

Isomerisierung des Anhydro-oleanolsäure-lactons-I (II).

a) Mit Chlorwasserstoff in Alkohol.

120 mg Substanz werden in 100 cm³ Alkohol und 5 cm³ Tetrachlorkohlenstoff gelöst und mit 4 cm³ konz. Salzsäure 3 Stunden gekocht. Die Lösung wird im Vakuum auf die Hälfte eingeengt, in Wasser gegossen und wie üblich aufgearbeitet. Das Präparat krystallisiert aus Chloroform-Methanol in Blättchen, die bei 269—270° (Hochvakuum) schmelzen, halogenfrei sind, mit Tetranitromethan Gelbfärbung und mit Anhydro-oleanolsäure-lacton-II keine Schmelzpunktserniedrigung geben. Nach weiterem Umlösen steigt der Schmelzpunkt auf 271—273° (Hochvakuum).

$$[\alpha]_D = +43^\circ \text{ (c} = 0,812\text{)}$$

b) Mit Palladium-Calciumcarbonat in Wasserstoffatmosphäre.

100 mg Substanz werden in 140 cm³ Feinsprit gelöst und mit 100 mg Palladium-Calciumcarbonat in Wasserstoffatmosphäre bei Zimmertemperatur während 20 Stunden geschüttelt. Die Substanz krystallisiert aus Chloroform-Methanol in Blättchen, die bei 270—272° (Hochvakuum) schmelzen und mit Anhydro-oleanolsäure-lacton-II (V) keine Schmelzpunktserniedrigung geben.

$$[\alpha]_D = +43^\circ \text{ (c} = 0,847\text{)}$$

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

30. Untersuchungen über die Gewebsatmung

1. Die Aktivierbarkeit der tierischen Atmung durch Aminosäuren

von S. Edlbacher und O. Wiss (unter Mitwirkung von Frieda Nebiker)

(22. XII. 45.)

Die gegenwärtigen Anschauungen über den Mechanismus der tierischen Gewebsatmung verdanken wir in erster Linie den grundlegenden Arbeiten von *O. Warburg* über das strukturgebundene eisenhaltige Häminferment. Die theoretisch wichtigen Untersuchungen von *H. Wieland* einerseits und *Thunberg* andererseits über Dehydrierungsvorgänge bildeten die Voraussetzung zur Entdeckung des wasserlöslichen eisenfreien Atmungsfermentes. Auch hier hat wiederum *O. Warburg* mit seiner Schule mit der Entdeckung des gelben Fermentes den entscheidenden Schritt getan. *R. Kuhn*, *Theorell*, *P. Karrer*, *H. von Euler* und *Green* haben dann in erster Linie entscheidende Fortschritte dieser Arbeitsrichtung erzielt. Die Charakterisierung der Cytochrome, einer dritten essentiellen Komponente der tierischen Atmung verdanken wir vor allem Untersuchungen von *Keilin* und *Theorell*. Später wurden dann durch *Warburg* und *von Euler* die Pyridin-Proteide als weitere enzymatische

Bestandteile in das Atmungssystem eingegliedert. *Szent Györgyi* und Mitarbeiter haben durch Untersuchungen über den Einfluss von Fumarsäure auf die Sauerstoffzehrung von Muskelgewebe dem Problem der Atmung eine neue Seite abgewonnen. Sie konnten zeigen, dass die Atmungsgrösse von überlebenden Geweben (Muskel, Leber, Niere) durch Zusatz von kleinen Mengen Fumarsäure sich ungefähr verdoppeln lässt. Der Ausbau dieser Untersuchungen hat sie dann zur Annahme geführt, dass die Fumarsäure durch cyclische Änderung ihrer Oxydationsstufe einen sogenannten Zwischenkatalysator der Atmung darstellt. Auf Grund der Tatsache, dass Citronensäure, dem Muskelgewebe zugesetzt, den Sauerstoffverbrauch steigert, und im Hinblick auf die von *F. Knoop* und *Martius* gefundene Kondensation von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure zu Citronensäure hat schliesslich *H. A. Krebs* den sogenannten Citronensäurecyclus entwickelt.

