

107. Untersuchungen über die Gewebsatmung.

2. Beziehungen der Aminosäurekatalyse zur Fumarsäurekatalyse bzw. zum Citronensäurecyclus¹⁾

von O. Wiss.

(10. V. 46.)

Die grundlegenden Arbeiten von *Szent Györgyi* und Mitarbeitern²⁾ haben es wahrscheinlich gemacht, dass C₄-Dicarbonsäuren in entscheidendem Masse als Katalysatoren an der Hauptatmung tierischer Gewebe beteiligt sind. Später haben *Krebs* und Mitarbeiter die Theorie des Citronensäurecyclus entwickelt.

Als Grundlage dazu diente einerseits die Kenntnis des Abbaues der Citronensäure im tierischen Organismus, die vor allem durch Untersuchungen von *F. Knoop* und *Martius*³⁾ geklärt worden ist; andererseits konnten *Krebs* und Mitarbeiter⁴⁾ eindeutig nachweisen, dass Citronensäure und andere Komponenten des Citronensäurecyclus als Atmungskatalysatoren wirken können.

Obwohl die katalytische Wirksamkeit aller dieser Stoffe kaum mehr bezweifelt werden kann, herrschen noch grosse Meinungsverschiedenheiten hinsichtlich ihrer speziellen Reaktionsweise⁵⁾.

In der ersten Mitteilung dieser Reihe⁶⁾ wurde in einigen orientierenden Untersuchungen an Leber, Niere, Muskel, Gehirn verschiedener Tierarten nachgewiesen, dass Aminosäuren ganz generell die Atmung überlebender tierischer Gewebe zu steigern vermögen. Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde versucht, diese Aminosäurekatalyse mit den einzelnen Komponenten des Citronensäurecyclus in Beziehung zu bringen. *Szent Györgyi* und *Krebs* verwendeten für die Aktivierungsversuche im wesentlichen Organbrei, der jedoch noch weitgehend intakte Struktur aufwies, so dass er überlebenden Gewebsschnitten gleichzusetzen ist⁷⁾. In der letzten Mitteilung⁶⁾ wurde die Bereitung zellfreier Organextrakte beschrieben,

¹⁾ Zum Teil vorgetragen an der 28. Tagung des Schweiz. Vereins der Physiol. u. Pharm. am 26. Januar 1946, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **4**, C 9 (1946).

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **224**, 1 (1934); **236**, 1 (1935); **244**, 105 (1936); **252**, 275 (1938).

³⁾ *Z. physiol. Ch.* **242**, I (1936); **246**, I (1937); **247**, 104 (1937); **257**, 29 (1938).

⁴⁾ *Enzymol.* **4**, 148 (1937); *Biochem. J.* **32**, 113, 913 (1938); **33**, 1047 (1939); **34**, 442, 775, 1234 (1940); **37**, XV, 334 (1943); **39**, 408 (1945).

⁵⁾ *Breusch*, *Z. physiol. Ch.* **250**, 262 (1937); *Biochem. J.* **33**, 1757 (1939); *Thomas*, *Enzymol.* **7**, 231 (1939); *Banga*, *Achoa* und *Peters*, *Biochem. J.* **33**, 1980 (1939); *Martius*, *Ergebn. Enzymf.* **8**, 247 (1939); *Evans* und *Slotin*, *J. Biol. Chem.* **136**, 301 (1940); *Wood*, *Werkmann*, *Hemingway* und *Nier*, *J. Biol. Chem.* **139**, 483 (1941); *Evans* und *Slotin*, *J. Biol. Chem.* **141**, 439 (1941); *Stare*, *Lipton*, *Goldinger*, *J. Biol. Chem.* **141**, 981 (1941); *Breusch*, *Enzymol.* **10**, 165 (1942); *Sci.* **97**, 490 (1943).

⁶⁾ *Helv.* **29**, 216 (1945).

⁷⁾ *Z. physiol. Ch.* **236**, 1 (1935).

die eine sehr intensive Sauerstoffzehrung aufweisen können. Vergleichende Untersuchungen haben ergeben, dass die Aktivität dieser Extrakte derjenigen von Gewebsschnitten entsprechen oder sie sogar übertreffen kann. Es konnte nun gezeigt werden, dass die am Citronensäurecyclus beteiligten Substanzen die Atmungsgrösse so bereiteter Rattenleberextrakte stark zu aktivieren vermögen. Die katalytische Wirksamkeit dieser Stoffe konnte dadurch sehr deutlich gemacht werden, indem sich die Versuchsbedingungen finden liessen, unter welchen zugesetztes Substrat nur bei Gegenwart eines Aktivators abgebaut wurde. Es liess sich aber auch zeigen, dass unter anderen experimentellen Bedingungen der Substratabbau nur bei gleichzeitigem Zusatz von *l*-Histidin erfolgte, so dass sowohl eine Komponente des Citronensäurecyclus als auch eine Aminosäure als notwendige Bestandteile des Enzymsystems in Erscheinung treten.

Experimenteller Teil.

1. Methoden:

Schon in der ersten Mitteilung (l. c.) wurde auf die Empfindlichkeit des Extraktes hingewiesen und hervorgehoben, dass nur während kurzer Zeit zentrifugiert werden soll. Es hat sich nun weiterhin gezeigt, dass ausser der Dauer des Zentrifugierens vor allem auch die angewandte Tourenzahl für die Aktivität des Extraktes von Bedeutung ist. Die mikroskopische Kontrolle der Präparate hat ergeben, dass die Wirksamkeit des Extraktes an die Zellerümmern gebunden ist. Um möglichst konstante Vergleichswerte zu erzielen, wurde deshalb die Bereitung des Extraktes in der folgenden Weise normiert: Die Organe des durch Kopfschlag getöteten Tieres werden möglichst rasch isoliert und im eiskalten Mörser mit der gleichen Gewichtsmenge Seesand während zwei Minuten verrieben.

