalanin zu Meerschweinchennierenschnitten wohl eine deutliche, regelmässige Ammoniak-Mehrbildung gegenüber dem Leerwert erfolgt, dass jedoch der Sauerstoff-Verbrauch in den Ansätzen mit Aminosäure deutlich geringer ist als in denjenigen ohne Aminosäure-Zusatz. Wir werden auf diese Hemmung der Atmung nach Zusatz von *l*-Phenylalanin zu Meerschweinchennierenschnitten in Abwesenheit eines Inhibitors weiter unten eingehen.

Aus den gleichen Gründen wie beim Abbau von *l*-Alanin durch Nierenschnitte (l. c.) nehmen wir auch hier die Ammoniak-Mehrbildung beim Zusatz von *l*-Phenylalanin gegenüber dem Ammoniak-Leerwert ohne *l*-Phenylalanin-Zusatz als Mass für den Abbau dieser Aminosäure an, um so mehr, als wir unter unseren Versuchsbedingungen einen Sauerstoff-Mehrverbrauch beim Abbau von *l*-Phenylalanin ohne Zusatz von Enzymgiften überhaupt nicht messen können. Wir nehmen weiterhin an, dass *l*-Phenylalanin zu Phenylbrenztraubensäure abgebaut werde; der Beweis dafür durch Isolierung des Reaktionsproduktes ist jedoch noch nicht erbracht worden. Die Tabellen 1 und 2 zeigen nun, dass der Abbau von *l*-Phenylalanin durch 0,001-m. Blausäure und 0,1-m. Natriumfluorid ziemlich stark, durch 0,05-m. Malonsäure und 0,001-m. Jodessigsäure noch fast zur Hälfte, durch 0,02-m. Pyrophosphorsäure jedoch nicht wesentlich gehemmt wird. 0,001-m. arsenige Säure steigert den Abbau von *l*-Phenylalanin durch Meerschweinchennierenschnitte deutlich. Der Abbau von *l*-Phenylalanin unterscheidet sich demnach durch die Widerstandsfähigkeit gegenüber arseniger Säure vom Abbau von *l*-Alanin und durch die relative Widerstandsfähigkeit gegenüber Pyrophosphorsäure vom Abbau von *l*-Asparaginsäure.

Auffallend ist nun weiter, dass nach Zugabe eines die Leeratmung deutlich hemmenden Inhibitors regelmässig ein Sauerstoff-Mehrverbrauch in den Ansätzen mit *l*-Phenylalanin gegenüber den Leerkontrollen eintritt, während ohne Inhibitor der Sauerstoff-Verbrauch in den Ansätzen mit *l*-Phenylalanin geringer ist als in den Leerkontrollen. Wir erklären dies in folgender Weise: Sowohl die Leeratmung wie die oxydative Desamierung von *l*-Phenylalanin benötigen Enzymsysteme, die vielleicht aus substratspezifischen Apodehydrasen, Wasserstoffüberträgern und dem Cytochrom-System zusammengesetzt sind. Die beiden Enzymsysteme enthalten also die Wasserstoffüberträger und das Cytochrom-System als gemeinsame Komponenten.

Ist nun eine dieser Komponenten nicht in so hoher Konzentration vorhanden, dass die Atmung und der *l*-Phenylalanin-Abbau nebeneinander ablaufen können, so treten Atmungssubstrat und *l*-Phenylalanin um diese Komponente in Konkurrenz. Nehmen wir nun an, die Konzentration der gemeinsamen Komponente K genüge gerade für den für die ungehemmte Atmung notwendigen Wasserstoff-Transport. Wird nun *l*-Phenylalanin zugegeben, so konkurriert es mit dem Atmungs-Substrat um die gemeinsame Komponente K. Bei gleicher Affinität zu K und gleicher Reaktionsgeschwindigkeit beider Systeme wird der Wasserstofftransport und somit auch der Sauerstoff-Verbrauch unverändert bleiben. Ist aber z. B. bei gleicher Affinität beider Systeme zur Komponente K die Reaktionsgeschwindigkeit des das *l*-Phenylalanin abbauenden Systems geringer, so ist der Gesamtwaterstoff-Transport und somit auch der Gesamtsauerstoff-Verbrauch geringer. *l*-Phenylalanin hemmt demnach in diesem Falle die Leeratmung kompetitiv. Wird jetzt durch Zusatz eines Inhibitors, der an der Apodehydrase angreift, die Atmung wesentlich gehemmt, so benötigt sie für den Wasserstoff-Transport eine geringere Konzentration der Komponente K. Diese ist somit jetzt im Überschuss vorhanden. Erfolgt unter diesen Umständen ein Zusatz von *l*-Phenylalanin, so ist die Komponente K in so reichlicher Menge vorhanden, dass es gar nicht zur Konkurrenz um sie kommt. Es tritt somit ein zusätzlicher Sauerstoffverbrauch bei Zusatz von *l*-Phenylalanin auf.