Vor kurzem haben wir nachweisen können, dass Aminosäuren und Proteine als Katalysatoren den oxydativen Abbau von *d*-Aminosäuren entscheidend beeinflussen können¹⁾. Es liess sich zeigen, dass unter geeigneten experimentellen Bedingungen, ohne den aktivierenden Einfluss von Aminosäuren oder Proteinen tatsächlich keine Oxydation der *d*-Aminosäure erfolgt, während nach Zusatz von geringen Mengen dieser Katalysatoren eine kräftige oxydative Desamidierung resultiert. Die folgenden Untersuchungen zeigen nun, dass die Atmung nativer Organextrakte und Organbreie durch Aminosäuren enorm gesteigert werden kann. Schon früher konnte der eine von uns (*E.*) gemeinsam mit *H. Grauer*²⁾ zeigen, dass *l*- und *d*-Histidin den Sauerstoffverbrauch von Rattenleberextrakt steigert. Dabei ergab sich, dass weder ein Absinken der Imidazolwerte, noch eine Mehrbildung von Ammoniak zu beobachten war.

Diese Versuche wurden damals so gedeutet, dass das Histidin durch eine Oxydase in irgend einer unbekannten Weise abgebaut wird. Auf Grund unserer jetzigen Einblicke ist nun zu sagen, dass diese mit Histidin ausgeführten Versuche ebenfalls so zu deuten sind, dass diese Aminosäure als Atmungsaktivator funktioniert und nicht als Substrat. Dadurch erklärt sich auch die Tatsache der Konstanz der Imidazolwerte und das Fehlen von Ammoniakbildung. Im weiteren geht aus unseren Versuchen hervor, dass dieser Reaktion ganz allgemeine Bedeutung zukommt, indem die Aktivierungseffekte an verschiedenen Organen bei der Ratte und beim Meerschweinchen nachgewiesen werden konnten. Bemerkenswert erscheint uns auch die Tatsache, dass es sich um ein eminent labiles Fermentsystem handelt. So gelingt es nur bei äusserst raschem Arbeiten und starker Kühlung der Gewebe bei der Präparation die typischen Steigerungseffekte zu erzielen.

¹⁾ Helv. **28**, 797 und 1111 (1945).

²⁾ Helv. **26**, 864 (1943).

Experimenteller Teil.

