

### 304. Oxydative Phosphorylierung und Citrullinsynthese in den Lebermitochondrien<sup>1)</sup>

von A. F. Müller und F. Leuthardt.

(17. X. 49.)

Wir haben bei Untersuchungen an isolierten Lebermitochondrien die Beobachtung gemacht, dass dieselben bei Gegenwart von Adenosin-triphosphat (A.T.P.) Pyruvat und andere Glieder des Tricarbonsäurecyclus zu oxydieren vermögen<sup>2)</sup>. Die Mitochondrien enthalten wahrscheinlich den gesamten Fermentkomplex der „Cyclophorase“<sup>3)</sup>. Eine Reihe von Beobachtungen sprechen dafür, dass eine ihrer wesentlichen Funktionen in der Zelle darin besteht, das A.T.P. aus Adenylsäure oder Adenosindiphosphat aufzubauen. Wir haben z. B. gefunden, dass die A.T.P.-abhängigen Synthesen des Glutamins und des Arginins (Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff*) nur in Gegenwart von Mitochondrien verlaufen. Die Fermente selbst, welche die Glutamin- oder Argininsynthese bewirken, sind aber löslich. Sie finden sich jedenfalls nach Zentrifugation bei 25000 g im Überstehenden. Die wesentliche und möglicherweise einzige Funktion der Mitochondrien besteht bei diesen Reaktionen darin, das A.T.P., das durch die Adenylpyrophosphatase ständig hydrolysiert wird, zu resynthetisieren. Ohne Mitochondrien kommt die Reaktion rasch zum Stillstand, weil kein energiereiches Phosphat zur Verfügung steht<sup>4)</sup>.

Andere Synthesen, wie die Bildung der Hippursäure aus Benzoesäure und Glykokoll oder die Citrullinsynthese, sind dagegen überhaupt in den Mitochondrien lokalisiert und bedürfen keiner weiteren Faktoren. In diesem Falle sind die speziellen Fermente, welche die Synthesen bewirken, räumlich noch enger mit dem System der oxydativen Phosphorylierung verbunden, indem sie ebenfalls in die Mitochondrien eingebaut sind. Um die Hippursäuresynthese in Gang zu halten, muss ein oxydierbares Substrat (Fumarat) zugesetzt werden. In den anderen Fällen ist dies nicht nötig, weil die Glutaminsäure selbst oxydiert wird.

<sup>1)</sup> Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

<sup>2)</sup> *J. Mauron* und *F. Leuthardt*, erscheint demnächst in *Helv. physiol. pharmacol. acta*. Ähnliche Resultate sind kürzlich von *E. P. Kennedy* und *A. L. Lehninger*, *J. Biol. Chem.* **179**, 957 (1949), publiziert worden.

<sup>3)</sup> *D. E. Green*, *W. F. Loomis* und *V. H. Auerbach*, *J. Biol. Chem.* **172**, 389 (1948).

<sup>4)</sup> Über die im folgenden erwähnten Versuche, die mit *J. Frei* und *H. Nielsen* ausgeführt wurden, soll in späteren Arbeiten berichtet werden.

Im folgenden teilen wir Versuche mit, welche zeigen, dass tatsächlich in Mitochondriensuspensionen bei Gegenwart verschiedener Substrate Adenylsäure sehr rasch in A.T.P. übergeführt wird und dass in einem System, welches Glutaminsäure enthält, die Konzentration des zugesetzten A.T.P. erhalten bleibt.

In weiteren Versuchen haben wir besonders das Verhalten des Phosphats bei der Citrullinsynthese untersucht. *Cohen* und *Grisolia*<sup>1)</sup> war es gelungen, die biologische Umwandlung des Ornithins in das Citrullin in eine aerobe und eine anaerobe Phase zu trennen. Vermutlich wird während der aeroben Phase ein Zwischenprodukt angehäuft, das anaerob mit Ornithin weiterreagiert. Weil es sich dabei um die Bildung einer labilen Phosphorsäureverbindung handeln könnte, haben wir anschliessend an die aerobe Inkubation das „echte“ anorganische Phosphat nach der Methode von *Lowry* und *Lopez*<sup>2)</sup> bestimmt. Wir verwandten diese Methode an Stelle derjenigen von *Fiske* und *Subbarow*<sup>3)</sup>, weil bei allfälliger Bildung labiler Phosphate die Möglichkeit besteht, dieselben auf diese Weise zu erfassen. Es liess sich auch tatsächlich eine Veresterung nachweisen, die am grössten war mit dem vollständigen System. Beim Fehlen der  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure war nur eine schwache oder überhaupt keine Verminderung des anorganischen Phosphats zu beobachten. Auch das Ammoniak scheint einen Einfluss auf die Veresterung zu haben. Fehlt die Glutaminsäure, so nimmt das anorganische Phosphat sehr rasch zu, weil in diesem Falle das zugesetzte Adenosintriphosphat rasch gespalten wird.

