

Zone total 75 mg eines farblosen Öls eluieren. Zersetzungsprodukte blieben in der Säule haften.

Die basische Hauptfraktion, die in Chloroform spezifische Drehwerte von $[\alpha]_D^{20} = -125^\circ$ bis -165° aufwies, konnte erst nach einer weiteren Reinigung über das neutrale Tartrat kristallisiert werden.

69 mg des Rohproduktes lieferten mit 23 mg D-Weinsäure in Methanollösung das neutrale Tartrat, das nach vorsichtigem Einengen zur Sirupkonsistenz und Zufügen von Aceton bis zur beginnenden Trübung in Nadeln (53 mg) kristallisierte. Die daraus freigesetzte Base kristallisierte nun aus Methanol beim Animpfen mit dem Decarboxylierungsprodukt aus Lysergsäure in Platten vom Smp. 172° (korr.). Ausbeute: 27 mg. Zur Analyse wurde die Substanz bei 155° im Hochvakuum sublimiert.

3,076 mg Subst. gaben 9,053 mg CO_2 und 2,019 mg H_2O

2,638 mg Subst. gaben $0,294 \text{ cm}^3 \text{ N}_2$ (19° , 746 mm)

$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2$ Ber. C 80,31 H 7,19 N 12,50%

Gef. „ 80,27 „ 7,34 „ 12,79%

$[\alpha]_D^{20} = -325^\circ$ ($c = 0,3$ in Chloroform)

Das Produkt ist in allen Eigenschaften identisch mit dem Decarboxylierungsprodukt aus Lysergsäure.

Zusammenfassung.

Die Aufhebung des Asymmetriezentrums am Kohlenstoffatom 8 durch β -Aminocarbonsäure-Spaltung ergibt ein identisches Lactam aus Lysergsäure und Isolysergsäure, was zur Formulierung dieser Isomeren als Diastereomere führt. Ihre hydrierbare Doppelbindung wird auf Grund des Vergleichs der Absorptionsspektren in Δ^{9-10} festgelegt. Der *Hofmann'sche* Abbau, die Decarboxylierung und die Hydrierung von Lysergsäure und Isolysergsäure werden in Übereinstimmung mit dieser Auffassung formuliert. Für den Mechanismus der reversiblen Lysergsäure-Isolysergsäure-Umlagerung wird eine Erklärung gegeben.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium „Sandoz“ Basel.

65. Über die Bildung von Alanin aus Brenztraubensäure und Histidin durch Leberextrakt¹⁾

von O. Wiss.

(I. II. 49.)

In einer früheren Arbeit²⁾ wurde von Untersuchungen über die Alaninbildung aus Brenztraubensäure und Ammoniumchlorid durch homogenisierte Rattenleber berichtet. Die Bildung ist abhängig von

¹⁾ Teilweise vorgetragen an der 30. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen (25. Januar 1947 in Fribourg).

²⁾ O. Wiss, Helv. **31**, 1189 (1948).

gleichzeitig verlaufenden Oxydationsvorgängen. In Stickstoffatmosphäre oder bei Zusatz von oxydationshemmenden Substanzen wie Kaliumcyanid oder Arsen trioxyd ist sie stark herabgesetzt. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass es sich um ein energetisch gekoppeltes Reaktionspaar handelt, wobei die Oxydation die Energie für die endergonisch verlaufende Aminierung liefert.

Wenn an Stelle von Ammoniumion Histidin mit Brenztraubensäure in der gleichen Versuchsanordnung zur Reaktion gebracht wird, wird ebenfalls Alanin gebildet. Der Nachweis erfolgte mit einer früher beschriebenen Bestimmungsmethode¹⁾ und durch Isolierung als β -Naphthalinsulfoverbindung.

Als Erklärung für diese Alaninbildung sind verschiedene Möglichkeiten in Betracht zu ziehen:

Brenztraubensäure könnte mit Histidin umaminiert werden, so dass neben dem Alanin Imidazolbrenztraubensäure gebildet würde. Aus neueren Untersuchungen²⁾ geht jedoch hervor, dass die Umaminierung auf wenige Aminosäuren beschränkt ist und dass Histidin nicht daran teilnimmt.