1. Methoden.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ammoniakbildung geschah in der üblichen Weise nach *O. Warburg* und *Conway* (l. c.) Der Histidinnachweis erfolgte einerseits nach *Edlbacher* und Mitarbeitern¹⁾, andererseits kam die von *Conrad* und *Berg*²⁾ modifizierte Bestimmung nach *Kapeller-Adler* zur Anwendung, die in unserem Institut eine weitere Ausarbeitung erfahren hat³⁾. Es hat sich als notwendig erwiesen, der Enzympräparation besondere Beachtung zu schenken. So hat sich gezeigt, dass die typischen Steigerungseffekte als Folgen von zu langsamem Arbeiten oder von ungenügender Kühlung vollständig unterbleiben können. Die Tiere wurden erst getötet, nachdem alle übrigen Versuchsvorbereitungen abgeschlossen waren, so dass nach Zugabe des Enzyms der Atmungsversuch sofort in Gang gesetzt werden konnte. Der Muskelbrei wurde folgendermassen präpariert: Dem durch Kopfschlag getöteten Tier wurde möglichst rasch das Fell abgezogen, mit wenigen Scheren schnitten die Ober- und Unterschenkelmuskulatur vom Knochen abgetrennt und die Muskelstücke sofort in ein in einer Kältemischung (Eis-Kochsalz) gekühltes Becherglas gegeben. Anschliessend wurden die Muskelstücke in der eisgekühlten *Latapie*-Mühle gemahlen, nachdem gemäss den Angaben von *Szent Györgyi* die Zermahlungsscheibe entfernt worden war. Der gewogene Brei wurde sofort mit eiskaltem Phosphatpuffer zu einer möglichst homogenen Mischung verrührt und mittels einer Pipette von weiter Ausflussöffnung in die *Warburg*-Gefässe verteilt. Vom Zeitpunkt der Tötung der Tiere bis zum Einhängen der Manometer in den Thermostaten sollten höchstens 20 Minuten verstreichen. Auch beim Arbeiten mit Extrakten erwiesen sich die angeführten Kautelen als unerlässlich. Nach rascher Isolierung der Organe wurden sie mittels Seesand im eiskalten Mörser zu einem homogenen Brei verrieben, im eiskalten Puffer suspendiert und während 1—2 Minuten zentrifugiert. Im allgemeinen wurde auch bei dieser Präparation die Zeitspanne von 20 Minuten nicht überschritten. Wie wir weiter unten am Beispiel zeigen werden, war es notwendig, das Substrat sofort in den Hauptraum zu geben. Wenn nämlich die Enzymlösung zum Temperaturausgleich während 10 Minuten ohne Substrat geschüttelt wurde, so erwies sie sich in der Folge für unsere Untersuchungszwecke als wirkungslos. Wir haben deshalb immer Substrat und Effektor gleich zu Beginn des Versuches in den Hauptraum gegeben.

Unter Beachtung der angeführten Kautelen gelingt es regelmässig die typischen Steigerungseffekte zu erzielen. Doch es liegt wohl auf der Hand, dass bei der ausserordentlichen Labilität des Enzymsystems, die absolute Grösse des Aktivierungseffektes relativ grossen Schwankungen unterliegen muss. Möglicherweise werden Untersuchungen über Alter und Geschlechtsunterschiede und Einfluss der Stoffwechsellage systematische Abweichungen ergeben. In den vorliegenden Untersuchungen wurden diese Gesichtspunkte noch nicht berücksichtigt.

2. Untersuchungen an Leberextrakten.

Edlbacher und *Grauer*⁴⁾ haben feststellen können, dass bei Zusatz von *l*- und *d*-Histidin zu verdünnten Rattenleberextrakten eine Zunahme der Sauerstoffzehrung auftritt. Es konnte damals gezeigt werden, dass dabei im Falle des *d*-Histidins keine merkliche Menge Ammoniak gebildet wird, und dass keine Abnahme der Imidazolwerte nachweisbar war. Entsprechende Untersuchungen bei *l*-Histidinzusatz lassen sich wegen der Anwesenheit der Histidase nicht verwerten. In Unkenntnis der erst später entdeckten Effektorenwirkung der Aminosäuren musste damals der Schluss gezogen werden, dass *d*- und *l*-Histidin oxydativ abgebaut werden. Dass tatsächlich kein oxydativer Abbau der genannten Substrate stattfindet, geht aus den folgenden Untersuchungen klar hervor. Im übrigen ist es sehr wohl möglich, dass nach Kenntnis der aktivierenden Wirkung der Aminosäuren auf die verschiedensten enzymatischen Vorgänge, weitere solche Einzel-

¹⁾ Z. physiol. Ch. **270**, 157 (1941).

²⁾ J. Biol. Chem. **117**, 350 (1937).

³⁾ Helv. **29**, 226 (1946).

⁴⁾ Helv. **26**, 864 (1943).

enzyme ihre Existenzberechtigung verlieren. Vor allem dann, wenn bei Verwendung von nativen Breien und Extrakten lediglich aus der Sauerstoffzehrung auf ein einzelnes Enzym geschlossen wird.

a) Steigerung der Leeratmung von Leberextrakten.

