

Sonderabdruck aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 236. Bd. (1935).

Über die Bedeutung der Fumarsäure für die tierische Gewebsatmung*).

Von

**E. Annau, I. Banga, B. Gözsy, St. Huszák, K. Laki, B. Straub
und A. Szent-Györgyi.**

Mit 12 Figuren im Text.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie, Universität Szeged.)

(Der Schriftleitung zugegangen am 20. Juli 1935.)

Einleitung, Übersicht, Methoden.

Von

A. Szent-Györgyi.

Nach unserem heutigen Wissen ruht die Hauptatmung tierischer Gewebe auf zwei großen katalytischen Systemen, in denen die beiden Komponenten der Zelloxydation, Sauerstoff und Nährstoff, aktiviert werden. Wie die Untersuchungen Warburgs zeigen, wird einerseits der Sauerstoff aktiviert, indem er sich mit dem „Atmungsferment“ verbindet, und das 2wertige Eisen seiner Hämatinkomponente zu 3wertigem Eisen oxydiert. Andererseits wird, wie uns Wieland lehrte, der Nährstoff aktiviert, dessen Wasserstoffatome durch die Dehydrase aufgelockert werden, so daß sie in Gegenwart eines geeigneten „Wasserstoffacceptors“ abgegeben werden können. D. Keilin gebührt das Verdienst, gezeigt zu haben, daß Atmungsferment und Dehydrasen nicht unmittelbar miteinander reagieren, sondern daß zwischen beiden eine Serie von Hämatinen, „Cytochrom“ genannt, eingeschaltet ist, die einerseits durch das Atmungsferment oxydiert, andererseits durch die Nährstoffdehydrierung reduziert wird. In der Zelle stellt also dieses Atmungsferment-Cytochrom-System den physiologischen Wasserstoffacceptor der Hauptatmung dar. Wir wollen

*) Die Ausführung dieser Arbeit wurde durch die Unterstützung der Josiah-Macy-Jr.-Stiftung New York ermöglicht.

es im folgenden „Warburg-Keilin-System“ nennen und kurzweg als „WKS“ bezeichnen.

Das eingehende Studium tierischer Dehydrierung verdanken wir Thunberg, der zur Untersuchung dieser Funktion seine bekannte Technik einführte, mit der er zeigte, daß die tierischen Gewebe zahlreiche organische Substanzen zu dehydrieren vermögen und somit Dehydrase für solche enthalten. Die quantitative vergleichende Untersuchung der Dehydrasen war zur Zeit der ersten klassischen Untersuchungen Thunbergs wegen Unkenntnis der Co-Dehydrasen unmöglich. In den letzten Jahren haben wir aber gelernt, daß die volle Aktivität zahlreicher Dehydrasen an die Anwesenheit von Co-Dehydrasen, Substanzen der Gruppe der Adenylnucleotide, gebunden ist.

Zwischen Dehydrierungen mit der Thunbergtechnik und dem Atmungsprozeß besteht in quantitativer Hinsicht eine gewisse Diskrepanz. Im Atmungsprozeß werden große Mengen von Sauerstoff aufgenommen und es werden ebenso große Mengen von Wasserstoff durch die Dehydrasen mobilisiert. Hingegen werden durch den Thunbergversuch schon die schwächsten Dehydrierungen mit großer Klarheit zum Nachweise gebracht. Es ist also deutlich, daß eine größere quantitative Bedeutung bei der Atmung nur denjenigen Dehydrierungen zukommen kann, die mit einer großen Intensität verlaufen. Untersucht man von diesem Standpunkte aus — unter Mitverwendung der Co-Dehydrasen — die zahlreichen bekannten tierischen Dehydrasen bzw. Wasserstoffdonatoren, so ergibt sich, daß sich unter ihnen nur eine geringe Anzahl befindet, die eine genügend intensive Aktivität zeigt, um bei der Hauptatmung eine größere quantitative Rolle spielen zu können.

