

133. Untersuchungen über die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* I.

Die Hemmung der Reaktion durch Malonat

von H. Fahrländer, P. Favarger und F. Leuthardt.

(I. III. 48.)

Die Bildung von Arginin aus Citrullin und Glutaminsäure (Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff*) im Leberhomogenat wird durch Malonat gehemmt (*Cohen* und *Hayano*¹⁾). Wir haben bei früherer Gelegenheit festgestellt, daß die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* durch solche Faktoren gehemmt wird, die die Konzentration des Adenosintriphosphats (A.T.P.) im Homogenat herabsetzen, sei es, daß sie seine Hydrolyse beschleunigen, sei es, dass sie seine Resynthese verlangsamen (*Leuthardt* und Mitarbeiter)²⁾. Malonat hemmt die Dehydrierung des Succinats, andererseits liefert die Oxydation der C₄-Dicarbonsäuren, wie eine Reihe von Untersuchungen gezeigt haben³⁾, die Energie für die Bildung von Phosphatbindungen. Da die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* vom A.T.P. abhängt, lag es nahe, ihre Hemmung in Gegenwart von Malonat durch eine Verminderung der A.T.P.-Resynthese zu erklären. Wir haben das Verhalten des labilen Phosphats unter dem Einfluß des Malonats untersucht und tatsächlich eine starke Verminderung desselben gefunden, die sich durch Fumarat aufheben lässt. Gleichzeitig wurde auch die Bildung der Bernsteinsäure unter verschiedenen Bedingungen verfolgt.

Nach den ersten Untersuchungen von *Borsook* und *Dubnoff*⁴⁾ sind in Gewebsschnitten aus Niere Glutaminsäure und Asparaginsäure bei der Bildung des Arginins gleich wirksam. Wir haben daher auch die Asparaginsäure in die Untersuchung einbezogen. Bei geeigneten Versuchsbedingungen beobachtet man dieselben Erscheinungen wie bei der Glutaminsäure.

¹⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

²⁾ F. Leuthardt, H. Fahrländer und H. Nielsen, Helv. physiol. pharmacol. acta **5**, 282 (1947); H. Fahrländer, P. Favarger, H. Nielsen und F. Leuthardt, Helv. physiol. pharmacol. acta **5**, 202 (1947).

³⁾ H. M. Kalckar, Enzymologia **2**, 47 (1937); Biochem. J. **33**, 631 (1939); S. P. Colowick, M. S. Welch und C. F. Cori, J. Biol. Chem. **133**, 359 (1940); S. P. Colowick, H. M. Kalckar und C. F. Cori, J. Biol. Chem. **133**, 641 (1940); R. Van Potter, Arch. Biochem. **6**, 439 (1945); J. Biol. Chem. **169**, 17 (1947).

⁴⁾ H. Borsook und W. Dubnoff, J. Biol. Chem. **141**, 717 (1941).

Experimenteller Teil.

Methodik.

Tiere: Zu allen Versuchen wurden Albinoratten beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere wurden mit einer Nahrung gefüttert, die an Kontrollen optimales Wachstum ergab. Vor den Versuchen mit Glutaminsäure wurden die Tiere 12—16, vor jenen mit Asparaginsäure 48—72 Stunden auf Hunger gesetzt.

Homogenat: Ein Teil eisgekühlter Leber wurde mit zwei Teilen des Milieus nach *Cohen* und *Hayano*¹⁾ mittels des Apparates von *Potter* und *Elvehjem*²⁾ bei 0° homogenisiert und durch Gaze koliert.

Inkubation: Die Ansätze wurden eine halbe Stunde lang bei 38° in Luft geschüttelt.

Substrate: Glutaminsäure und Citrullin von *F. Hoffmann-La Roche & Co.* Asparaginsäure, Malonsäure, Na-Malonat, Na-Succinat, Na-Malat, Na-Fumarat von *Schering-Kahlbaum*. α -Ketoglutarinsäure verdanken wir der Freundlichkeit von Dr. *O. Wiss* in Basel. A.T.P. wurde nach *Needham*³⁾ gemäss den Angaben von *Le Page*⁴⁾ hergestellt. Cytochrom C wurde nach *Keilin* und *Hartree*⁵⁾ aus Rinderherz gewonnen. Myosin wurde nach *Szent-Györgyi*⁶⁾ dargestellt.

Analytische Methoden.

1. Im Leberhomogenat wird aus dem entstehenden Arginin durch die Arginase sofort Harnstoff abgespalten. Die Argininsynthese kann daher durch Bestimmung des Harnstoffs verfolgt werden. Der Harnstoff wurde manometrisch mittels „Arlo“-Urease gemessen (*Krebs* und *Henseleit*⁷⁾). Der Harnstoff wird in den Tabellen ausgedrückt als mm³ CO₂ (22,2 mm³ CO₂ = 60 γ Harnstoff).

2. Phospho-brenztraubensäure wurde nach *Kalckar*⁸⁾, sowie nach *Lohmann* und *Meyerhof*⁹⁾ bestimmt.

3. Fructosediphosphat wurde nach Fällung mit Ba-Acetat mittels der Methode nach *Roe*¹⁰⁾ bestimmt. Zugewetztes Fructosediphosphat wurde so zur Gänze wiedergefunden.

4. Das anorganische Phosphat wurde nach der Methode von *Fiske* und *Subbarow*¹¹⁾ bestimmt, wobei wir uns der Angaben von *Le Page* und *Umbreit*⁴⁾ bedienten. Das nach dieser Methode in den Ansätzen unmittelbar bestimmbare Phosphat wird mit P₀ bezeichnet. Es umfasst das „wahre“ anorganische Phosphat, sowie die besonders leicht spaltbaren Phosphatverbindungen (Kreatinphosphat, Acetylphosphat), die aber in der vorliegenden Untersuchung keine Rolle spielen.

Unter labilem Phosphat (P_l) verstehen wir das Phosphat, das durch Hydrolyse während 9 Minuten in n. HCl bei 100° freigesetzt wird. Die zum Neutralisieren der organischen Säuren verwendeten Lösungen der Alkalihydroxyde waren frei von Silikat, wie wir durch vielfache Kontrollen festgestellt haben.

¹⁾ *P. P. Cohen* und *M. Hayano*, *J. Biol. Chem.* **166**, 251 (1946).

²⁾ *R. Van Potter* und *C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **114**, 495 (1936).

³⁾ *D. M. Needham*, *Biochem. J.* **36**, 113 (1942).

⁴⁾ *G. A. Le Page* in *W. W. Umbreit, R. H. Burris* und *J. F. Stauffer*, *Manometric techniques and related methods etc.*, Burgess Publishing Co., Minneapolis 1945.

⁵⁾ *D. Keilin* und *E. F. Hartree*, *Proc. Roy. Soc. Ser. B* **122**, 298 (1937).

