

gewaschen und schliesslich mit Äther-Eisessig 10:1 eluiert. Durch diese Änderungen lässt sich die chromatographische Reinigung bedeutend kürzen und vereinfachen.

Die in der früheren Vorschrift angegebene Fällung des Farbstoffes als Natriumsalz fiel weg. Statt dessen wurde nun das nach der Adsorption in Methanol übergeführte Konzentrat in einer durch Evakuieren entlüfteten Ampulle eingeschmolzen und 2 bis 3 Wochen bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dabei krystallisierte der Farbstoff zusammen mit grösseren Mengen Fettsäuren aus. Letztere wurden durch Waschen mit Petroläther entfernt. Bei raschem Arbeiten blieb so der Farbstoff ungelöst und lag nach dem Auskochen mit Methanol und Petroläther schon ziemlich rein vor. Die Ausbeuten liessen sich durch die beschriebenen Änderungen auf ca. 3—5 mg pro kg Hefebrei steigern.

Trotz mehrmaligem Umkrystallisieren aus Benzol-Methanol konnte das freie Torularhodin nicht aschefrei erhalten werden. Doch zeigten die Analysen von 3 Präparaten mit verschiedenem Aschegehalt ziemlich gute Übereinstimmung:

$C_{37}H_{48}O_2$	Ber.	C 84,66	H 9,24%
	Gef. ¹⁾	„ 84,66; 84,55; 84,88	„ 9,37; 9,23; 9,74%

Mikrohydrierung: 2,30 mg verbrauchten bei 18,6° und 732 mm 1,265 cm³ Wasserstoff. Für 12 Doppelbindungen berechnen sich 1,310 cm³.

Torularhodin-methylester.

28 mg roher Farbstoff wurden in 20 cm³ Benzol gelöst und mit 1,5 Mol Diazomethan in Äther versetzt. Nach 2 Stunden wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand aus Benzol-Methanol umgelöst. Dunkelrote Nadelchen, Smp. 172—173° uncorr.

$C_{38}H_{50}O_2$	Ber.	C 84,71	H 9,36	OCH ₃ 5,75%
	Gef.	„ 84,74	„ 9,98	„ 5,83%

Die Verbindung war aschefrei.

Absorptionsspektren in:	Schwefelkohlenstoff	581	541	502 m μ
	Benzol	554	517	484 m μ
	Benzin	533	498	468 m μ
	Pyridin	560	519	485 m μ
	Alkohol	533	496	464 m μ

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

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

6. Die Funktion der Aminosäuren und Eiweisskörper als Effektoren des oxydativen Abbaues der Aminosäuren

von S. Edlbacher und O. Wiss.

(18. V. 45.)

In einer Reihe von Mitteilungen haben wir über den enzymatischen Abbau der Aminosäuren berichtet²⁾ und gezeigt, dass bei Wahl geeigneter Versuchsbedingungen die optischen Antipoden der Aminosäuren diesen Abbau hemmen können. Diese antipodische Hemmung zeigt deutlich, dass zwischen dem Stoffwechsel der *l*- und *d*-Formen

¹⁾ Nach Abzug des Aschegehaltes.

²⁾ Helv. **27**, 1824, 1831 (1944).

Beziehungen bestehen, denen möglicherweise eine grosse physiologische Rolle zufällt. Schon in der letzten Mitteilung¹⁾ haben wir darauf hingewiesen, dass alle diese Ergebnisse, die wir bisher nur bei Verwendung von Organschnitten, Organbrei und nativen Extrakten erzielten, unter Anwendung von Reinenzymen geprüft werden müssen.

Wir haben nun in der vorliegenden Arbeit die von *O. Warburg* und *Christian*²⁾ beschriebene *d*-Aminosäure-oxydase nach dem von *Negelein* und *Brömel*³⁾ angegebenen Verfahren weitgehend gereinigt, indem wir diese Reinigung bis zur Spaltung des Symplexes in Protein und Coferment durchführten. In den meisten Fällen wurde als Coferment der über die Phenolextraktion gereinigte Hefekochsaft verwendet. In einzelnen Fällen jedoch gelangte das reine, krystallisierte Bariumsalz des Dinucleotids zur Anwendung. Es ergab sich dabei, dass das rohe Coferment aus Hefephenolextrakt und das reine Dinucleotid in gleicher Weise wirken. Lässt man nun eine konzentrierte Lösung der gereinigten, reaktivierten *d*-Aminosäure-oxydase mit *d*-Alanin reagieren, so wird die oxydative Desaminierung des *d*-Alanins durch verschiedene *l*-Aminosäuren antipodisch gehemmt. Die antipodische Hemmbarkeit ist somit nicht an die Gegenwart von Begleitstoffen geknüpft, sondern eine Eigentümlichkeit der reinen *d*-Aminosäure-oxydase. Lässt man jedoch die gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase in geringer Konzentration auf *d*-Aminosäuren einwirken, so verwandelt sich der Hemmungseffekt durch zugesetzte andere Aminosäuren in eine Aktivierung. Es gelingt so, eine durch Verdünnung fast vollständig inaktive Lösung der *d*-Aminosäure-oxydase durch Zugabe anderer Aminosäuren zu ca. fünfzigfacher Aktivität zu steigern. Es zeigte sich weiter, dass der oxydative Abbau der *d*-Aminosäuren durch das verdünnte Reiferment nicht nur durch *l*-, sondern auch durch *d*-Aminosäuren aktiviert werden kann.

Da dieser Aktivierungseffekt der *d*-Aminosäure-oxydase nicht nur beim oxydativen Abbau des *d*-Alanins, sondern auch bei einer grossen Zahl anderer *d*-Aminosäuren eintritt, und da andererseits die Mehrzahl der *d*- und *l*-Aminosäuren als Aktivatoren wirken können, lässt sich das ganze Problem in den einfachen Satz zusammenfassen: Die *l*- und *d*-Aminosäuren sind positive oder negative Effektoren des oxydativen Abbaues der *d*-Aminosäuren. Es hängt nur von der Enzymkonzentration ab, ob eine Hemmung oder Aktivierung stattfindet. Über die physiologischen Konsequenzen dieser Tatsache wird am Schluss dieser Abhandlung noch gesprochen werden. Die einzelnen *l*- und *d*-Aminosäuren wirken verschieden stark als Akti-

¹⁾ Helv. 27, 1824, 1831 (1944).

²⁾ Bioch. Z. 298, 150 (1938).

³⁾ Bioch. Z. 300, 225 (1939).

vatoren. Von allen untersuchten Aminosäuren erwiesen sich *l*- und *d*-Histidin bei weitem am wirksamsten.

Diese Untersuchungen wurden auch auf Amine ausgedehnt. Diese zeigen im allgemeinen keinen Aktivierungseffekt, nur durch Histamin liess sich die *d*-Aminosäure-oxydase zu beträchtlicher Aktivität steigern.

