

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).

einer vorläufigen Mitteilung bereits beschrieben haben, die Glutaminsäure im Leberhomogenat überhaupt durch das Gemisch von Ketoglutarsäure und Ammoniak oder auch von Brenztraubensäure und Ammoniak ersetzt werden (*Fahrländer* und *Mitarbeiter*¹⁾). (Nach *Borsook* und *Dubnoff*²⁾ ist dies auch in Nierenschnitten der Fall.) Damit ist gezeigt, dass die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* tatsächlich eine Teilreaktion der Harnstoffsynthese in der Leber sein kann. Die Leber kann den Harnstoff aus Ammoniumsalzen als alleiniger Stickstoffquelle aufbauen. Es ist daher auch notwendig, dass in der Leberzelle selbst die Glutamin- oder die Asparaginsäure, die das eine Stickstoffatom für die Synthese der Guanidingruppe liefern, fortwährend aus Ammoniak und einem N-freien Körper regeneriert werden können. *Krebs* und *Mitarbeiter*³⁾ haben kürzlich festgestellt, dass im Leberhomogenat bei Zusatz von α -Ketoglutarat Ammoniak sehr rasch verschwindet, ohne dass dabei Harnstoff auftritt. Es handelt sich um die Bildung von Glutaminsäure. Wir erhielten von dieser Publikation erst nach Abschluss unserer Versuche Kenntnis.

Experimenteller Teil.

Methoden.

Tiermaterial: Es wurden Albinoratten beiderlei Geschlechts verwendet. Die Normaltiere waren optimal ernährt, wie die entsprechenden Wachstumskurven zeigten. Wenn nichts anderes bemerkt, wurden die Tiere vor dem Versuch 16 Stunden auf Hunger gesetzt.

Eine Serie B₁-avitaminotischer Ratten wurde uns durch Herrn Prof. *Fleisch* vom Vitamininstitut in Lausanne zur Verfügung gestellt. Eine zweite Serie wurde in unserem Institut gezogen. Die B₁-avitaminotischen Tiere erhielten folgende Nahrung:

Saccharose	70,5%
Casein	20,0%
Salzgemisch F.R.L.	4,0%
Cholinchlorid	0,5%
Arachidöl	3,0%
Lebertran	2,0%

Ein Kilo dieser Mischung wurde mit 200 g Wasser angerührt, dem 1 g folgender Vitaminmischung zugesetzt war:

Ca-Pantothenat	80,0 mg
Adermin	16,0 mg
Lactoflavin	64,0 mg
Nikotinsäureamid	160,0 mg
mit 3,6 g Saccharose verrieben.	

Dass die Tiere wirklich B₁-avitaminotisch waren, geht aus der rapiden Gewichtszunahme bei Injektion einer geringen Menge Aneurin hervor.

¹⁾ *H. Fahrländer, P. Favarger, H. Nielsen und F. Leuthardt*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **5**, 202 (1947).

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

³⁾ *H. A. Krebs, L. V. Eggleston und R. Herns*, *Nature (Lond.)* **159**, 808 (1947).

Aus äusseren Gründen konnten wir den Bradycardietest nicht durchführen. Die Tiere wurden zum Versuch getötet, wenn sie neben der Extremitätencyanose deutlich ataktische Symptome, evtl. schon leichte Krämpfe zeigten. Einige Tiere kamen mitten im Krampfstadium in den Versuch. Da es schwer vorausszusehen ist, wann die Tiere in die finalen Stadien kommen, haben wir darauf verzichtet, vor dem Versuch eine Hungerperiode einzuschalten.

Homogenat: Ein Teil der eisgekühlten Leber wurde bei 0° mit dem Apparat von *Potter und Elvehjem*¹⁾ in zwei Teilen Milieu nach *Cohen und Hayano*²⁾ oder nach *Lehninger*³⁾ homogenisiert und durch Gaze koliert.

Milieu: Auf 3 cm³ Gesamtvolumen wurde 1 cm³ Salzgemisch nach *Cohen und Hayano*²⁾ oder nach *Lehninger*³⁾ gegeben. Das letztere unterscheidet sich vom ersteren nur durch die kleinere Mg⁺⁺-Konzentration.

Inkubation: Die Ansätze wurden immer in 25 cm³-Erlenmeyerkölbchen bei 38° während 30 Minuten in Luft geschüttelt.

Substrat: Glutaminsäure, Citrullin, Na-Pyruvat, Cocarboxylase, sowie die verwendeten Vitamine sind Präparate der Firma *Hoffmann-La Roche*. Na-Malonat, Na-Succinat, Na-Fumarat von *Schering-Kahlbaum*, α -Ketoglutar säure synthetisiert nach *Wislicenus und Waldmüller*⁴⁾. Adenosintriphosphat (A.T.P.) wurde nach *Needham*⁵⁾, unter Berücksichtigung der Angaben von *Le Page*⁶⁾, Cytochrom C nach *Keilin und Hartree*⁷⁾ hergestellt.

Analytische Methoden.

1. Harnstoffbestimmung: Der Harnstoff wurde manometrisch mittels „Arleo“-Urease nach der Methode von *Krebs und Henseleit*⁸⁾ bestimmt und als mm³ CO₂ (22,2 mm³ CO₂ = 60 γ Harnstoff) ausgedrückt. In den Tabellen sind die Leerwerte immer abgezogen. Wegen der hohen Arginaseaktivität der Leber wird das entstehende Arginin rasch in Harnstoff und Ornithin gespalten. Wir setzen daher im folgenden die gemessene Menge Harnstoff der gebildeten Menge Arginin gleich.

2. NH₃ wurde nach *Sobel*⁹⁾ und Mitarbeiter in Borsäure überdestilliert und mit HCl titriert¹⁰⁾.

3. Bernsteinsäurebestimmung: Wie früher angegeben (*Fahrländer und Mitarbeiter*¹¹⁾).

Resultate.

Versuche mit α -Ketoglutar säure.

In verschiedenen Geweben, u. a. in der Säugerleber, kann α -Ketoglutar säure bei Gegenwart von Ammoniak in Glutaminsäure übergeführt werden, wobei der Wasserstoff von Dihydrocozymase geliefert wird (*Euler und Mitarbeiter*¹²⁾, *Dewan*¹³⁾). Bei der Reaktion

¹⁾ V. R. Potter und A. Elvehjem, J. Biol. Chem. **114**, 195 (1936).