Nach Zugabe der eiskalten Phosphatpufferlösung vom $p_H = 8,0$ ($1/3$ des Organengewichts) wird der Brei im Mörser während $1\frac{1}{2}$ Minuten suspendiert und anschliessend sofort zentrifugiert. Die Zentrifuge wird in 2—3 Stufen rasch auf ca. 2000 Touren pro Minute gebracht, so während 10 Sekunden belassen und sofort wieder ausgeschaltet. Der Extrakt, eine relativ stabile Zelltrümmersuspension, wird in einen *Erlenmeyer*-Kolben abgossen, wobei zu verhindern ist, dass der evtl. vorhandene Schaum mitverwendet wird. Die Verteilung des Extraktes in die einzelnen *Warburg*-Gefässe geschieht mittels Pipette von weiter Ausflussöffnung. Vor dem Pipettieren wird die Suspension jedesmal kräftig umgeschwenkt. Unter Beachtung dieser Kautelen gelingt es bei Verwendung von gleichwertigem Tiermaterial, gut reproduzierbare Vergleichswerte zu erhalten. Es hat sich immer wieder bestätigt (l. c.), dass Substrat und Effektor gleich zu Beginn des Versuches dem Enzym beigegeben werden müssen, weil sonst der Extrakt im Verlauf der Temperaturengleichperiode vollständig inaktiviert wird.

Der Sauerstoffverbrauch wurde nach der *Warburg*'schen Methode gemessen. Die Ammoniakbildung wurde nach *Conway* bestimmt. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen betrug in allen Ansätzen 3 cm^3 . Es wurde ausschliesslich Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ verwendet. Als weitere Methode gelangte die Brenztraubensäurebestimmung nach *Straub*¹⁾ zur Anwendung. Weitere methodische Einzelheiten sind in den früheren Mitteilungen beschrieben.

2. Beziehungen der Aminosäurekatalyse zur Fumarsäurekatalyse.

Aus den in der letzten Mitteilung (l. c.) angeführten Versuchsergebnissen geht hervor, dass Aminosäuren den Sauerstoffverbrauch von Organextrakten auf ca. den

¹⁾ Z. physiol. Ch. **244**, 117 (1936).

zehnfachen Wert zu aktivieren vermögen. In analogen Versuchen konnte nun der Nachweis erbracht werden, dass Fumarsäure, in geringen Konzentrationen den Extrakten zugesetzt, in ganz ähnlicher Weise wirken kann. Frühere Untersuchungen über die *d*-Aminosäure-oxydase¹⁾ hatten ergeben, dass die Effektorenwirkung entscheidend von der Enzymkonzentration abhängig ist. Es wurde deshalb die aktivierende Wirkung von Fumarsäure einerseits und Histidin andererseits bei fallenden Enzymkonzentrationen untersucht.

a) Enzymkonzentration I.

Konzentrierter Extrakt zeigt ohne Substratzusatz nur eine relativ geringe Leeratmung. Zugeseetzte Brenztraubensäure bewirkt eine starke Zunahme des Sauerstoffverbrauchs. Zusatz von *l*-Histidin oder Fumarsäure hat keine weitere wesentliche Steigerung des Sauerstoffverbrauchs zur Folge.

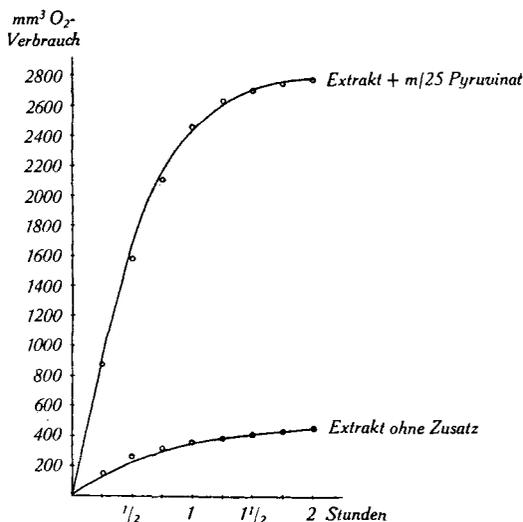


Fig. 1.

Rattenleberextrakt 4; 1,5 cm³.

Tabelle 1.

♀ Ratten, ca. 1 Jahr alt.

Versuchsdauer: = 1 Stunde.

A

Leberextrakt Nr. 1	Pyruvat Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm ³ O ₂ -Verbrauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert
2 cm ³			490	
2 cm ³	m/25		1370	880
2 cm ³		m/100	616	126
2 cm ³	m/25	m/100	1315	825

¹⁾ Helv. **28**, 797, 1111 (1945); **29**, 162 (1946).

B

Versuchsdauer = 1 Stunde.

Leber- extrakt Nr. 2	Pyruvinat Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm ³ O ₂ - Verbrauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert
1,5 cm ³			370	
1,5 cm ³	m/25		2805	2435
1,5 cm ³		m/100	605	235
1,5 cm ³	m/25	m/100	2695	2325

C

Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt Nr. 3	Pyruvinat Mol.	Fumarsäure Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm ³ O ₂ - Verbrauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert
1,5 cm ³				593	
1,5 cm ³	m/25			3175	2585
1,5 cm ³		m/500		638	45
1,5 cm ³			m/100	682	98
1,5 cm ³	m/25	m/500		3580	2387
1,5 cm ³	m/25		m/100	4085	3492

D

Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt Nr. 4	Pyruvinat Mol.	<i>l</i> -Histidin Mol.	mm ³ O ₂ - Verbrauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert
1,5 cm ³			449	
1,5 cm ³	m/25		2790	2341
1,5 cm ³		m/100	453	4
1,5 cm ³	m/25	m/100	2498	2049

b) Enzymkonzentration II.