Einfache Peptide, sowie Peptone, Protamine und komplizierter zusammengesetzte Proteine erweisen sich auch als Effektoren. Weiterhin liess sich nachweisen, dass der Histidingehalt dieser Stoffe die Aktivierungsgrösse entscheidend beeinflusst.

Intraprotein gebundenes Histidin zeigt demnach dieselbe spezifische Wirkung wie die freie Aminosäure.

Methoden.

Als Ausgangsmaterial für gereinigtes Fermentprotein dienten Schweinenieren, da Hammelnieren nicht erhältlich waren. Die Präparation erfolgte nach der Vorschrift von *Negelein* und *Brömel*¹⁾. Ursprünglich wurde die Präparation, ausgehend von Schweinenieren-Acetonrockenpulver, die bis zur Abtrennung des Cofermentes getrieben wurde, täglich frisch vorgenommen. Später bereiteten wir uns in einem grösseren Ansatz ca. 3 g eines Dauerpräparates dieser Reinigungsstufe durch Trocknung bei 0° über Phosphor-pentoxyd im Vakuum. Im Verlauf von 3 Wochen war keine erhebliche Abnahme der Enzymaktivität festzustellen. Das Trockenpulver liess sich — während einer halben Stunde bei 38° mit Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ extrahiert — nur teilweise wieder auflösen. Von dem Rückstand wurde abzentrifugiert, so dass eine wasserklare Lösung resultierte. Den nativen Ratten-Nierenextrakt bereiteten wir wie früher durch Verreiben der frisch entnommenen Nieren mittels Seesand. Als Coferment diente durch Phenolextraktion gereinigter Hefekochofsaft²⁾ oder das reine Bariumsalz des Dinucleotids.

Zur Messung des Sauerstoff-Verbrauches und der Ammoniak-Bildung verwendeten wir die Methoden von *Warburg* und *Conway*, wie wir sie in früheren Mitteilungen beschrieben haben. Das Substrat, d. h. die *d*-Aminosäure wurde bei dem *Warburg*-Versuch nach einer Temperatur-Ausgleichsperiode von $\frac{1}{4}$ Stunde eingekippt, während die Aktivierungssubstanz oder der Hemmkörper zu Beginn des Versuchs in den Hauptraum gegeben wurden. Die Gesamtflüssigkeit betrug in allen Fällen 3 cm³. Die Brenztraubensäure wurde nach der Salicylaldehyd-Methode nach *Straub*³⁾ bestimmt.

Hemmung und Aktivierung der *d*-Alaninoxydase durch *l*-Leucin.

Die natürlichen Aminosäuren hemmen den *d*-Aminosäureabbau bei variierter Substratkonzentration und konstanter Reaktionsgeschwindigkeit immer um den gleichen Betrag, d. h. die Aktivitätskurve erleidet eine Parallelverschiebung, wie diese in der 5. Mitteilung⁴⁾ beschrieben wurde. Daraus folgt, dass die prozentuale Hemmung des *d*-Aminosäure-Abbaues vor allem bei Verwendung kleiner Substratkonzentrationen in Erscheinung tritt. Unter geeigneten Bedingungen lässt sich so zeigen, dass der *d*-Alanin-Abbau bei Verwendung von gereinigtem Ferment auch durch sehr kleine *l*-Leucin-Konzentrationen (m/200) hemmbar ist.

¹⁾ Bioch. Z. **300**, 225 (1939).

²⁾ Bioch. Z. **298**, 150 (1938).

³⁾ Z. physiol. Ch. **244**, 117 (1936).

⁴⁾ Helv. **27**, und zwar S. 1838 (1944).

Tabelle 1.

5 g Acetontrockenpulver wurden bis zur Ammoniumsulfat-Fällung verarbeitet und der Niederschlag in 22 cm³ Phosphatpuffer gelöst. Davon wurde 1,5 cm³ pro Ansatz eingefüllt, p_H = 7,0, Versuchsdauer 10 Minuten.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Leucin Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	Prozent Hemmung
m/200	—	40	—
m/200	m/50	15	62%
m/200	m/100	21	48%
m/200	m/200	23	42%

Bei Verwendung kleinerer Enzymkonzentrationen hingegen verringert sich der Hemmungseffekt. Bei noch weiterer Verdünnung der Enzymlösung erscheint das *l*-Leucin als Hemmkörper inaktiv, um schliesslich in extrem verdünnten Enzymlösungen als Aktivator in Erscheinung zu treten, wie das aus Fig. 1 hervorgeht.

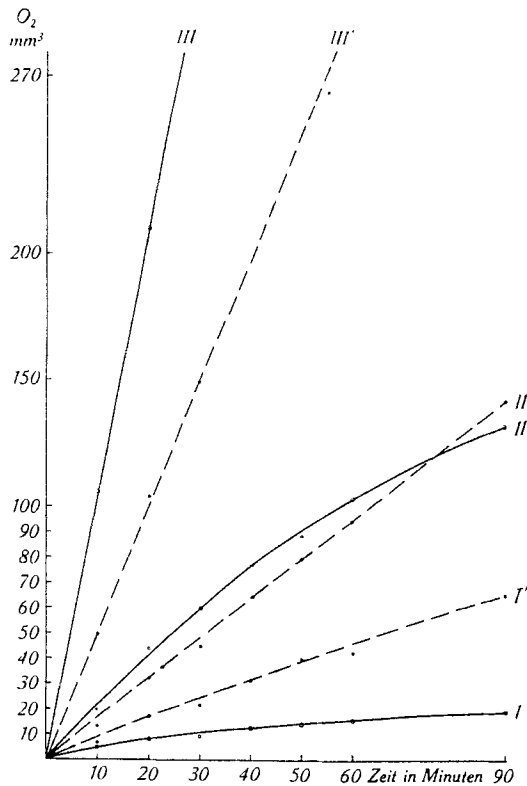


Fig. 1.

--- mit Leucin. — ohne Leucin.

Die Kurvenpaare I, II und III zeigen den *d*-Alaninabbau bei verschiedenen Enzymkonzentrationen mit und ohne *l*-Leucinzusatz. 5 g Acetonrockenpulver aus Schweineiere wurden bis zur Abtrennung des Cofermentes verarbeitet, und die letzte Fällung in 20 cm³ Phosphatpuffer p_H = 8 gelöst (= Lösung A). Die Reaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zusatz des Cofermentes aus Hefephenolextrakt¹⁾. Die *d*-Alanin-Endkonzentration betrug in allen Ansätzen m/50, die *l*-Leucin-Endkonzentration war immer m/40.

Enzymkonzentration I und I' = 0,125 cm³ Lösung A + 0,0125 cm³ Hefeextrakt.

Enzymkonzentration II und II' = 0,25 cm³ Lösung A + 0,025 cm³ Hefeextrakt.