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

³⁾ A. Lehninger, J. Biol. Chem. **161**, 438 (1945).

⁴⁾ W. Wislicenus und M. Waldmüller, B. **44**, 1564 (1911).

⁵⁾ D. M. Needham, Biochem. J. **36**, 113 (1942).

⁶⁾ G. A. Le Page in W. W. Umbreit, R. H. Burris, J. F. Stauffer, Manometric techniques and related methods. Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.

⁷⁾ D. Keilin und E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. Ser. B **122**, 298 (1937).

⁸⁾ A. H. Krebs und K. Henseleit, Z. physiol. Ch. **210**, 33 (1932).

⁹⁾ A. E. Sobel, M. Mayer und S. P. Gottfried, J. Biol. Chem. **156**, 355 (1944).

¹⁰⁾ Die Bestimmungen wurden durch Fr. E. Bujard ausgeführt, der wir an dieser Stelle bestens danken.

¹¹⁾ H. Fahrländer, P. Favarger und F. Leuthardt, Helv. **31**, 942 (1948).

¹²⁾ H. v. Euler, E. Adler, G. Günther und N. B. Das, Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1938).

¹³⁾ J. G. Dewan, Biochem. J. **32**, 1378 (1938).

von *Borsook* und *Dubnoff* im Leberhomogenat kann die Glutaminsäure innerhalb gewisser Grenzen durch α -Ketoglutarsäure und NH_3 vollkommen ersetzt werden. Ob mit α -Ketoglutarsäure und Ammoniak gleichviel Harnstoff gebildet wird wie mit Glutaminsäure, hängt von der Konzentration des Homogenates und der Menge der Substrate ab. Wie Tabelle 1 zeigt, können bei kleiner Homogenat- und kleiner Substratkonzentration in beiden Fällen gleiche Harnstoffwerte gefunden werden. Bei höherer Substratkonzentration wird aus α -Ketoglutarat und NH_3 weniger Harnstoff gebildet als aus der äquimolaren Menge Glutaminsäure. Erhöhung der Homogenatkonzentration lässt die Werte auch bei höherer Substratkonzentration wieder gleich gross werden. Die Substratmenge, die für eine bestimmte Homogenatkonzentration mit α -Ketoglutarat und Ammoniak gleich viel Harnstoff ergibt wie Glutaminsäure, kann wegen starker Schwankungen von Tier zu Tier nicht angegeben werden. Versuch 5 der Tabelle I zeigt die stärkst auseinanderliegenden Werte bei äquimolaren Substratmengen, die wir beobachtet haben. Worauf die Unterschiede beruhen, wissen wir nicht. Möglicherweise ist die nach *Potter*¹⁾ bei

Tabelle I.

Argininsynthese aus Glutaminsäure oder α -Ketoglutarsäure + NH_3 .

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C 1,0 $\times 10^{-6}$ -m. 1 cm^3 Milieu nach *Cohen*²⁾ auf 3 cm^3 Gesamtvolumen.

Versuch No.	Homogenat cm^3 pro 3 cm^3 Ansatz	Citrullin $\mu\text{Mol}/\text{cm}^3$	Glutaminsäure oder α -Ketoglutarsäure + NH_3 $\mu\text{Mol}/\text{cm}^3$	mm ³ Harnstoff	
				Glutaminsäure	α -Ketoglutarsäure + NH_3
1	0,2	5,7	0,5	65	70
	0,2	5,7	1,5	109	97
	0,2	5,7	3,0	131	102
2	0,3	2,9	2,9	97	70
3	0,3	5,7	5,7	285	322
	0,3	5,7	5,7	312	330
4	0,3	5,7	3,0	144	122
	0,3	5,7	3,0	155	132
5	0,3	1,6	1,6	80	58
	0,3	3,3	3,3	133	68
	0,3	5,0	5,0	128	60
6	0,3	1,6	1,6	122	104
	0,3	5,0	5,0	162	121
	0,4	1,6	1,6	111	104
	0,4	5,0	5,0	211	219
7	0,3	3,3	3,3	129	129
	0,3	3,3	3,3	133	122
8	0,3	3,3	3,3	168	163
	0,3	3,3	3,3	175	175

¹⁾ *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).

Gegenwart von Ketonensäuren stark beschleunigte Hydrolyse des A.T.P. („phosphate leak“) dafür verantwortlich zu machen. Da die reduktive Bildung der Glutaminsäure von der Codehydrase abhängt¹⁾²⁾, könnte auch der Codehydrasegehalt der Homogenate dabei eine Rolle spielen. *Cohen* und *Hayano*³⁾ scheinen die Möglichkeit des Ersatzes der Glutaminsäure durch die zugeordnete Ketonensäure und NH_3 übersehen zu haben, weil sie offenbar mit ungeeigneten Konzentrationen gearbeitet haben.

Die einleitend erwähnten Beobachtungen von *Krebs* und Mitarbeitern⁴⁾ werden durch die in Fig. 1 dargestellten Versuche bestätigt. Bei Verwendung von α -Ketoglutarat und NH_3 verschwindet pro Harnstoffmolekel etwa eine NH_3 -Molekel. Dicarbonsäuren beeinflussen den Harnstoffumsatz in kleinen Konzentrationen nicht, in höheren Konzentrationen (vgl. *Fahrländer* und Mitarbeiter⁵⁾) hemmen sie. *Borsook* und *Dubnoff*⁶⁾ haben schon in ihrer ersten Publikation darauf hingewiesen, dass die Desaminierung der Glutaminsäure mit einer Decarboxylierung verbunden sein könnte, da nie die Bildung von

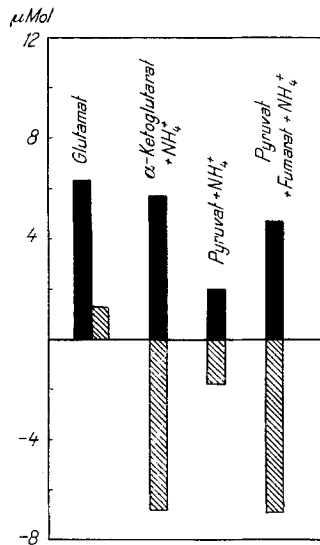


Fig. 1.

Vergleich von NH_3 -Verbrauch und Harnstoffbildung bei der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* im Leberhomogenat.