Tabelle 2.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaues von *l*-Phenylalanin durch Pyrophosphorsäure, Malonsäure und Natriumfluorid.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Endkonzentrationen: *l*-Phenylalanin 0,04-m.
Pyrophosphorsäure 0,02-m.
Malonsäure 0,05-m.
Natriumfluorid 0,1 -m.

<i>l</i> -Phenylalanin-Zusatz	Hemmkörper-Zusatz	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Phenylalanin-Abbau	% Hemmung der Leeratmung	% Hemmung des <i>l</i> -Phenylalanin-Abbaues
—	—	14,4	0,5	1,2	10%	33%
	—	12,5	1,7			
	Pyrophosphorsäure	13,0	0,8			
	Pyrophosphorsäure	11,1	1,6			
+	—	15,3	0,2	0,9	9%	33%
	—	10,9	1,1			
	Pyrophosphorsäure	14,0	0,8			
	Pyrophosphorsäure	12,4	1,4			
—	—	14,8	0,5	0,7	50%	43%
	—	14,5	1,7			
	Malonsäure	7,4	0,9			
	Malonsäure	8,0	1,3			
+	—	14,4	0,5	1,2	57%	50%
	—	12,5	1,7			
	Malonsäure	6,2	0,9			
	Malonsäure	8,6	1,5			
—	—	15,3	0,2	0,9	67%	66%
	—	10,9	1,1			
	Natriumfluorid	5,1	1,4			
	Natriumfluorid	4,6	1,7			
+	—	14,9	1,1	0,5	67%	70%
	—	13,8	1,6			
	Natriumfluorid	5,1	1,3			
	Natriumfluorid	4,3	1,45			

Einfluss von 0,001-m. Blausäure, 0,001-m. arseniger Säure, 0,001-m. Jodessigsäure, 0,02-m. Pyrophosphorsäure, 0,05-m. Malonsäure und 0,1-m. Natriumfluorid auf den Abbau von *l*-Glutaminsäure.

l-Glutaminsäure wird durch die *l*-Glutaminsäure-dehydrase zu Iminoglutarsäure dehydriert, welche in einem nicht enzymatischen Gleichgewicht mit α -Ketoglutarsäure und Ammoniak steht. α -Ketoglutarsäure wird jedoch im Gewebe sofort weiter oxydativ abgebaut, während das Ammoniak mit überschüssiger *l*-Glutaminsäure ebenfalls sofort zu Glutamin synthetisiert wird. Man erhält demnach, wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, bei Zugabe von *l*-Glutaminsäure zu Meerschweinchennierenschnitten zwar einen hohen Sauerstoff-Mehrverbrauch gegenüber der Leeratmung, jedoch keine Ammoniak-Mehr-