Enzymkonzentration III und III' = 1,0 cm³ Lösung A + 0,1 cm³ Hefeextrakt.

Bei zeitlicher Beobachtung des Reaktionsablaufes zeigte sich, dass zugesetztes *l*-Leucin unter allen Bedingungen den *d*-Alaninabbau beeinflusst. Die Abbaukurven können wohl einzelne Parteien gemeinsam haben, der Reaktionsablauf ist jedoch grundlegend geändert.

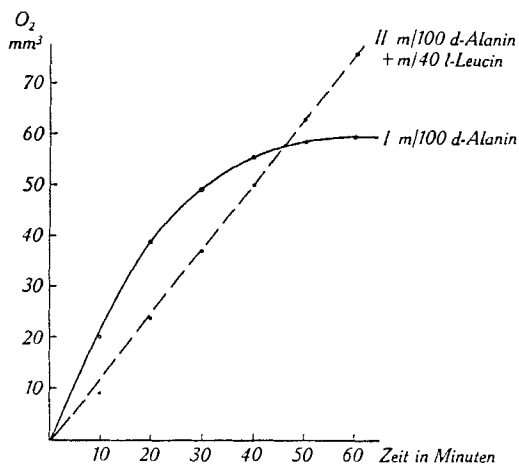


Fig. 2.

Kurve I der Fig. 2 zeigt den Abbau von m/100 *d*-Alanin. (Enzymkonzentration 0,18 cm³ Lösung A + 0,018 cm³ Hefeextrakt). Das Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit kommt offensichtlich durch Erschöpfung des Enzyms zustande, da das Substrat in grossem Überschuss vorhanden ist. Zugewetztes *l*-Leucin beeinflusst den Reaktionsablauf so, dass der Abbau mit konstanter Reaktionsgeschwindigkeit verläuft (Kurve II, Fig. 2). Anfänglich resultiert eine Hemmung, die sich allmählich in eine Aktivierung umkehrt. *l*-Leucinzusatz wirkt sich also folgendermassen aus: Bei hoher Enzymkonzentration tritt Hemmung ein. Bei mittlerer Enzymkonzentration tritt zuerst Hemmung und später Aktivierung ein. Bei niedriger Enzymkonzentration tritt Aktivierung ein.

Aktivierung durch andere *l*-Aminosäuren.

In Erweiterung dieser Beobachtungen haben wir eine grosse Anzahl anderer *l*-Aminosäuren hinsichtlich ihrer Effektorenwirkung auf die *d*-Aminosäure-oxydase untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten *l*-Aminosäuren eine steigernde Wirkung auf die *d*-Alanin-oxydase ausüben (Tab. 2 a—g).

¹⁾ Helv. **26**, 864 (1943).

Tabelle 2.

a)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	15	—
m/50	<i>l</i> -Valin	m/100	89	74
m/50	<i>l</i> -Leucin	m/100	127	112
m/50	<i>l</i> -Isoleucin	m/100	80	65
m/50	<i>l</i> -Phenylalanin	m/100	86	71
m/50	<i>l</i> -Asparaginsäure	m/100	264	249
m/50	<i>l</i> -Glutaminsäure	m/100	134	119
m/50	Glykokoll	m/100	122	107
m/50	<i>l</i> -Tryptophan	m/100	142	127

b)

Als Coferment wurde reines Bariumdinucleotid verwendet.

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	5	—
m/50	<i>l</i> -Histidin	m/100	340	335
m/50	<i>l</i> -Lysin	m/100	83	78
m/50	<i>l</i> -Ornithin	m/100	107	102
m/50	<i>l</i> -Citrullin	m/100	127	122
m/50	<i>l</i> -Arginin	m/100	101	96

c)

Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	18	—
—	<i>l</i> -Cystin	m/150	11	—
—	<i>l</i> -Tyrosin	m/200	9	—
—	<i>l</i> -Dijodtyrosin	m/200	7	—
m/50	<i>l</i> -Cystin	m/150	241	212
m/50	<i>l</i> -Tyrosin	m/200	139	112
m/50	<i>l</i> -Dijodtyrosin	m/200	76	51

d)

Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	21	—
—	<i>d, l</i> -Methionin	m/100	94	—
m/50	<i>d, l</i> -Methionin	m/100	290	175

e)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	15	—
—	<i>l</i> -Prolin	m/100	0	—
—	<i>d, l</i> -Serin	m/100	4	—
m/50	<i>l</i> -Prolin	m/100	78	63
m/50	<i>d, l</i> -Serin	m/100	123	104

f)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	14	—
—	<i>l</i> -Cystein	m/100	8	—
m/50	<i>l</i> -Cystein	m/100	130	108

g)

Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbr. abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbr. durch Aktivie- rung bedingt	mm ³ NH ₃ - Bildung abzüglich Leerwert	mm ³ NH ₃ - Bildung Aktivie- rung bedingt
*m/100	—	—	0	—	10	—
* —	<i>l</i> -Histidin	m/50	3	—	— 46	—
*m/100	<i>l</i> -Histidin	m/50	489	486	603	639
m/100	—	—	0	—	— 3	—
—	<i>l</i> -Glutaminsäure	m/50	5	—	— 17	—
m/100	<i>l</i> -Glutaminsäure	m/50	235	230	274	294

* Als Coferment wurde reines Bariumdinucleotid verwendet.

In einzelnen Versuchen haben wir statt des durch Phenolextraktion gereinigten Hefekochsaftes, pro Ansatz 10 γ reines Bariumdinucleotid verwendet. Bei den einzelnen Versuchen findet sich ein entsprechender Vermerk. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Aktivierungseffektes.

Als Enzym wurde das oben beschriebene Trockenpräparat verwendet. Es wurden je 8 mg Pulver mit einem cm^3 Phosphatpuffer $\text{p}_\text{H} = 8,0$ während einer halben Stunde bei 38° extrahiert. Pro Ansatz wurden $0,5 \text{ cm}^3$ Hefeextrakt zugegeben. In vielen Kontrollversuchen haben wir uns vergewissert, dass keine der untersuchten *l*-Aminosäuren unter den hier gewählten Bedingungen einen zusätzlichen Sauerstoff-Verbrauch bewirkte, wenn keine *d*-Aminosäure an der Reaktion beteiligt war. Aus Gründen der Platzersparnis haben wir nur einzelne dieser Versuche hier mitgeteilt.

Die Bestimmung des gebildeten Ammoniaks haben wir nur in einzelnen Versuchen durchgeführt. Pro Mol Sauerstoff-Verbrauch liess sich ein Mol Ammoniak nachweisen. Für den Desaminierungsvorgang allein wird pro Mol Ammoniak nur $\frac{1}{2}$ Mol Sauerstoff verbraucht. Das oben angeführte Verhältnis erklärt sich durch die Abwesenheit der Katalase bei Verwendung gereinigter Enzymlösungen.