A.T.P. 0,001-m., Cytochrom C 10^{-6} -m. 0,3 cm³ Homogenat und 1 cm³ Milieu nach *Cohen*³⁾ in 3 cm³ Ansatz. Konzentration von Glutamat, α -Ketoglutarat, Pyruvat, Ammoniak 0,0033-m.; Fumarat 0,002-m.

Schwarze Säulen (nach oben): Harnstoffbildung in μ Mol. Schraffierte Säulen (nach unten): Ammoniakverbrauch in μ Mol. Aus Glutamat wird eine kleine Menge Ammoniak freigesetzt.

¹⁾ *H. v. Euler, E. Adler, G. Günther und N. B. Das, Z. physiol. Ch.* **254**, 61 (1938).

²⁾ *J. G. Dewan, Biochem. J.* **32**, 1378 (1938).

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

⁴⁾ *H. A. Krebs, L. V. Eggleston und R. Hems, Nature (Lond.)* **159**, 808 (1947).

⁵⁾ *H. Fahrländer, P. Favarger und F. Leuthardt, Helv.* **31**, 942 (1948).

⁶⁾ *H. Borsook und J. W. Dubnoff, J. Biol. Chem.* **141**, 717 (1941).

α -Ketoglutar säure nachgewiesen worden ist. Die in der vorangehenden Arbeit mitgeteilten Versuche über die Anhäufung von Bernsteinsäure bei Gegenwart von Malonat sind mit dieser Annahme durchaus vereinbar. Wir haben untersucht, ob bei einer genügenden NH_3 -Konzentration nicht schon katalytische Mengen α -Ketoglutarat die Argininsynthese bewirken könnten. Dazu wurde die Harnstoffbildung bei kleiner Glutaminsäurekonzentration verglichen mit der Harnstoffbildung bei der gleichen Konzentration α -Ketoglutar säure plus einem grossen Überschuss Ammoniak. Das zur Glutaminsäuresynthese verbrauchte α -Ketoglutarat müsste immer wieder neu gebildet werden, wenn eine einfache Desaminierung der Glutaminsäure stattfinden würde; m. a. W., die Ketoglutar säure müsste bei Gegenwart von Ammoniak katalytisch wirken. Wie Tabelle Ia zeigt, verliefen die diesbezüglichen Versuche negativ. Auch wenn die Konzentration des NH_3 und des Citrullins auf das Mehrfache der Glutaminsäure- bzw. der α -Ketoglutar säurekonzentration gesteigert wird, tritt gegenüber den Werten mit Glutaminsäure ohne NH_3 -Zusatz keine Erhöhung der Harnstoffbildung ein.

Anscheinend finden im Leberhomogenat noch Nebenreaktionen statt. Die der Tabelle Ia zugrunde liegenden Versuche zeigen, dass sich bei einem Überschuss von Citrullin in Anwesenheit von Glutaminsäure oder Ammonium- α -ketoglutarat sehr viel mehr Harnstoff bildet, als der zugesetzten Menge Glutaminsäure oder Ammoniumsalz entspricht. Würde im dargestellten Versuch bei der Argininsynthese das dritte Stickstoffatom der Guanidengruppe nur aus der Aminogruppe der Glutaminsäure gebildet, so könnte nur 1 μ Mol Harnstoff entstehen; bei der höchsten Citrullinkonzentration findet sich aber das Vierfache dieses Wertes. Wir nehmen an, dass das Citrullin teilweise abgebaut wird, und dass sein Stickstoff zur Synthese von Glutaminsäure verwendet wird, die mit dem verbleibenden Citrullin Arginin bildet. Die Frage bleibt offen, ob das Citrullin auf einem von der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* unabhängigen Weg Harnstoff liefern kann (vgl. *Bach*¹⁾).

Tabelle Ia.

Harnstoffbildung in Gegenwart kleiner Mengen α -Ketoglutarat und grossem NH_3 -Überschuss.

1 cm^3 Milieu nach *Cohen*²⁾ und 0,4 cm^3 Homogenat pro 3 cm^3 Ansatz. A.T.P. 0,001-m.; Cytochrom C $1,0 \times 10^{-6}$ -m. Mit Citrullin 0,0057-m. ohne Zusätze wurden in 3 cm^3 Ansatz 0,47 μ Mol Harnstoff gebildet.

Citrullin- konzentration	Harnstoffbildung			
	0,00033-m. Glutaminsäure		0,00033-m. α -Ketoglutar säure + 0,0066-m. NH_3	
	μ Mol total	in % des zugesetzten Citrullins	μ Mol total	in % des zugesetzten Citrullins
0,0029-m.	2,0	24%	2,2	25%
0,023-m.	3,8	5,5%	4,1	6,0%

Zugabe von NH_3 zu einem Ansatz, der Glutaminsäure und Citrullin enthält, kann die Harnstoffbildung merklich steigern (Tabelle II). Die Erscheinung ist inkonstant, sie wurde nicht systematisch untersucht. Es kann sich hier um eine Regeneration des Citrullins aus dem Ornithin handeln, das durch die Arginasewirkung gebildet wird, d. h. um

¹⁾ *S. J. Bach*, *Biochem. J.* **33**, 1833 (1939); *S. J. Bach*, *E. M. Cosk* und *S. William-son*, *Biochem. J.* **38**, 325 (1944).

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

eine Totalsynthese des Harnstoffs im Homogenat aus Ammoniak und Kohlensäure. Die Bildung von Citrullin bzw. Harnstoff aus Ornithin und Ammoniak ist neuerdings von zwei Seiten beschrieben worden¹⁾²⁾.

Tabelle II.

Steigerung der Argininsynthese aus Citrullin und Glutaminsäure durch Ammoniak.

A.T.P. 0,001-m. Glutaminsäure, Citrullin 0,0057-m. 1 cm³ Milieu nach *Lehninger*³⁾ und 0,4 cm³ Homogenat auf 3 cm³ Gesamtvolumen.

NH ₃ -Zugabe μ Mol/cm ³	Harnstoff in cm ³ /Ansatz	Zunahme in %
—	280	—
3,3	339	21
—	206	—
6,6	231	11
—	249	—*)
6,6	345	38*)
—	245	—*)
6,6	331	35*)
—	227	—
6,6	229	0

*) Hydrogencarbonatmilieu: der Ansatz (3 cm³) enthält 0,5 cm³ 1,3-proz. NaHCO₃; Gasatmosphäre 5% CO₂ in O₂.

Versuche mit Pyruvat.