⁶⁾ *A. Szent-Györgyi*: *Studies from the Institute of Medical Chemistry, University Szeged*, Vol. III, *J. Karger*, Basel 1943.

⁷⁾ *H. A. Krebs* und *K. Henseleit*, *Z. physiol. Ch.* **210**, 33 (1932).

⁸⁾ *H. M. Kalckar*, *Biochem. J.* **33**, 631 (1939).

⁹⁾ *K. Lohmann* und *O. Meyerhof*, *Bioch. Z.* **273**, 60 (1934).

¹⁰⁾ *I. H. Roe*, *J. Biol. Chem.* **107**, 15 (1934).

¹¹⁾ *C. H. Fiske* und *Y. Subbarow*, *J. Biol. Chem.* **66**, 375 (1925).

5. Das A.T.P. wurde in einigen Fällen mittels hochgereinigtem Myosin (A.T.P.-ase) bestimmt. Myosin katalysiert die Reaktion Adenosintriphosphat \rightarrow Adenosindiphosphat + Phosphat. Dazu wurden nach der üblichen, halbstündigen Inkubation alle Fermente des Milieus durch Erhitzen während 30 Sekunden im siedenden Wasserbad inaktiviert. Nach Abkühlen in Eis wurde das Milieu mittels eines 0,1-m. NaOH-Glykokollpuffers auf p_H 9,1 gebracht. Nach Zugabe des in 0,5-m. KCl gelösten Myosins wird während 10 Minuten bei 38° inkubiert. Während des kurzen Erhitzens wird ein Teil des im Milieu vorhandenen A.T.P. hydrolysiert. Wir haben deshalb bei diesen Versuchen das Phosphat am Ende des Hauptversuches, nach dem Erhitzen im Wasserbad und nach der Inkubation mit Myosin bestimmt.

6. Zur Bernsteinsäurebestimmung wurde das Milieu mit ca. 15-proz. Metaphosphorsäure in der Kälte enteiweiss und dem Filtrat so viel konz. H_2SO_4 zugegeben, dass die Endkonzentration 2-n. war. Hierauf wurde im Apparat von *Kutscher* und *Steudel* während 3 Stunden mit Äther extrahiert. Der nach Abdestillieren des Äthers verbleibende Rückstand wurde in 2-n. H_2SO_4 aufgenommen und zur Zerstörung der Malonsäure 1 Stunde im Autoklaven auf 134° erhitzt (*Weil-Malherbe*¹). Nach Neutralisieren wurde die Bernsteinsäure manometrisch nach *Krebs*²) bestimmt. Bei diesem Vorgehen werden 87—93%, im Mittel 90% einer zugesetzten, bekannten Bernsteinsäuremenge wiedergefunden. Die im experimentellen Teil angegebenen Bernsteinsäurewerte sind durch Multiplikation mit dem Faktor 1,1 auf 100% umgerechnet. Bei der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* entsteht durch Desaminierung der Glutaminsäure möglicherweise α -Ketoglutar säure. Diese würde bei der Extraktion auch in den Äther übergehen und im Autoklaven teilweise zu Bernsteinsäure decarboxyliert werden. Wir haben versucht, die α -Ketoglutar säure nach *Weil-Malherbe*¹) als Bisulfitverbindung zu fixieren, doch ist dieses Verfahren nicht befriedigend. Es wurden 10—15% der zugesetzten α -Ketoglutar säure als Bernsteinsäure bestimmt. Um den möglichen Fehler schätzen zu können, der durch das Übergehen der Ketoglutar säure in den Extrakt entsteht, haben wir mehrmals am Ende des Versuches die vorhandenen Ketosäuren nach der Methode von *Long*³) bestimmt. Bei Gegenwart von Glutaminsäure oder von α -Ketoglutar säure + NH_3 schwanken die gefundenen Werte zwischen 0 und 2 μ Mol pro 3 cm³ Ansatz (berechnet als α -Ketoglutar säure). Diese Menge fällt neben der in unseren Versuchen gebildeten Menge Bernsteinsäure nicht in Betracht.

Ergebnisse.

a) Versuche mit Glutaminsäure.

Wie Tabelle I und Fig. 1 zeigen, wird die Argininbildung aus Citrullin und Glutaminsäure im Leberhomogenat (gemessen durch den sekundär aus Arginin entstehenden Harnstoff) durch Malonsäure stark gehemmt. Neben der individuellen, geringen Schwankung von Tier zu Tier scheint die Grösse der Hemmung mit abnehmender Aminosäurekonzentration zuzunehmen. Die Malonsäurehemmung wird aufgehoben durch eine mindestens äquimolare Konzentration Fumar- bzw. *d, l*-Äpfelsäure. Geringere als äquimolare Mengen von Fumarsäure genügen zur vollständigen Enthemmung nicht. Zur Sicherheit wurde in unseren Versuchen die Fumarsäurekonzentration meist doppelt so hoch wie diejenige der Malonsäure gewählt.

Es wird allgemein angenommen, dass die Malonsäure in den von uns gewählten kleinen Konzentrationen (0,001—0,0025-m.) die Succinodehydrase spezifisch hemmt. Aus der Aufhebung der Hemmung durch die Fumarsäure lässt sich schliessen, dass auch im vorliegenden Fall tatsächlich die Dehydrierung der Bernsteinsäure gehemmt wird. Wie Tabelle I zeigt, wird die Hemmung durch Zusatz von Succinat etwas verringert. Es handelt sich hier wahrscheinlich um eine Gleichgewichtsreaktion, bei der die Malonsäure durch Succinat teilweise verdrängt wird.

¹) *H. Weil-Malherbe*, *Biochem. J.* **31**, 299 (1937).

²) *H. A. Krebs*, *Biochem. J.* **31**, 2095 (1937).

³) *C. Long*, *Biochem. J.* **36**, 807 (1942).

Tabelle I.

Wirkung von Fumarat, Malat, Succinat, Malonat.

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10^{-6} -m. 1 cm³ Salzmilieu nach *Cohen*¹⁾ auf 3 cm³ Gesamtvolumen. 0,3 oder 0,4 cm³ Homogenat. Temperatur 38°; Versuchsdauer 30 Minuten.