Bei Verwendung einer kleineren Extraktkonzentration wird die Leeratmung durch den Zusatz der Brenztraubensäure kaum beeinflusst. Wird jedoch dem System eine geringe Menge Fumarsäure zugegeben, so erfolgt ein kräftiger Substratabbau, wie das nach den Untersuchungen von *Szent Györgyi* (l. c.) zu erwarten war. Die Tatsache, dass unter den hier gewählten Versuchsbedingungen ohne Fumarsäure kein oxydativer Abbau der Brenztraubensäure erfolgt, spricht für die grosse Bedeutung dieser Substanz als Atmungskatalysator. Es zeigte sich nun aber auch, dass das *l*-Histidin in ganz analoger Weise wirken kann. Ohne Histidinzusatz bewirkt Brenztraubensäure keine nennenswerte Steigerung des Sauerstoffverbrauchs. Bei Gegenwart der Aminosäure erfolgt ein intensiver Abbau der Brenztraubensäure. Die Fumarsäure lässt sich demnach durch das *l*-Histidin ersetzen. Werden Fumarsäure und *l*-Histidin zusammen zugesetzt, so erfolgt unter diesen Versuchsbedingungen keine weitere Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs.

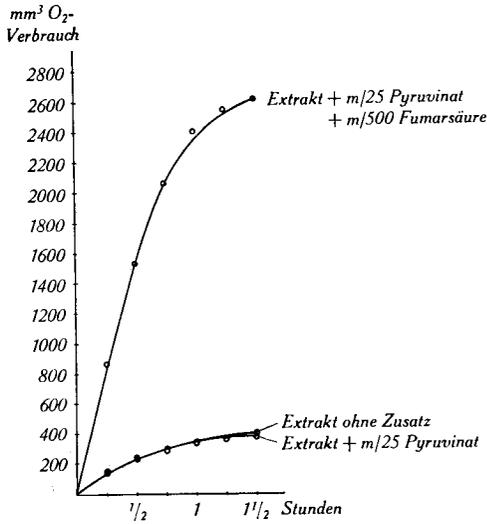


Fig. 2.

Rattenleberextrakt 7; 1,2 cm³.

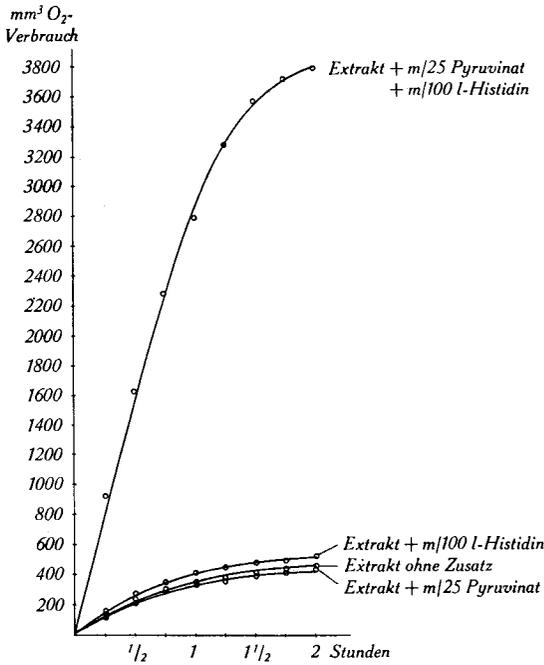


Fig. 3.

Rattenleberextrakt 5; 1,5 cm³.

Tabelle 2.

♀ Ratten, ca. 1 Jahr alt.

A

Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt Nr. 5	Pyru- vinat Mol.	Fumar- säure Mol.	l-Histi- din Mol.	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivie- rung bedingt	Pyru- vinat oxydativ abge- baut
1,5 cm ³				463			
1,5 cm ³	m/25			441	- 22		
1,5 cm ³		m/500		490	27		
1,5 cm ³			m/100	526	63		
1,5 cm ³	m/25	m/500		2755	2292	2287	m/125
1,5 cm ³	m/25		m/100	3780	3317	3276	m/52
1,5 cm ³	m/25	m/500	m/100	3910	3447	3379	m/50

B

Versuchsdauer = 1 ½ Stunden

Leber- extrakt Nr. 6	Pyru- vinat Mol.	Fumar- säure Mol.	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivierung bedingt	Pyruvinat oxydativ abgebaut
1,2 cm ³			353			
1,2 cm ³	m/25		425	72		
1,2 cm ³	m/25	m/500	2505	2152	2080	m/76

C

Versuchsdauer = 1 ½ Stunden.

Leber- extrakt Nr. 7	Pyruvinat Mol.	Fumarsäure Mol.	mm ³ O ₂ - Verbrauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivierung bedingt
1,2 cm ³			401		
1,2 cm ³	m/25		389	- 12	
1,2 cm ³	m/25	m/500	2615	2214	2226

Tabelle 3.

♀ Ratten, ca. 1 Jahr alt.

A

Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt Nr. 8	Pyru- vinat Mol.	l-Histi- din Mol.	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivierung bedingt	Pyruvinat oxydativ abgebaut
1,0 cm ³			333			
1,0 cm ³	m/25		355	22		
1,0 cm ³		m/100	365	32		
1,0 cm ³	m/25	m/100	1095	762	708	m/82

B
Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt Nr. 9	Pyru- vinat Mol.	<i>l</i> -Histi- din Mol.	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivie- rung bedingt	Pyruvinat oxydativ abgebaut
1,0 cm ³			303			
1,0 cm ³	m/25		364	61		
1,0 cm ³		m/100	327	24		
1,0 cm ³	m/25	m/100	1870	1567	1482	m/54

C
Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt Nr. 5	Pyru- vinat Mol.	<i>l</i> -Histi- din Mol.	Fumar- säure Mol.	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivie- rung bedingt	Pyru- vinat oxydativ abge- baut
1,5 cm ³				463			
1,5 cm ³	m/25			441	- 22		
1,5 cm ³		m/100		526	63		
1,5 cm ³	m/25	m/100		3780	3317	3276	m/52
1,5 cm ³	m/25	m/100	m/500	3910	3447	3379	m/50

c) Enzymkonzentration III.