Pyruvat und NH₃ mit Citrullin im Leberhomogenat zusammengebracht, bilden ebenfalls Harnstoff. Die Harnstoffproduktion aus Pyruvat und Ammoniumionen wird durch Fumar- und Bernsteinsäure stark gesteigert (Tabelle III). Ähnliches haben wir bei der Argininbildung aus Asparaginsäure beobachtet (*Fahrländer* und Mitarbeiter⁴⁾). Malonsäure vermindert die Wirkung der Bernsteinsäure, und auch der Fumarsäure, wenn deren Konzentration nicht 2—3mal höher als jene der Malonsäure gewählt wird. Auch bei der Argininbildung aus Asparaginsäure beobachtet man, dass sehr viel höhere Fumaratkonzentrationen zur Aufhebung der Malonathemmung nötig sind als mit Glutaminsäure. Man findet mit Pyruvat und NH₃ ohne Dicarbonsäurezusatz nie so hohe Harnstoffwerte wie bei Gegenwart von Glutaminsäure.

Bestimmt man die Menge des fixierten Ammoniaks bei Gegenwart von Pyruvat, so findet man, dass ein grösserer Teil des zugesetzten NH₃ verschwindet, als der Harnstoffproduktion entspricht (Fig. 2). Wahrscheinlich ist dies auf die von *Kritzmann*⁵⁾ sowie von *Wiss*⁶⁾ beobachtete Alaninbildung aus Pyruvat und NH₃ zurückzuführen. Trotz dieser Nebenreaktion sind die Harnstoffwerte etwa gleich gross wie die mit Asparaginsäure gefundenen.

¹⁾ P. P. Cohen und M. Hayano, J. Biol. Chem. **170**, 687 (1947).

²⁾ H. Borsook und J. W. Dubnoff, J. Biol. Chem. **169**, 461 (1947).

³⁾ A. Lehninger, J. Biol. Chem. **161**, 438 (1945).

⁴⁾ H. Fahrländer, P. Favarger und F. Leuthardt, Helv. **31**, 942 (1948).

⁵⁾ M. G. Kritzmann, J. Biol. Chem. **167**, 77 (1947).

⁶⁾ O. Wiss, Helv. physiol. pharmacol. acta **5**, C 22 (1947).

Tabelle III.

Argininsynthese aus Citrullin, Pyruvat und NH_3 ; Einfluss von Malonat und Succinat und Fumarat.

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C $1,0 \times 10^{-6}$ -m. Pyruvat, NH_4Cl , Citrullin 0,0033-m. 0,3 cm^3 Homogenat und 1 cm^3 Milieu nach *Lehninger*¹⁾ in 3 cm^3 Gesamtvolumen. Tiere 48 bis 72 Stunden auf Hunger gesetzt.

Versuch No.	Fumarat $\mu\text{Mol/cm}^3$	Succinat $\mu\text{Mol/cm}^3$	Malonat $\mu\text{Mol/cm}^3$	Harnstoff mm^3	Förderung (+) Hemmung (-) in %
1	—	—	—	28	—
	1,0	—	—	111	+ 300
	2,0	—	—	122	+ 335
	4,0	—	—	116	+ 315
2	—	—	—	28	—
	0,5	—	—	69	+ 146
	1,0	—	—	92	+ 230
	2,0	—	—	96	+ 240
3	—	—	—	25	—
	—	—	1,0	13	- 46
	2,0	—	—	102	+ 310
	2,0	—	1,0	56	- 124
4	—	—	—	27	—
	—	—	1,0	15	- 42
	4,0	—	—	85	+ 217
	4,0	—	1,0	91	+ 7
5	—	—	—	47	—
	1,0	—	—	101	+ 115
	1,0	—	1,0	66	+ 40
	3,0	—	—	111	+ 136
	3,0	—	1,0	107	+ 128
	—	1,0	—	115	+ 145
	—	1,0	1,0	49	+ 4
6	—	—	—	23	—
	0,5	—	—	66	+ 187
	1,0	—	—	90	+ 280
	—	0,5	—	83	+ 260
	—	1,0	—	96	+ 315
7	3,0	—	—	63	ohne Pyruvat- zusatz, mit NH_3 und Citrullin
	—	3,0	—	63	

¹⁾ A. *Lehninger*, J. Biol. Chem. **161**, 438 (1945).

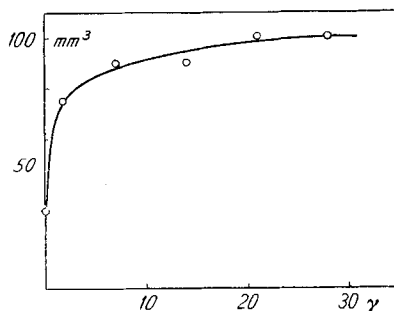


Fig. 2.

Einfluss der Cocarboxylase auf die Harnstoffbildung aus Pyruvat, Ammoniak und Citrullin beim B_1 -avitaminotischen Tier.

A.T.P. 0,001-m., 0,4 cm³ Homogenat und 1 cm³ Milieu nach *Cohen*¹⁾ pro 3 cm³ Ansatz. Pyruvat, Ammoniak 0,0067-m.; Citrullin 0,0057-m. Abszisse: γ Cocarboxylase pro cm³ Ansatz. Ordinate: Harnstoff in mm³. Der Wert für 1,8 γ Cocarboxylase (niedrigster Wert) ist einer anderen Versuchsserie entnommen wie die übrigen Punkte.

In Gegenwart von Citrullin bildet sich auch bei Zusatz von Bernstein- oder Fumarsäure und NH_3 ohne α -Ketoglutarat oder Pyruvat eine gewisse Menge Harnstoff (siehe Tabelle III, Versuch No. 7).

Wirkung der Cocarboxylase.

Um näheren Einblick in die Reaktion zu erhalten, haben wir die Argininbildung bei Gegenwart von Pyruvat und NH_3 beim B_1 -avitaminotischen Tier untersucht. Bei einer Homogenatkonzentration von 0,4 cm³ pro 3 cm³ Ansatz, weniger deutlich auch bei 0,3 cm³ pro 3 cm³ Ansatz, fördert Cocarboxylase (Aneurinpyrophosphat) die Reaktion;

Tabelle IV.

Einfluss der Cocarboxylase bei Gegenwart von Pyruvat und α -Ketoglutarat in 3 cm³ Gesamtvolumen.