Versuch No.	Glutaminsäure, Citrullin, μ Mol/cm ³	Malonat μ Mol/cm ³	Fumarat μ Mol/cm ³	Succinat μ Mol/cm ³	Harnstoff mm ³ /3cm ³	Hemmung %
1	5,7	—	—	—	121	—
		2,5	—	—	50	58
		2,5	—	Malat	127	0
				5 μ Mol/cm ³		
2	3,3	—	—	—	125	—
		1,0	—	—	52	58
		1,0	0,5	—	93	25
		1,0	1,0	—	118	5
		1,0	2,0	—	116	7
		2,0	—	—	41	77
		2,0	1,0	—	67	46
		2,0	3,0	—	115	8
3	5,7	—	—	—	72	—
		2,5	—	—	21	71
		2,5	5,0	—	80	0
		2,5	—	5,0	23	68
4	5,7	—	—	—	86	—
		2,5	—	—	10	89
		2,5	—	5,0	42	51
		2,5	5,0	—	95	0
5	3,3	—	—	—	84	—
		1,0	—	—	12	85
		1,0	—	1,0	26	69
6	3,3	—	—	—	123	—
		1,0	—	—	22	82
		1,0	—	2,0	66	46
		1,0	2,0	—	122	0
7	5,7	—	—	—	92	—
		—	—	10,0	55	40
8	5,7	—	—	—	150	—
		—	11,4	—	120	20

Direkt bewiesen wird die Hemmung der Succinodehydrase durch die in Fig. 1 zusammengefassten Bernsteinsäurebestimmungen. Die Konzentration der Glutaminsäure bzw. des Ammonium- α -Ketoglutarats (vgl. *Fahrländer* und Mitarbeiter²⁾), wurde so gewählt,

¹⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

²⁾ H. Fahrländer, P. Favarger, H. Nielsen und F. Leuthardt, Helv. physiol. pharmacol. acta **5**, 202 (1947).

dass die Malonsäurehemmung möglichst vollständig war. Ohne Malonatzusatz findet man nur wenig Succinat. Das ist angesichts der von *Cohen* und *Hayano*¹⁾ vermerkten, starken Atmung, die wir ebenfalls feststellen konnten, nicht erstaunlich. Das aus der Glutaminsäure gebildete Succinat wird offenbar rasch weiter oxydiert. Bei Gegenwart von Glutaminsäure ist in den Ansätzen mit Malonat die angehäuften Menge Bernsteinsäure äquivalent der gleichzeitig gebildeten Harnstoffmenge oder wenig höher als dieselbe. Zusatz von Fumarat lässt parallel zu den Harnstoffwerten auch die Menge der Bernsteinsäure ansteigen; in der Regel wird auch unter diesen Bedingungen etwas mehr Bernsteinsäure als Harnstoff gebildet. (Eine Ausnahme bildet nur der 1. Versuch in Fig. 1 mit 0,0057-m. Glutaminsäure.)

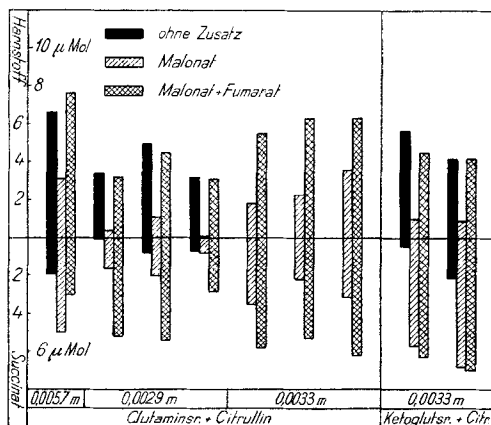


Fig. 1.

Bildung von Harnstoff und Succinat in μMol .

Versuchsbedingungen vgl. Tabelle I. Nach oben: Harnstoff; nach unten: Succinat. Ohne Zusatz bedeutet: Glutaminsäure oder α -Ketoglutarat + NH_3 und Citrullin, A.T.P., Cytochrom, aber ohne Malonat oder Fumarat. Unten ist die Konzentration der Glutaminsäure und der α -Ketoglutarat in der Endlösung angegeben.

Andere Verhältnisse findet man, wenn die Glutaminsäure durch α -Ketoglutarat und NH_3 ersetzt wird. Bei Gegenwart von Malonat erreicht jetzt die angehäuften Menge Bernsteinsäure Werte, die man mit Glutaminsäure erst bei Zusatz von Fumarat findet und die sehr viel grösser sind als die gleichzeitig gebildete Harnstoffmenge. Fügt man den Malonat enthaltenden Ansätzen Fumarat zu, so wird die Harnstoffbildung bedeutend erhöht, ohne dass eine weitere Vermehrung der Bernsteinsäure stattfindet. Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass unter unseren Versuchsbedingungen die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* den wichtigsten Weg für die Desaminierung der Glutaminsäure im Leberhomogenat darstellt. Wird diese Reaktion durch Malonat gehemmt (der Mechanismus dieser Hemmung wird später diskutiert), so geht auch die Bernsteinsäurebildung, d. h. die Desaminierung der Glutaminsäure, stark zurück. Nur die geringen, die Harnstoffwerte übersteigenden Bernsteinsäuremengen sind evtl. auf andere Wege der Glutaminsäure-desaminierung (z. B. die direkte oxydative Desaminierung) zurückzuführen.

Nach den mitgeteilten Resultaten ist die Fumarsäure für den Ablauf der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* im Homogenat von grosser Bedeutung. Es entsteht die Frage, auf welche Weise sie in die Reaktion eingreift. In den letzten Jahren haben verschiedene

¹⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

Autoren¹⁾ gezeigt, dass die Oxydation der C₄-Dicarbonsäuren zur Bildung von energiereichen Phosphatbindungen führen kann. Andererseits hängt die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* vom A.T.P. ab (*Cohen* und *Hayano*²⁾). Die Vermutung liegt nahe, dass die Blockierung der Bernsteinsäureoxydation durch Malonat die Resynthese des A.T.P. verunmöglicht. Wir haben früher zeigen können³⁾, dass nach Zusatz von A.T.P. bei Gegenwart von Glutaminsäure im Leberhomogenat am Versuchsende noch bedeutende Mengen labiles Phosphat (9 Min. Hydrolyse in 1-n. HCl) vorhanden sind. Analoge Befunde hat *Potter*⁴⁾ beim oxydativen Abbau von Dicarbonsäuren erhoben.

Wie Tabelle II und Fig. 2 zeigen, ist in den Ansätzen mit Malonat die am Ende des Versuches gefundene Menge labilen Phosphats bedeutend geringer als in den normalen Ansätzen ohne Hemmungskörper. Zusatz von Fumarat lässt sowohl das labile Phosphat, als auch die Harnstoffsynthese auf den ursprünglichen Wert ansteigen.

Tabelle II.

Verhalten des labilen Phosphats bei Zusatz von Malonat und Fumarat. A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10⁻⁶-m. 0,2 cm³ Leberhomogenat. 1 cm³ Milieu nach *Cohen*²⁾ auf 3 cm³ Gesamtvolumen. Citrullin, Glutaminsäure 0,0057-m. Malonsäure 0,0025-m. Fumarsäure 0,005-m. Hst = Harnstoff.

ohne Zusatz		Malonat		Malonat + Fumarat	
Hst. mm ³ /3 cm ³	P ₉ —P ₀ γ/3 cm ³	Hst. mm ³ /3 cm ³	P ₉ —P ₀ γ/3 cm ³	Hst. mm ³ /3 cm ³	P ₉ —P ₀ γ/3 cm ³
126	163	53	90	119	163
135	135	35	45	127	149
94	120	18	8	103	122
170	106	60	15	167	101
153	125	91	90	172	135
—	100	—	0	—	100

Es ist zu beachten, dass eine strenge Parallelität zwischen der Hemmung der Harnstoffbildung und dem Absinken des labilen Phosphors unter Malonsäureeinfluss nicht zu erwarten ist; stellt doch der am Ende des Versuchs gemessene Harnstoff die Integration der Harnstoffbildung über die ganze Versuchsdauer dar, während die Menge des labilen Phosphats die Resultante aus Hydrolyse und Resynthese im Moment der Entnahme ist.