Durch weitere Herabsetzung der Extraktkonzentration bleibt die Atmungsgrösse auch bei gleichzeitigem Zusatz von Brenztraubensäure und Fumarsäure oder von *l*-Histidin anstelle der Fumarsäure unverändert. Werden jedoch alle drei Komponenten, d. h. Brenztraubensäure, Fumarsäure und *l*-Histidin dem Extrakt zugesetzt, so erfolgt der intensive Abbau der Brenztraubensäure.

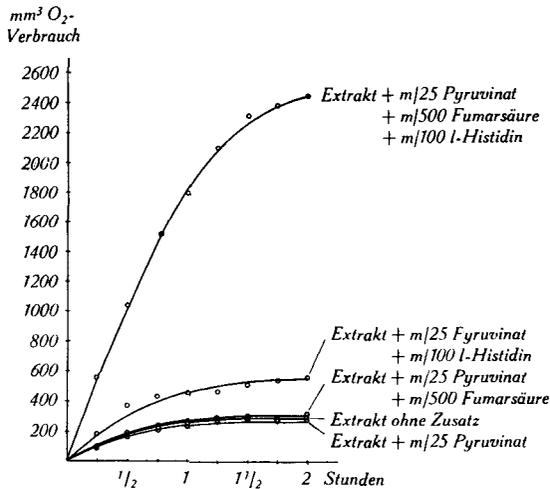


Fig. 4.

Rattenleberextrakt 10; 1 cm³.

Tabelle 4.
Rattenleber.
Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt	Pyru- vinat Mol.	Fumar- säure Mol.	l-Histi- din Mol.	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivie- rung bedingt	Pyru- vinat oxydativ abge- baut
Nr. 10							
1,0 cm ³				303			
1,0 cm ³	m/25			292	- 11		
1,0 cm ³		m/500		340	37		
1,0 cm ³			m/100	400	97		
1,0 cm ³	m/25	m/500		315	12	- 14	
1,0 cm ³	m/25		m/100	552	249	163	
1,0 cm ³	m/25	m/500	m/100	2435	2132	2009	m/66
Nr. 11							
1,0 cm ³				274			
1,0 cm ³	m/25			283	9		
1,0 cm ³		m/500		313	39		
1,0 cm ³			m/100	310	36		
1,0 cm ³	m/25	m/500		510	236	188	
1,0 cm ³	m/25		m/100	607	333	288	
1,0 cm ³	m/25	m/500	m/100	1640	1366	1282	m/114
Nr. 12							
1,0 cm ³				384			
1,0 cm ³	m/25			360	- 24		
1,0 cm ³		m/500		400	16		
1,0 cm ³			m/100	425	41		
1,0 cm ³	m/25	m/500		434	50	58	
1,0 cm ³	m/25		m/100	579	195	178	m/147
1,0 cm ³	m/25	m/500	m/100	1984	1600	1567	m/60
Nr. 8							
1,0 cm ³				333			
1,0 cm ³	m/25			355	22		
1,0 cm ³		m/500		361	28		
1,0 cm ³			m/100	365	32		
1,0 cm ³	m/25	m/500		425	92	42	
1,0 cm ³	m/25		m/100	1095	762	708	m/82
1,0 cm ³	m/25	m/500	m/100	1810	1477	1395	m/51

3. Der Abbau von Brenztraubensäure, Milchsäure und α-Glycerophosphat durch Leberextrakt.

Die Ergebnisse früherer Untersuchungen (l. c.) liessen vermuten, dass die Brenztraubensäure durch zellfreie Extrakte oxydativ abgebaut würde. Durch die Bestimmung der Brenztraubensäure liess sich nun eindeutig nachweisen, dass der Sauerstoffverbrauch mit dem Schwund der Brenztraubensäure parallel verläuft. Aus dem Vergleich der verbrauchten Sauerstoffmenge und der verschwundenen Brenztraubensäure ist ersichtlich

(Tabelle 5), dass *l*-Histidin oder Fumarsäure nicht bloss eine einfache Dehydrierung der Brenztraubensäure katalysiert, sondern dass die Brenztraubensäure bis zu den Oxydationsendprodukten, Kohlendioxyd und Wasser, abgebaut werden kann. *Szent Györgyi* und *Annau*¹⁾ haben aus Aktivierungsversuchen mit Fumarsäure bei Verwendung von Leberbrei vermutet, dass die Brenztraubensäure nur zur Essigsäure dehydriert würde. Aus den mitgeteilten Versuchsergebnissen ist ersichtlich, dass ihre Präparate eine viel geringere Aktivität aufwiesen. Möglicherweise ist die Diskrepanz der Ergebnisse auf diesen Umstand zurückzuführen.

Tabelle 5.
Rattenleber.

Leber- extrakt	Zusatz	mm ³ O ₂ - Verbrauch abzüglich Leerwert	Pyruvinat oxydativ abgebaut*)	Pyruvinat- konz. äquivalent dem O ₂ - Verbrauch**)
Nr. 6 1,20 cm ³	Pyruvinat m/25 + Fumarsäure m/500	2152	m/76	m/78
Nr. 8 1,0 cm ³	Pyruvinat m/25 + <i>l</i> -Histidin m/100	762	m/82	m/220
Nr. 9 1,0 cm ³	Pyruvinat m/25 + <i>l</i> -Histidin m/100	1567	m/54	m/107
Nr. 10 1,0 cm ³	Pyruvinat m/25 + Fumarsäure m/500 + <i>l</i> -Histidin m/100	2297	m/66	m/73
Nr. 11 1,0 cm ³	Pyruvinat m/25 + Fumarsäure m/500 + <i>l</i> -Histidin m/100	1366	m/114	m/123

*) Durch die Brenztraubensäure-Bestimmung nach *Straub* ermittelt.

***) Berechnung aus dem Sauerstoffverbrauch unter der Annahme, dass Pyruvinat zu den Oxydationsendprodukten (Kohlendioxyd und Wasser) abgebaut wird.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Brenztraubensäure unter Umständen bis zu den Oxydationsendprodukten (Kohlendioxyd und Wasser) oxydiert werden kann (Nr. 6 und Nr. 11).