Verdünnter Rattenleberextrakt (1 Gewichtsteil Leber: 3 Gewichtsteile Phosphatpuffer $p_H = 8,0$) zeigt bei Zusatz von verschiedenen Aminosäuren eine deutliche Zunahme des Sauerstoffverbrauches. Die optischen Antipoden verhalten sich im Prinzip gleich. Die *d*-Mono-aminomonocarbonsäuren erwiesen sich für diese Untersuchungszwecke als ungeeignet, da eventl. Steigerungseffekte durch die intensive oxydative Desaminierung überdeckt werden.

Der durch die übrigen Aminosäuren verursachte Sauerstoffverbrauch ist von nur unbedeutender Ammoniakbildung begleitet. Dass die zugesetzten Aminosäuren tatsächlich als Aktivatoren wirken und nicht etwa oxydativ abgebaut werden, liess sich im Falle des *d*-Histidins eindeutig nachweisen. Der Nachweis mittels der Kapeller-Adler-Reaktion, deren Eintritt an die intakte Histidinmolekel gebunden ist, hat ergeben, dass vor und nach abgelaufener Reaktion genau die gleiche Menge *d*-Histidin nachweisbar ist.

Tabelle 1.

A.

Rattenleberbrei mit doppelter Phosphatpuffermenge versetzt $p_H = 8,0$.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.

Versuchsdauer = 1 Stunde.

Leber-extrakt cm ³	Zusatz	Mol	mm ³ O ₂ -Verbrauch	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm ³ NH ₃ -Bildung	mm ³ NH ₃ -Bildung abzüglich Leerwert
1			90		106	
1	<i>l</i> -Histidin	m/10	174	84	441	335*)
1	<i>d</i> -Histidin	m/10	195	105	148	42
1	<i>l</i> -Arginin	m/10	136	46	103	- 3
1	<i>d</i> -Arginin	m/10	118	28	107	1
1	<i>l</i> -Phenylalanin	m/10	159	69	128	22
1	<i>l</i> -Asparaginsäure	m/10	151	61	130	24
1	<i>l</i> -Glutaminsäure	m/10	161	71	121	15
1	<i>l</i> -Leucin	m/10	162	72	133	27

*) Histidasewirkung.

B.

Rattenleberbrei mit doppelter Phosphatpuffermenge versetzt $p_H = 8,0$.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.

Versuchsdauer = 1 Stunde.

Leber-extrakt cm ³	<i>d</i> -Histidin Mol	mm ³ O ₂ -Verbrauch	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert
1		160	
1	m/50	287	127
1	m/50	313	153

In mehreren Parallelansätzen zeigte sich, dass vor und nach Ablauf des Atmungsversuches genau die gleiche Histidinmenge nachgewiesen werden konnte. Die Bestimmung erfolgte nach der umgearbeiteten Methode von *Kapeller-Adler*.

Zugesetzte Histidinmenge	3,1 mg
Vor dem Versuch nachgewiesene Histidinmenge	3,3 mg
	3,4 mg
Nach dem Versuch nachgewiesene Histidinmenge	3,3 mg
	3,3 mg

Tabelle 2 zeigt, dass sich auch die Leeratmung von Meerschweinchen-Leberextrakten beträchtlich aktivieren lässt.

Tabelle 2.

Meerschweinchenleber mit Seesand verrieben, mit gleicher Phosphat-Puffermenge $p_H = 8,0$ versetzt.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.

Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber-extrakt cm ³	<i>l</i> -Histidin Mol	<i>d</i> -Histidin Mol	mm ³ O_2 -Ver- brauch	mm ³ O_2 - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm ³ NH_3 - Bildung	mm ³ NH_3 - Bildung abzüglich Leerwert
1			905		251	
1	m/100		1325	420	945	694*)
1		m/100	1165	260	306	55

*) Histidasewirkung.

b) Steigerung der Substratatmung in Leberextrakten.