Nach *Edlbacher* und Mitarbeitern³⁾ entsteht in der Leber durch die Wirksamkeit der Histidase aus Histidin Glutaminsäure. Der Nachweis wurde durch Isolierung der Glutaminsäure erbracht. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass durch das Verfahren aus einem unbekanntem Abbauprodukt des Histidins Glutaminsäure künstlich erzeugt worden ist. *Tesar* und *Rittenberg*⁴⁾ haben durch Verfütterung von deuteriumhaltigem Histidin keine Anhaltspunkte für eine Glutaminsäurebildung erhalten; sie haben jedoch die Möglichkeit der Glutaminsäurebildung auf Grund ihrer Untersuchungen nicht ausschliessen können. Mit Hilfe der mikrobiologischen Methode konnten wir diese Glutaminsäurebildung aus Histidin bestätigen. Es hat sich ergeben, dass die Glutaminsäure mit zunehmendem Histidinabbau angereichert wird. Wenn auch damit kein sicherer Beweis für die Glutaminsäurebildung aus Histidin erbracht ist, so ist sie doch erheblich wahrscheinlicher geworden. Immerhin besteht auch in diesem Falle die Möglichkeit, dass der zur Bestimmung verwendete *Lactobacillus* an Stelle der Glutaminsäure eine unbekannte, stoffwechselverwandte Substanz verwerten kann. Wenn aus Histidin Glutaminsäure entsteht, so ist es möglich, dass die oben erwähnte Alaninbildung auf Umaminierung zwischen Brenztraubensäure und der aus Histidin entstandenen Glutaminsäure zurückzuführen ist. Vergleichende Versuche haben jedoch ergeben, dass Glutaminsäure in viel geringerem

¹⁾ *O. Wiss*, *Helv.* **31**, 22 (1948).

²⁾ *P. P. Cohen* und *G. L. Hekhuis*, *J. Biol. Chem.* **140**, 711 (1941); *D. E. Green*, *L. F. Leloir* und *V. Nocito*, *J. Biol. Chem.* **161**, 559 (1945).

³⁾ *S. Edlbacher* und *J. Kraus*, *Z. physiol. Ch.* **195**, 267 (1931).

⁴⁾ *Ch. Tesar* und *D. Rittenberg*, *J. Biol. Chem.* **170**, 35 (1947).

Masse als Alanin gebildet wird. Durch Zusatz von Brenztraubensäure wird ihre Bildung etwas herabgesetzt. Die Herabsetzung entspricht jedoch nur einem Bruchteil des gebildeten Alanins.

Es bleibt somit zur Erklärung der Alaninbildung eine dritte Möglichkeit: Die Brenztraubensäure wird mit Hilfe des durch Ringspaltung freigesetzten Ammoniaks zu Alanin aminiert. Für diese Annahme sprechen folgende Beobachtungen: Die gleichzeitige Bestimmung des Imidazol- und Ammoniakgehaltes in Vergleichsansätzen, von denen der eine Histidin und der andere Histidin und Brenztraubensäure enthält, zeigt, dass bei ungefähr gleicher Abnahme des Imidazols das messbare freie Ammoniak durch Zusatz von Brenztraubensäure stark verringert wird. Wird zu Leberextrakt Brenztraubensäure zugesetzt, so wird diese teilweise abgebaut; die Abnahme ist jedoch deutlich erhöht, wenn gleichzeitig Histidin zugegen ist. Der Aminostickstoffgehalt zeigt das umgekehrte Verhalten; Zusatz von Histidin zu Brenztraubensäure erhöht die Aminostickstoffwerte. Aus allen diesen Beobachtungen muss der Schluss gezogen werden, dass das Alanin aus Brenztraubensäure und dem durch die Histidase freigesetzten Ringstickstoff entsteht. In gleichem Sinne sprechen Versuche mit der Urocaninsäure. Urocaninsäure wird durch ein von *Sera* und *Yada*¹⁾ beschriebenes Ferment analog dem Histidin durch Ringspaltung abgebaut. Im Unterschied zur Histidinspaltung wird vorerst kein Ammoniak gebildet. Erst durch Umwandlung des entstandenen Glutamins in Glutaminsäure soll 1 Mol Ammoniak freigesetzt werden. Wird an Stelle von Histidin Urocaninsäure neben Brenztraubensäure zu Leberextrakt zugegeben, so wird kein zusätzliches Alanin gebildet.