## Mitochondrien und Phosphorylierung.

### Experimenteller Teil.

#### Methodik.

Tiermaterial. Es wurden männliche Albinoratten im Gewicht von 100—180 g verwendet. Die Tiere wurden ausschliesslich mit Fleischkost ernährt und vor dem Versuch 12 Stunden auf Hunger gesetzt.

Herstellung des Homogenats und der Mitochondriensuspension. Wir verweisen auf unsere früheren Mitteilungen<sup>4)</sup>.

Milieu. Dazu diente, wenn nichts anderes bemerkt ist, ein Glycylglycin- oder Phosphatpuffer und KCl, das bis zur Isotonie der Gesamtlösung zugesetzt wurde. Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>, Gasatmosphäre: Luft oder 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>. Die Ansätze wurden in 25 cm<sup>3</sup>-*Erlenmeyer*-Kölbchen während 15 Minuten im Wasserbad bei 38° geschüttelt.

Substanzen. Die meisten verwendeten Produkte wurden von *F. Hoffmann-La Roche*, Basel, bezogen. Glutamin wurde aus Rübensaft nach *Vickery* und Mitarb.<sup>5)</sup>,

<sup>1)</sup> *P. P. Cohen* und *S. Grisolia*, *J. Biol. Chem.* **174**, 389 (1948).

<sup>2)</sup> *O. H. Lowry* und *J. A. Lopez*, *J. Biol. Chem.* **162**, 421 (1946).

<sup>3)</sup> *C. H. Fiske* und *Y. Subbarow*, *J. Biol. Chem.* **66**, 375 (1925).

<sup>4)</sup> *F. Leuthardt*, *A. F. Müller* und *H. Nielsen*, *Helv.* **32**, 744 (1949); *F. Leuthardt* und *A. F. Müller*, *Exper.* **4**, 478 (1948).

<sup>5)</sup> *H. B. Vickery*, *G. W. Pucher* und *H. E. Clark*, *J. Biol. Chem.* **109**, 39 (1935).

$\alpha$ -Ureidoglutarsäure aus L(+)-Glutaminsäure und Kaliumcyanat nach bekannten Methoden dargestellt. A.T.P. wurde nach *Needham* unter Berücksichtigung der Angaben von *Le Page* bereitet<sup>1</sup>). Muskel-Adenylsäure erhielten wir von *Ernst Bischoff Company Inc.*, Ivoryton, Connecticut, die Cozymase von den *Schwarz Laboratories* in New York (60% Reinheit).

