

Zusammenfassung.

1. Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure liegen in der Leber in viel höherer Konzentration vor als im Blut.

2. Die Glutaminsäure zeigt mit einer Konzentration von über 100 mg% den höchsten Gehalt; sie wird durch verschiedene Ernährung kaum beeinflusst.

3. Das Alanin wird durch Kohlehydrat-Zufuhr verglichen mit den Werten anderer Ernährung um ca. 100% erhöht.

4. Die Asparaginsäure zeigt den geringsten Gehalt. Kohlehydrat- und Fettkost bewirken gegenüber den Eiweisswerten eine mässige Erhöhung.

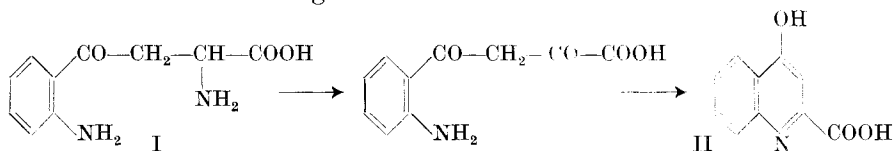
Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

67. Über den Abbau des Tryptophans zu Alanin und Anthranilsäure im tierischen Organismus

von O. Wiss und F. Hatz.

(I. II. 49.)

Die ersten Angaben über den Abbau des Tryptophans stammen von *Ellinger*¹⁾. Nach Verfütterung von Tryptophan hat er aus dem Hundeharn die Kynurensäure isoliert. Von *Kotake*²⁾ wurde das Kynurenin als Zwischenprodukt isoliert, das nach Oxydation des Tryptophans zu α -Oxytryptophan durch Ringspaltung entstehen soll. *Butenandt*³⁾ hat durch Synthese nachgewiesen, dass die von *Kotake* dem Kynurenin zugeteilte Formel nicht in allen Teilen richtig ist. Wird die neue Formel dem Kynurenin zugrunde gelegt, so kann nach *Butenandt* der biologische Abbau des Kynurenins (I) zu Kynurensäure (II) durch oxydative Desaminierung über o-Amino-benzoylbrenztraubensäure erfolgen:



¹⁾ A. *Ellinger*, Z. physiol. Ch. **43**, 325 (1904/5); A. *Ellinger* und Z. *Matsuoka*, Z. physiol. Ch. **109**, 259 (1920).

²⁾ Y. *Kotake*, Z. physiol. Ch. **195**, 139 (1931).

³⁾ A. *Butenandt*, W. *Weidel*, R. *Weichert* und W. *von Derjugin*, Z. physiol. Ch. **279**, 27 (1943).

Kotake und Mitarbeiter¹⁾ haben jedoch die Beobachtung gemacht, dass die Katze nach Verabreichung von Tryptophan nicht Kynurensäure sondern Anthranilsäure ausscheidet, die sie isolieren konnten. In Weiterführung dieser Untersuchungen wurde von demselben Autor und seinen Schülern in Organen verschiedener Tiere ein Enzym beschrieben, das Kynurenin in Anthranilsäure überführt. Über den Abbaumechanismus wurden keine Angaben gemacht.

Neuerdings haben amerikanische Autoren Beziehungen zwischen dem Tryptophan und der Nicotinsäure festgestellt. Aus Fütterungsversuchen geht hervor, dass Tryptophan Nicotinsäure ersetzen kann²⁾, und das verabreichte Tryptophan in Form von Nicotinsäure oder ihrer Derivate ausgeschieden wird³⁾. Obwohl diese Angaben nicht unwidersprochen geblieben⁴⁾, scheint durch Untersuchungen von *Lepkovsky* und Mitarbeitern⁵⁾ durch Verabreichung von mit ¹⁴C markiertem Tryptophan die Bildung der Nicotinsäure aus Tryptophan erwiesen zu sein. Der Abbauweg ist allerdings noch unklar. Auf Grund von Untersuchungen an *Neurospora*⁶⁾ wird angenommen, dass er über 3-Oxyanthranilsäure erfolgt. Im Fütterungsversuch ist es tatsächlich gelungen, das Tryptophan bzw. die Nicotinsäure durch 3-Oxyanthranilsäure zu ersetzen⁷⁾.