Im Gegensatz zur früher beschriebenen Alaninbildung aus Brenztraubensäure und Ammoniumion entsteht Alanin aus Brenztraubensäure und Histidin auch unter anaeroben Bedingungen. Es ist zu vermuten, dass in diesem Falle die exergonisch verlaufende Ringspaltung die zum Aufbau des Alanins nötige Energie liefert; vielleicht wird dabei der Stickstoff nicht in Form von Ammoniak freigesetzt, sondern von einem unbekanntem Abbauprodukt des Histidins direkt auf die Brenztraubensäure übertragen.

Experimenteller Teil.

Methoden.

1. Ammoniak: Bestimmung nach *Conway*²⁾.
2. Imidazol: Bestimmung nach *Edlbacher* und Mitarbeitern³⁾.
3. Brenztraubensäure: Bestimmung nach *Straub*⁴⁾.
4. Aminostickstoff: Bestimmung nach *Folin*⁵⁾.

¹⁾ *Sera* und *Yada*, Mitt. med. Ges. Osaka **38**, I (1939).

²⁾ *E. J. Conway* und *A. Byrne*, Biochem. J. **27**, 418 (1933).

³⁾ *S. Edlbacher*, *H. Baur*, *H. R. Staehelin* und *A. Zeller*, Z. physiol. Ch. **270**, 158 (1941).

⁴⁾ *F. B. Straub*, Z. physiol. Ch. **244**, 117 (1936).

⁵⁾ *O. Folin*, J. Biol. Chem. **51**, 393 (1922).

5. Alanin: Bestimmung nach *O. Wiss*¹⁾.

6. Glutaminsäure bzw. Glutamin: Bestimmung nach *Hac* und Mitarbeitern²⁾.

Genauere Angaben über die Durchführung der Bestimmungen finden sich in einer früheren Arbeit³⁾.

Bildung von Alanin aus Histidin und Brenztraubensäure.

Es wurden Ratten-, Meerschweinchen- oder Kaninchenlebern verwendet. Die Lebern wurden entweder homogenisiert, wie in einer früheren Mitteilung beschrieben worden ist (loc. cit.), oder in Form eines Extraktes zugesetzt, der folgendermassen hergestellt wurde: 1 Teil Leber wurde mit Seesand verrieben, mit 1 Teil Phosphatpuffer extrahiert und nach 10 Minuten langem Zentrifugieren die flüssige Phase verwendet. Es hat sich gezeigt, dass homogenisierte Leber und Leberextrakt in genau gleicher Weise aus Brenztraubensäure und Histidin Alanin bilden. Die Versuche wurden in *Warburg*-Gefässen durchgeführt (Gesamtflüssigkeitsvolumen = 3 cm³). Das p_H des Puffers betrug 8,0. Ein Versuch bestand aus folgenden 4 Ansätzen:

1. Extrakt (2,0—2,5 cm³) mit Puffer auf 3 cm³ ergänzt.

2. Extrakt (2,0—2,5 cm³) + m/25 Brenztraubensäure.

3. Extrakt (2,0—2,5 cm³) + m/50 L-Histidin.

4. Extrakt (2,0—2,5 cm³) + m/25 Brenztraubensäure + m/50 L-Histidin.

Brenztraubensäure und Histidin wurden im Puffer gelöst den Ansätzen zugegeben. Die Konzentrationsangaben für Brenztraubensäure und Histidin bedeuten die Endkonzentration.

In der folgenden Tabelle sind angegeben:

1. Differenz der Ammoniakwerte aus den Ansätzen 3 und 4, welche zeigt, wieviel Ammoniak durch die zugesetzte Brenztraubensäure gebunden wird.

2. Differenz der Imidazolwerte aus den Ansätzen 3 und 4. Die sehr geringe Differenz zeigt, dass durch die zugesetzte Brenztraubensäure die Ringspaltung nur in geringem Masse beeinflusst wird.

Tabelle 1.