Die Ausdehnung dieser Untersuchungen auf andere Substrate hat ergeben, dass sich der Abbau von Milchsäure und α -Glycerophosphat in ganz analoger Weise durch Fumarsäure und Histidin aktivieren lässt. Die verbrauchten Sauerstoffmengen übersteigen auch in diesen Fällen bei weitem diejenige Menge, die durch einfache Dehydrierung dieser Substanzen benötigt würde. Es muss deshalb angenommen werden, dass nicht nur der Abbau der C₃-Verbindungen, sondern auch derjenige ihrer Oxydationsprodukte durch Fumarsäure und *l*-Histidin katalysiert wird.

¹⁾ Z. physiol. Ch. **244**, 145 (1936).

Tabelle 6.
Rattenleber.
Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt	Milch- säure	<i>l</i> -Histi- din	Fumar- säure	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	mm ³ O ₂ durch Aktivierung bedingt
Nr. 14						
1,0 cm ³				316		
1,0 cm ³	m/25			428	112	
1,0 cm ³		m/100		348	32	
1,0 cm ³			m/500	344	28	
1,0 cm ³	m/25	m/100		995	679	535
1,0 cm ³	m/25		m/500	1490	1174	1034
1,0 cm ³	m/25	m/100	m/500	1600	1284	1112
Nr. 15	α -Glycero- phosph.					
1,0 cm ³				303		
1,0 cm ³	m/25			367	64	
1,0 cm ³	m/25	m/100		427	124	60
1,0 cm ³	m/25		m/500	405	102	38
1,0 cm ³	m/25	m/100	m/500	1470	1167	1103

4. Beziehungen der Aminosäurekatalyse zu weiteren Komponenten des Citronensäurecyclus.

Ausgedehnte Untersuchungen haben ergeben, dass alle anderen uns zugänglichen Zwischenprodukte des Citronensäurecyclus, nämlich Apfelsäure, Bernsteinsäure, Oxal-essigsäure, Ketoglutaräure und Citronensäure sich der Fumarsäure analog verhalten. Es hat sich demnach gezeigt, dass sie entweder allein oder im Verein mit *l*-Histidin den Abbau der Brenztraubensäure zu katalysieren vermögen. Die Aktivierungseffekte sind wiederum in typischer Weise von der Konzentration des Organextraktes abhängig: Bei Verwendung von relativ grossen Extraktkonzentrationen sind die einzelnen Komponenten allein schon wirksam, während nach Verringerung der Konzentration die typischen Aktivierungseffekte nur bei gleichzeitigem Zusatz von *l*-Histidin erfolgen.

5. Zur Atmungsgrösse der Leberextrakte.

Aus allen den hier mitgeteilten Beobachtungen ist wohl deutlich ersichtlich, dass die aktivierten Leberextrakte hohe Atmungsgrössen aufweisen. Der Vergleich des Q_{O_2} ($\frac{\text{mm}^3 \text{ O}_2 \text{ in mm}^3}{\text{h} \cdot \text{mg Trockengewicht}}$) von Rattenleberschnitten mit dem Q_{O_2} der aktivierten Rattenleberextrakte ergibt, dass letztere eine 2—3mal grössere Aktivität aufweisen können. Nach Angaben von *O. Warburg* und *Minami*¹⁾ beträgt der Q_{O_2} von Rattenleberschnitten im Durchschnitt 10. Der entsprechende Quotient der aktivierten Extrakte kann Werte bis zu 30 erreichen. Im Gegensatz dazu beträgt die Aktivität der nicht aktivierten Extrakte nur einen Bruchteil derjenigen der zellgebundenen Atmung.

6. Hemmungsversuche mit Kaliumcyanid.

In der letzten Mitteilung (l. c.) wurden einige Versuchsergebnisse über die hemmende Wirkung des Cyanions mitgeteilt. In weiteren Untersuchungen liess sich nun feststellen, dass die Atmung des nicht aktivierten Extraktes sich in dieser Hinsicht auch gegenüber dem durch Fumarsäure und Histidin bedingten Atmungsanteil verschieden verhält.

¹⁾ Biochem. Z. **142**, 317 und 334 (1923).

Der Sauerstoffverbrauch des nichtaktivierten Extraktes lässt sich durch 0,001 Kaliumcyanid auf ca. die Hälfte reduzieren, während die durch Histidin und Fumarsäure bedingte zusätzliche Atmungsgrösse durch 0,001 Kaliumcyanid fast vollständig hemmbar ist. Es ist bekannt, dass die zellgebundene Atmung tierischer Gewebe durch Blausäure stärker gehemmt wird als diejenige der entsprechenden Extrakte. Der aktivierte Anteil der Extraktatmung verhält sich demnach in dieser Hinsicht der zellgebundenen Atmung ähnlich.

Tabelle 7.

Rattenleber.

Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt	Pyru- vinat	Effektor	Konz.	mm ³ O ₂ -Ver- brauch	mm ³ O ₂ ab- züglich Leer- wert	mm ³ O ₂ durch Akti- vierung be- dingt	Pyru- vinat oxy- dativ abge- baut
Nr. 13							
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin	m/100	317			
1,0 cm ³				344	27		
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin	m/100	308	- 9		
1,0 cm ³				705	388	370	
1,0 cm ³	m/25	Fumarsäure	m/500	328	11		
1,0 cm ³		Fumarsäure	m/500	404	87	49	
		Fumarsäure+					
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin		2120	1803	1774	m/61
1,0 cm ³	m/25	α-Ketoglutar-säure	m/500	336	19		
1,0 cm ³			m/500	434	117	71	
		α-Ketoglutar-säure +					
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin		1980	1663	1626	m/59
1,0 cm ³	m/25	Bernsteinsäure	m/500	335	18		
1,0 cm ³		Bernsteinsäure	m/500	350	33	- 12	
		Bernsteinsäure+					
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin		2025	1708	1672	m/59
1,0 cm ³	m/25	Citronensäure	m/500	373	56		
1,0 cm ³			m/500	456	139	56	
		Citronensäure+					
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin		1980	1663	1589	m/62
1,0 cm ³	m/25	Apfelsäure	m/500	328	11		
1,0 cm ³			m/500	384	94	56	
		Apfelsäure+					
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin		1947	1630	1601	m/61
1,0 cm ³	m/25	Oxalessigsäure	m/500	327	10		
1,0 cm ³			m/500	1032	715	682	m/147
		Oxalessigsäure+					
1,0 cm ³	m/25	l-Histidin		1737	1480	1452	m/62