Das Kynurenin hat insofern grosse biologische Bedeutung erlangt als *Butenandt*⁸⁾ nachgewiesen hat, dass es als sogenannter „gen-abhängiger“ Stoff für die Auslösung der Augenpigmentbildung von Insekten verantwortlich ist.

In einer früheren Arbeit⁹⁾ konnten wir feststellen, dass oral und peroral verabreichte Aminosäuren einen Anstieg des Alaningehaltes des Blutes zur Folge haben. Dabei ist aufgefallen, dass das Tryptophan schon in sehr kleiner Dose einen deutlichen Alaninanstieg bewirkt.

1) *Y. Kotake* und *Y. Nakayama*, *Z. physiol. Ch.* **270**, 76 (1941).

2) *W. A. Krehl*, *P. S. Sarma*, *L. J. Tepley* und *C. A. Elvehjem*, *J. Nutr.* **31**, 85 (1946); *G. M. Briggs*, *A. C. Groschke* und *R. J. Lillie*, *J. Nutr.* **32**, 659 (1946); *D. W. Woolley*, *J. Biol. Chem.* **162**, 179 (1946); *W. A. Krehl*, *P. S. Sarma* und *C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **162**, 403 (1946).

3) *S. A. Singal*, *A. P. Briggs*, *V. P. Sydenstricker* und *J. M. Littlejohn*, *J. Biol. Chem.* **166**, 573 (1946); *W. A. Perlzweig*, *F. Rosen*, *N. Levitas* und *J. Robinson*, *J. Biol. Chem.* **167**, 511 (1947); *P. W. Albert*, *B. T. Scheer* und *H. J. Deuel Jr.*, *J. Biol. Chem.* **175**, 479 (1948).

4) *P. Ellinger* und *M. M. Abdel Kader*, *Nature* **160**, 675 (1947); *F. Rosen*, *J. W. Huff* und *W. A. Perlzweig*, *J. Nutr.* **33**, 561 (1947).

5) *C. Heidelberger*, *M. E. Gullberg*, *A. F. Morgan* und *S. Lepkovsky*, *J. Biol. Chem.* **175**, 471 (1948). *C. Heidelberger*, *E. P. Abraham* und *S. Lepkovsky*, *J. Biol. Chem.* **176**, 1461 (1948).

6) *H. K. Mitchell* und *J. F. Nyc*, *Proc. Nat. Acad. Sc.* **34**, 1 (1948).

7) *H. K. Mitchell*, *J. F. Nyc* und *R. D. Owen*, *J. Biol. Chem.*, im Druck (1948); (Zitiert nach *Albert*, *Scheer* und *Deuel*, *J. Biol. Chem.* **175**, 479 (1948).

8) *A. Butenandt*, *W. Weidel* und *E. Becker*, *Naturw.* **28**, 63 (1940).

9) *F. Hatz*, *Helv.* **32**, 251 (1949).

Der Gesamtgehalt des im Blut zusätzlich nachgewiesenen Alanins ist jedoch im Vergleich zur verabreichten Tryptophanmenge so gering, dass dieser Alaninanstieg nicht als Beweis für eine Stoffwechselbeziehung aufgefasst werden kann. Immerhin war damit ein Hinweis gegeben, dass eine solche Beziehung bestehen könnte.

Zunahme des freien Alanins der Leber nach Verabreichung von Tryptophan oder Kynurenin ¹⁾.