Ver- such Nr.	Tierart	Ver- suchs- dauer in Std.	Am- moni- ak	Imidazol	Brenz- trauben- säure	Amino- stickstoff	Alanin
1	Meerschweinchen.	1 ½	- m/57	—	- m/170	+ m/67	—
2	Meerschweinchen.	1 ½	- m/69	- m/838	- m/324	+ m/52	—
3	Meerschweinchen.	2	- m/58	0	- m/176	+ m/59	—
4	Ratte.	2	- m/52	—	—	—	+ m/102
5	Ratte.	6	- m/60	—	—	—	+ m/69
6	Ratte.	½	- m/74	—	—	—	+ m/50
7	Ratte.	6	- m/106	- m/277	- m/336	+ m/86	+ m/71
8	Ratte.	1	- m/85	- m/674	- m/271	+ m/134	+ m/141
9	Ratte.	6	- m/40	- m/180	- m/187	+ m/89	+ m/166
10	Ratte.	½	- m/105	—	—	—	+ m/75
11	Ratte.	½	- m/108	- m/1630	—	—	+ m/82
12	Ratte.	2	- m/50	- m/170	—	—	+ m/66
13	Ratte.	6	- m/72	- m/287	—	—	+ m/77
14	Ratte.	½	- m/92	- m/2380	—	—	+ m/83
15	Ratte.	½	- m/99	- m/398	—	—	+ m/84

¹⁾ *O. Wiss*, *Helv.* **31**, 22 (1948).

²⁾ *L. R. Hac*, *E. E. Snell* und *R. J. Williams*, *J. Biol. Chem.* **159**, 273 (1945).

³⁾ *O. Wiss*, *Helv.* **31**, 1189 (1948).

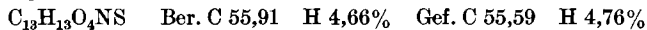
3. Differenz der Brenztraubensäurewerte aus den Ansätzen 2 und 4. Es ist daraus ersichtlich, dass durch Zugabe des Histidins der Brenztraubensäuregehalt abnimmt.

4. Differenz der Aminostickstoffwerte aus den Ansätzen 4 und 3. Es geht daraus hervor, wieviel Aminostickstoff durch Zusatz der Brenztraubensäure gebildet wird.

5. Differenz der Alaninwerte aus den Ansätzen 4 und 3 zeigt die durch Zusatz der Brenztraubensäure bedingte Zunahme des Alanins.

Isolierung des gebildeten Alanins.

In mehreren Grossansätzen wurde der in oben beschriebener Weise hergestellte Extrakt von ca. 100 g Ratten- oder Schweinelebern mit 5 g Brenztraubensäure und 10 g L-Histidin während mehrerer Stunden bei 38° C digeriert. Das Alanin wurde nach dem in einer früheren Arbeit (loc. cit.) beschriebenen Verfahren als β -Naphthalinsulfoverbindung isoliert. Das in grösseren Mengen ausfallende Reaktionsprodukt konnte jeweils nur in relativ geringen Mengen (ca. 100 mg) in krystalliner Form erhalten werden. Der Schmelzpunkt der isolierten Substanz betrug 60–61° C (korr.). Die Kohlenstoff-Wasserstoff-Analyse ergab gute Übereinstimmung mit den theoretischen Werten:



Die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ der aus reinem L-Alanin hergestellten β -Naphthalinsulfoverbindung betrug in alkoholischer Lösung -18° . Bei dem isolierten β -Naphthalinsulfoalanin wurden spezifische Drehungswinkel von -18° bis -19° festgestellt. Daraus ist ersichtlich, dass natürliches Alanin isoliert worden ist.

Vergleichende Untersuchungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Mit der oben wiedergegebenen Versuchsanordnung wurden unter Verwendung desselben Extraktes die beschriebenen vier Versuchsansätze gleichzeitig in Stickstoff- und Sauerstoffatmosphäre gehalten. Aus der folgenden Tabelle geht hervor, dass die Aminierung von der Gegenwart des Sauerstoffs unabhängig ist.

Tabelle 2.