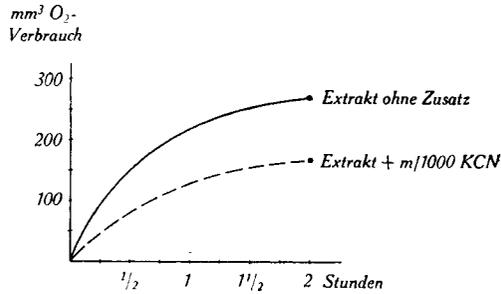


Fig. 5.

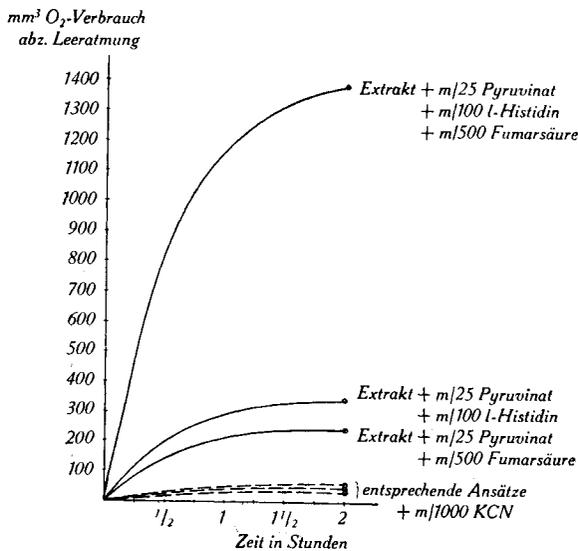
Rattenleberextrakt 11; 1 cm^3 .

Fig. 6.

Rattenleberextrakt 11; 1 cm^3 .

7. Die Abhängigkeit der Aktivierungseffekte von der Stoffwechsellage der Tiere.

Auf Grund der Tatsache, dass die Leber als Glykogenspeicher hinsichtlich ihrer stofflichen Zusammensetzung grossen Schwankungen unterliegt, war zu erwarten, dass die Aktivierungseffekte wesentlich von der Stoffwechsellage der Tiere abhängen. Es hat sich auch gezeigt, dass Organe von Hungertieren sich von denjenigen von normal ernährten Tieren sehr verschieden verhalten. Organextrakte von Hungertieren zeigen mit zunehmender Dauer der Karenzzeit ein Absinken der Leeratmung. Im Verlauf der Hungerperiode treten dadurch die Aktivierungseffekte immer deutlicher in Erscheinung. Dieses Verhalten spricht für die Annahme, dass das Absinken der Atmungsgrösse durch die Verminderung von Substrat und katalytisch wirkenden Substanzen bedingt ist, so dass erst nach ihrer Zugabe die Atmung wieder optimal einsetzen kann.

Tabelle 8.
Meerschweinchen.
 Versuchsdauer = 2 Stunden.

Leber- extrakt	Pyru- vinat	Apfel- säure	Fumar- säure	d-Histi- din	mm ³ O ₂ - Ver- brauch	mm ³ O ₂ abzüglich Leerwert	Aktivie- rung Prozent
Tiere nicht gehungert							
1,0 cm ³					1075		
1,0 cm ³	m/25				1725	650	
1,0 cm ³		m/500			1170	95	
1,0 cm ³			m/500		1365	290	
1,0 cm ³				m/100	1440	365	
1,0 cm ³	m/25	m/500			1740	665	0
1,0 cm ³	m/25		m/500		1685	610	0
1,0 cm ³	m/25			m/100	1710	635	0
1,0 cm ³	m/25	m/500		m/100	1685	610	0
1,0 cm ³	m/25		m/500	m/100	1705	630	0
48 Stunden Hunger							
1,0 cm ³					660		
1,0 cm ³	m/25				1550	890	
1,0 cm ³		m/500			693	33	
1,0 cm ³			m/500		805	145	
1,0 cm ³				m/100	1235	575	
1,0 cm ³	m/25	m/500			2025	1365	31
1,0 cm ³	m/25		m/500		1905	1245	23
1,0 cm ³	m/25			m/100	2200	1540	42
1,0 cm ³	m/25	m/500		m/100	1993	1333	29
1,0 cm ³	m/25		m/500	m/100	1950	1290	26
72 Stunden Hunger							
1,0 cm ³					410		
1,0 cm ³	m/25				775	365	
1,0 cm ³		m/500			548	138	
1,0 cm ³			m/500		555	145	
1,0 cm ³				m/100	526	116	
1,0 cm ³	m/25	m/500			1421	1011	83
1,0 cm ³	m/25		m/500		1498	1088	93
1,0 cm ³	m/25			m/100	1308	898	69
1,0 cm ³	m/25	m/500		m/100	1590	1180	105
1,0 cm ³	m/25		m/500	m/100	1650	1240	113

Aus den oben mitgeteilten Versuchsergebnissen (Tabelle 1—4, Figur I—IV) geht hervor, dass geringe Änderungen der Extraktkonzentrationen grosse Unterschiede der Aktivierungsgrösse bedingen können, so dass eine Substanz, wie oben dargelegt, einerseits eine kräftige katalytische Wirkung entfalten kann, währenddem sie andererseits bei ganz geringer Herabsetzung der Extraktkonzentration als unwirksam erscheint. Weiterhin hat sich gezeigt, dass ausser der Stoffwechsellage auch Altersunterschiede der Tiere eine Modifikation der Aktivierungseffekte verursachen können. Organextrakte junger Tiere zeigen in kleineren Konzentrationen die typischen Steigerungseffekte als solche alter Tiere. Wenn ausserdem die Empfindlichkeit der wirksamen Extrakte berücksichtigt wird, so ist wohl klar ersichtlich, dass nur unter sehr konstanten Versuchsbedingungen gut reproduzierbare Werte zu erwarten sind, und dass es nicht ohne Vorversuche gelingen kann, einen ganz bestimmten Effekt zu erzielen. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, jeweils eine grössere Anzahl von Tieren aus der gleichen Zucht längere Zeit unter genau gleichen Lebensbedingungen zu halten, und sie jeweils nach 24-stündiger Hungerperiode zu verwenden. Vergleichende Versuche mit abgestuften Extraktkonzentrationen ermöglichen dann, einen Überblick über die Reaktionsweise der jeweils verwendeten Tiergruppe zu erhalten. So war es in der Folge möglich, jeden typischen Einzelfall sofort zu reproduzieren.