Die Phosphatbestimmung muss zu einem Zeitpunkt erfolgen, da noch aktiv Arginin gebildet wird. Das Gleichgewicht zwischen Verbrauch und Resynthese des A.T.P. kann in der Tat nur so lange bestehen, als Glutaminsäure desaminiert und über Bernsteinsäure in Fumarsäure umgesetzt wird. Nach Stillstand dieser Reaktion hydrolysiert die sehr aktive A.T.P.-ase der Leber das A.T.P. sehr rasch. Einen grossen Einfluss hat, wie

¹⁾ *H. M. Kalckar*, *Enzymologia* **2**, 47 (1937); *Biochem. J.* **33**, 631 (1939); *S. P. Colowick*, *M. S. Welch* und *C. F. Cori*, *J. Biol. Chem.* **133**, 359 (1940); *S. P. Colowick*, *H. M. Kalckar* und *C. F. Cori*, *J. Biol. Chem.* **133**, 641 (1940); *R. Van Potter*, *Arch. Biochem.* **6**, 439 (1945); *J. Biol. Chem.* **169**, 17 (1947).

²⁾ *P. P. Cohen* und *M. Hayano*, *J. Biol. Chem.* **166**, 251 (1946).

³⁾ *F. Leuthardt*, *H. Fahrlander* und *H. Nielsen*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **5**, 282 (1917); *H. Fahrlander*, *P. Favarger*, *H. Nielsen* und *F. Leuthardt*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **5**, 202 (1947).

⁴⁾ *R. Van Potter*, *Arch. Biochem.* **6**, 439 (1945); *J. Biol. Chem.* **169**, 17 (1947).

Potter¹⁾ zeigte, die Konzentration der verwendeten Substrate. Übersteigt dieselbe eine gewisse Grenze, so verschwindet labiles Phosphat sehr rasch, wahrscheinlich durch intermediäre Bildung unstabiler Phosphatbindungen („phosphate leak“). Die von uns verwendeten Konzentrationen der Glutaminsäure liegen eher etwas höher als die von Potter²⁾ als optimal betrachteten Werte, die eine Erhaltung oder Zunahme der A.T.P.-Konzentration gestatten. Vielleicht sind die niederen Werte für das labile Phosphat, die wir gelegentlich erhalten haben, auf zu hohe Substratkonzentration zurückzuführen. Weitere Beobachtungen zu dieser wichtigen Frage sind im Abschnitt über Asparaginsäure mitgeteilt.

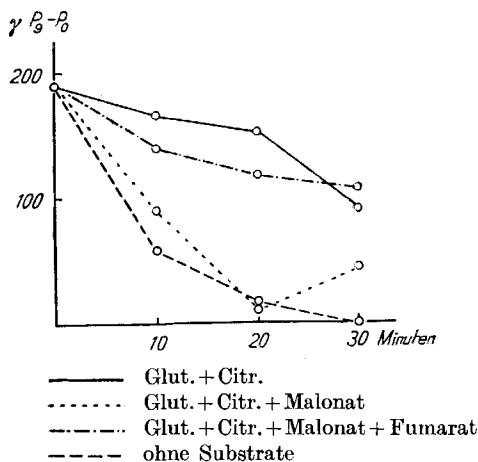


Fig. 2.

Veränderung des labilen Phosphats bei Gegenwart von Malonat Fumarat.

Abzisse: Zeit in Minuten; Ordinate: labiles Phosphat in γ pro Ansatz ($P_9 - P_0$). 0,8 cm³ Homogenat in 12 cm³ Ansatz. Konzentration der Substrate und Zusätze: Glutaminsäure, Citrullin 0,0057-m., Malonat 0,0025-m., Fumarat 0,005-m., A.T.P. 0,001-m., Cytochrom C 10^{-6} -m.

Es entsteht die Frage, ob das gefundene labile Phosphat mit A.T.P. identifiziert werden darf oder ob ein Teil davon von anderen leicht hydrolysierbaren Verbindungen herrührt. Als solche kämen hauptsächlich Kohlenhydratabbauprodukte in Frage, da trotz der Hungerperiode die Lebern der Versuchstiere noch ziemliche Mengen Glykogen enthalten. Fructosediphosphat spaltet bei 9 Minuten Hydrolyse in n. HCl 25% seines Phosphors, die Phospho-enol-Brenztraubensäure 46% ihres Phosphors als anorganisches Phosphat ab (vgl. *Le Page* und Mitarbeiter³⁾). Phosphokreatin sowie Acylphosphate kommen nicht in Frage, da sie bei stark saurer Reaktion, wie sie für die Methode nach *Fiske* und *Subbarow* angewendet wird, durch Molybdat sofort gespalten werden (*Lowry* und *Lopez*⁴⁾; *Potter*²⁾). Die Bestimmung des Phospho-enol-pyruvates in unseren Ansätzen ergab bei beiden angewandten Methoden ein vollständig negatives Ergebnis. Fructosediphosphat ist ebenfalls in so geringen Mengen vorhanden, dass es vernachlässigt werden kann (Tabelle III).

¹⁾ R. Van Potter, Arch. Biochem. **6**, 439 (1945); J. Biol. Chem. **169**, 17 (1947).

²⁾ R. Van Potter, J. Biol. Chem. **169**, 17 (1947).

³⁾ G. A. Le Page in W. W. Umbreit, R. H. Burris und J. F. Stauffer, Manometric techniques and related methods etc., Burgess Publishing Co., Minneapolis 1945.

⁴⁾ O. H. Lowry und J. A. Lopez, J. Biol. Chem. **162**, 421 (1946).

Tabelle III.

Fructosediphosphatbestimmung nach *Roe*¹⁾ in der Ba-Salz-Fällung. Bestimmung nach Inkubation von 30 Minuten. A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10⁻⁶-m. Glutaminsäure, Citrullin 0,0057-m.

P ₉ $\gamma/3$ cm ³	Fructosediphosphat als P $\gamma/3$ cm ³
57	4,3
22	7
66	9

Wir versuchten ferner, das labile Phosphat mittels einer direkten Methode zu identifizieren.