Aktivierung der *d*-Alaninoxydase durch *d*-Aminosäuren.

Die Wirksamkeit der *d*-Aminosäure-oxydase ist durch streng optische Spezifität ausgezeichnet. Es war deshalb von Interesse festzustellen, ob die Effektorenwirkung nur den optischen Antipoden, d. h. den natürlichen Formen der Aminosäuren zufalle. Es zeigte sich jedoch, dass die *d*-Aminosäuren in gleicher Weise wie ihre optischen Antipoden als Aktivatoren des *d*-Alaninabbaues wirken (Tab. 3).

Tabelle 3.

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm^3 O_2 -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm^3 O_2 -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	15	—
—	<i>l</i> -Leucin	m/100	0	—
—	<i>d</i> -Leucin	m/100	86	—
—	<i>l</i> -Asparaginsäure	m/100	1	—
—	<i>d</i> -Asparaginsäure	m/100	51	—
—	<i>l</i> -Arginin	m/100	1	—
—	<i>d</i> -Arginin	m/100	3	—
m/50	<i>l</i> -Leucin	m/100	115	100
m/50	<i>d</i> -Leucin	m/100	162	61
m/50	<i>l</i> -Asparaginsäure	m/100	247	231
m/50	<i>d</i> -Asparaginsäure	m/100	287	221
m/50	<i>l</i> -Arginin	m/100	73	57
m/50	<i>d</i> -Arginin	m/100	95	77

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Spezifische Wirkung des *l*- und *d*-Histidins.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, erwies sich das *l*-Histidin als wirksamster Aktivator des *d*-Alaninabbaues. Die Fortführung dieser Untersuchungen ergab das auffallende Resultat, dass *l*-Histidin noch in äusserst geringer Konzentration wirksam ist. So gelingt es, durch Konzentrationen von m/100000 *l*-Histidin, d. h. mit ca. 1,5 γ *l*-Histidin pro cm³, noch eine deutliche Aktivierung zu erzielen. Die unnatürliche Form des Histidins erwies sich in genau gleicher Weise wirksam. Keine der übrigen untersuchten Aminosäuren zeigte eine ähnliche spezifische Wirksamkeit. Zum grossen Teil erwiesen sie sich schon in m/1000-Konzentration als unwirksam (Tab. 4).

Tabelle 4.

Als Coferment wurde reines Bariumdinucleotid verwendet.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	<i>d</i> -Histidin Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
Versuchsdauer: 2 Stunden.				
m/50	—	—	19	—
—	m/100	—	13	—
—	—	m/100	50	—
m/50	m/100	—	864	832
m/50	—	m/100	848	779
Versuchsdauer: 1 Stunde.				
m/50	—	—	14	—
—	—	m/12500	-1	—
—	—	m/25000	5	—
m/50	—	m/12500	127	114
m/50	—	m/25000	84	65
m/50	m/12500	—	198	184
m/50	m/25000	—	88	74
m/25	—	—	12	—
m/25	—	m/50000	64	52
m/25	—	m/100000	40	28
m/25	m/50000	—	80	68
m/25	m/100000	—	40	28

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Effektorenwirkung von Derivaten der Aminosäuren.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen, die der Abklärung des Aktivierungsmechanismus dienen sollten, haben wir verschiedene Amine und andere Derivate der Aminosäuren untersucht. Keto- und Oxysäuren zeigten keinen aktivierenden Einfluss auf die *d*-Aminosäure-oxydase (Tab. 5a, b).

Tabelle 5.

a)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	14	—
m/50	Ketoglutarensäure	m/100	18	4
m/50	Brenztraubensäure	m/100	16	2
m/50	Oxalessigsäure	m/100	16	2

b)

Versuchsdauer: 2 Stunden.

Als Coferment wurde reines Bariumdinucleotid verwendet.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	19	—
—	<i>l</i> -Histidin	m/100	13	—
—	<i>l</i> -Imidazol- milchsäure	m/100	7	—
m/50	<i>l</i> -Histidin	m/100	864	832
m/50	<i>l</i> -Imidazol- milchsäure	m/100	85	59
m/50	—	—	21	—
—	<i>l</i> -Histidin	m/100	5	—
—	<i>d</i> -Imidazol- milchsäure	m/100	5	—
m/50	<i>l</i> -Histidin	m/100	696	670
m/50	<i>d</i> -Imidazol- milchsäure	m/100	70	44
m/100	—	—	0	—
—	Milchsäure	m/50	13	—
m/100	Milchsäure	m/50	22	9

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Von den zahlreich untersuchten Aminen erwies sich nur das Histamin als wirksam. Wenn auch seine Effektorenwirkung bedeutend kleiner ist als diejenige des Histidins, so ist der Effekt doch eindeutig nachweisbar (Tab. 6).

Tabelle 6.

Als Coferment wurde reines Bariumdinucleotid verwendet.
Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	19	—
—	<i>l</i> -Histidin	m/100	13	—
—	Histamin	m/100	2	—
m/50	<i>l</i> -Histidin	m/100	864	832
m/50	Histamin	m/100	407	386
m/50	—	—	18	—
—	<i>l</i> -Tyrosin	m/200	9	—
—	Tyramin	m/200	14	—
m/50	<i>l</i> -Tyrosin	m/200	139	112
m/50	Tyramin	m/200	8	- 24
m/50	—	—	20	—
—	<i>l</i> -Lysin	m/100	17	—
—	Cadaverin	m/100	- 2	—
—	Arcain	m/100	4	—
—	Agmatin	m/100	- 4	—
—	Putrescin	m/100	4	—
m/50	<i>l</i> -Lysin	m/100	120	83
m/50	Cadaverin	m/100	3	- 15
m/50	Arcain	m/100	4	- 12
m/50	Agmatin	m/100	5	- 19
m/50	Putrescin	m/100	14	- 10
m/50	—	—	25	—
—	<i>l</i> -Alanin	m/100	- 3	—
—	Äthylamin	m/100	- 2	—
m/50	<i>l</i> -Alanin	m/100	199	177
m/50	Äthylamin	m/100	16	- 7
m/50	—	—	47	—
—	<i>l</i> -Phenylalanin	m/100	4	—
—	Phenyläthylamin	m/100	1	—
—	<i>l</i> -Leucin	m/100	4	—
—	<i>l</i> -Isoamylamin	m/100	8	—
m/50	<i>l</i> -Phenylalanin	m/100	270	219
m/50	Phenyläthylamin	m/100	16	- 32
m/50	<i>l</i> -Leucin	m/100	256	205
m/50	Isoamylamin	m/100	3	- 52

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

β -Alanin zeigte keine aktivierende Wirkung auf die *d*-Aminosäure-oxydase:

Tabelle 7.

Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	β -Alanin Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	18	—
—	m/100	7	—
m/50	m/100	14	- 11

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Weiterhin haben wir methyl- und benzoylsubstituierte Aminosäuren auf ihre aktivierende Wirkung geprüft. Es zeigte sich, dass die Einführung einer Methylgruppe die Aktivität ganz erheblich herabsetzt, während die mit Benzoyl substituierten Aminosäuren sich als vollständig inaktiv erwiesen:

Tabelle 8.

a)

Als Coferment wurde reines Bariumdinucleotid verwendet.

Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	19	—
—	<i>l</i> -Histidin	m/100	13	—
—	α -Benzoyl-histidin	m/100	5	—
m/50	<i>l</i> -Histidin	m/100	864	832
m/50	α -Benzoyl-histidin	m/100	22	- 2

b)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	Methyl- histidin Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	14	—
m/50	m/100	—	341	327
m/50	m/1000	—	317	303
m/50	—	m/100	129	115
m/50	—	m/1000	24	10

e)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	21	—
m/50	<i>l</i> -Asparaginsäure	m/100	258	237
—	Benzoyl-asparaginsäure	m/100	0	—
m/50	Benzoyl-asparaginsäure	m/100	33	12

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Ohne aktivierenden Einfluss waren folgende Substanzen: Thyroxin, Harnstoff, Betainchlorid, Glycoyamin, Urocaninsäure, Kreatin, Guanidin, Nicotylamid, Natriumchlorid.

Wirkungsweise der Peptide.

Peptide erwiesen sich im Prinzip in gleicher Weise aktiv wie die einzelnen Aminosäuren:

Tabelle 9.

a)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	Carnosin Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	14	—
m/50	m/1000	—	317	303
m/50	m/10000	—	91	77
m/50	—	m/1000	204	190
m/50	—	m/10000	84	70

b)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/50	—	—	14	—
—	Glycyl-glycin	m/100	— 1	—
m/50	Glykokoll	m/100	93	79
m/50	Glykokoll	m/50	173	159
m/50	Glycyl-glycin	m/100	173	160

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Wirkungsweise der Protamine und anderer Proteine.

Untersuchungen hinsichtlich der aktivierenden Wirkung von Proteinen bestätigen die in Tabelle 9 angeführten Ergebnisse. Auch zu längeren Peptidketten vereinigte Aminosäuren zeigen die typische Effektorenwirkung. Weiterhin liess sich nachweisen, dass die Intensität der Wirkung vom Histidingehalt abhängig ist. Minimale Konzentrationen histidinhaltiger Eiweisskörper aktivieren dementsprechend in spezifischer Weise. Während die histidinfreien Protamine Clupein, Escocin, Coregonin, Scombrin nur bis m/1000-Konzentration aktivieren, aktiviert das histidinreiche Sturin bei viel niedrigeren Konzentrationen (unter m/5000) noch äusserst stark. Besonders sei auch auf die starke Wirkung des an Histidin reichen Globins und der Globinalbumose hingewiesen:

Tabelle 10.

a)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	Sturin Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	—	39	—
m/25	m/100	—	460	421
m/25	m/1000	—	449	410
m/25	m/5000	—	377	338
m/25	m/50000	—	117	78
—	—	(m/100)	5	—
—	—	(m/1000)	5	—
—	—	(m/5000)	2	—
—	—	(m/50000)	— 4	—
m/25	—	(m/100)	196	152
m/25	—	(m/1000)	388	344
m/25	—	(m/5000)	328	287
m/25	—	(m/50000)	50	15

b)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Sturin Konz.	Scombrin Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	—	26	—
m/25	(m/500)	—	349	323
m/25	(m/10000)	—	157	131
m/25	(m/30000)	—	53	27
m/25	—	(m/500)	186	160
m/25	—	(m/10000)	42	16
m/25	—	(m/30000)	34	8

c)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	—	28	—
—	Coregonin	(m/100)	4	—
m/25	Coregonin	(m/100)	51	19
—	Scobrinn	(m/100)	0	—
m/25	Scobrinn	(m/100)	263	235
—	Esocin	(m/100)	- 2	—
m/25	Esocin	(m/100)	56	30
m/25	—	—	27	—
—	Esocin	(m/500)	3	—
m/25	Esocin	(m/500)	49	19
—	Coregonin	(m/500)	3	—
m/25	Coregonin	(m/500)	36	6

d)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Clupein Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	39	—
—	(m/100)	- 2	—
—	(m/1000)	0	—
—	(m/5000)	- 4	—
—	(m/50000)	2	—
m/25	(m/100)	132	95
m/25	(m/1000)	131	92
m/25	(m/5000)	33	- 2
m/25	(m/50000)	28	- 13

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Tabelle 11.

a)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	—	27	—
—	Seidenpepton	(m/500)	4	—
m/25	Seidenpepton	(m/500)	353	322
m/25	—	—	24	—
—	Seidenpepton	(m/5000)	- 6	—
m/25	Seidenpepton	(m/5000)	249	231

b)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Globalalbumose Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	42	—
—	(m/500)	— 1	—
—	(m/5000)	0	—
—	(m/20000)	5	—
m/25	(m/500)	489	448
m/25	(m/5000)	491	449
m/25	(m/20000)	535	488

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Tabelle 12.

a)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Zusatz	Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	—	27	—
m/25	Casein	(m/500)	163	136
—	Gliadin	(m/500)	— 1	—
m/25	Gliadin	(m/500)	32	6
m/25	—	—	24	—
m/25	Casein	(m/5000)	37	13
—	Gliadin	(m/5000)	— 6	—
m/25	Gliadin	(m/5000)	42	24

b)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	Globin*) Konz.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzügl. Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/25	—	50	—
—	(m/500)	9	—
—	(m/5000)	5	—
m/25	(m/500)	346	287
m/25	(m/5000)	103	48

*) Aus Rinderblut.

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Die angegebenen Konzentrationen der Protamine, Peptone und Proteine sind in folgender Weise zu interpretieren: Bei den histidinhaltigen Eiweisskörpern bezieht sich die angegebene Molarität auf den Histidingehalt. Die übrigen Eiweisskörper wurden, sofern das Molekulargewicht bekannt war, in gleicher molarer Konzentration zugesetzt, sonst wurde die dem histidinhaltigen Eiweisskörper entsprechende Konzentration verwendet.

Hinsichtlich der unter Tabelle 10 und 12 angeführten Ergebnisse handelt es sich lediglich um Resultate einiger orientierender Versuche. Es hat sich immerhin gezeigt, dass mehrere gleichzeitig zugesetzte Aminosäuren sich in komplexer Weise gegenseitig beeinflussen, und dass die Konzentrationsverhältnisse von entscheidender Bedeutung sind. Da sich daraus eine sehr grosse Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten ergibt, werden weitere ausgedehnte Untersuchungen zur Abklärung dieser Zusammenhänge nötig sein.

Abhängigkeit der Aktivierungsgrösse von der *d*-Alanin-Konzentration.