Unter Beachtung der oben angegebenen Kautelen bei der Enzympräparation gelingt es, durch Aminosäuren nicht nur eine Steigerung der Leeratmung, sondern auch eine enorme Aktivierung der Substratatmung zu erzielen. In der folgenden Tabelle ist ein Aktivierungseffekt durch *l*-Histidin wiedergegeben. Die Tatsache, dass der durch Histidin zusätzlich verbrauchte Sauerstoff diejenige Menge Sauerstoff weit übersteigt, die bei vollständiger Oxydation des zugesetzten Histidins gebunden würde, beweist, dass das Histidin tatsächlich als Effektor wirkt.

Tabelle 3.

Rattenleber mit Seesand verrieben, mit gleicher Phosphatpuffermenge $p_H = 8,0$ versetzt.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.

Pyruvat wurde in den Hauptraum, Histidin in den Ansatz eingefüllt.

Histidin nach Temperaturausgleichsperiode (10 Minuten) zugekippt.

Leber-extrakt cm ³	Pyruvat Mol	<i>l</i> -Histidin Mol	mm ³ O_2 - Verbrauch	mm ³ O_2 -Ver- brauch abzüglich Leerwert
1,5			478	
1,5		m/500	493	15
1,5	m/25		620	142
1,5	m/25	m/500	1760	1282

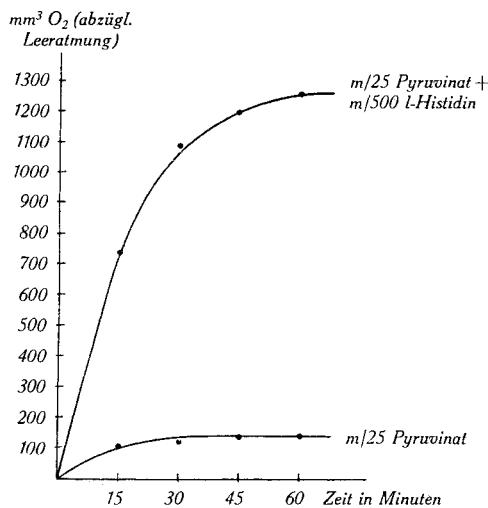


Fig. 1.

Die Ausdehnung der Aktivierungsversuche auf andere Aminosäuren hat gezeigt, dass sicher eine grosse Anzahl derselben als Effektoren wirken kann, und dass sowohl die natürlichen als auch die unnatürlichen Formen wirksam sind.

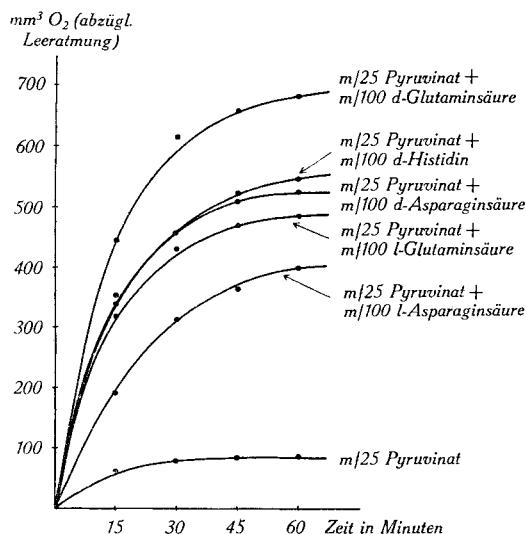


Fig. 2.

Rattenleber mit Seesand verrieben, mit gleicher Phosphatpuffermenge versetzt. p_H = 8. Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm. Versuchsdauer = 1 h. Pro Ansatz wurden 1,5 cm³ Extrakt eingefüllt.

Wir haben schon in der Einleitung erwähnt, dass es sich um ein äusserst labiles Enzymsystem handelt. Als Illustration dazu geben wir 2 Parallelversuche wieder. Es handelt sich in beiden Versuchen um die genau gleiche Anordnung. Im ersten Versuchsanansatz wurde das Substrat gleich zu Beginn des Versuches zum Enzym zugegeben. Es zeigte sich der typische Aktivierungseffekt. Im zweiten Versuchsanansatz hingegen wurde das Substrat erst nach Ablauf der Temperaturausgleichsperiode zum Enzym eingekippt. Die Aktivierung blieb aus.