Die in Tabelle IV zusammengefassten Ergebnisse bei Zusatz von hochgereinigtem, nach *Szent-Györgyi*²⁾ dargestelltem Myosin lassen erkennen, dass das labile Phosphat auf ca. die Hälfte reduziert wird; es dürfte also zum grössten Teil dem A.T.P. angehören.

Tabelle IV.

Verhalten des labilen Phosphats gegen Myosin.

Glutaminsäure, Citrullin 0,0057-m. A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10⁻⁶-m. 1 cm³ Milieu nach *Cohen*³⁾ auf 3 cm³ Gesamtvolumen. Homogenat 0,3 cm³. Inkubation 30 Minuten bei 38° in Luft. 30 Sekunden Erhitzen bei 100°. 10 Minuten Inkubation mit Myosin bei 38° in Luft.

Substrate	P ₉ —P ₀ am Versuchsende $\gamma/3$ cm ³	P ₉ —P ₀ nach Erhitzen auf 100° $\gamma/3$ cm ³	P ₉ —P ₀ nach Myosinzusatz $\gamma/3$ cm ³
Glutaminsäure, Citrullin .	170	110	53
Glutaminsäure, Citrullin .	158	112	55
Glutaminsäure, Citrullin .	100	87	40
Glutaminsäure, Citrullin + Malonat	15	—	—
Glutaminsäure, Citrullin + Malonat + Fumarat .	111	68	33
Glutaminsäure, Citrullin .	181	150	70
Glutaminsäure, Citrullin .	174	155	65
Glutaminsäure, Citrullin .	129	64	33
Glutaminsäure, Citrullin + Malonat	97	58	37
Glutaminsäure, Citrullin + Malonat + Fumarat .	143	88	42

¹⁾ I. H. Roe, J. Biol. Chem. **107**, 15 (1934).

²⁾ A. Szent-Györgyi, Studies from the Institute of Medical Chemistry, University Szeged, Vol. III, J. Karger, Basel 1943.

³⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

Bei Zusatz von Fluorid zum Milieu steigt das labile Phosphat auf hohe Werte an. Diese Beobachtung bildet eine Ergänzung zu den Untersuchungen *Potter's*¹⁾, der bei Fluoridzusatz zum Homogenat starkes Absinken des anorganischen Phosphats feststellte, wenn die Ansätze neben dem A.T.P. Dicarbonsäuren enthielten. Die Harnstoffbildung wird bei Gegenwart von Fluorid vollständig gehemmt; da Urease ebenfalls durch Fluorid inaktiviert wird, haben wir in diesem Fall zur Harnstoffbestimmung die Xanthidrolmethode verwendet.

*Potter*¹⁾ hat in sorgfältigen Untersuchungen die Bedingungen festgelegt, die nötig sind, damit sich im Nierenhomogenat (Ratte) die Hydrolyse und die Resynthese des A.T.P. ohne Fluoridzusatz gerade das Gleichgewicht halten. Seine Ansätze enthielten je $1,3 \mu \text{ Mol/cm}^3$ Glutamat, Succinat und Lactat. Die Bedingungen für den Gleichgewichtszustand waren in unseren Ansätzen, die Glutaminsäure und Citrullin enthielten, auch beim Zusatz von Fumarat oder Succinat meistens nicht optimal. In der Regel war das labile Phosphat nach 30 Minuten auf etwa die Hälfte des Anfangswertes abgesunken. Fig. 2 zeigt die Konzentration des leicht hydrolysierbaren Phosphats in Abhängigkeit von der Zeit unter verschiedenen Bedingungen.

b) Versuche mit Asparaginsäure.

Cohen und *Hayano*²⁾ haben gefunden, dass die Harnstoffbildung aus Asparaginsäure und Citrullin bedeutend kleiner ist als diejenige aus Glutaminsäure und Citrullin. Dies trifft nach unseren Untersuchungen bei solchen Tieren zu, die mehr als einen Tag gehungert haben, nicht aber bei solchen, die wenig oder gar nicht hungerten. Bei den letzteren ist Asparaginsäure meist so wirksam wie Glutaminsäure (Tabelle V); doch finden sich auch Ausnahmen von dieser Regel.

Tabelle V.

Argininbildung aus Glutamin- und Asparaginsäure.

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10^{-6} -m. Glutaminsäure, Asparaginsäure, Citrullin 0,0033-m. Homogenat 0,3 cm³. 1 cm³ Milieu nach *Cohen*²⁾ auf 3 cm³ Gesamtvolumen. Tiere 12 Stunden auf Hunger gesetzt. Inkubation 30 Minuten bei 38° in Luft.

Aminosäure	Harnstoff mm ³ /3 cm ³
Glutaminsäure, Citrullin	129
Asparaginsäure, Citrullin	145
Glutaminsäure, Citrullin	173
Asparaginsäure, Citrullin	188

Wenn die Tiere vor dem Versuch 48—72 Stunden gehungert haben, lässt sich die Harnstoffbildung aus Asparaginsäure und Citrullin durch Fumarat oder Succinat bedeutend steigern (vgl. Tabelle VI). Diese Steigerung ist nur wenig ausgesprochen oder fehlt, wenn man die Asparaginsäurekonzentration genügend klein wählt (vgl. Tabelle VIII). Erhöht man die Konzentration der Fumar- oder Bernsteinsäure über eine gewisse Grenze hinaus, so beginnt die fördernde Wirkung auf die Argininsynthese wieder abzunehmen. Eine Konzentration des Fumarats von $1 \mu \text{ Mol/cm}^3$ war in den meisten Versuchen optimal; bei $4 \mu \text{ Mol/cm}^3$, in einzelnen Fällen auch schon bei geringerer Konzentration, wird die maximale Harnstoffbildung nicht mehr erreicht (vgl. Tabelle VI). Bemerkenswert ist die aus Tabelle VI ersichtliche und mehrfach bestätigte Tatsache, dass bei Gegenwart von Malonat die maximale Harnstoffbildung auch bei hoher Fumaratkonzentration erhalten bleibt.

¹⁾ *R. van Potter*, J. Biol. Chem. **169**, 17 (1947).

²⁾ *P. P. Cohen* und *M. Hayano*, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

Tabelle VI.

Argininbildung aus Asparaginsäure; Einfluss von Succinat, Fumarat, Malonat.

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10^{-6} -m. Glutaminsäure, Citrullin, Asparaginsäure 0,0033-m. Homogenat 0,3 cm². 1 cm³ Milieu nach *Cohen*¹⁾ auf 2 cm³ Gesamtvolumen. Tiere 48 Stunden auf Hunger gesetzt. Inkubation 30 Minuten bei 38° in Luft.