Die Tatsache, dass Zusatz einer *d*-Aminosäure zur *d*-Aminosäure-oxydase bei Gegenwart einer *l*-Aminosäure eine Steigerung des Sauerstoff-Verbrauchs und der Ammoniak-Bildung bewirkt, beweist noch nicht, dass nur die *d*-Aminosäure vom Abbau betroffen wird. Der Steigerungseffekt minimaler Histidinkonzentrationen lässt sich jedoch nur durch deren Katalysatorwirkung erklären. In Analogie war deshalb anzunehmen, dass *l*-Aminosäuren, in grösserer Konzentration zugesetzt, in gleicher Weise als Katalysatoren wirken. Im gleichen Sinn sprechen auch Abbauversuche bei Zusatz verschiedener Konzentrationen von *d*-Alanin. Es zeigte sich nämlich, dass die Abbaugrösse in typischer Weise von der *d*-Alaninkonzentration abhängt. Ausserdem wird im folgenden Absatz gezeigt, dass beim Abbau von *d*-Alanin immer unter den gegebenen Bedingungen Brenztraubensäure entsteht, während beim Abbau von *d*-Leucin, welches durch Enzym abgebaut wird, das durch *l*-Alanin aktiviert wurde, keine Brenztraubensäure nachweisbar ist. Im Verein mit der oben erwähnten Tatsache, dass Spuren von Histidin den *d*-Aminosäureabbau zu aktivieren vermögen, lässt sich wohl schwerlich eine andere Deutung finden als die, dass die *d*-Aminosäure abgebaut wird, und die *l*-Aminosäure als Aktivator funktioniert.

Tabelle 13.

Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierg. bedingt	mm ³ NH ₃ -Bildung abzüglich Leerwert	mm ³ NH ₃ -Bildung d. Aktivierg. bedingt
—	m/300	0	—	- 14	—
m/25	—	130	—	179	—
m/50	—	38	—	64	—
m/100	—	16	—	38	—
m/25	m/300	508	378	566	401
m/50	m/300	324	286	394	344
m/100	m/300	186	170	227	203

Die Präparation des Enzyms erfolgte wie im Kommentar zu Fig. 1 beschrieben ist. Pro Ansatz wurde 0,18 cm³ Proteinlösung und 0,036 cm³ Hefeextrakt verwendet.

Nachweis der Ketonsäuren.

In einzelnen Fällen haben wir die Ketosäuren nachgewiesen. Wird die *d*-Aminosäure-oxydase in gereinigter Form verwendet, so wird die entstehende Ketosäure nach *Holleman* durch das bei der oxydativen Desaminierung entstandene Wasserstoffperoxyd zu der um ein C-Atom ärmeren Fettsäure decarboxyliert. Um die Ketosäuren nachweisen zu können, muss dementsprechend Katalase zugesetzt werden, welche das entstandene Wasserstoffperoxyd sofort zersetzt. Wir verwendeten als Katalase hämolysierte Ratten-Erythrocyten. Es zeigte sich aber, dass dadurch schon eine Aktivierung der *d*-Aminosäure-oxydase zustande kommt. Dieser Effekt war von vornherein zu erwarten, nachdem wir oben zeigen konnten, dass auch nur durch Globinzusatz der Abbau der *d*-Aminosäure stark gesteigert wird. Bei Zusatz von Katalase, *d*-Alanin und *l*-Histidin zur *d*-Aminosäure-oxydase liessen sich beträchtliche Mengen Brenztraubensäure nachweisen. Wurde jedoch der *d*-Leucinabbau durch *l*-Alanin aktiviert, so konnte keine Brenztraubensäure nachgewiesen werden. Wie die Verhältnisse liegen, wenn die Aktivierung durch eine *d*-Aminosäure erfolgt, muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden:

Tabelle 14.

Katalasezusatz: Ein abgemessenes Volumen Ratten-Citratblut wurde dreimal mit dem zehnfachen Volumen *Ringer*-Lösung ausgewaschen. Das ursprüngliche Volumen wurde mit der fünfzehnfachen Puffermenge versetzt und das in der Tabelle angegebene Volumen verwendet. Enzym: Pro Ansatz wurde 0,18 cm³ Proteinlösung und 0,036 cm³ Hefe-Extrakt verwendet:

a)

Versuchsdauer: 2 Stunden.

Katalase cm ³	<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm ³ O ₂ -Ver- brauch abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Ver- brauch durch Aktivie- rung bedingt	mm ³ NH ₃ - Bildung abzüglich Leerwert	mm ³ NH ₃ - Bildung durch Aktivie- rung bedingt	Pyruvinat Mol.
0,1	m/100	—	110	—	183	—	m/587
0,1	—	m/50	4	—	21	—	0
0,1	m/100	m/50	271	157	415	211	m/228

b)

Versuchsdauer: 2 Stunden.

Katalase cm ³	<i>d</i> -Leucin Mol.	<i>l</i> -Alanin Mol.	mm ³ O ₂ -Ver- brauch abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Ver- brauch durch Aktivie- rung bedingt	mm ³ NH ₃ - Bildung abzüglich Leerwert	mm ³ NH ₃ - Bildung durch Aktivie- rung bedingt	Pyruvinat Mol.
0,1	m/50	—	120	—	184	—	0
0,1	—	m/100	8	—	— 3	—	0
0,1	m/50	m/100	175	47	264	83	0

Aktivierung des Abbaues verschiedener *d*-Aminosäuren durch *l*-Histidin.

Die bisher beschriebenen Aktivierungsversuche wurden im wesentlichen am Beispiel des *d*-Alaninabbaues durchgeführt. Wir haben aber auch eine Anzahl anderer *d*-Aminosäuren in entsprechender Weise untersucht. Darüber werden wir in einer späteren Mitteilung berichten. Wir wollen lediglich die Tatsache vorwegnehmen, dass sich die *d*-Aminosäuren in zwei Gruppen einteilen lassen: Der Abbau der ersten Gruppe von *d*-Aminosäuren lässt sich durch andere Aminosäuren stark aktivieren, bei einer zweiten Gruppe ist der Aktivierungseffekt geringfügig oder nicht nachweisbar. Soweit sich die Verhältnisse beim gegenwärtigen Stand der Untersuchung überblicken lassen, finden sich in der ersten Gruppe die Monoamino-monocarbonsäuren, während die zweite Gruppe aus Vertretern der Monoamino-dicarbonsäuren und der basischen Aminosäuren besteht:

Tabelle 15.

a)

Versuchsdauer: 2 Stunden.