Durch Arbeiten von *Van Slyke*²⁾ ist bekannt geworden, dass parenteral verabreichte Aminosäuren sehr rasch die Blutbahn verlassen und sich in der Leber nachweisen lassen. Es konnte deshalb vermutet werden, dass Alanin, sofern es aus zugeführtem Tryptophan gebildet wird, in der Leber angereichert wird. Einer Anzahl von jungen Ratten wurde Tryptophan in kleinen Dosen peroral verabreicht, nach kurzer Zeit der Alaningehalt in der Leber bestimmt und mit demjenigen von Kontrolltieren verglichen. Es hat sich herausgestellt, dass ein starker, statistisch gesicherter Alaninanstieg von im Durchschnitt 33,5 mg% auf 55,5 mg% auftritt. Die gleichzeitig durchgeführte Tryptophanbestimmung hat ergeben, dass Tryptophan eine viel geringere Konzentration aufweist (Durchschnitt 1,17 mg%) und nach Zufuhr der Gehalt nicht signifikant erhöht wird, ganz unabhängig davon, ob die Bestimmung unmittelbar nach Verabreichung oder im Verlaufe der folgenden Stunden durchgeführt worden ist (Durchschnitt 1,55 mg%). Es ist anzunehmen, dass dieses Verhalten auf einen raschen Abbau dieser Aminosäure zurückzuführen ist.

In gleicher Weise verabreichtes Kynurenin hat ebenfalls einen Alaninanstieg zur Folge. Der Alaningehalt der Leber wurde im Durchschnitt von 33,2 mg% auf 56,7 mg% erhöht. Auch hier hat die gleichzeitig durchgeführte Tryptophanbestimmung sehr niedrige Werte und keine signifikanten Unterschiede ergeben (Durchschnitt 1,38 mg% und 1,4 mg%).

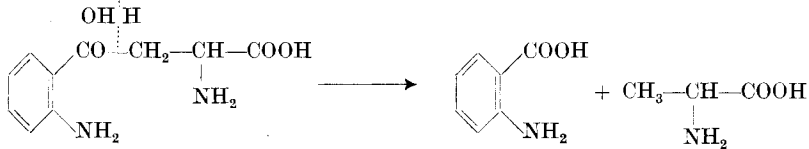
Bildung des Alanins aus Kynurenin in vitro.

In vitro-Versuche mit Leberextrakt haben ergeben, dass aus zugesetztem Kynurenin unter aeroben und anaeroben Bedingungen Alanin und Anthranilsäure gebildet werden. Gleichzeitig ist eine entsprechende Abnahme des Kynurenins nachweisbar. Andererseits ist es uns nicht gelungen, in dieser Versuchsanordnung eine Ammoniakbildung nachzuweisen. Auf Grund dieser Untersuchungen muss vermutet werden, dass neben den bisher beschriebenen Abbauwegen das

¹⁾ Wir sind Herrn Dr. G. Viollier und der Fa. *Hoffmann-La Roche* in Basel, die das Präparat dargestellt hat, für die Überlassung von synthetischem DL-Kynurenin zu grossem Dank verpflichtet.

²⁾ *D. D. Van Slyke* und *G. M. Meyer*, J. Biol. Chem. **16**, 197 (1913).

Kynurenin hydrolytisch nach folgender Gleichung in Anthranilsäure und Alanin aufgespalten werden kann:



Experimenteller Teil.

Methoden.

1. Alanin: chemische Bestimmungsmethode nach *O. Wiss*¹⁾.
2. Tryptophan: mikrobiologische Bestimmungsmethode nach *Greene* und *Black*²⁾ mit *Lactobacillus arabinosus*.
3. Anthranilsäure und Kynurenin: Die Bestimmung der Anthranilsäure und des Kynurenins wurde genau nach der von *Kotake* und Mitarbeitern³⁾ beschriebenen Methode durchgeführt. Nach Angaben von *Kotake* ist die Reaktion weitgehend spezifisch. Von anderen evtl. möglichen Abbauprodukten des Tryptophans haben Indolelessigsäure, Kynurensäure, Acetophenon, o-Phthalsäure und Hippursäure keine Reaktion gegeben, während Kynurenin, Anthranilsäure, o-Aminoacetophenon und p-Aminobenzoesäure mit dem zur Bestimmung verwendeten p-Dimethylaminobenzaldehyd reagieren. Der durch Kynurenin entstandene Farbstoff lässt sich jedoch durch Behandlung mit Butylalkohol von den übrigen abtrennen, indem er als einziger durch Butylalkohol nicht extrahiert wird, so dass Anthranilsäure und Kynurenin nebeneinander bestimmt werden können.
4. Ammoniakbestimmung nach *Conway*⁴⁾.