Tabelle 4.

Rattenleber mit Seesand verrieben, mit gleicher Phosphatpuffermenge versetzt $p_H = 8,0$.
Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.
Versuchsdauer = 1 Stunde.

Leber-extrakt cm ³	Pyruvi-nat Mol	<i>l</i> -Histidi-n Mol	mm ³ O ₂ -Verbrauch	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
A*					
1,5			460		
1,5	m/25		512	52	
1,5		m/100	499	39	
1,5	m/25	m/100	1236	776	685
B**					
1,5			464		
1,5	m/25		452	- 12	
1,5		m/100	503	41	
1,5	m/25	m/100	452	- 12	- 41

*) Substrat zu Beginn des Versuchs zu Enzym zugegeben.

**) Substrat im Ansatz, nach Temperaturausgleichsperiode zugekippt.

Versuche mit Nierenextrakten.

Wie aus dem folgenden Versuch hervorgeht, lässt sich die Atmungsgrösse durch Zusatz von *l*-Histidin um ein Mehrfaches erhöhen.

Tabelle 5.

Meerschweinchennieren mit Seesand verrieben, mit 2½facher Menge Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ versetzt.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.

Versuchsdauer = 2 Stunden.

Nieren-extrakt cm ³	<i>l</i> -Histidin Mol	mm ³ O ₂ -Verbrauch	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert
2		550	
2	m/100	1455	905

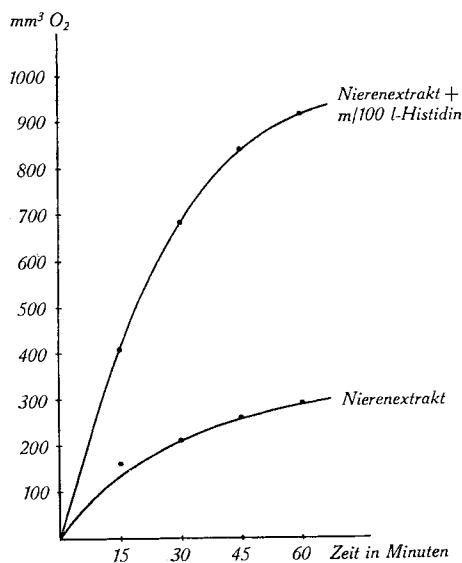


Fig. 3.

Meerschweinchennieren mit Seesand verrieben, mit $3\frac{1}{2}$ facher Phosphatpuffermenge versetzt. $p_H = 8$. Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm^3 . Versuchsdauer = 1 h. Pro Ansatz wurden 2 cm^3 Extrakt eingefüllt.

Versuche mit Gehirnextrakt.

In orientierenden Versuchen haben wir feststellen können, dass die typischen Aktivierungseffekte auch bei Verwendung von Gehirnextrakten nachweisbar sind.

Tabelle 6.

Rattengehirn mit Seesand verrieben, mit doppelter Phosphatpuffermenge versetzt
 $p_H = 8,0$.
 Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm^3 .
 Versuchsdauer = 1 Stunde.

Gehirn-extrakt	<i>l</i> -Histidin	mm³ O₂-Verbrauch	mm³ O₂-Verbrauch abzüglich Leerwert	mm³ NH₃-Bildung	mm³ NH₃-Bildung abzüglich Leerwert
1 cm³		137		86	
1 cm³	m/100	176	39	90	4

Versuche mit Muskelbrei.

Als Beispiel für die Atmungssteigerung im Muskelbrei haben wir die Aktivierung des Abbaus der Milchsäure durch Kreatin und Arginin herausgegriffen.

Tabelle 7.