#### Analytische Methoden.

Phosphatbestimmungen. Das „true inorganic“ Phosphat wurde nach der Methode von *Lowry* und *Lopez*<sup>2</sup>) bestimmt, wobei wir uns der Angaben von *Potter*<sup>3</sup>) bedienen. Die Ansätze (Vol. 3,0 cm<sup>3</sup>) wurden sofort nach der Inkubation, der Vergleichsanzsatz vorher, mit 2,0 cm<sup>3</sup> 17,5-proz. kalter Trichloressigsäure gut vermischt, in der Kälte zentrifugiert, ein aliquoter Teil des Überstehenden mit der gleichen Menge 7-proz. kalter Trichloressigsäure nochmals verdünnt und von dieser Lösung 0,1 cm<sup>3</sup> zur kolorimetrischen Bestimmung verwendet, womit wir eine 100-fache Verdünnung erreichten. Dazu kommen 2,4 cm<sup>3</sup> eines Acetatpuffers vom p<sub>H</sub> 4,2 (bestehend aus 44 cm<sup>3</sup> 0,5-m. Na-Acetat, 40 cm<sup>3</sup> 1,0-m. Essigsäure und H<sub>2</sub>O ad 480 cm<sup>3</sup>) und 0,25 cm<sup>3</sup> einer 1-proz. Ascorbinsäurelösung in Wasser. 0,25 cm<sup>3</sup> Ammoniummolybdatlösung (0,5%) in 0,05-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden in Abständen von 15 oder 30 Sekunden dazu pipettiert, dann wurde 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschliessend in den gleichen Zeitabständen im Spectrophotometer von *Beckman* die Extinktion bei einer Wellenlänge von 720  $\mu$ m abgelesen. Parallel bestimmten wir im gleichen sauren, eiweissfreien Filtrat den P nach der Methode von *Fiske-Subbarow* gemäss den Angaben von *Le Page* und *Umbreit*<sup>1</sup>).

Unter labilem Phosphat (P<sub>9</sub>) verstehen wir das Phosphat, das durch Hydrolyse während 9 Minuten in 1-n. HCl bei 100° freigesetzt wird; es wurde ebenfalls nach der Methode von *Fiske-Subbarow* bestimmt (*Beckman*-Photometer).

Citrullinbestimmung, nach den Angaben von *Archibald*<sup>4</sup>). Die Einzelheiten sind a. a. Ort beschrieben<sup>5</sup>).

#### Resultate.

##### 1. Veresterung der Adenylsäure bei Zugabe von verschiedenen Substraten.

Ein typischer Versuch zeigt, dass bei Zugabe von 10  $\mu$ Mol von Glutaminsäure oder  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure oder Na-Pyruvat die zugegebene Menge Adenylsäure (8  $\mu$ Mol) zum grossen Teil verestert wird. Lässt man hingegen das Substrat weg, so ist die Abnahme des anorganischen Phosphats nur noch sehr klein. Nach 9minütiger Hydrolyse in 1-n. HCl bei 100° wird das veresterte Phosphat frei; dort wo kein Substrat zugegeben wurde erscheint sogar mehr Phosphat als im Kontrollversuch, was darauf schliessen lässt, dass das A.T.P. resp. die Adenylsäure bis zum Adenosin abgespalten wurde (Fig. 1).

##### 2. Einfluss der Cozymase.

Wir haben bei verschiedenen A.T.P.-abhängigen Reaktionen eine starke Hemmung durch hohe Konzentrationen eines Cozymasepräparates beobachtet. Wir untersuchten daher auch dessen Einfluss auf die oxydative Phosphorylierung.

Es liess sich zeigen, dass die Cozymase (4 mg pro Ansatz) einen deutlichen Einfluss auf die Veresterung der Adenylsäure hatte; bei Zugabe von A.T.P. an Stelle der Adenylsäure bleibt das anorganische Phosphat während 15 Minuten konstant; bei Gegenwart von Cozymase (4 mg) nimmt dagegen bei gleicher Versuchsdauer der anorganische P

<sup>1</sup>) G. A. Le Page in W. W. Umbreit, R. H. Burris und J. F. Stauffer, Manometric techniques and related methods. Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.

<sup>2</sup>) O. H. Lowry und J. A. Lopez, J. Biol. Chem. **162**, 421 (1946).

<sup>3</sup>) V. R. Potter, J. Biol. Chem. **169**, 17 (1947).

<sup>4</sup>) R. M. Archibald, J. Biol. Chem. **156**, 121 (1944).

<sup>5</sup>) F. Leuthardt, A. F. Müller und H. Nielsen, Helv. **32**, 744 (1949).

stark zu, und zwar mehr, als durch Hydrolyse des A.T.P. zu Adenylsäure zu erwarten wäre. Es deutet dies wiederum darauf hin, dass unter diesen Bedingungen auch die Esterbindung hydrolysiert wird und dass Adenosin entsteht.