Versuch No.	Aminosäure 0,0033-m.	Succinat μ Mol/cm ³	Fumarat μ Mol/cm ³	Malonat μ Mol/cm ³	Harnstoff mm ³ /3cm ³	Zunahme (+) oder Hemmung (-) in %
1	Glutaminsäure	—	—	—	123	—
	„	—	—	1,0	22	- 82
	„	—	2,0	1,0	124	0
	Asparaginsäure	—	—	—	51	—
	„	—	—	1,0	18	- 65
	„	—	2,0	1,0	133	+ 160
2	Asparaginsäure	—	—	—	76	—
	„	—	—	1,0	42	- 45
	„	—	2,0	1,0	133	+ 75
3	Asparaginsäure	—	—	—	76	—
	„	—	—	1,0	42	- 45
	„	—	1,0	—	132	+ 74
	„	—	1,0	1,0	91	+ 20
	„	—	2,0	—	124	+ 63
	„	—	2,0	1,0	114	+ 50
	„	—	4,0	—	100	+ 32
	„	—	4,0	1,0	124	+ 63
4	Asparaginsäure	—	—	—	40	—
	„	1,0	—	—	107	+ 167
	„	1,0	—	2,5	21	- 80
	„	4,0	—	—	120	+ 200
	„	4,0	—	2,5	42	- 79
5	Asparaginsäure 0,0022-m.	—	—	—	64	—
	„	—	1,0	1,0	6	- 94
	„	—	1,0	1,0	61	- 4
6	Asparaginsäure	—	—	—	18	—
	„	—	1,0	—	122	+ 580
7	Asparaginsäure	—	—	—	24	—
	„	—	0,5	—	45	+ 87
	„	—	1,0	—	71	+ 196

¹⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

Malonat hemmt die Reaktion auch bei Gegenwart von Asparaginsäure und verhindert die beschriebene Steigerung durch Succinat. Die Hemmung erscheint daher bei Zusatz von Succinat am grössten. Fumarat vermag die Malonathemmung aufzuheben. Im allgemeinen ist die Malonathemmung bei der Asparaginsäure allein etwas schwächer und unregelmässiger als bei der Glutaminsäure; erst im System, das durch Succinat „stabilisiert“ ist, findet man eine gleichmässig starke Hemmung.

Die Wirkung der Dicarbonsäure auf die Harnstoffsynthese steht offenbar mit der oxydativen Resynthese des A.T.P. im Zusammenhang. Die Bestimmung der Phosphatfraktionen ergibt (Tabelle VIII), wie bei der Glutaminsäure, eine starke Verminderung des 9-Minuten-Phosphats durch Malonat und ein Ansteigen auf den ursprünglichen Wert, wenn dem malonathaltigen Ansatz Fumarat zugesetzt wird. Eine strenge Proportionalität zwischen der Konzentration des labilen Phosphats am Schluss des Versuches, d. h. nach 30 Minuten, und der gebildeten Harnstoffmenge besteht aber auch hier nicht. Trotzdem Fumarat oder Succinat die Argininbildung aus Asparaginsäure und Citrullin stark ansteigen lassen, bewirken sie keine Zunahme des labilen Phosphats gegenüber den Ansätzen mit Asparaginsäure + Citrullin allein. Zur Aufklärung dieser Diskrepanz müsste vor allem die zeitliche Veränderung der Phosphatfraktionen und der Argininbildung verfolgt werden. Diese Untersuchung steht noch aus.

Tabelle VII.

Verhalten des labilen Phosphats mit Asparaginsäure bei Gegenwart von Malonat und Fumarat.

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10^{-6} -m. Milieu nach *Cohen*¹⁾ auf 3 cm³ Gesamtvolumen. Homogenat 0,3 cm³. Phosphatentnahme nach 20 Minuten. Tiere 48—72 Stunden auf Hunger gesetzt. Hst. = Harnstoff, mm³ in 3 cm³ Ansatz, $P_9 - P_0$ = leicht hydrolysierbares Phosphat, γP in cm³ Ansatz.

Ver- such No.	Asparaginsäure			Malonat			Fumarat			Malonat + Fumarat		
	μ Mol /cm ³	Hst. mm ³	$P_9 - P_0$ γ	μ Mol /cm ³	Hst. mm ³	$P_9 - P_0$ γ	μ Mol /cm ³	Hst. mm ³	$P_9 - P_0$ γ	μ Mol /cm ³	Hst. mm ³	$P_9 - P_0$ γ
1	3,3	42	23	1,0	26	20	2,0	100	88	1,0 + 2,0	56	53
2	3,3	122	55	1,0	67	21	2,0	164	—	1,0 + 2,0	149	—
3	3,3	114	105	1,0	69	0	2,0	99	65	1,0 + 2,0	123	107
4	3,3	82	107	1,0	54	75	1,0	131	118	1,0 + 1,0	111	218
5	2,2	74	182	1,0	16	21	1,0	71	204	1,0 + 1,0	71	214
6	1,65	86	172	1,0	61	0	1,0	85	193	1,0 + 1,0	84	140

Wie früher schon hervorgehoben, spielt bei diesen Versuchen die beschleunigende Wirkung der zugesetzten Substrate auf den Zerfall des A.T.P. (der „leak“ Effekt *Potter's*) eine Rolle. Will man Einsicht in den Phosphatstoffwechsel bei der Reaktion der Asparagin-

¹⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

säure mit dem Citrullin erhalten, so muss man mit möglichst kleinen Konzentrationen der Substrate arbeiten; die Reaktion mit Asparaginsäure ist in dieser Hinsicht offenbar empfindlicher als diejenige mit Glutaminsäure. Wir sind mit der Asparaginsäurekonzentration von den meist gebrauchten $3,3 \mu\text{Mol/cm}^3$ sukzessive auf 2,2 und $1,6 \mu\text{Mol/cm}^3$ heruntergegangen, ebenso reduzierten wir die Fumarsäurekonzentration auf $1 \mu\text{Mol/cm}^3$. Regelmässigere Resultate erhielten wir erst mit diesen niederen Konzentrationen; bei hoher Asparaginsäurekonzentration liess sich oft kein oder nur wenig labiles Phosphat nachweisen. Bei niederer Konzentration findet man dagegen mit Asparaginsäure ein ähnliches Verhalten der Phosphatfraktionen wie mit Glutaminsäure (vgl. Tabelle VII die Versuche 1 und 2 mit 5 und 6).

Wir haben auch bei Gegenwart von Asparaginsäure die Anhäufung des Succinats bei Malonatzusatz bestimmt (Tabelle VIII). Es wird stets viel weniger Succinat gebildet als bei Gegenwart von Glutaminsäure.

Tabelle VIII.

Anhäufung von Bernsteinsäure bei Gegenwart von Malonat.

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 10^{-6} -m. Asparaginsäure, Glutaminsäure, Citrullin 0,0033-m. Homogenat $0,3 \text{ cm}^3$. 1 cm^3 Milieu nach *Cohen*¹⁾ auf 3 cm^3 Gesamtvolumen. Malonat 0,001-m. Fumarat 0,003-m. Tiere 48 Stunden auf Hunger gesetzt.