Rattenmuskelbrei mit doppelter Phosphatpuffermenge versetzt $p_H = 8,0$.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.

Versuchsdauer = 1 Stunde.

Leerwert: 1 cm³ Muskelbrei = 220 mm³ Sauerstoffverbrauch.

Muskelbrei cm ³	Milchsäure Mol	Effektor m/50	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
1	m/50		54	
1		<i>l</i> -Arginin	73	
1		<i>d</i> -Arginin	38	
1		Kreatin	8	
1	m/50	<i>l</i> -Arginin	168	41
1	m/50	<i>d</i> -Arginin	177	85
1	m/50	Kreatin	158	96

Hemmungsversuch mit Kaliumcyanid.

Kaliumcyanid in m/1000 Konzentration hemmt den durch Aktivierung bedingten Sauerstoffverbrauch vollständig.

Tabelle 8.

Rattenleber mit Seesand verrieben, mit gleicher Phosphatpuffermenge versetzt, $p_H = 8,0$.
Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³.

Versuchsdauer = 1 Stunde.

Leberextrakt cm ³	<i>l</i> -Histidin Mol	KCN Mol	mm ³ O ₂ -Verbrauch	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert
1,5			370	
1,5	m/100		605	235
1,5		m/1000	235	
1,5	m/100	m/1000	231	- 4

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den hier mitgeteilten Tatsachen geht hervor, dass die Atmung verschiedener tierischer Gewebe und Gewebsextrakte durch Aminosäuren stark aktivierbar ist. Es handelt sich hier offenbar um eine Reaktionsweise von ganz allgemeiner Bedeutung. Durch diese Feststellung wird auch auf die schon früher von *Edlbacher* und *Grauer* (l. c.) mitgeteilte Beobachtung über die Einwirkung von Leberextrakten auf Histidin neues Licht geworfen, indem diese Versuche so zu deuten sind, dass das Histidin nicht oxydiert wird, sondern als Aktivator der Atmung wirkt. Demnach ordnen sich alle diese Beobachtungen in vollkommener Übereinstimmung zu dem gemeinsamen Gesichtspunkt, dass Aminosäuren auf die Atmung eine

positive Effektorenwirkung ausüben. Wie im experimentellen Teil beschrieben wurde, lassen sich nun die Versuchsbedingungen auch so wählen, dass nach Zusatz des Substrats, der Brenztraubensäure, nur mehr eine ganz minimale zusätzliche Atmung zu beobachten ist. Gerade bei derartigen Versuchsbedingungen bewirkt nun die Zusage von Aminosäuren eine ganz eminente Steigerung der Veratmung der Brenztraubensäure.

In unseren vorangegangenen Untersuchungen (l. c.) über die Wirkung der hochgradig gereinigten *d*-Aminosäure-oxydase konnte diese positive Effektorenwirkung der Aminosäuren durch die Annahme einer Bildung von Komplex-enzymen erklärt werden. Im jetzigen Falle der Aktivierung der Atmung durch Aminosäuren handelt es sich aber um ein äusserst kompliziertes Oxydations-system, und es lässt sich auf Grund der bisherigen Beobachtungen noch nicht sagen, welche Teilenzyme am ganzen Vorgang beteiligt sind. Es erscheint uns aber doch in einem gewissen Grade wahrscheinlich, dass auch bei dieser Aktivierung der Atmung durch Aminosäuren die Bildung von Komplex-enzymen die Steigerung der Atmung bewirkt. Die vollständige Hemmbarkeit der durch die Aktivierung erzielten zusätzlichen Mehratmung durch Blausäure weist darauf hin, dass möglicherweise — und zwar im Gegensatz zu der bisher geltenden Meinung — eventuell die Häminfermente auch im zellfreien Milieu wirksam sein können. Durch ihre grosse Labilität ist die von uns gefundene Oxydationsreaktion bisher der Beobachtung entgangen. Die Tatsache, dass im zellfreien Extrakt die Brenztraubensäure in so intensiver Weise oxydiert werden kann, beweist, dass in den verschiedenen Geweben ein labiles, bisher unbekanntes Oxydationssystem existiert, welches wahrscheinlich bei den desmolytischen Vorgängen eine allgemeine und wichtige Rolle spielt. Es ist durchaus möglich, dass diese Feststellungen dazu führen werden, die bisherigen Vorstellungen über die „Hauptatmung“ der Gewebe einer Revision zu unterziehen. Wir haben schon in der 6. Mitteilung der Reihe über den Abbau der Aminosäuren im Organismus im Anschluss an die Effektorenwirkung der Aminosäuren auf die *d*-Aminosäure-oxydase die Beziehung zur spezifisch-dynamischen Wirkung der Aminosäuren erörtert. Nachdem wir nun zeigen konnten, dass dieser katalytischen Wirkung der Aminosäuren ganz allgemeine Bedeutung zukommt, erscheint uns die Annahme berechtigt, dass deren spezifisch-dynamische Wirkung mit der Effektorenwirkung auf enzymatische Vorgänge ihre Erklärung findet.