A.T.P. 0,001-m., Citrullin 0,572-m. 0,4 cm³ Homogenat und 1 cm³ Milieu nach *Cohen*¹⁾ auf 3 cm³ Gesamtvolumen. Cocarboxylase 83 γ /cm³. Lebern von B_1 -avitaminotischen Tieren.

NH_4Cl μ Mol/cm ³	Pyruvat μ Mol/cm ³	α -Keto- glutarat μ Mol/cm ³	Harnstoff mm ³	
			mit Cocarboxylase	ohne Cocarboxylase
6,6	6,6	—	103	50
6,6	—	6,6	202,5	198,5
13,2	6,6	—	99	91
13,2	—	6,6	218	209
6,6	6,6	—	142	32

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

Versuch 2 in Tabelle IV ist negativ; es handelt sich sehr wahrscheinlich um eine Leber, die noch genügend Cocarboxylase enthielt, trotzdem das Tier starke Symptome des Vitaminmangels aufwies. Aus Tabelle V geht hervor, dass auch die fördernde Wirkung der Fumarsäure durch Cocarboxylase verstärkt wird. Fig. 2 zeigt, dass schon kleine Cocarboxylasekonzentrationen unter unseren Versuchsbedingungen wirksam sind. Im gleichen Konzentrationsbereich haben wir die Wirkung des Aneurins untersucht, fanden es aber unwirksam.

Tabelle V.

Einfluss der Cocarboxylase bei Gegenwart von Pyruvat und Fumarat. A.T.P. 0,001-m. Citrullin, Pyruvat, NH_4Cl 0,0033-m. 1 cm^3 Milieu nach *Cohen*¹⁾ und 0,3 cm^3 Homogenat auf 3 cm^3 Gesamtvolumen. Cocarboxylase 20 γ/cm^3 . Lebern von B_1 -avitaminotischen Tieren.

Fumarat $\mu\text{Mol}/\text{cm}^3$	mm ³ Harnstoff	
	mit Cocarboxylase	ohne Cocarboxylase
—	26	16
1,0	73	36
—	25	15
1,0	69	43
—	47	14
1,0	77	44
—	5	0,5
1,0	28	22
4,0	24	14

Krebs und *Eggleston*²⁾ nehmen an, dass die Cocarboxylase die Carboxylierung des Pyruvats zu Oxalessigsäure katalysiert. *Barron* und Mitarbeiter³⁾ haben gefunden, dass auch die Entstehung von α -Ketoglutarat aus Pyruvat im Versuch mit Gewebsschnitten vom Aneurin abhängt. Im ersten Falle könnte durch reduktive Aminierung Asparaginsäure, im zweiten Glutaminsäure entstehen, die beide bei der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* wirksam sind. Die Frage, ob aus Pyruvat und NH_3 in unserem Fall die eine oder andere gebildet wird, bleibt offen.

In der vorangehenden Arbeit⁴⁾ wurde gezeigt, dass bei Gegenwart von Glutaminsäure der Zusatz von Malonat zur Anhäufung einer Bernsteinsäuremenge führt, die der gebildeten Menge Harnstoff mindestens äquivalent ist. Mit Asparaginsäure erhält man unter den gleichen Bedingungen viel weniger Bernsteinsäure. Wir haben daraus auf eine direkte Reaktion der Asparaginsäure mit dem Citrullin geschlossen. Wenn im vorliegenden Fall Pyruvat und Ammoniak vorwiegend Glutaminsäure bilden, ist bei Gegenwart von Malonat ebenfalls eine Bernsteinsäureanhäufung zu erwarten; wird vorwiegend Asparaginsäure gebildet, so sollte viel weniger Succinat nachweisbar sein, als der gleichzeitig gebildeten Menge Harnstoff entspricht.

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

²⁾ H. A. Krebs und L. V. Eggleston, Biochem. J. **34**, 1383 (1940).

³⁾ E. S. G. Barron, C. M. Lyman, M. A. Lipton und J. A. Goldinger, J. Biol. Chem. **141**, 957 (1941).

⁴⁾ H. Fahrländer, P. Favarger und F. Leuthardt, Helv. **31**, 942 (1948).

Wie aus der Tabelle VI hervorgeht, sind die Resultate bei Verwendung von Pyruvat und NH_3 nicht eindeutig.

Tabelle VI.

Succinatanhäufung bei Gegenwart von Malonat und Fumarat.

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C $1,0 \times 10^{-6}$ -m. Glutaminsäure, Pyruvat, NH_3 , Citrullin 0,0033-m. 0,3 cm^3 Homogenat und 1 cm^3 Milieu nach *Cohen*¹⁾ auf 3 cm^3 Gesamtvolumen. Die Harnstoff- und Succinatmengen sind in μMol pro 3 cm^3 Gesamtvolumen angegeben.

Substrate	Malonsäure			Fumarsäure			Malonsäure + Fumarsäure		
	$\mu\text{Mol}/\text{cm}^3$	Hst. μMol	Succ. μMol	$\mu\text{Mol}/\text{cm}^3$	Hst. μMol	Succ. μMol	$\mu\text{Mol}/\text{cm}^3$	Hst. μMol	Succ. μMol
Glutaminsäure, Pyruvat + NH_3	— 1,0	— 1,1	— 1,2	— 3,0	— 6,0	— 1,0	1,0 + 3,0 1,0 + 3,0	7,3 5,7	6,4 2,6
Glutaminsäure, Pyruvat + NH_3	— —	— —	— —	— —	— —	— —	1,0 + 3,0 —	7,2 4,3	6,8 3,5
Glutaminsäure, Pyruvat + NH_3	1,0 —	1,7 —	3,5 —	— 3,0	— 4,8	— 0,6	1,0 + 3,0 1,0 + 3,0	5,4 3,8	5,8 1,0
Glutaminsäure, Pyruvat + NH_3	— —	— —	— —	— —	— —	— —	1,0 + 3,0 1,0 + 3,0	6,3 4,5	5,2 3,8
Glutaminsäure, Pyruvat + NH_3	— —	— —	— —	— 3,0	— 5,1	— 1,2	1,0 + 3,0 1,0 + 3,0	6,5 5,1	8,0 3,4
Glutaminsäure, Pyruvat + NH_3	— —	— —	— —	— —	— —	— —	2,5 + 3,1 2,5 + 3,1	6,3 3,5	7,6 1,8