bildung gegenüber dem Leerwert. Im Gegenteil, das bei der Leeratmung gleichzeitig freiwerdende Ammoniak wird bei Zugabe von Glutaminsäure grösstenteils auch noch zur Glutamin-Synthese verbraucht. Nach Krebs (l. c.) kann die Glutamin-Synthese jedoch durch Zugabe von 0,001-m. arseniger Säure unterdrückt werden, während die *l*-Glutaminsäure-dehydrase selbst nicht gehemmt wird. Wir haben dies in unseren Versuchen aber nicht regelmässig bestätigen können. Besser scheint sich dazu der Zusatz von 0,001-m. Jodessigsäure zu eignen, wobei ganz gleichmässige Ammoniak-Mehrbildungswerte erhalten werden. Am besten eignet sich jedoch Zugabe von 0,1-m. Natriumfluorid für unsere Untersuchungen, da dadurch der Sauerstoff-Mehrverbrauch kaum beeinflusst wurde, also ein sonst ungehemmter oxydativer Abbau der *l*-Glutaminsäure durch die Nierenschnitte gesichert ist. Da bei Zusatz von 0,001-m. arseniger Säure oder 0,001-m. Jodessigsäure die Ammoniak-Bildungswerte beim Abbau der *l*-Glutaminsäure meist fast gleich hoch wie bei Natriumfluoridzusatz sind, kann eine wesentliche Hemmung der oxydativen Desaminierung der *l*-Glutaminsäure auch durch arsenige Säure oder Jodessigsäure ausgeschlossen werden. Alle diese Befunde sind auf Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3.

Hemmung der Leeratmung und des Abbaus von *l*-Glutaminsäure durch arsenige Säure, Jodessigsäure und Natriumfluorid.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Endkonzentrationen: *l*-Glutaminsäure 0,04-m.
arsenige Säure 0,001-m.
Jodessigsäure 0,001-m.
Natriumfluorid 0,1-m.

<i>l</i> -Glutaminsäure-Zusatz	Hemmkörper-Zusatz	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für Glutamin-säure-Abbau	% Hemmung der Leeratmung	% Hemmung der Glutaminsäure-Abbaues
—	—	15,7	0,5	—		
+	—	25,1	0,2	— 0,3		
—	arsenige Säure	4,7	0,5		70%	Steigerung
+	arsenige Säure	5,5	1,5	1,0		
—	—	14,4	0,5	—		
+	—	20,8	0	— 0,5		
—	arsenige Säure	4,4	1,1		68%	keine Änderung
+	arsenige Säure	5,4	0,5	— 0,6		
—	—	14,8	0,5	—		
+	—	23,8	0,1	— 0,4		
—	Jodessigsäure	5,2	1,3		65%	Steigerung
+	Jodessigsäure	8,2	2,1	0,8		
—	—	14,3	0,7	—		
+	—	25,5	0,1	— 0,6		
—	Jodessigsäure	4,2	1,1		71%	Steigerung
+	Jodessigsäure	7,7	2,1	1,0		
—	—	14,9	1,1	—		
+	—	18,4	0,2	— 0,9		
—	Natriumfluorid	5,1	1,3		67%	Steigerung
+	Natriumfluorid	9,8	2,5	1,2		
—	—	14,5	0,8	—		
+	—	18,6	0,1	— 0,7		
—	Natriumfluorid	4,8	1,0		67%	Steigerung
+	Natriumfluorid	11,9	3,5	2,5		

Tabelle 4 zeigt, dass die oxydative Desaminierung von *l*-Glutaminsäure durch Meerschweinchennierenschnitte, gemessen an der Ammoniak-Mehrbildung gegenüber dem Leerwert, in Gegenwart von 0,1-m. Natriumfluorid nur durch 0,001-m. Blausäure deutlich gehemmt wird, während weder 0,02-m. Pyrophosphorsäure noch 0,05-m. Malonsäure einen sicheren Einfluss auf die oxydative Desaminierung von *l*-Glutaminsäure ausüben. Die hier nachgewiesene alleinige Hemmbarkeit der oxydativen Desaminierung der *l*-Glutaminsäure durch 0,001-m. Blausäure zeigt deutlich den grossen Unterschied zwischen der *l*-Glutaminsäure-dehydrase und allen drei bisher untersuchten *l*-Aminosäure-oxydasesen.

Tabelle 4.

Hemmung der Leeratmung und des *l*-Glutaminsäureabbaus durch Blausäure, Malonsäure und Pyrophosphorsäure in Gegenwart von Natriumfluorid.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Endkonzentrationen: *l*-Glutaminsäure 0,04-m.
Blausäure 0,001-m.
Malonsäure 0,05-m.
Pyrophosphorsäure 0,02-m.
Natriumfluorid 0,1-m.