Zusammenfassung.

1. Aminosäuren können als starke Aktivatoren die Atmungsvorgänge tierischer Gewebe katalysieren.

2. Es liess sich im zellfreien Organextrakt ein äusserst labiles Atmungssystem nachweisen, das bei Zusatz von Aminosäuren, Brenztraubensäure intensiv oxydiert.

3. Die durch Aktivierung bedingte Atmungsgrösse ist durch Kaliumcyanid in m/1000 Konzentration vollständig hemmbar, während die Leeratmung des Extraktes durch Kaliumcyanid auf ca. die Hälfte reduziert wird.

Basel, im Dezember 1945
Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

31. Zur stufenphotometrischen Bestimmung des Histidins

von K. Schmid.

(22. XII. 45.)

Wie *Edlbacher* gemeinsam mit *Baur*, *Staehelin* und *Zeller*¹⁾ nachgewiesen hat, liefert die von *Hanke* und *Koessler*²⁾ ausgearbeitete Bestimmungsmethode des Histidins, welche auf der Kuppelung mit Diazobenzolsulfosäure nach *Pauly* basiert, zu ungenaue Werte. *Edlbacher* und Mitarbeiter konnten jedoch auf Grund derselben Reaktion durch Anwendung von p-Chloranilin einen in Butylalkohol sehr stabilen Azofarbstoff erhalten und so eine äusserst empfindliche Methode entwickeln. Sie schliesst aber den Nachteil in sich, dass sie für Histidin nicht spezifisch ist. Auch andere Imidazolderivate, Tyrosin und Polyphenole zeigen mit verschiedener Empfindlichkeit dieses Verhalten.

Für die Erforschung des Histidin-Stoffwechsels ist es aber von grosser Bedeutung, dass auf Grund einer spezifischen Reaktion gezeigt werden kann, ob am aliphatischen Rest dieser Aminosäure eine Veränderung eingetreten ist.

In der Bromierung des Histidins, die bekanntlich so durchgeführt wird, dass die Histidinlösung mit Bromwasser bis zur Gelbfärbung versetzt und der gebildete Farbstoff in der Wärme entwickelt wird, fand *F. Knoop* einen spezifischen Nachweis. *R. Kapeller-Adler*³⁾ modifizierte diese Reaktion, indem Brom bis zur Blaufärbung von Kaliumjodidstärkepapier zur Lösung zugefügt und der entstandene Farbstoff in Ammoniak-Ammoniumcarbonat-Gemisch entwickelt und seine Intensität stufenphotometrisch gemessen wurde. Arbeitet man jedoch nicht mit reinen Lösungen von Histidin, sondern

¹⁾ Z. physiol. Ch. **270**, 158 (1941).

²⁾ J. Biol. Chem. **59**, 803 (1924).

³⁾ Bioch. Z. **264**, 131 (1933).