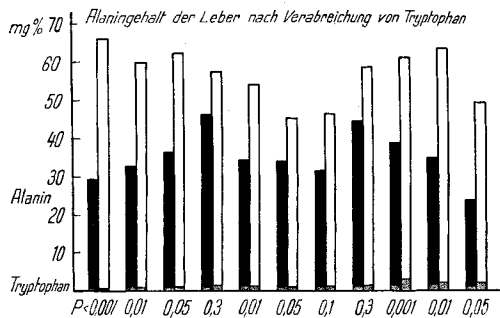


Fig. 1.

Schwarze Stäbe = Durchschnitts-Alaninwerte von je 5 Kontrolltieren.
 Weisse Stäbe = Durchschnitts-Alaninwerte von den mit Tryptophan gefütterten Tieren.
 Die schraffierten Anteile geben die Durchschnittswerte des in der Leber gleichzeitig bestimmten Tryptophangehaltes.

Für die Alaninwerte jedes einzelnen Versuches wurde die Signifikanz nach dem t-Test von *Fisher* errechnet. Wenn alle Versuche zusammen ausgewertet werden, ergibt sich ein *P*, das kleiner ist als 0,001.

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

²⁾ *R. D. Greene* und *A. J. Black*, *J. Biol. Chem.* **155**, 1 (1944).

³⁾ *Y. Kotake* und Mitarbeiter, *Z. physiol. Ch.* **270**, 41 (1941).

⁴⁾ *E. J. Conway* und *A. Byrne*, *Biochem. J.* **27**, 418 (1933).

Tierversuche.

Es wurden weisse Ratten von ca. 50 g Gewicht verwendet. Je 5 Tieren wurden 1 mg L-Tryptophan auf je 10 g Körpergewicht bzw. 2 mg DL-Kynurenin auf je 10 g in 1-proz. Lösung mit der Pipette verabreicht, während 5 gleichwertigen Ratten dasselbe Volumen Wasser zugeführt wurde. 15, 30 oder 60 Minuten nach der Verabreichung wurden alle Tiere getötet, die Lebern sofort entnommen, gewogen und ein aliquoter Teil (1–2 g) einzeln mit der gleichen Menge Seesand im Mörser vollständig homogenisiert. Der so erhaltene Brei wurde mit der fünffachen Menge Wasser (bezogen auf das Lebergewicht) extrahiert, die festen Anteile durch 10 Minuten langes Zentrifugieren abgetrennt und die flüssige Phase enteiwesst: 1 cm³ wurde mit 5 cm³ Pikrinsäure versetzt und zur Alaninbestimmung verwendet. Zum Rest wurde je ein Fünftel des Volumens 10-proz. Na-wolframatlösung und 0,67-normale Schwefelsäure zugegeben und im neutralisierten Filtrat das Tryptophan bestimmt.

In Figur 1, S. 535, sind die Ergebnisse nach Verabreichung von L-Tryptophan zusammengestellt.

Fig. 2 zeigt die Ergebnisse nach Verabreichung von DL-Kynurenin. Wie in Fig. 1 sind die Alanin- und Tryptophanwerte und das P für die einzelnen Versuche angegeben.