Besprechung der Ergebnisse.

Mit früheren (l. c.) und den hier mitgeteilten Untersuchungen liess sich der Nachweis erbringen, dass Aminosäuren die Atmung tierischer Gewebe zu aktivieren vermögen. Es konnte auch bestätigt werden, dass die Komponenten des Citronensäurecyclus in ähnlicher Weise wirken. Von entscheidender Bedeutung erscheint die Tatsache, dass unter bestimmten experimentellen Bedingungen zellfreie Gewebssuspensionen nur in Gegenwart dieser Aktivatoren imstande sind, zugesetzte Substrate abzubauen. Unter den so gewählten Versuchsbedingungen erscheinen diese Aktivatoren demnach als obligate Bestandteile des Enzymsystems. Die zur Wirkung nötige Konzentration der Aktivatoren liegt durchaus im Bereich der physiologischen Verhältnisse. Dass ausser den Aminosäuren auch die übrigen Aktivatoren in der wirksamen Konzentration vorhanden sind, haben *Annau* und *Erdös*¹⁾ für den Fall der Bernsteinsäure nachgewiesen. Aus 600 kg Schweinenieren haben sie 3 g Bernsteinsäure isolieren können. Alle diese Tatsachen sprechen für die Annahme, dass die Aminosäuren und die Komponenten des Citronensäurecyclus auch im Leben als Atmungskatalysatoren wirksam sind, und dass sie durch gemeinsames Zusammenwirken die Stoffwechselvorgänge regulieren können.

*Warburg*²⁾ hat in grundlegenden Arbeiten die Bedeutung der Struktur für die enzymatischen Atmungsvorgänge dargelegt. Es ist vor allem den Untersuchungen *Keilin's*³⁾ und *Theorell's*⁴⁾ zu ver-

¹⁾ Z. physiol. Ch. **257**, 111 (1938).

²⁾ O. *Warburg*, Über die katalytischen Wirkungen der lebenden Substanz, Berlin 1928.

³⁾ Proc. Roy. Soc. [B] **106**, 418 (1930); **122**, 298 (1932); **129**, 277 (1940); Biochem. J. **39**, 289 (1945).

⁴⁾ Bioch. Z. **279**, 463 (1935); **285**, 207 (1936); **298**, 242 (1939); Sci. **90**, 67 (1939); Am. Soc. **63**, 1804, 1812, 1818, 1820 (1941).

danken, dass einzelne an der Hauptatmung beteiligte Hämifermente als lösliche Stoffe von der Zellstruktur abgetrennt werden konnten. Da es jedoch bisher nicht gelungen ist, alle an der Atmung beteiligten Hämifermente in wirksamer Form von der strukturierten Substanz abzulösen, so bleibt die Frage offen, ob die Struktur essentiell am Atmungsvorgang beteiligt ist, wie es *O. Warburg* ursprünglich angenommen hat, indem er die Zellstrukturen mit der Oberflächenkatalyse in Beziehung brachte (l. c.), oder ob die Strukturgebundenheit nur eine zufällige Erscheinung ist, weil einzelne Komponenten sich nicht isolieren lassen. Andererseits ist jedoch nicht zu übersehen, dass durch die Zerstörung der Zelle die Atmung tierischer Gewebe auf einen Bruchteil der ursprünglichen Intensität herabgesetzt wird, und dass auch spezifische Einzelleistungen verlorengehen können. Leberbrei und Leberextrakt in der üblichen Weise präpariert, zeigen im Vergleich zum intakten Gewebe eine stark herabgesetzte Atmungsgrösse und sind nicht mehr befähigt, diejenigen Substrate zu oxydieren, die das unversehrte Organ mit grosser Intensität abzubauen vermag. Die Tatsache, dass solche zellfreien Organpräparate gegenüber Blausäure weit weniger empfindlich sind als das intakte Gewebe, zeigt auch, dass die Zerstörung der Zellen eine Änderung der Reaktionsweise zur Folge hat.

Es liess sich nun aber zeigen, dass zellfreie Extrakte sich dem intakten Gewebe weitgehend ähnlich verhalten können, wenn sie in ganz nativem Zustand zur Untersuchung gelangen und wenn ihnen sofort Substrat und Effektoren beigegeben werden. Diese aktivierten Extrakte zeigen analog dem zellgebundenen Enzymsystem eine grosse Sauerstoffzehrung. Brenztraubensäure, Milchsäure und α -Glycerophosphat werden intensiv abgebaut. In Übereinstimmung mit dem Verhalten des intakten Gewebes ist diese Extraktatmung stark blausäureempfindlich.