In dem Material z. B., auf das sich unsere Untersuchungen beziehen (zerkleinerter Brustmuskel der Taube in Phosphatlösung), fanden wir insgesamt nur 8 Dehydrasen, die dieser Anforderung einer hohen Aktivität entsprachen, und zwar die Dehydrase für: 1. Bernsteinsäure [Thunberg, Battelli und Stern*], 2. Milchsäure, 3. Glycerinaldehydphosphorsäureester [Gözszy¹⁾], 4. Glycerinphosphorsäure [Ahlgren*], 5. Hexosemonophosphat, 6. Hexosediphosphat [Broman, Thunberg*], 7. Glutaminsäure [Thunberg, Holmberg*], 8. Citronensäure [Thunberg, Battelli und Stern*].

*) Vgl. Euler u. Harrison, a. a. O. S. 16.

¹⁾ Diese Z. 222, 279 (1933).

Mehrere dieser Dehydrasen sind aus verschiedenen tierischen Geweben schon seit längerer Zeit bekannt. Im wesentlichen haben alle diese Fermente übereinstimmende Eigenschaften. Nur die Bernsteinsäuredehydrase zeigt besondere Züge, die, wie z. B. ihre hohe Resistenz und Aktivität, schon in den früheren Tagen ihrer Erforschung auffielen. Vergleichen wir aber die genannten Dehydrasen unter Zuhilfenahme der uns heute zur Verfügung stehenden Mittel, so wird die Ausnahmestellung der Succinodehydrase durchaus überzeugend:

1. Untersucht man die Kinetik genannter Dehydrasen, so ergibt sich, daß die Wirksamkeit der Fermente in ihrer Abhängigkeit von der Substratkonzentration einen für Fermentwirkungen allgemein charakteristischen monomolekularen Typus zeigt. Wie aber Widmark²⁾ entdeckte, zeigt die Succinodehydrase einen durchaus verschiedenen Verlauf und gibt schon bei minimaler Substratkonzentration eine maximale Wirkung, gehört also den Reaktionen vom sog. Nulltypus zu.

2. Alle genannten Fermente bedürfen zu ihrer vollen Aktivität einer Co-Dehydrase. Allein die Succinodehydrase wird durch Co-Dehydrase nicht beeinflußt.

3. Im Respirometer verbraucht der gewaschene Muskel in Gegenwart von Bernsteinsäure entsprechend der starken Dehydrierung im Thunbergversuch große Mengen Sauerstoff. Der aktivierte Wasserstoff der Bernsteinsäure wird also unmittelbar durch das anwesende WKS oxydiert. Hingegen vermögen die anderen Substanzen nicht — obwohl sie im Thunbergversuch ebenso energisch dehydriert werden — den Sauerstoff als Acceptor zu gebrauchen*). Da das Vermögen desselben Fermentpräparates, Bernsteinsäure aerob zu oxydieren, beweist, daß in ihm WKS in genügender Aktivität vorhanden ist, muß geschlossen werden, daß im Gegensatz zur Bernsteinsäuredehydrase die anderen Dehydrasen mit dem WKS nicht in unmittelbarer Verbindung stehen.

4. Vom Blickpunkte des Zwischenstoffwechsels ist bemerkenswert, daß abgesehen von der Bernsteinsäure, Glutaminsäure und Citronensäure die genannten Verbindungen der C₃-C₆-Gruppe angehören, die dort eine so bedeutende Rolle spielen. Hingegen

²⁾ Skand. Arch. Physiol. 41, 200 (1921).

*) Nur das Hexosediphosphat vermag eine relative geringe Menge von Sauerstoff aufzunehmen.

ist von der 4 C-atomigen Bernsteinsäure keine solche Rolle nachgewiesen.