Zum Vergleich wurde immer ein Ansatz mit Glutaminsäure, Malonat und Fumarat mitgeführt. Die Malonatkonzentration wurde klein gewählt, um die Konzentration der Fumarsäure niedrig halten zu können. Es kann sonst zur früher erwähnten Hemmung der Reaktion durch die Dicarbonsäure oder andern sekundären Reaktionen kommen. Die Harnstoffbildung bei Gegenwart von Malonat und Glutaminsäure wurde in dieser Versuchsserie nicht bestimmt. Wenn aber bei Gegenwart von Glutaminsäure der Bernsteinsäurewert gleich hoch oder höher liegt als der entsprechende Harnstoffwert, darf man nach früheren Versuchen²⁾ eine starke Malonsäurehemmung annehmen. Wie Tabelle VI zeigt, findet man bei Gegenwart von Pyruvat und NH_3 Bernsteinsäurewerte, die deutlich unter dem entsprechenden Harnstoffwert liegen. Einzig Versuch 4 der Tabelle VI bildet eine Ausnahme.

Es kann daraus geschlossen werden, dass Pyruvat wahrscheinlich nur zum Teil in Glutaminsäure übergeht. Der Rest muss das Ammoniak auf einem anderen Weg fixieren und auf das Citrullin übertragen, ohne dass dabei Bernsteinsäure gebildet wird, wahrscheinlich durch Carboxylierung des Pyruvats und Bildung von Asparaginsäure. Diese Frage bedarf einer weiteren, eingehenden Untersuchung.

Hemmung durch Ketonsäuren.

Pyruvat und α -Ketoglutarat hemmen im Leberhomogenat die Argininsynthese aus Glutaminsäure und Citrullin. Die Pyruvathemmung wurde, wie einleitend erwähnt,

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

²⁾ H. Fahrlander, P. Favarger und F. Leuthardt, Helv. **31**, 942 (1948).

schon von *Borsook* und *Dubnoff*¹⁾ in Nierenschnitten beobachtet. Tabelle VII fasst unsere Resultate zusammen. Auch am gleichen Tier ist die Hemmung durch äquimolare Mengen der beiden Ketosäuren nicht gleich stark, die Werte liegen aber nie weit auseinander. Zur Erklärung des Hemmungsmechanismus können wir bis jetzt nur einen negativen Ver-

Tabelle VII.

Aufhebung der Pyruvat- und α -Ketoglutarathemmung durch NH_3 .

A.T.P. 0,001-m. Cytochrom C $1,0 \times 10^{-6}$ -m. 1 cm^3 Milieu nach *Cohen*²⁾ auf 3 cm^3 Gesamtvolumen.

Homogenat-konz. cm^3 pro 3 cm^3 Ansatz	Glutaminsäure + Citrullin $\mu \text{ Mol/cm}^3$	Pyruvat $\mu \text{ Mol/cm}^3$	α -Keto- glutarat $\mu \text{ Mol/cm}^3$	NH_3 $\mu \text{ Mol/cm}^3$	Harnstoff mm^3	Hemmung(-) oder Zunahme (+) in %
0,4	5,72	—	—	—	134	—
		1,0	—	—	100	-25
		2,0	—	—	76	-43
0,4	5,72	—	—	—	206	—
		3,3	—	—	121	-41
		—	1,6	—	158	-22
		—	1,6	6,6	219	0
		—	6,4	—	89	-57
		—	6,4	6,6	200	-2
0,4	5,72	—	—	—	243	—
		3,3	—	—	188	-35
		3,3	—	6,6	265	+9
		—	3,3	—	151	-38
		—	3,3	6,6	277	+14
0,4	5,72	—	—	—	339	—
		6,6	—	—	135	-60
		6,6	—	3,3	231	-22
		6,6	—	6,6	338	0
		6,6	—	13,2	322	-5
0,3	3,33	—	—	—	151	—
		3,3	—	—	53	-65
		3,3	—	1,1	80	-47
		3,3	—	2,2	111	-26
		3,3	—	3,3	140	-7
		3,3	—	4,4	144	-5
		—	3,3	—	70	-53,5
		—	3,3	1,1	95	-37
		—	3,3	2,2	128	-15
		—	3,3	3,3	140	-7
		—	3,3	4,4	144	-5

¹⁾ H. *Borsook* und J. W. *Dubnoff*, J. Biol. Chem. **141**, 717 (1941).

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

sich anführen: Variation der A.T.P.-Konzentration beeinflusst die Grösse der Hemmung nicht merkbar. Die Hemmung wird durch eine den Ketosäuren äquimolare Menge NH_3 aufgehoben. Ist die Konzentration des NH_3 kleiner, so ist die Aufhebung der Hemmung unvollständig.

Die Pyruvathemmung und ihre Aufhebung durch NH_3 wurde ebenfalls am B_1 -avitaminotischen Tier untersucht und mit der Hemmung durch α -Ketoglutarat verglichen (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Aufhebung der Pyruvat- und α -Ketoglutarathemmung durch NH_3 beim B_1 -avitaminotischen Tier; Einfluss der Cocarboxylase.

A.T.P. 0,001-m. Glutaminsäure + Citrullin 0,00572-m. 0,4 cm^3 Homogenat und 1 cm^3 Milieu nach *Cohen*¹⁾ auf 3 cm^3 Gesamtvolumen. Cocarboxylase 83 γ/cm^3 . Pyruvat, α -Ketoglutarat, NH_4Cl in $\mu\text{ Mol}/\text{cm}^3$.

Pyruvat	α -Keto-glutarat	NH_4Cl	mm ³ Harnstoff	
			mit Cocarboxylase	ohne Cocarboxylase
—	—	—	207	190
6,6	—	—	74	75
6,6	—	6,6	168	121
—	6,6	—	107	120
—	6,6	6,6	171	183
—	—	—	171	171
3,3	—	—	122	106
3,3	—	6,6	197	158
—	6,6	—	74	100
—	6,6	6,6	165	169
—	—	—	187	208
—	—	6,6	277	258
6,6	—	—	76	89
6,6	—	6,6	272	161
—	—	—	243	231
3,3	—	—	158	131
3,3	—	6,6	265	194
—	3,3	—	151	162
—	3,3	6,6	277	253

Ohne Cocarboxylasezusatz wird die Pyruvathemmung durch NH_3 nur unvollständig aufgehoben; Zusatz des Cofermentes führt zur vollständigen Aufhebung der Pyruvathemmung. α -Ketoglutarat und NH_3 verhalten sich beim avitaminotischen Tier gleich wie beim normalen. Cocarboxylase hat keinen Einfluss. Bei Versuch 2 und 3 der Tabelle VIII wird die Harnstoffbildung aus Glutaminsäure und Citrullin durch NH_3 deutlich gesteigert, bei Versuch 2 auch in Anwesenheit von Pyruvat (vgl. auch Tabelle II). Wie oben schon erwähnt wurde, beruht diese Steigerung wahrscheinlich auf einer Regeneration des Citrullins aus Ammoniak und Ornithin.