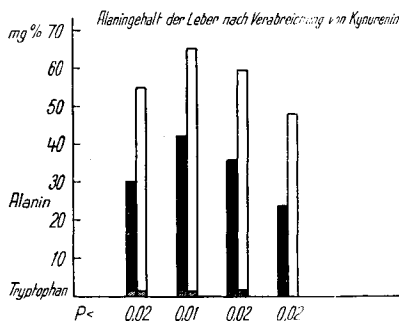


Fig. 2.

Schwarze Stäbe = Durchschnitts-Alaninwerte von je 5 Kontrolltieren.

Weisse Stäbe = Durchschnitts-Alaninwerte von den mit Kynurenin gefütterten Tieren.

Die schraffierten Anteile geben die Durchschnittswerte des in der Leber gleichzeitig bestimmten Tryptophangehalts.

In vitro-Versuche.

Die Versuche wurden in Warburg-Gefässen durchgeführt. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen betrug 3 cm³. Frisch entnommene Lebern ausgewachsener Ratten wurden mit Seesand homogenisiert, der Brei mit dem doppelten Volumen Phosphatpuffer, p_H = 7,4, extrahiert. Die so erhaltene Suspension wurde während 10 Sekunden zentrifugiert und pro Ansatz 1 cm³ der überstehenden Flüssigkeit eingefüllt. Das Kynurenin wurde in Puffer gelöst zugegeben. Nach einer Versuchsdauer von 2–6 Stunden wurden in der Reaktionsflüssigkeit Ammoniak, Alanin, Anthranilsäure und Kynurenin bestimmt.

Aus der folgenden Tabelle ist ersichtlich, dass Alanin und Anthranilsäure zugenommen haben, dass Kynurenin abgebaut worden ist und dass sich kein Ammoniak gebildet hat. Die in der Tabelle aufgeführten Zahlen bedeuten Mikromol Substanz pro g Frischleber. Die angegebenen Prozentanteile des gebildeten Alanins, der gebildeten Anthranilsäure und des abgebauten Kynurenins beziehen sich auf die zugesetzte L-Kynureninmenge, wobei angenommen wird, dass 1 Mol Kynurenin in 1 Mol Alanin und 1 Mol Anthranilsäure aufgespalten wird.

Tabelle 1.

DL-Kynurenin zugesetzt	Alanin gefunden	Alanin Differenz	Anthranilsäure gefunden	Anthranilsäure Differenz	Kynurenin abgebaut	Ammoniak gefunden
0	17	5 = 15%	—	—	—	20
33	22		—		—	19
0	15	5 = 33%	—	—	—	—
15	20		—		—	
0	21	9 = 60%	0	7 = 28%	—	—
15	30		7		—	
0	23	15 = 60%	0	9 = 36%	—	—
25	38		9		—	
0	19	8 = 53%	0	6 = 40%	—	22
15	27		6		—	20
0	19	10 = 67%	0	5 = 33%	—	22
15	29		5		—	17
0	21	13 = 52%	0	8 = 32%	—	28
25	34		8		—	31
0	21	13 = 52%	0	9 = 36%	—	28
25	34		9		—	25
0	20	11 = 44%	0	6 = 24%	0	—
25	31		6		9,5 = 38%	—
0	26	7 = 56%	—	—	0	—
12,5	33		—		7 = 56%	—
0	23,5	9 = 72%	—	—	0	—
12,5	32,5		—		6,5 = 52%	—

Die Versuche wurden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt; es haben sich keine Unterschiede ergeben.

Zusammenfassung.

1. Verabreichung kleiner Mengen L-Tryptophan und DL-Kynurenin an junge Ratten hat eine starke Erhöhung des freien Alanins der Leber zur Folge.

2. In vitro kann homogenisierte Leber Kynurenin in Alanin und Anthranilsäure (Anthranilsäurederivate?) spalten. Gleichzeitig ist eine Abnahme des zugesetzten Kynurenins nachweisbar.

3. Die Spaltung verläuft in gleicher Weise unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.