<i>l</i> -Glutaminsäure-Zusatz	Hemmkörper-Zusatz	Q_{O_2}	Q_{NH_3}	Q_{NH_3} für Glutaminsäure-Abbau	% Hemmung der Leeratmung	% Hemmung der Glutaminsäure-Abbaus
—	—	4,8	1,0	2,5	56%	56%
+	—	11,9	3,5			
—	Blausäure	2,1	1,2			
+	Blausäure	4,3	2,3			
—	—	4,8	1,2	2,1	38%	29%
+	—	11,5	3,3			
—	Blausäure	3,0	1,0			
+	Blausäure	6,8	2,5			
—	—	4,8	1,0	2,5	46%	16%
+	—	11,9	3,5			
—	Malonsäure	2,6	1,1			
+	Malonsäure	6,1	3,2			
—	—	2,7	1,1	1,2	45%	Steigerung
+	—	8,3	2,3			
—	Malonsäure	1,5	1,1			
+	Malonsäure	3,7	2,7			
—	—	4,8	1,0	2,5	21%	10%
+	—	11,9	3,5			
—	Pyrophosphorsäure	3,8	1,0			
+	Pyrophosphorsäure	11,8	3,3			
—	—	2,7	1,1	1,2	Steigerung	Steigerung
+	—	8,3	2,3			
—	Pyrophosphorsäure	4,0	1,0			
+	Pyrophosphorsäure	9,9	2,7			

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

Die Versuche mit Enzymgiften sprechen dafür, dass die oxydative Desaminierung von *l*-Phenylalanin durch ein spezifisches Enzym-System erfolgt, das sich von dem das *l*-Alanin und dem die *l*-Asparaginsäure abbauenden System unterscheidet. Die Konkurrenzversuche ergaben nicht ganz eindeutige Resultate. Meist tritt zwar eine Summation der Ammoniak-Bildungswerte auf, doch liegt der Ammoniakwert bei Zusatz zweier Aminosäuren hie und da nur gleich hoch wie der höhere der beiden Einzelwerte. Tabelle 5 gibt je zwei Konkurrenzversuche zwischen *l*-Alanin und *l*-Phenylalanin und zwischen *l*-Asparaginsäure und *l*-Phenylalanin wieder, die letzteren bei Gegenwart von 0,001-m. arseniger Säure, da sonst die Ammoniak-Bildungswerte aus *l*-Asparaginsäure nicht richtig gemessen werden können. Die Aminosäure-Konzentrationen wurden wie immer bei Konkurrenzversuchen so gewählt, dass eine weitere Konzentrationserhöhung keinen erhöhten Abbau hervorruft. Wir erachten trotz der nicht ganz regelmässigen Summationen der Ammoniakwerte in den Konkurrenzversuchen die Existenz eines spezifischen Enzymsystems für die oxydative Desaminierung von *l*-Phenylalanin als wahrscheinlich, weil in einigen Versuchen doch ganz eindeutige Summationen der Ammoniakwerte vorliegen, vor allem aber auf Grund der Resultate der Hemmversuche.

Konkurrenzversuche zwischen *l*-Glutaminsäure und den anderen *l*-Aminosäuren sind nicht möglich, weil der für die Messung des Abbaues der *l*-Glutaminsäure nötige Zusatz von 0,1-m. Natriumfluorid den Abbau der übrigen Aminosäuren zu stark hemmt.

Tabelle 5.

Konkurrenzversuche zwischen *l*-Alanin und *l*-Phenylalanin und zwischen *l*-Asparaginsäure und *l*-Phenylalanin, letzteres bei Gegenwart von 0,001-m. arseniger Säure.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer.

Endkonzentrationen: *l*-Aminosäuren 0,04-m.