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

Diskussion.

Der eine von uns hat schon früher der Meinung Ausdruck verliehen, dass bei der Harnstoffbildung aus Aminosäuren kein freies Ammoniak auftritt, sondern dass die Aminogruppe direkt, d. h. durch Transaminierung, in das Harnstoffmolekül eingeführt wird¹⁾. Diese Annahme basierte auf der gleichzeitigen Messung des Harnstoffs und des Ammoniaks bei Gegenwart verschiedener Aminosäuren (Glutamin, Alanin, Leucin). Wenn man die Abhängigkeit der Harnstoffsynthese von der Ammoniakkonzentration berücksichtigt, so findet man, dass die Konzentration des durch Desaminierung gebildeten Ammoniaks (im Milieu und im Innern des Gewebes) zu klein ist, um die tatsächlich beobachtete Geschwindigkeit der Synthese zu erklären. Der Nachweis, dass die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* auch in der Leber vonstatten geht, und dass unter denselben Bedingungen leicht auch Glutaminsäure aus Ammoniak und α -Ketoglutarinsäure gebildet wird, lässt vermuten, dass diese Reaktionen Zwischenstufen des Ornithinzyklus sind, und damit ist auch gezeigt, dass wenigstens ein Stickstoffatom tatsächlich durch eine Transaminierung in den Harnstoff eingeführt wird. Da die Glutaminsäure oder die Asparaginsäure ihrerseits durch Transaminierung gebildet werden können (Reaktion von *Braunstein* und *Kritzmann*²⁾), besteht auch die Möglichkeit, dass bestimmte, andere Aminosäuren auf diese Weise ihre Aminogruppe ohne Freisetzung von Ammoniak in den Harnstoff überführen können. Es ist seither *Cohen* und *Hayano*³⁾ gelungen, im Leberhomogenat auch die Citrullinbildung (genauer die Bildung eines Stoffes, der mit Diacetylmonoxim wie Citrullin reagiert) aus Ornithin nachzuweisen. Neben Hydrogencarbonat, Ammoniumsalz und Adenylsäure ist auch hier die Gegenwart von Glutaminsäure nötig. Wenn Magnesiumionen zugegen sind, läuft die Reaktion bis zum Harnstoff weiter, ohne Magnesiumionen bleibt sie beim Citrullin stehen.

Gleichzeitig haben auch *Borsook* und *Dubnoff*⁴⁾ unter ähnlichen Bedingungen im Leberhomogenat die Bildung des Harnstoffs aus Ornithin, Ammoniumsalz und Hydrogencarbonat nachgewiesen. Das von ihnen verwendete System enthielt neben Glutaminsäure und A.T.P. noch Oxalylacetat oder Fumarat. Es ist noch nicht klar, welches die Rolle der Glutaminsäure bei der ersten Stufe der Harnstoffsynthese, der Citrullinbildung, ist.

¹⁾ *F. Leuthardt*, Z. physiol. Ch. **252**, 238 (1938); **265**, 1 (1940); Bioch. Z. **299**, 291 (1938); *F. Leuthardt* und *B. Glasson*, Helv. physiol. pharmacol. acta **2**, 549 (1944).

²⁾ *A. E. Braunstein* und *M. G. Kritzmann*, Enzymologia **2**, 129 (1937).

³⁾ *P. P. Cohen* und *M. Hayano*, J. Biol. Chem. **170**, 687 (1947).

⁴⁾ *H. Borsook* und *J. W. Dubnoff*, J. Biol. Chem. **169**, 461 (1947).

Es sind auch in jüngster Zeit noch Zweifel in bezug auf die Bedeutung des Citrullins als Zwischenstufe der Harnstoffsynthese geäußert worden. In der eben erwähnten Arbeit haben *Borsook* und *Dubnoff* beobachtet, dass im Homogenat Harnstoffbildung aus Citrullin durch 0,0026-n. Na-Arsenat nicht beeinflusst wird, während dieselbe Arsenkonzentration die Argininbildung aus Citrullin in Nierenschnitten vollständig unterdrückt. Sie werfen deshalb die Frage auf, ob in der Leber das Citrullin den Harnstoff tatsächlich durch Überführung in Arginin bildet oder ob nicht ein anderer Weg möglich ist.

Eine weitere Beobachtung, die gegen eine Beteiligung des Citrullins an der Harnstoffsynthese zu sprechen scheint, ist kürzlich von *Nadine* und *Buchanan*¹⁾ mitgeteilt worden. Der in Gegenwart von markiertem (C^{13}) Hydrogencarbonat von Leberschnitten gebildete Harnstoff enthielt mit und ohne Citrullinzusatz fast den gleichen Gehalt des C-Isotops, und das Citrullin, das am Versuchsende wieder isoliert wurde, enthielt kein Isotop, hatte also während der Reaktion seinen Carbamidkohlenstoff nicht ausgetauscht. Dieses Resultat kann nicht durch mangelnde Diffusion erklärt werden, denn das zugesetzte Citrullin steigerte die Harnstoffsynthese in den Schnitten und ausserdem ist bekannt, dass im Schnitt gebildetes Citrullin leicht in das Milieu diffundiert (*Gornall* und *Hunter*²⁾). Es bleibt abzuwarten, in welcher Weise diese Widersprüche ihre Aufklärung finden werden.