<i>l</i> -Histidin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch durch Aktivierung bedingt	mm ³ NH ₃ -Bildung abzüglich Leerwert	mm ³ NH ₃ -Bildung durch Aktivierung bedingt
—	<i>d</i> -Alanin	m/50	21	—	22	—
—	<i>d</i> -Valin	m/50	11	—	20	—
—	<i>d</i> -Leucin	m/50	13	—	20	—
—	<i>d</i> -Isoleucin	m/50	7	—	18	—
—	<i>d</i> -Phenylalanin	m/50	8	—	40	—
—	<i>d</i> -Histidin	m/50	13	—	12	—
—	<i>d</i> -Asparaginsäure	m/50	92	—	112	—
—	<i>d</i> -Glutaminsäure	m/50	13	—	18	—
m/100	—	—	5	—	6	—
m/100	<i>d</i> -Alanin	m/50	696	670	917	889
m/100	<i>d</i> -Valin	m/50	519	503	834	808
m/100	<i>d</i> -Leucin	m/50	306	288	507	481
m/100	<i>d</i> -Isoleucin	m/50	805	793	1064	1040
m/100	<i>d</i> -Phenylalanin	m/50	559	546	744	698
m/100	<i>d</i> -Histidin	m/50	69	51	61	43
m/100	<i>d</i> -Asparaginsäure	m/50	126	29	—	—
m/100	<i>d</i> -Glutaminsäure	m/50	24	6	9	-15

b)

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>l</i> -Histidin Mol.	Zusatz	Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
—	<i>d</i> -Arginin	m/25	12	—
m/100	<i>d</i> -Arginin	m/25	31	19

Enzym: vgl. Kommentar zu Tabelle 2.

Aktivierung von Rohfermenten.

In einigen orientierenden Versuchen haben wir festgestellt, dass auch in ungereinigten Enzymlösungen die Aktivierung nachweisbar ist. Da in solchen Lösungen also Aminosäuren, Peptide und Proteine gleichzeitig auf das Enzym einwirken, kommt es zur Ausbildung komplizierter Gleichgewichte, die auch zur Hemmung der Enzymreaktion führen können. Es war deshalb von vornherein anzunehmen, dass bei Verwendung ungereinigter Enzymlösungen der Aktivierungseffekt in viel geringerem Masse in Erscheinung treten wird.

Tabelle 16.

Rattennieren wurden mit feinem Seesand verrieben, mit der fünffachen Menge Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ versetzt und zentrifugiert. Pro Ansatz wurde 1 cm^3 des Extraktes verwendet.

Versuchsdauer: 1 Stunde.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm^3 O_2 -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm^3 O_2 -Verbrauch d. Aktivierg. bedingt	mm^3 NH_3 -Bildung abzüglich Leerwert	mm^3 NH_3 -Bildung d. Aktivierg. bedingt
m/50	—	113	—	227	—
—	m/100	8	—	— 1	—
m/50	m/100	140	19	274	48

Tabelle 17.

Acetontrockenpulver von Schweinenieren wurde während einer halben Stunde bei 38° mit dem zwanzigfachen Volumen Phosphatpuffer $p_H = 8$ extrahiert und davon $0,3\text{ cm}^3$ pro Ansatz verwendet.

Versuchsdauer: $2\frac{1}{2}$ Stunden.

<i>d</i> -Alanin Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm^3 O_2 -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm^3 O_2 -Verbrauch d. Aktivierung bedingt
m/100	—	11	—
—	m/40	3	—
m/100	m/40	50	36

Schliesslich haben wir in einigen Kontrollversuchen geprüft, ob die zugesetzten *l*-Aminosäuren anstelle des Cofermentes oder Apofermentes wirken könnten. Wie zu erwarten war, hat sich gezeigt, dass nur bei Gegenwart des spezifischen Cofermentes und Apofermentes das Enzym wirksam ist.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den hier mitgeteilten Tatsachen ergibt sich, dass sich die verschiedenartigsten Aminosäuren beim oxydativen Abbau gegenseitig beeinflussen können. Wirkt das Ferment in hoher Konzentration, so beobachtet man sowohl beim Roh- als auch beim Reiferment die „antipodische Hemmung“, wie sie in den vorangegangenen Mitteilungen¹⁾ ausführlich beschrieben wurde. Wirkt das

¹⁾ Helv. 27, 1824, 1831 (1944).

Ferment jedoch in niedriger Konzentration, so beobachtet man nun eine eminente Aktivierung des oxydativen Abbaus der *d*-Aminosäuren. Diese Aktivierung wird nun sowohl durch *d*- als auch durch *l*-Aminosäuren bewirkt. Der Aktivierungseffekt ist umso grösser, je weiter die Reinigung der *d*-Aminosäure-oxydase getrieben ist. Man kann in Bezug auf diesen Aktivierungseffekt die einzelnen Aminosäuren in zwei Gruppen zusammenfassen:

Die erste Gruppe dieser Aminosäuren umfasst diejenigen, deren *l*-Formen durch Schnitte, Hackbrei und Extrakte nur in minimalem Masse abgebaut werden. Der Abbau der *d*-Formen dieser Aminosäuren ist nun durch *l*- und *d*-Aminosäuren äusserst stark aktivierbar. Zu dieser Gruppe gehören alle untersuchten Monoaminomonocarbonsäuren wie Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin.

Die zweite Gruppe der Aminosäuren umfasst solche, deren *l*-Formen durch sehr stark wirkende, spezifische Enzyme in den verschiedenen Organen abgebaut werden. Zu dieser gehören: *l*-Histidin (durch Histidase), *l*-Arginin (durch Arginase), *l*-Glutaminsäure (durch Glutaminsäure-dehydrase), *l*-Asparaginsäure, die durch ein Enzym abgebaut wird, welches sich höchst wahrscheinlich von den übrigen Aminosäure-oxydasen unterscheidet, wie der Eine von uns gemeinsam mit *H. Grauer* in der 2. Abhandlung¹⁾ durch die spezifische Hemmbarkeit nachgewiesen hat. Diese zweite Gruppe von Aminosäuren verhält sich so, dass der Abbau ihrer *d*-Formen durch die Gegenwart anderer *l*- und *d*-Aminosäuren wohl prinzipiell auch aktiviert werden kann, dass diese Aktivierung jedoch nur ganz minimal ist. Überraschenderweise wirken jedoch Aminosäuren dieser zweiten Gruppe als die stärksten Aktivatoren des Abbaues der *d*-Monoamino-monocarbonsäuren und zwar wirkt *l*- und *d*-Histidin am allerstärksten, so dass wenige Gamma dieser Aminosäure pro cm³ genügen, um in manchen Fällen eine zwanzigfache Aktivierung herbeizuführen. Nach der Stärke des Aktivierungseffekts ordnen sie sich zu der folgenden Reihe: *l*- und *d*-Histidin → *l*- und *d*-Asparaginsäure → *l*- und *d*-Glutaminsäure → *l*- und *d*-Arginin.