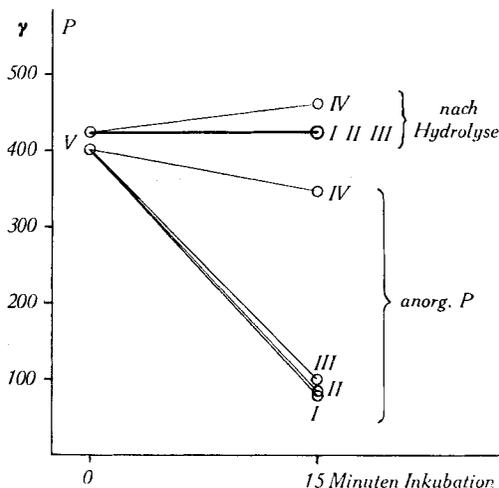


Fig. 1.

Mitochondrien 0,5 cm<sup>3</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,0067-m., Muskel-Adenylsäure 0,00275-m., NaF 0,0033-m., Glycyl-Glycinpuffer pH 7,2 0,013-m., anorganisches Phosphat 400 γ. KCl zur Isotonie. NaHCO<sub>3</sub> 0,013-m.; Gasatmosphäre 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>. Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>. Substratzusatz: Glutaminsäure (I), α-Ketoglutar Säure (II) oder Na-Pyruvat (III) je 0,0033-m., IV ohne Substrat, V wurde nicht inkubiert. Inkubationsdauer: 15 Minuten bei 38°.

**Tabelle 1.**

Anorganischer P in γ pro Ansatz.

Exp.	zu Beginn	nach 15 Minuten Inkubation	
		ohne Cozymase	mit Cozymase
I	428	220	384
II	428	426	652

Homogenat: 3 g Leber in 6 cm<sup>3</sup> isot. KCl, davon 0,3 cm<sup>3</sup> pro Ansatz. MgSO<sub>4</sub> 0,0033-m. Glutaminsäure, Citrullin, α-Ketoglutarat je 0,0067-m.; NH<sub>4</sub>Cl 0,0067-m., Cozymase 1,5 mg/cm<sup>3</sup>, Phosphat 430 γ. Gesamtvolumen 3,0 cm<sup>3</sup>. Gasatmosphäre in Luft. Dauer: 15 Minuten bei 38°.

Exp. I enthält Muskel-Adenylsäure 0,00275-m., Exp. II A.T.P. 0,001-m.

### 3. Einfluss der α-Ureidoglutar Säure und des NH<sub>3</sub>.

Anschliessend an die Arbeit von *Cohen* und *Grisolia*<sup>1)</sup>, in der gezeigt wurde, dass die biologische Citrullinsynthese in eine aerobe und abschliessende anaerobe Phase unterteilt werden kann, verfolgten wir das Verhalten des anorganischen Phosphats bei Gegenwart der für die Citrullinbildung nötigen Substrate. Wir beobachteten bei Gegenwart von A.T.P. immer eine Abnahme des anorganischen P; die Methoden von *Fiske-Subbarow* und von *Lowry-Lopez* ergaben identische Resultate. Wenn also eine P-Verbindung inter-

<sup>1)</sup> P. P. Cohen und S. Grisolia, J. Biol. Chem. **174**, 389 (1948).

mediär gebildet wird, so muss sie so labil sein, dass sie auch unter den Bedingungen der Methode von *Lowry* und *Lopez* gespalten wird. Es zeigte sich regelmässig eine stärkere Abnahme des organischen Phosphats bei gleichzeitiger Gegenwart von  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure und Glutaminsäure, als wenn Glutaminsäure allein zugesetzt wurde (vgl. Tabelle 2, Experiment Ia und Ib).

**Tabelle 2.**  
Anorganischer P in  $\gamma$  pro Ansatz.

Exp.	zu Beginn	nach 15 Minuten Inkubation		
		$\alpha$ -Ureidoglutarsäure + Glutaminsäure	Glutamin- säure	ohne Substrat
Ia	320	276	293	395
Ib	312	271	296	391
II	415	85	110	370

Exp. I: a) P-Bestimmung nach *Fiske-Subbarow*, b) nach *Lowry-Lopez*. Mitochondriensuspension,  $MgSO_4$  0,01-m., A.T.P. 0,0007-m., KCl bis zur Isotonie,  $NaHCO_3$  0,013-m.; Phosphatpuffer  $p_H$  7,0, Phosphat 315  $\gamma$ ;  $NH_4Cl$  0,0033-m., Glutaminsäure 0,013-m.;  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure 0,01-m.; Gesamtvolumen 3,0  $cm^3$ . Gasatmosphäre 95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$ . Inkubationsdauer: 15 Minuten bei 38°.