Aminosäure-Zusatz	Arsenige Säure-Zusatz	QN _{H₃} für Substrat-Abbau
<i>l</i> -Alanin	—	0,7
<i>l</i> -Phenylalanin	—	0,5
<i>l</i> -Alanin + <i>l</i> -Phenylalanin	—	1,2
<i>l</i> -Alanin	—	1,3
<i>l</i> -Phenylalanin	—	1,0
<i>l</i> -Alanin + <i>l</i> -Phenylalanin	—	1,3
<i>l</i> -Asparaginsäure	+	1,9
<i>l</i> -Phenylalanin	+	1,3
<i>l</i> -Asparaginsäure + <i>l</i> -Phenylalanin . .	+	3,3
<i>l</i> -Asparaginsäure	+	2,8
<i>l</i> -Phenylalanin	+	1,1
<i>l</i> -Asparaginsäure + <i>l</i> -Phenylalanin . .	+	3,2

Einfluss von Kohlenmonoxyd auf die Leeratmung und den Abbau von *l*-Alanin.

Tabelle 6 gibt die Hemmungen der Leeratmung und der oxydativen Desaminierung von *l*-Alanin durch Meerschweinchennierenschnitte in einem Gasgemisch von 85% Kohlenmonoxyd und 15% Sauerstoff, verglichen mit den entsprechenden Werten in einem Ge-

misch von 85% Stickstoff und 15% Sauerstoff wieder. Während für die Leeratmung eine mässige Hemmung sichersteht, fallen die Hemmwerte für den *l*-Alaninabbau in den Bereich der Fehlergrenzen.

Tabelle 6.

Einfluss von Kohlenmonoxyd auf die Leeratmung und den Abbau von *l*-Alanin.

Meerschweinchennierenschnitte in Phosphat-Ringer

Endkonzentration: *l*-Alanin 0,04-m.

Gasgemische: 85% CO + 15% O₂.

85% N₂ + 15% O₂.

Versuche wurden im Dunkeln ausgeführt.

Die Zahlen stellen Mittelwerte von 2 gleichzeitig mit dem gleichen Gewebe ausgeführten Versuchen dar.

<i>l</i> -Alanin-Zusatz	Gasgemisch	Q _{O₂}	Q _{NH₃}	Q _{NH₃} für <i>l</i> -Alanin-Abbau	% Hemmung der Leeratmung	% Hemmung des <i>l</i> -Alanin-Abbaues	
—	N ₂ + O ₂	9,0	0,5	0,6	20%	15%	
+	N ₂ + O ₂	9,1	1,1				
—	CO + O ₂	7,2	0,4		35%		
+	CO + O ₂	5,5	0,9				
—	N ₂ + O ₂	9,3	0,4	1,0	35%	20%	
+	N ₂ + O ₂	9,5	1,4				
—	CO + O ₂	6,1	0,7				
+	CO + O ₂	6,0	1,5				

Besprechung der Ergebnisse.

In unserer ersten Mitteilung (l. c.) konnten wir anhand von Hemm- und Konkurrenzversuchen zeigen, dass *l*-Alanin und *l*-Asparaginsäure sehr wahrscheinlich nicht durch das gleiche Ferment oxydativ desaminiert werden. Die oxydative Desaminierung von *l*-Valin verhielt sich dagegen gegenüber Hemmsubstanzen wie diejenige von *l*-Alanin; doch ist der Abbau von *l*-Valin gering, die Fehlerbreite deshalb gross, so dass diese Resultate etwas weniger gesichert erscheinen. In dieser Arbeit haben wir nun in gleicher Weise das Verhalten der oxydativen Desaminierung von *l*-Phenylalanin und *l*-Glutaminsäure gegenüber den gleichen Hemmsubstanzen und in Konkurrenzversuchen mit den bereits untersuchten *l*-Aminosäuren geprüft und fanden, dass diese beiden *l*-Aminosäuren wahrscheinlich wieder durch andere Enzyme abgebaut werden. Im Gegensatz zu der früheren Annahme, dass die Grosszahl der *l*-Aminosäuren durch eine einzige „*l*-Aminosäure-oxydase“ oxydativ desaminiert werde, zeigt sich durch unsere Untersuchungen immer deutlicher, dass wahrscheinlich viele hochspezifischen *l*-Aminosäure-oxydasesen gefunden werden können, möglicherweise für jede einzelne Aminosäure eine andere.