Die Versuche mit verschiedenen Proteinen und Peptiden zeigen weiterhin, dass der Histidingehalt der einzelnen Proteine für die Aktivierung des oxydativen Abbaues der *d*-Monoamino-monocarbonsäuren integrierend ist. Sie zeigen also, dass nicht nur freie Aminosäuren den oxydativen Abbau der einfachen Aminosäuren entscheidend beeinflussen, sondern dass auch das intraprotein gebundene Histidin die gleiche Wirkung hat. Durch diese Beobachtung wird nun auch in anderer Hinsicht ein Ausblick eröffnet. Es ist wahrscheinlich, dass die von *F. Miescher* zuerst beobachtete Liquidation des Körpereiwisses bei der Protaminbildung durch derartige Phäno-

¹⁾ Helv. 27, 928 (1944).

mene gesteuert wird. Die spezifische Auswahl der Eiweissbausteine, die bei diesem Umbau von Körpereiwiss stattfindet, indem gewisse Aminosäuren dem oxydativen Abbau anheimfallen und andere, besonders die Hexonbasen, gespeichert werden, ist wahrscheinlich durch derartige Aktivierungsvorgänge erklärbar. Wenn z. B. im Protamin Clupein sich nur die Aminosäuren Arginin, Alanin, Serin, Valin und Prolin vorfinden, während *Steudel* und *Suzuki*¹⁾ in der Hoden-Zwischenflüssigkeit Leucin, Tyrosin, Lysin, Histidin, Cystein und Tryptophan fanden, so ist es wohl höchst wahrscheinlich, dass eine derartige spezifische Auswahl von Eiweissbausteinen durch ein Regulations-System bewirkt wird, welches im Prinzip auf der von uns beobachteten Effektorenwirkung einzelner Aminosäuren und Eiweisskörper beruht. Im speziellen müsste das natürlich noch untersucht werden.

Es ist weiterhin bemerkenswert, dass auch das Decarboxylierungsprodukt des Histidins, das Histamin, wie wir oben gezeigt haben, gegenüber allen anderen Aporrhegmen eine Vorzugsstellung einnimmt, indem es das einzige biogene Amin ist, welches den oxydativen Abbau der *d*-Aminosäuren stark zu aktivieren vermag.

Alle diese Tatsachen drängen zu der Frage nach der Bedeutung der *d*-Aminosäure-oxydase für den Eiweissstoffwechsel. Die bisherigen Vorstellungen, die besonders durch die bekannten Arbeiten von *Kögl* und vieler anderer entwickelt wurden, setzen als biologische Funktion der *d*-Aminosäure-oxydase die Aufrechterhaltung der optischen Reinheit der Proteine. Auf Grund unserer Beobachtungen möchten wir hier aber noch auf eine weitere Möglichkeit hinweisen. Die gewaltige Aktivität der *d*-Aminosäure-oxydase im Gegensatz zu der minimalen Abbaugrösse der *l*-Monoamino-monocarbonsäuren hätte keinen physiologischen Sinn, wenn tatsächlich nur Spuren von *d*-Aminosäuren im Stoffwechsel auftreten würden. Wenn man aber die Annahme macht, dass der Abbau der Aminosäuren in der Weise erfolgt, dass durch ständige Aminierungen und Umaminierungen im Sinne von *F. Knoop*, sowie von *Braunstein* und *Kritzmann*²⁾ der ganze Eiweiss-Stoffwechsel so stattfindet, dass der Abbau der Aminosäuren über die *d*-Formen geht, indem bei der Neubildung von Aminosäuren sich immer solche *d*-Formen intermediär bilden, so würden diese von uns mitgeteilten Beobachtungen eine Klärung über den Weg dieses Abbaues bringen. Dies ist natürlich zunächst nur eine Hypothese. Aber gewisse Andeutungen in den Arbeiten von *Braunstein* weisen darauf hin, dass die Umaminierungsreaktionen nicht streng optisch spezifisch verlaufen. Wir werden deshalb in dieser Hinsicht Untersuchungen durchführen.

¹⁾ Z. physiol. Ch. **127**, 1 (1922).

²⁾ Enzymol. **2**, 129, 138 (1937), **7**, 25 (1939).

*Green*¹⁾ berichtet über Versuche, die zur Isolierung einer löslichen *l*-Aminosäure-oxydase geführt haben. Da uns diese Arbeit nur im Referat zugänglich ist, können wir die Aktivität seines Enzyms nicht mit unseren Versuchen vergleichen. Auch sei hier in diesem Zusammenhang auf die interessanten Untersuchungen von *A. Zeller*²⁾ hingewiesen, der im Schlangengift eine äusserst aktive Ophio-*l*-Aminosäure-oxydase gefunden hat. Es sei hier ausdrücklich hervorgehoben, dass wir nicht annehmen, dass im Säugergewebe gar keine spezifischen *l*-Aminosäure-oxydasen existieren. Die eminente Aktivität der *d*-Aminosäure-oxydase lässt sich aber zunächst nur mit der Vorstellung des von uns vermuteten Reaktions-Schemas erklären. Die *Zeller*'sche Ophio-*l*-Aminosäure-oxydase, die bei den Reptilien auftritt, stellt einen wichtigen Spezialfall eines Enzyms dar, der selbstverständlich nicht ohne weiteres mit den Stoffwechselfvorgängen im Säugerorganismus verglichen werden kann. Ihre grosse Aktivität zeigt, dass auf phylogenetischer und ökologischer Grundlage Enzymsysteme sich zu maximaler Leistungsfähigkeit entwickeln können.

Die beschriebene Effektorenwirkung gewisser Aminosäuren und Eiweisskörper eröffnet einen Weg zur Klärung der spezifisch-dynamischen Wirkung der Aminosäuren.

Zusammenfassung.

1. Es werden Versuche über die Hemmung und Aktivierung der *d*-Aminosäure-oxydase mitgeteilt.

2. Gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase in niedriger Konzentration wird durch alle untersuchten *d*- und *l*-Aminosäuren aktiviert.

3. Die oxydative Desaminierung der *d*-Moncamino-monocarbonsäuren wird am stärksten durch *l*- und *d*-Histidin aktiviert und zwar wirkt diese Aminosäure schon in Gammakonzentration pro cm³.

4. Je weiter die Reinigung der *d*-Aminosäure-oxydase getrieben wird, desto stärker ist der Aktivierungseffekt.

5. Diejenigen Aminosäuren, deren *l*-Formen durch spezifische Enzyme abgebaut werden, wie Histidin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin wirken entsprechend der angegebenen Reihenfolge als besonders starke Aktivatoren.

6. Proteine wirken ebenfalls als Aktivatoren der *d*-Aminosäure-oxydase. Je reicher an Histidin sie sind, desto stärker wirken sie.

Fr. *Frieda Nebiker* hat bei den Versuchen wertvolle Hilfe geleistet.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

¹⁾ J. Biol. Chem. **148**, 461 (1943).

²⁾ Helv. **28**, 365 (1945).