Exp. II: Mitochondriensuspension, Glutaminsäure,  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure,  $NH_4Cl$ , NaF 0,0033-m.,  $MgSO_4$  0,0067-m., Adenylsäure 0,00275-m., Glycyl-Glycinpuffer  $p_H$  7,2 0,013-m.,  $NaHCO_3$  0,013-m., anorganisches Phosphat 415  $\gamma$ ; mit KCl zur isoton. Konz. ergänzt. Gesamtvolumen 3,0  $cm^3$ . Gasatmosphäre 95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$ . Versuchsdauer: 15 Minuten bei 38°.

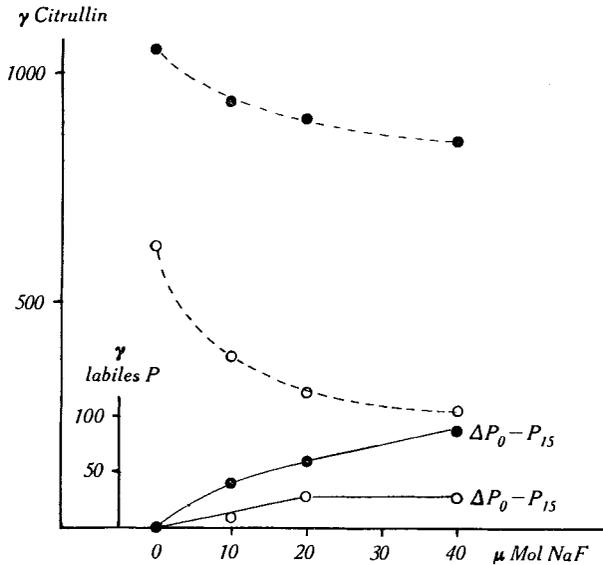


Fig. 2.

Mitochondrien 0,5  $cm^3$ ,  $MgSO_4$  0,010-m., A.T.P. 0,00067-m.,  $NaHCO_3$  0,013-m. KCl zur Isotonie. Phosphatpuffer  $p_H$  7,0, 0,315  $\gamma$  P.

● Glutaminsäure 0,0067-m.,  $NH_4Cl$  0,0033-m., ○ Glutamin 0,0067-m. Die Ansätze, in denen Citrullin bestimmt wurde, enthielten 0,0033-m. Ornithin. Gesamtvolumen 3,0  $cm^3$ . Gasatmosphäre 95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$ . Inkubationsdauer: 15 Minuten bei 38°.

Ersetzten wir das A.T.P. durch Muskel-Adenylsäure, so war die Veresterung wiederum beträchtlich; auch hier erhielten wir mit der Kombination von  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure und Glutaminsäure die stärkste Veresterung (vgl. Tabelle 2, Experiment II).

Bei Gegenwart von  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure und Glutaminsäure scheint das  $\text{NH}_3$  ebenfalls einen Einfluss auf die Veresterung des anorganischen Phosphats zu haben, und zwar im Sinne einer Steigerung. Wurde hingegen nur Glutaminsäure allein oder Succinat als Substrat verwendet, so konnte dieser Einfluss des  $\text{NH}_3$  nicht mehr beobachtet werden.

#### 4. Vergleich der Phosphorylierung und Citrullinbildung.

In früheren Arbeiten haben wir gezeigt, dass Glutamin unter geeigneten Bedingungen der Glutaminsäure +  $\text{NH}_3$  in der biologischen Citrullinsynthese aus Ornithin überlegen war. Bei kleinen Substratkonzentrationen (0,003—0,006-m.) war hingegen die Glutaminsäure +  $\text{NH}_3$  immer ein besserer Citrullinbildner. Wir haben nun unter gleichen Bedingungen sowohl die Citrullinbildung wie auch die oxydative Phosphorylierung verfolgt. Wie aus Figur 2 ersichtlich ist, geht eine stärkere oxydative Phosphorylierung bei Gegenwart von Glutaminsäure +  $\text{NH}_3$  mit einer vermehrten Citrullinbildung einher. Beim Glutamin hingegen ist die oxydative Phosphorylierung geringer, die Citrullinausbeute daher auch kleiner.