Andererseits zeigt ein Vergleich der verschiedenen Hemmbarkeit des Abbaues einzelner *l*-Aminosäuren, wie nahe verwandt die Fermente für die oxydative Desaminierung von *l*-Alanin, *l*-Phenylalanin und *l*-Asparaginsäure sind, während das die *l*-Glutaminsäure abbauende Enzym eine sehr auffallende Sonderstellung einnimmt. Bemerkenswert ist ferner die aus den Hemmversuchen hervorgehende Verwandtschaft der untersuchten *l*-Aminosäure-oxydases (ausser der *l*-Glutaminsäure-dehydrase) mit den für die Leeratmung und für die Oxydation von *l*-Äpfelsäure und *d,l*-Milchsäure notwendigen Enzym-Systemen. Da wir bereits in der letzten Arbeit auf die meisten dieser Zusammenhänge aufmerksam gemacht haben, wollen wir hier die Tatsachen nur noch in übersichtlicher Form zusammenstellen.

Tabelle 7.

Übersicht über die Wirkung der untersuchten Hemmsubstanzen auf den Abbau aller in der 1. und 2. Mitteilung untersuchten Substrate.

Die Hemmung wird durch + bezeichnet.

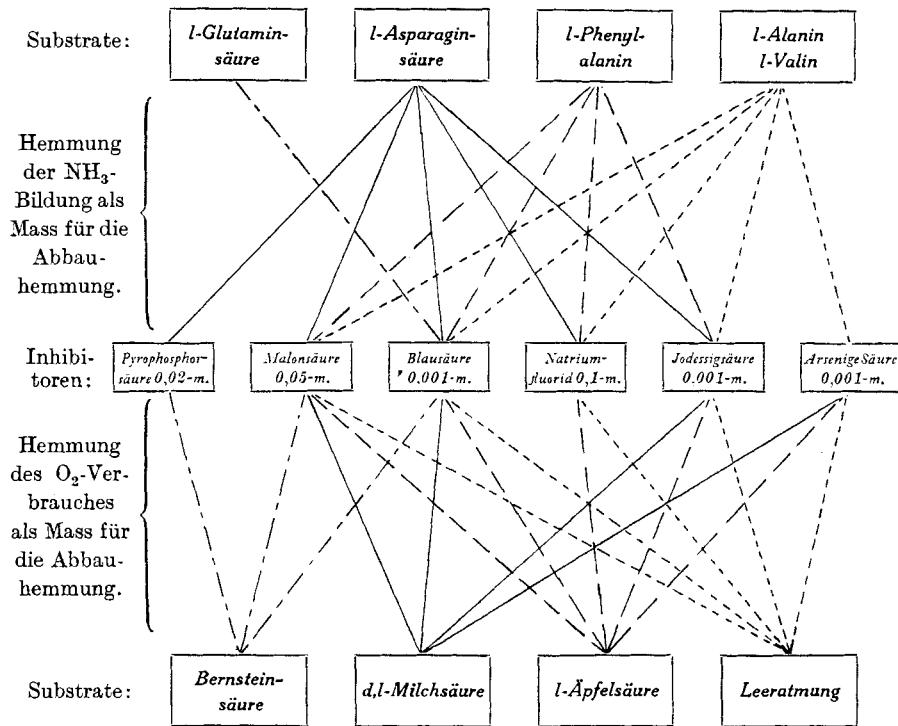
Bei den Aminosäuren wird die Ammoniakbildung, bei der Leeratmung und den übrigen Substraten der Sauerstoff-Verbrauch als Mass für den Abbau angenommen.

Hemmsubstanz m.	p-Phe-nylen-diamin	<i>l</i> -Glu-tamin-säure	Bern-stein-säure	<i>l</i> -Aspa-ragin-säure	<i>l</i> -Phenyl-alanin	Brenz-trauben-säure
HCN 0,001-m. . .	+	+	+	+	+	+
Jodessigsäure 0,001-m. . .	-	-	-	+	+	+
As ₂ O ₃ 0,001-m. .	-	-	-	-	-	+
Malonsäure 0,05-m.	-	-	+	+	+	-
Pyrophosphorsäure 0,02-m. . . .	-	-	+	+	(+)	-
NaF 0,1-m. . . .	-	-	-	+	+	-
Hemmsubstanz m.	Zitronen-säure	<i>d,l</i> -Milch-säure	<i>l</i> -Äpfel-säure	Leer-Atmung	<i>l</i> -Alanin	<i>l</i> -Valin
HCN 0,001-m. . .	+	+	+	+	+	+
Jodessigsäure 0,001-m. . .	+	+	+	+	+	+
As ₂ O ₃ 0,001-m. .	+	+	+	+	+	+
Malonsäure 0,05-m.	-	+	+	+	+	+
Pyrophosphorsäure 0,02-m. . . .	-	-	-	-	-	-
NaF 0,1-m. . . .	-	-	+	+	+	+