Ver- such Nr.	Tierart	Ver- suchs- dauer in Std.	Atmo- sphäre	Am- moniak	Imidazol	Brenz- trauben- säure	Amino- stickstoff
16	Meerschweinchen .	1 ½	O ₂	– m/84	– m/463	– m/287	+ m/63
			N ₂	– m/84	– m/885	– m/75	+ m/56
17	Ratte	2	O ₂	– m/33	– m/267	– m/55	+ m/69
			N ₂	– m/29	– m/117	– m/88	+ m/44
18	Kaninchen	2	O ₂	– m/85	– m/1310	– m/353	+ m/90
			N ₂	– m/99	0	– m/107	+ m/106

Vergleichende Untersuchungen über Glutaminsäure- und Alaninbildung.

Wird zu Leberextrakt Histidin zugegeben, so lässt sich eine deutliche Zunahme der Glutaminsäure bzw. des Alanins feststellen. Wenn gleichzeitig dem Ansatz Brenztraubensäure zugegeben wird, so findet wohl eine Abnahme der Glutaminsäure statt; wie aus Tabelle 3 hervorgeht, entspricht die Abnahme der Glutaminsäure jedoch nur ca. einem Drittel des gebildeten Alanins.

Im übrigen wurden die Versuche in gleicher Weise durchgeführt wie oben beschrieben. Von den in der Tabelle in Kolonne 1 und 3 angegebenen Alanin- und Glutaminsäurewerten sind die Leerwerte, d. h. die im Extrakt vorhandenen Mengen, abgezogen.

Auch aus dem zeitlichen Verlauf der Glutaminsäurebildung, verglichen mit demjenigen des Alanins, geht hervor, dass sie im Vergleich zur Alaninbildung verzögert ist (Fig. 1). Die Glutaminsäure kann deshalb nicht als Muttersubstanz für das Alanin in Frage

kommen. In Parallelansätzen, welchen Histidin und Brenztraubensäure zugesetzt war, wurden nach verschiedener Versuchsdauer, d. h. nach 30, 60 und 120 Minuten, Alanin und Glutaminsäure bestimmt.

Tabelle 3.

Zusatz	1	2	3	4
	Alanin	Differenz	Glutaminsäure	Differenz
Histidin	m/976	+ m/82	m/252	- m/252
Histidin + Brenztraubensäure	m/76		0	
Histidin	0	+ m/67	m/134	- m/177
Histidin + Brenztraubensäure	m/67		m/560	
Histidin	m/1086	+ m/77	m/121	- m/220
Histidin + Brenztraubensäure	m/72		m/269	

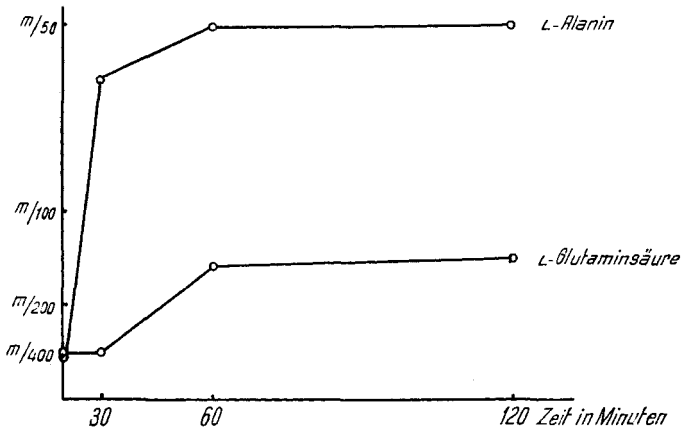


Fig. 1.

Zusammenfassung.

1. Extrakte aus Ratten-, Meerschweinchen- und Kaninchenlebern bilden aus Brenztraubensäure und Histidin Alanin.

2. Das gebildete Alanin wurde als β -Naphthalinsulfoverbindung isoliert. Die spezifische Drehung zeigt, dass natürliches Alanin isoliert worden ist.

3. Im Gegensatz zur Alaninbildung aus Brenztraubensäure und Ammoniumion entsteht Alanin auch unter anaeroben Bedingungen.

4. Es konnte festgestellt werden, dass der zur Aminierung verwendete Stickstoff aus dem Imidazolring stammt. Das Alanin entsteht nicht durch Umaminierung zwischen der aus dem Histidin entstandenen Glutaminsäure und der Brenztraubensäure.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.