	Malonat		Fumarat		Malonat + Fumarat	
	Hst. $\mu\text{Mol/}$ 3 cm^3	Succinat $\mu\text{Mol/}$ 3 cm^3	Hst. $\mu\text{Mol/}$ 3 cm^3	Succinat $\mu\text{Mol/}$ 3 cm^3	Hst. $\mu\text{Mol/}$ 3 cm^3	Succinat $\mu\text{Mol/}$ 3 cm^3
Glutaminsäure . .	—	—	—	—	6,3	7,6
Asparaginsäure . .	1,8	1,4	5,5	2,3	3,5	1,8
Glutaminsäure . .	2,3	2,2	—	—	6,3	5,3
Asparaginsäure . .	—	—	—	—	4,5	1,0
Glutaminsäure . .	—	—	—	—	7,2	6,8
Asparaginsäure . .	—	—	—	—	7,9	3,3
Glutaminsäure . .	3,6	3,1	—	—	6,3	6,2
Asparaginsäure . .	—	—	7,4	2,4	6,5	0,5

Diskussion.

Für die Synthese des Arginins aus dem Citrullin ist eine Aminosäure nötig, die durch Transaminierung ihre Aminogruppe auf das Citrullin überträgt. Nach den bisherigen Feststellungen kommen hierfür nur die beiden Dicarbonsäuren Glutamin- und Asparaginsäure in Frage. Ob die Asparaginsäure direkt mit dem Citrullin reagiert oder über den Umweg der Glutaminsäure, lässt sich noch nicht definitiv entscheiden, doch sprechen unsere Versuche für eine direkte Reaktion.

Wie *Cohen* und *Hayano*¹⁾ gezeigt haben, hängt die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* vom A.T.P. ab. Das aktive System muß also alle Faktoren enthalten, welche für die ständige Resynthese der

¹⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

labilen Phosphatbindungen nötig sind, da im Homogenat das A.T.P. sehr rasch hydrolysiert wird. Unsere Versuche über das Verhalten des labilen Phosphats bei der Malonathemmung zeigen, dass für die Resynthese des A.T.P. die Bernsteinsäure oder die Fumarsäure unentbehrlich sind. Diese Säuren entstehen im Verlauf der Reaktion durch Desaminierung der Glutaminsäure. Die Glutaminsäure hat also zwei verschiedene Funktionen zu erfüllen: sie liefert durch Transaminierung nicht nur den Stickstoff für den Aufbau der Guanidgruppe, sondern gleichzeitig auch die N-freie Dicarbonsäure, mit deren Oxydation die Resynthese des A.T.P. gekoppelt ist.

Es ist bis heute nicht bekannt, welches das Produkt der Glutaminsäure-desaminierung bei der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* ist. α -Ketoglutarinsäure konnte nie nachgewiesen werden und bereits die Entdecker der Reaktion wiesen auf die Möglichkeit hin, dass die Oxydation des primären Reaktionsproduktes mit einer Decarboxylierung verbunden sein könnte. Unsere Untersuchungen geben über diese Frage keinen Aufschluss. Die Beobachtung, dass bei Gegenwart von Malonat auf eine Molekel Harnstoff mindestens eine Molekel Succinat erscheint, widerspricht auf alle Fälle der Annahme einer simultanen Desaminierung und Decarboxylierung der Glutaminsäure nicht.

Wie im Versuchsteil ausgeführt wurde, verläuft die Argininsynthese mit Asparaginsäure in vielen Fällen langsamer als mit Glutaminsäure; doch lässt Zusatz von Fumarat die Geschwindigkeit bedeutend ansteigen, so dass man unter diesen Bedingungen Harnstoffwerte von ähnlicher Grösse erhält wie mit Glutaminsäure. Worauf diese Unterschiede beruhen und wie die Wirkung des Fumarats zu erklären ist, lässt sich nicht mit Sicherheit angeben. Wir haben die Vermutung ausgesprochen, dass der wesentliche Faktor die Konzentration des A.T.P. ist, und dass erst bei Zusatz von Fumarat (oder in Abwesenheit von Malonat auch von Succinat) die Bedingungen für die Resynthese des A.T.P. optimal werden. Wir konnten aber für diese Annahme keine experimentellen Belege erbringen. Das System mit Asparaginsäure scheint gegen sekundäre Wirkungen der zugesetzten Substrate („phosphate leak“) empfindlicher zu sein als das System, das Glutaminsäure enthält. Das Desaminierungsprodukt der Asparaginsäure (wahrscheinlich Oxallessigsäure) ist entweder weniger geeignet, die Resynthese des A.T.P. zu unterhalten als das Succinat, das aus der Glutaminsäure entsteht, oder es bewirkt einen stärkeren „leak effect“ als das Succinat. Nach *Potter*¹⁾ ist Oxalylacetat in der Tat besonders wirksam.

Es erhebt sich weiter die Frage, ob die Asparaginsäure direkt mit dem Citrullin reagiert oder ob ihre Aminogruppe durch Trans-

¹⁾ *R. Van Potter*, Arch. Biochem. **6**, 439 (1945); J. Biol. Chem. **169**, 17 (1947).

aminierung zuerst auf α -Ketoglutarsäure übertragen wird und Glutaminsäure bildet. Als Quelle der Ketoglutarsäure käme die Oxalessigsäure in Frage, die durch Desaminierung der Asparaginsäure entsteht und nach dem Tricarbonsäurezyklus weiter umgesetzt werden könnte¹⁾. Es sind aber dafür, dass eine derartige intermediäre Bildung von α -Ketoglutarsäure im Leberhomogenat genügend rasch erfolgt, keine direkten experimentellen Anhaltspunkte vorhanden. Die meisten Untersuchungen sind an Muskelsuspensionen durchgeführt worden. Wir haben gezeigt, dass mit Glutaminsäure bei Gegenwart von Malonat eine dem gebildeten Harnstoff mindestens äquivalente Menge Bernsteinsäure angehäuft wird. Mit Asparaginsäure findet man unter den gleichen Bedingungen stets nur wenig Succinat. Würde die Asparaginsäure über den Umweg der Glutaminsäure mit Citrullin reagieren, so müsste es bei Gegenwart von Malonat auch hier zu einer Anhäufung von Bernsteinsäure kommen. Es ist also wenig wahrscheinlich, dass der Umweg über die Glutaminsäure den Hauptweg der Reaktion darstellt; unsere Beobachtungen sprechen eher dafür, dass die Asparaginsäure direkt mit dem Citrullin zu reagieren vermag. In den Versuchen mit Gewebsschnitten aus Niere von *Borsook* und *Dubnoff*²⁾ waren die beiden Aminodicarbonsäuren etwa gleich aktiv.