Tabelle 7 gibt eine Zusammenstellung über die Wirkung der Hemmstoffe auf den Abbau aller untersuchten Substrate. Bei den Aminosäuren wurde immer die Ammoniakbildung als Mass für den Abbau genommen, bei der Leeratmung und den übrigen Substraten der Sauerstoffverbrauch. Das Schema Figur 1 soll schliesslich besonders die Verwandtschaften und Sonderstellungen der einzelnen *l*-Amino-oxydasen unter sich und gegenüber den Enzymsystemen der Leeratmung, des *l*-Äpfelsäure-, *d,l*-Milchsäure- und des Bernsteinsäure-Abbaues zur Darstellung bringen.

Fig. 1.

Darstellung des Einflusses verschiedener Inhibitoren auf den Abbau von *l*-Alanin, *l*-Valin, *l*-Phenylalanin, *l*-Asparaginsäure und *l*-Glutaminsäure einerseits, auf die Leeratmung und den Abbau von *l*-Äpfelsäure, *d,l*-Milchsäure und Bernsteinsäure andererseits. Die Verbindungslinien zwischen Substrat und Inhibitor zeigen die Hemmungen an. Substrat-endkonzentrationen 0,04-m.



Wir haben weiter in der ersten Mitteilung die Vermutung ausgesprochen, dass die oxydative Dësaminierung von *l*-Alanin durch ein Enzymsystem bestehend aus einer Dehydrase, Wasserstoffüberträgern und dem Cytochrom-System erfolgen könnte. Dasselbe hat Krebs für den Abbau der *l*-Asparaginsäure angenommen. Für die oxydative

Desaminierung von *l*-Glutaminsäure ist dieser Abbaumechanismus von *Dewan* nachgewiesen worden. Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass *l*-Phenylalanin in Abwesenheit eines Inhibitors die Leeratmung der Nierenschnitte wahrscheinlich kompetitiv hemmt, spricht dafür, dass auch für den Abbau von *l*-Phenylalanin ein solches aus einer Dehydrase, Wasserstoffüberträgern und dem Cytochrom-System zusammengesetztes Enzymsystem in Frage kommt.

In ihrem Buch „Über die Biochemie der Tumoren“ haben *von Euler* und *Skarzynski*¹⁾ den Begriff des „Enzymoids“ aufgestellt als einen Enzymkomplex mit mehr oder weniger abdissoziierbaren Wirkungsgruppen. Es ist durchaus denkbar, dass die Gruppe der Enzyme, die für die oxydative Desaminierung der Aminosäuren in Frage kommt, auch von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet werden muss. Wir werden auf diese Enzymoid-Vorstellung in einer weiteren Abhandlung noch zurückkommen.

Zum Schluss möchten wir noch besonders darauf hinweisen, dass solche an überlebenden Schnitten bestimmter Organe einer bestimmten Tierart erhobenen Befunde weder auf Extrakte des gleichen Organs noch auf andere Organe der gleichen Tierart noch auf das gleiche Organ anderer Tierarten ohne weiteres übertragen werden dürfen.

Zusammenfassung.