Der gleiche Versuch zeigt auch, dass NaF in bekannter Weise die oxydative Phosphorylierung steigert; die gleichen Konzentrationen hemmen aber die Citrullinbildung wahrscheinlich durch Beeinträchtigung einer Reaktion des A.T.P. mit den Fermenten der Citrullinsynthese.

#### Diskussion.

In unseren Versuchen, die im Gegensatz zu den Arbeiten von *Green* und Mitarb.<sup>1)2)</sup> mit reinen Mitochondriensuspensionen ausgeführt wurden, nahm während 15 Minuten bei Gegenwart eines Substrates wie z. B. Glutaminsäure das anorganische Phosphat nicht zu; teilweise beobachteten wir sogar eine schwache Abnahme. Wird aber die Glutaminsäure weggelassen und nicht durch ein anderes Substrat wie z. B. Succinat ersetzt, so steigt das anorganische Phosphat rasch an, weil das zugegebene A.T.P. hydrolysiert wird. Wir müssen also annehmen, dass bei Gegenwart von Glutaminsäure, Succinat oder eines anderen geeigneten Substrats die Wirkung der A.T.P.-ase durch die oxydative Phosphorylierung kompensiert wird.

$\alpha$ -Ureidoglutarsäure kann die Glutaminsäure nicht ersetzen; sie bewirkt aber bei Gegenwart der letzteren fast immer eine zusätzliche Veresterung von anorganischem Phosphat. Wird im gleichen Filtrat der Phosphor parallel nach der Methode von *Lowry-Lopez* („echtes“ anorganisches Phosphat) und *Fiske-Subbarow* bestimmt, so ergeben sich annähernd gleiche Werte. Die eventuelle Bildung eines labilen P-haltigen Intermediärproduktes (N-Phosphat) lässt sich auf diesem Weg also nicht nachweisen. Bei allen Versuchen mit Fluoridzusatz bleibt nicht nur das anorganische Phosphat konstant, sondern es nimmt ab und man beobachtet eine beträchtliche Vermehrung des labilen P. Es scheint, dass Fluorid die Wirkung der A.T.P.-asen

<sup>1)</sup> *D. E. Green, W. F. Loomis und V. H. Auerbach, J. Biol. Chem.* **172**, 389 (1948).

<sup>2)</sup> *R. J. Cross, J. V. Taggart, G. A. Covo und D. E. Green, J. Biol. Chem.* **177**, 655 (1949).

stärker hemmt als die oxydative Phosphorylierung, so dass es bilanzmässig zu vermehrtem Verschwinden des anorganischen Phosphats kommt. Welcher Art die dabei entstehende labile Phosphorsäure-Verbindung ist, können wir momentan noch nicht entscheiden. Es ist möglich, dass Pyrophosphat gebildet wird, wie in den unter ähnlichen Bedingungen durchgeführten Versuchen von *Cross* und Mitarb.<sup>1)</sup>.

Wie im experimentellen Teil beschrieben wurde, bewirkt das  $\text{NH}_3$  ein geringes zusätzliches Verschwinden von anorganischem Phosphat, aber nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure. Ist nur Glutaminsäure oder Succinat zugegen, so lässt sich kein Einfluss des  $\text{NH}_3$  erkennen. Es ist uns nicht möglich anzugeben, ob diese Wirkung des Ammoniaks irgendwie mit der Citrullinsynthese zusammenhängt.

Wird an Stelle des A.T.P. Muskel-Adenylsäure zugesetzt, so ist die Abnahme des anorganischen Phosphats im Ansatz (bestimmt nach der Methode von *Fiske* und *Subbarow*) bedeutend grösser als mit A.T.P. Nach 9 minutiger Hydrolyse in 1-n. HCl bei 100° wird das anorganische Phosphat wieder freigesetzt. Man kann daher annehmen, dass während der Inkubation die Adenylsäure in Adenosindiphosphat oder A.T.P. umgewandelt wurde.