In diesem Zusammenhang ist eine kürzlich erschienene Mitteilung von *Ratner*³⁾ von grossem Interesse. Aus Acetontrockenpulver der Rinderleber lässt sich ein lösliches Ferment extrahieren, das unter anaeroben Bedingungen, bei Gegenwart von A.T.P., Mg^{++} und Phosphoglycerinsäure (zur Resynthese des A.T.P.) aus Citrullin und Asparaginsäure Arginin bildet. Die Asparaginsäure wird dabei in Äpfelsäure übergeführt. Glutaminsäure allein ist in diesem System unwirksam. Sie liefert nur in Gegenwart von Oxallessigsäure Arginin, d. h. wenn durch Umaminierung die Bildung von Asparaginsäure möglich ist. Es bleibt abzuklären, wieweit die Bildung von Malat eine Besonderheit dieses Systems darstellt; auf alle Fälle beweist es die Möglichkeit einer direkten Reaktion der Asparaginsäure mit dem Citrullin.

Nach den Untersuchungen von *Ochoa*⁴⁾ werden bei der Oxydation von α -Ketoglutarat zu Succinat in Herzmuskelextrakten 3 Molekel Phosphat pro Sauerstoffatom verestert. Die Oxydation von Succinat zu Fumarat liefert nach demselben Autor eine Phosphatbindung. Wenn man annimmt, dass im Leberhomogenat die oxydative Phosphorylierung ebenso wirksam ist wie im Muskelextrakt, so entsteht

1) *H. A. Krebs*, *Advanc. Enzymol.* **3**, 191 (1943).

2) *H. Borsook* und *J. W. Dubnoff*, *J. Biol. Chem.* **141**, 717 (1941).

3) *S. Ratner*, *J. Biol. Chem.* **170**, 761 (1947).

4) *S. Ochoa*, *J. Biol. Chem.* **151**, 493 (1943); **155**, 87 (1944).

die Frage, warum die Oxydation des α -Ketoglutarats zu Succinat, die auch bei Gegenwart von Malonat stattfinden kann, für die Resynthese des A.T.P. nicht genügt. Wir weisen hier nur auf die eine, schon oben erwähnte Möglichkeit hin, dass bei der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* überhaupt kein α -Ketoglutarat entsteht, sondern dass das primäre Reaktionsprodukt zwischen Glutaminsäure und Citrullin direkt Bernsteinsäure liefert. Es ist wahrscheinlicher, dass diese Reaktion energiereiche Phosphatbindungen verbraucht, als dass sie solche bildet. Die Energie für die Resynthese des A.T.P. muss also aus der Oxydation des Succinats stammen, dessen Anhäufung bei Gegenwart von Malonat leicht nachzuweisen ist.

Die Versuche über die Anhäufung der Bernsteinsäure unter verschiedenen Bedingungen zeigen gleichzeitig auch, welche grosse Bedeutung der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* für die Desaminierung der Glutaminsäure (jedenfalls im Leberhomogenat) zukommt. Malonat hemmt, wie zu erwarten, die Succinatbildung aus α -Ketoglutarat nicht. Dagegen liefert die Glutaminsäure bei Gegenwart von Malonat nur wenig Succinat. Dieses Succinat entsteht wohl zur Hauptsache durch oxydative Desaminierung der Glutaminsäure und Decarboxylierung der entstehenden α -Ketoglutarsäure. Wird aber durch Zusatz von Fumarat die Argininbildung wieder in Gang gebracht, so entsteht aus Glutaminsäure fast ebensoviel Succinat wie aus dem Ketoglutarat. Es wird also durch die Argininsynthese eine bedeutende Menge Glutaminsäure zusätzlich desaminiert.

Zusammenfassung.

1. Die Bildung von Arginin aus Citrullin und Glutaminsäure im Leberhomogenat (Ratte) wird durch Malonat gehemmt. Es wird bei Gegenwart von Malonat Bernsteinsäure angehäuft, deren Menge der gleichzeitig gebildeten Argininmenge (gemessen als Harnstoff) mindestens äquivalent ist.

2. Die Malonathemmung wird durch Fumarat aufgehoben, nicht aber durch Succinat. Die Argininbildung hängt also von der Gegenwart des Fumarats ab und Malonat wirkt durch Blockierung der Fumaratbildung.

3. Bei Gegenwart von Malonat findet man am Ende der Versuchsperiode eine starke Verminderung des labilen Phosphats im Vergleich zu den Ansätzen, die kein Malonat enthalten. Bei Gegenwart von Fumarat tritt diese Verminderung nicht ein.

4. Glutaminsäure kann durch Asparaginsäure ersetzt werden. Auch in diesem Falle wird die Reaktion durch Malonat gehemmt und es tritt eine parallele Verminderung des labilen Phosphats ein, die durch Fumarat verhindert werden kann. Fumarat steigert in

vielen Fällen auch die Argininbildung aus Asparaginsäure in den malonatfreien Ansätzen. Der Einfluss des Malonats und des Fumarats auf das labile Phosphat lässt sich meistens bei niederer Konzentration der Asparaginsäure besser erkennen als bei hoher Konzentration. Im letzteren Falle komplizieren sekundäre Wirkungen der zugesetzten Substrate („phosphate leak“ nach *Potter*) die Deutung der Beobachtungen.

5. Wir nehmen an, dass im Leberhomogenat die Oxydation der Bernsteinsäure die Energie für die Resynthese des A.T.P. liefert. Succinat ist das erste fassbare Produkt der Desaminierung der Glutaminsäure bei der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff*. Die Glutaminsäure liefert also nicht nur das eine N-Atom für den Aufbau der Guanidingruppe, sondern auch die C₄-Dicarbonsäure, von deren Oxydation die Resynthese des A.T.P. abhängt. Malonat hemmt die Succinatoxydation und verhindert damit die Erhaltung einer genügend hohen Konzentration des A.T.P. in den Versuchsansätzen.

Institut de chimie physiologique de l'Université de Genève.

134. Untersuchungen über die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* II.

Der Einfluss der Ketonsäuren und des Ammoniaks; Wirkung der Cocarboxylase¹⁾

von H. Fahrländer, H. Nielsen und F. Leuthardt.

(1. III. 48.)

Die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* (Synthese des Arginins aus Citrullin und Glutaminsäure) im Leberhomogenat wird, wie aus den Versuchen von *Cohen* und *Hayano*²⁾ hervorgeht, durch α -Ketoglutarat stark gehemmt. *Borsook* und *Dubnoff*³⁾ selbst haben in Nierenschnitten eine Hemmung durch Pyruvat beobachtet. Wir haben diese Wirkung der Ketonsäuren im Leberhomogenat bestätigt, konnten aber gleichzeitig feststellen, dass sie durch den Zusatz von Ammoniumsalzen aufgehoben wird. Es kann aber auch, wie wir in

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

²⁾ *P. P. Cohen* und *M. Hayano*, J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).

³⁾ *H. Borsook* und *J. W. Dubnoff*, J. Biol. Chem. **141**, 717 (1941).