1. Der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die oxydative Desaminierung von *l*-Phenylalanin und *l*-Glutaminsäure durch Meerschweinchennierenschnitte wurde geprüft.
2. Der Abbau von *l*-Phenylalanin wird durch 0,001-m. Blausäure, 0,1-m. Natriumfluorid, 0,05-m. Malonsäure und 0,001-m. Jodessigsäure stark gehemmt. 0,02-m. Pyrophosphorsäure übt nur einen schwachen hemmenden Einfluss aus und 0,001-m. arsenige Säure hemmt den Abbau von *l*-Phenylalanin überhaupt nicht.
3. Der Abbau von *l*-Glutaminsäure wird nur durch 0,001-m. Blausäure gehemmt; alle übrigen genannten Inhibitoren beeinflussen den Abbau nicht.
4. Die Tatsache, dass der *l*-Phenylalanin-Abbau durch arsenige Säure nicht beeinflusst wird, während der *l*-Alaninabbau dadurch stark gehemmt wird, sowie Konkurrenzversuche mit *l*-Phenylalanin und *l*-Alanin sprechen dafür, dass diese beiden *l*-Aminosäuren wahrscheinlich durch verschiedene Enzyme oxydativ desaminiert werden.
5. Die Tatsache, dass der *l*-Phenylalanin-Abbau durch Pyrophosphorsäure nur schwach gehemmt wird, während der Abbau von *l*-Asparaginsäure durch diesen Inhibitor stark gehemmt wird, sowie Konkurrenzversuche mit *l*-Phenylalanin und *l*-Asparaginsäure machen

¹⁾ Verlag Enke, Stuttgart, 1942, S. 154 und 157.

es wahrscheinlich, dass auch der Abbau dieser beiden *l*-Aminosäuren durch zwei verschiedene Fermente erfolgt.

6. Die bekannte Sonderstellung der *l*-Glutaminsäure unter den *l*-Aminosäuren im tierischen Organismus wird durch die genannten Hemmversuche ebenfalls bestätigt.

7. Es werden Tatsachen angeführt, die vielleicht dafür sprechen, dass auch der Abbau des *l*-Phenylalanins durch ein Enzym-System erfolgt, das sich aus einer Dehydrase, Wasserstoffüberträgern und dem Cytochromsystem zusammensetzt.

Fräulein *G. Schönberg* sei auch an dieser Stelle für die Mithilfe bei den 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 an dieser Stelle seinen besten Dank aussprechen möchte.

Basel, im März 1944.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

105. Études sur les matières végétales volatiles XXX¹).

Applications de la formylation sélective du bornéol, de l'octanol-(3) et de l'alcool benzylque, en présence de linalol et de ses esters, à l'analyse des huiles essentielles

par Y. R. Naves.

(29 IV 44)

Le bornéol accompagne le linalol dans les essences de shiu (ho²), d'aspic³), de lavandin⁴). En raison de la dissonnance des odeurs des deux alcools, de leurs esters, la valeur vénale de ces essences dépend de leur teneur en bornéol.

L'essence de shiu, et du fait des événements de guerre les essences de lavandin et d'aspic, constituent des sources industrielles de linalol et d'acétate de linalyle. Or, les séparations du bornéol et du linalol et des esters de ces deux alcools sont des opérations difficiles, souvent imparfaites à des degrés divers qu'il convient d'apprécier. Les essences de shiu, de lavandin, d'aspic, le linalol et l'acétate de linalyle provenant d'essence de

¹) XXIXème communication: *Helv.* **27**, 645 (1944).

²) La présence de *d*-bornéol est connue de tous les techniciens industriels, ce constituant étant isolé en partie par la rectification de l'essence de shiu.

³) *Bouchardat, Voiry*, C. r. **106**, 551 (1888); *Bouchardat*, C. r. **117**, 53, 1094 (1893); *Rutowski, Makarowa-Semjanskaja*, *Riechstoffindustrie* **3**, 28 (1928).

⁴) *Naves, Angla*, Ann. chim. anal., **23**, 204 (1941); *Naves, Fette und Seifen*, **49**, 187 (1942); voy. ég. *Spiras, Vanderstreek*, *Parfumerie* **1**, 235 (1943), *Igolen*, Bl. [5] **10**, 221 (1943); cfr. *Naves*, *ibid.* 506.

Le bornéol n'est pas mélangé d'isobornéol. En effet, $[\alpha]_D$ ($c = 20$) = + 32,61° (acide acétique); + 34,15° (chloroforme); + 36,80° (benzène): Cfr. *Hückel, A.* **549**, 175 (1941); *Naves, Angla*, C. r. **213**, 570 (1941).