In Schnitten aus der Leber der B_1 -avitaminotischen Ratte wird die Harnstoffsynthese durch Aneurin gesteigert (*Leuthardt* und *Glasson*³⁾). Cocarboxylase ist wegen mangelnder Diffusionsfähigkeit unwirksam. Wir haben im Versuchsteil gezeigt, dass Cocarboxylase die Argininbildung bei Gegenwart von Pyruvat und Ammoniumionen fördert, weil das Coferment offenbar zur Bildung des Oxalylacetats oder des α -Ketoglutarats aus dem Pyruvat nötig ist. In den genannten Versuchen mit Gewebsschnitten erfolgt die Harnstoffbildung ebenfalls bei Gegenwart von Pyruvat. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch dort das Aneurin (nach Phosphorylierung) die Bildung der Ketodicarbonsäuren beschleunigt. Bei Versuchen mit Gewebsschnitten wird die Harnstoffsynthese durch Pyruvat stark gefördert, sehr viel weniger durch α -Ketoglutarat. (Die Versuche mit Oxalylacetat sind wegen der Unbeständigkeit der Substanz nicht eindeutig.) Die Erfahrungen mit Gewebshomogenat zeigen, dass dieser Unterschied offenbar auf der schlechten Diffusion der Dicarbonsäuren

¹⁾ *J. H. Nadine* und *J. M. Buchanan*, Am. J. med. Sciences **213**, 248 (1947).

²⁾ *A. G. Gornall* und *A. Hunter*, J. Biol. Chem. **147**, 593 (1943).

³⁾ *F. Leuthardt* und *B. Glasson*, Helv. physiol. pharmacol. acta **1**, 221 (1943).

im intakten Gewebe beruht. Die geringe Diffusionsfähigkeit der Glutaminsäure im intakten Lebergewebe ist die Ursache, dass sich die Argininbildung aus Citrullin und Glutaminsäure bei Verwendung von Schnitten nicht nachweisen lässt (*Krebs*¹⁾) und dass erst die Verwendung der Homogenattechnik ihre Entdeckung in der Leber ermöglicht. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Glutaminsynthese (*Leuthardt* und *Bujard*²⁾). Wahrscheinlich beruht die Überlegenheit des Säureamids Glutamin über die Glutaminsäure im Gewebsschnitt, die sich bei verschiedenen Reaktionen gezeigt hat (Harnstoffsynthese³⁾, Hippursäuresynthese⁴⁾), auf der besseren Diffusionsfähigkeit des Glutamins, das, im Gegensatz zur Glutaminsäure, nur eine ionisierte Carboxylgruppe trägt.

Die Vermutung, dass Cocarboxylase in tierischen Geweben für die Carboxylierung des Pyruvats nötig ist, ist erstmals von *Krebs* und *Eggleston*⁵⁾ geäußert worden. *Barron* und Mitarbeiter⁶⁾ haben den Einfluss des Aneurins bei verschiedenen Reaktionen des Pyruvats nachgewiesen, bei denen seine Carboxylierung zu Oxalylacetat als Zwischenstufe in Frage kommt, von denen aber die meisten zu komplex sind, als dass die Wirkung des Cofermentes lokalisiert werden könnte. Über den Wirkungsmechanismus der Cocarboxylase bei derartigen Kondensationsreaktionen ist gegenwärtig noch nichts bekannt.

Für die starke Hemmung der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* durch α -Ketonsäuren und die Enthemmung durch Ammoniumsalze können wir keine sichere Erklärung geben. Da bei der Reaktion zwei Wasserstoffatome durch ein (noch unbekanntes) System von Wasserstoffüberträgern aufgenommen werden, ist es möglich, dass während der Oxydation der zugesetzten Ketonsäure die Menge der verfügbaren oxydierten Form eines oder mehrerer Wasserstoffüberträger herabgesetzt wird. Durch Zusatz von Ammoniumsalzen entsteht umgekehrt aus der Ketonsäure ein Wasserstoffakzeptor (reduktive Synthese der entsprechenden Aminosäure; vgl. *Euler* und Mitarbeiter⁷⁾) und damit eine erhöhte Konzentration oxydierter Wasserstoffüberträger. Wir können diese Anschauung z. Zt. aber nicht beweisen.

¹⁾ H. A. Krebs, Biochem. J. **36**, 758 (1942).

²⁾ F. Leuthardt und E. Bujard, Helv. physiol. pharmacol. acta **5**, C 39 (1947); Helv. med. acta **14**, 274 (1947).

³⁾ F. Leuthardt, Z. physiol. Ch. **252**, 238 (1938); **265**, 1 (1940); Bioch. Z. **299**, 291 (1938).

⁴⁾ F. Leuthardt, Z. physiol. Ch. **270**, 113 (1941).

⁵⁾ H. A. Krebs und L. V. Eggleston, Biochem. J. **34**, 1383 (1940).

⁶⁾ E. S. G. Barron, C. M. Lyman, M. A. Lipton und J. A. Goldinger, J. Biol. Chem. **141**, 957 (1941).

⁷⁾ H. v. Euler, E. Adler, G. Günther und N. B. Das, Z. physiol. Ch. **254**, 61 (1938).

Zusammenfassung.

1. Bei der Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* im Leberhomogenat (Ratte) kann die Glutaminsäure durch α -Ketoglutarsäure plus Ammoniak ersetzt werden, dabei verschwindet etwas mehr Ammoniak, als der Menge des gebildeten Harnstoffs entspricht.

2. Die Glutaminsäure kann auch durch Brenztraubensäure plus Ammoniak ersetzt werden; man erreicht mit diesem System allerdings nie so hohe Harnstoff-(= Arginin)-werte wie mit der äquivalenten Menge Glutaminsäure.

3. Im Homogenat aus der Leber von B₁-avitaminotischen Ratten wird die Argininbildung bei Gegenwart von Pyruvat, nicht aber von α -Ketoglutarat durch Aneurinpyrophosphat, gesteigert. Aneurin ist nicht wirksam. Wir nehmen an, dass die Cocarboxylase für die Umwandlung der Brenztraubensäure in Oxalessigsäure oder α -Ketoglutarsäure nötig ist, die in Gegenwart von Ammoniak in die entsprechenden Aminosäuren übergehen.

4. Setzt man dem System, das Citrullin und Glutaminsäure enthält, α -Ketoglutarat oder Pyruvat zu, so wird die Argininbildung stark gehemmt. Ammoniak hebt diese Hemmung auf. Setzt man Ammoniak allein zu, so erhält man eine Steigerung der Argininbildung. Wir vermuten, dass unter diesen Bedingungen Citrullin aus dem Ornithin regeneriert wird.

5. Die Bedeutung der mitgeteilten Befunde, insbesondere für die Harnstoffsynthese in der Leber, wird diskutiert.

Institut de Chimie physiologique de l'Université de Genève.