Diese Tatsachen scheinen geeignet, auf die Zellgebundenheit enzymatischer Vorgänge neues Licht zu werfen: Die intermediären Atmungsvorgänge erweisen sich je länger desto mehr als äusserst komplexes System vieler enzymatischer Einzelreaktionen. Während bisher die Zellstruktur mit der Erscheinung der Oberflächenkatalyse in Beziehung gebracht wurde, soll in diesem Zusammenhang diejenige Funktion der Zellstruktur hervorgehoben werden, die ein geordnetes Zusammenwirken der Einzelreaktionen ermöglicht. Die Zerstörung der Zelle hat eine Störung des Systems zur Folge. Durch die Bereitung von Extrakten werden die Zellinhalte so verdünnt, dass unter Umständen die zur Wirkung nötige Konzentration einzelner Komponenten unterschritten wird. Durch Zusatz von Aminosäuren und den übrigen katalytisch wirkenden Substanzen setzen die Abbauvorgänge wieder ein, und die so erreichte Reaktionsweise entspricht

derjenigen des intakten Gewebes. Es scheint demnach, dass das Enzymsystem so zu einer Konstellation komplettiert wird, wie sie sich ähnlich auch in der unversehrten Zelle vorfindet. Die Tatsache, dass durch minimale Änderung der Konzentration die Abbauvorgänge sich experimentell entscheidend modifizieren lassen, lässt vermuten, dass solche Mechanismen auch den Stoffwechsel der Zelle regulieren können.

Wenn auch die Übertragung von Schlussfolgerungen aus in-vitro-Versuchen auf den lebenden Organismus nicht vorbehaltlos zulässig ist, so scheinen doch die mitgeteilten Versuchsergebnisse auf die folgenden allgemeinen Zusammenhänge hinzuweisen: Da alle untersuchten katalytisch wirkenden Stoffe den Charakter von Metaboliten oder Plasmabausteinen besitzen, ist es wohl unmöglich, diese Arten von Substanzen von den Wirkstoffen scharf abzugrenzen. Es erscheint somit sehr wahrscheinlich, dass der Einteilung physiologisch wirkender Substanzen in Plasmabausteine, Metabolite und Wirkstoffe keine allgemeine Bedeutung zukommt, sondern dass sie nur für gewisse Extremfälle Gültigkeit hat. Die Tatsache, dass die katalytischen Effekte in vitro von geringfügigen Konzentrationsunterschieden oder von der Stoffwechsellage der Tiere abhängig sind, deuten darauf hin, dass die Funktion eines Stoffes sich auch in vivo mit der Reaktionslage des Organismus ändern kann. Wenn nun ausserdem die grosse Anzahl der im Organismus wirkenden Stoffe berücksichtigt wird, ergibt sich eine beinahe unendliche Vielgestaltigkeit der Reaktionsweise. Es kann deshalb durchaus nicht überraschen, wenn die Abklärung der speziellen Reaktionsart einzelner Substanzen grosse Schwierigkeiten bereitet, vor allem dann, wenn nicht berücksichtigt wird, dass durch die Wahl verschiedener Versuchsbedingungen immer nur spezielle Einzelfälle festgehalten werden. Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse erscheint es möglich, dass die einleitend erwähnten Kontroversen hinsichtlich der speziellen Reaktionsweise der einzelnen Katalysatoren weitgehend ihrer Grundlage entbehren, und dass die scheinbar widersprechenden Beobachtungen nur auf die Vielgestaltigkeit der Reaktionsart zurückzuführen sind.

Frühere Untersuchungen (l. c. ¹⁾ ²⁾) an Reinenzymen haben ergeben, dass die Reaktionsart der *d*-Aminosäure und des Pepsins durch Aminosäuren und Begleitproteine entscheidend beeinflusst wird. Es wurde daraus geschlossen, dass die gereinigte Form des Enzyms nicht schlechthin dem Enzym als solchem gleichgesetzt werden darf, sondern dass es bloss eine Spielart des Komplexenzyms darstellt. Mit den hier mitgeteilten Beobachtungen wird diese Vorstellung weiter experimentell begründet.

¹⁾ Exper. 2, 1 (1946).

²⁾ Helv. 29, 237 (1946).

Zusammenfassung.

1. Fumarsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Oxalessigsäure, Ketoglutarinsäure und Citronensäure können als kräftige Aktivatoren den oxydativen Abbau von Brenztraubensäure, Milchsäure und Glycerophosphorsäure durch zellfreien Rattenleberextrakt katalysieren.

2. Unter bestimmten Versuchsbedingungen findet der oxydative Abbau der Substrate nur bei Gegenwart eines Aktivators statt.

3. Unter anderen Versuchsbedingungen werden die genannten Substrate erst abgebaut, wenn ausser einer Komponente des Citronensäurecyclus *l*-Histidin als Aktivator zugegen ist.

4. Der durch Aminosäure- oder Fumarsäurekatalyse bedingte Abbau von Brenztraubensäure kann sich bis zu den Oxydationsendprodukten, Kohlendioxyd und Wasser, erstrecken.

5. Die Aktivierungseffekte sind in entscheidendem Masse von der Stoffwechsellage des Organs abhängig.

Herrn Prof. *Edlbacher*, der die Anregung zu diesen Untersuchungen gegeben hat, sei auch an dieser Stelle für seine Ratschläge bestens gedankt.

Frl. *Frieda Nebiker* danke ich für die sorgfältige Durchführung der Versuche.

Basel, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

108. Versuche zur Reinigung der Histidase

von **Ch. J. Morel.**

(10. V. 46.)

In der Arbeit von *S. Edlbacher* und *G. Viollier*¹⁾ wurde eine Adsorptionsmethode beschrieben, nach der es gelang, die in der Leber vorkommenden Enzyme Histidase und Urocaninase zu trennen. Das auf diese Weise gewonnene Präparat war nun ohne Wirkung auf die Urocaninsäure, enthielt aber immer noch Arginase. Eine Trennung von letzterer gelang auch durch wiederholte Adsorption mit dem damals verwendeten Bleiphosphat nicht.

In weiteren Untersuchungen haben sich nun fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen als ausschliessliches Reinigungsverfahren als ungeeignet erwiesen, weil Ammoniumsalze in hoher Konzentration die Bestimmung der Histidase- und der Arginasespaltprodukte stören, und weil dadurch die Sicherstellung eines arginasefreien Histidasepräparates erschwert ist. Durch Kombination der Adsorptions- und Fällungsmethode gelang es nun aber, diese Schwierigkeit

¹⁾ Z. physiol. Ch. **276**, 108 (1942).