Diese Veresterung der Adenylsäure tritt nur bei Gegenwart von Glutaminsäure, Pyruvat,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure u. a. Substraten ein. Ohne Substrat wird bilanzmässig wohl etwas Adenylsäure verestert, andererseits zeigt sich aber nach 9minutiger Hydrolyse eine Zunahme des anorganischen Phosphats über den Anfangswert hinaus, was nur durch die Entstehung von Adenosin erklärt werden kann.

Für die Hemmung der Phosphorylierung bei Gegenwart von grossen Mengen von Cozymase können wir noch keine Erklärung geben. (Sie kann in verschiedenen Versuchen schon bei etwa 0,5  $\mu\text{Mol/cm}^3$  festgestellt werden.) Es ist noch nicht sicher, ob dieser Effekt durch die Cozymase selbst oder durch eine Verunreinigung hervorgerufen wird. Wir werden bei anderer Gelegenheit auf diese Frage zurückkommen.

### Zusammenfassung.

1. Suspensionen von Lebermitochondrien (Ratte) phosphorylieren Adenylsäure bei Gegenwart von Pyruvat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Fumarat oder Glutaminsäure. Das aufgenommene anorganische Phosphat wird durch 9minutige Hydrolyse in 1-n. HCl wieder vollständig abgespalten. Es wird also aus der Adenylsäure Adenosin-di- oder -triphosphorsäure gebildet. Die Mitochondrien enthalten alle für die oxydative Phosphorylierung der Adenylsäure nötigen Fermente.

<sup>1)</sup> *R. J. Cross, J. V. Taggart, G. A. Couo und D. E. Green, J. Biol. Chem.* **177**, 655 (1949).

2. Ohne Zusatz eines oxydierbaren Substrates wird nur wenig anorganisches Phosphat aufgenommen. Nach 9minütiger Hydrolyse erscheint sogar mehr anorganisches Phosphat als aufgenommen wurde. Es hat also unter diesen Bedingungen die Adenylsäure Phosphat verloren und ist wahrscheinlich in Adenosin übergegangen.

3. Bei Zusatz von Adenosintriphosphat und der oben genannten Substrate bleibt die Konzentration des labilen Phosphats während der Inkubation erhalten. Ohne Substrat nimmt sie rasch ab. Die Geschwindigkeit der oxydativen Phosphorylierung genügt also, um die Wirkung der Adenosintriphosphatase zu kompensieren.

In den meisten Versuchen, besonders bei Zusatz von NaF, wird zusätzlich anorganisches Phosphat verestert. Die entstandene Verbindung wird in 9 Minuten hydrolysiert. Es handelt sich wahrscheinlich um Pyrophosphat.

4. Wir haben das Verhalten des Phosphats auch unter Versuchsbedingungen untersucht, welche die Synthese des Citrullins aus dem Ornithin gestatten. Dabei zeigt sich die doppelte Rolle der Glutaminsäure: sie spielt einerseits eine spezifische Rolle bei der Bildung der Carbamylgruppe und dient gleichzeitig dazu, die oxydative Resynthese des A.T.P. in Gang zu halten. Unter bestimmten Bedingungen bewirken  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure und Ammoniumsalze eine schwache zusätzliche Veresterung von Phosphat. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass bei der Citrullinsynthese intermediär labile Phosphorsäureverbindungen gebildet werden. Auf direktem Weg haben sich solche bisher aber nicht erfassen lassen.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

---

### 305. Messungen der Strömungsdoppelbrechung von verdünnten Lösungen einer schonend hergestellten Thymonucleinsäure<sup>1)</sup>

von H. Schwander und R. Cerf.

(18. X. 49.)

Die vorliegende Untersuchung hat den Zweck, eine sorgfältig dargestellte Thymonucleinsäure durch eine gut messbare und physikalisch deutbare Grösse zu charakterisieren, welche mit dem Molekulargewicht eindeutig verknüpft ist. Die Rotationsdiffusionskonstante, welche aus Strömungsdoppelbrechungsmessungen bestimmt werden kann, erweist sich als geeignet.

<sup>1)</sup> Über die Darstellung der Substanz vgl. R. Signer und H. Schwander, *Helv.* **32**, 853 (1949).