5. Im gleichen Sinne spricht auch das Bestehen der von Einbeck³⁾ entdeckten Fumarase, die Fumarsäure, das Oxydationsprodukt der Bernsteinsäure, unter Wasseraufnahme zu Äpfelsäure verändert. Aus reiner Fumarsäure entsteht unter Einwirkung von Fumarase ein im Gleichgewicht stehendes Gemisch von Fumar- und Äpfelsäure im Verhältnis 1 : 3. Reine Äpfelsäure wird durch Fumarase unter Wasseraustritt ebenfalls in das Gleichgewichtsgemisch überführt.

Zusammen mit der Bernsteinsäuredehydrase ist Fumarase eines der aktivsten bekannten Fermente. Was soll es nun bedeuten, daß die Zelle für Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure die aktivsten Fermente beherbergt, die regelmäßig offenbar nicht als Zwischenstufen im Abbau der Nährstoffe entstehen?

6. Auf die ganz besondere Funktion der C₄-Dicarbonsäuren wies zuletzt auch die immer noch unerklärte, merkwürdige Beobachtung Thunbergs⁴⁾ hin, daß Maleinsäure die Atmung weitgehend vergiftet, obwohl sie selber als Donator auftritt. Maleinsäure hat keinen Einfluß auf die bekannten Glieder des Atmungssystems, und ihre einzige besondere Eigentümlichkeit ist die, daß sie auch dieser merkwürdigen Gruppe der C₄-Dicarbonsäuren angehört.

Diese Beobachtungen ließen vermuten, daß den C₄-Dicarbonsäuren und den zugehörigen Fermenten ihren besonderen Eigenschaften entsprechend auch eine besondere Funktion zukommt, und daß diese an der Atmung nicht als Nährstoffe, sondern als Katalysatoren beteiligt seien. Um weitere Anhaltspunkte zu bekommen, wurden durch zwei von uns [Gözszy und Szent-Györgyi⁵⁾] Versuche ausgeführt, die neue Beweise für die Ausnahmestellung der genannten Substanzen erbrachten. Es wurde versucht, die Bernsteinsäuredehydrase in spezifischer Weise auszuschalten, um zu beobachten, welchen Einfluß dies auf die Atmung habe. Dies konnte auf Grund der Arbeit von Quastel⁶⁾, sowie Quastel und Wooldridge⁷⁾ durch Malonat geschehen. Es zeigte sich, daß die Atmung durch Malonat weitgehend gehemmt wird,

³⁾ Biochem. Z. 95, 297 (1919).

⁴⁾ Skand. Arch. Physiol. 40, 1 (1920).

⁵⁾ Diese Z. 224, 1 (1934).

⁶⁾ Biochemic. J. 20, 166 (1926).

⁷⁾ Biochemic. J. 22, 689 (1928).

obwohl dieses Gift weder Nährstoffdehydrierung, noch Sauerstoffaktivierung beeinflusst. Die Intensität der Giftwirkung ist von derselben Größenordnung wie die des Cyans. Kommt also den C_4 -Dicarbonsäuren bei der Atmung eine katalytische Rolle zu, und wurde durch ihre Ausschaltung die Atmung stillgelegt, so mußte auch versucht werden, ob durch ihre Zugabe die Atmung nicht erhöht wird? Eine Atmungssteigerung durch Fumarat wurde bereits durch Thunberg⁸⁾ beobachtet und von Grönwall⁹⁾ studiert. Gözsy und Szent-Györgyi zeigten, daß die Fumarsäure unter Umständen die Atmung um mehrere 100% zu steigern vermag. Das besonders eigentümliche dieser Steigerung war aber, daß das Fumarat hierbei nicht verbraucht wurde, also im Gegensatz zu anderen ähnlichen beschriebenen atmungssteigernden Substanzen nicht als Donator, sondern als Katalysator wirkte.

Daß es sich hier nicht um die Aktivierung eines künstlich hergestellten Systemes handelt, zeigen die hier zu berichtenden Analysen. Nach Banga wird durch Fumarat die Atmung eigentlich nicht „gesteigert“, sondern nur „konserviert“. Das in Phosphat suspendierte Gewebe verliert gewöhnlich rasch von der Intensität seiner Atmung. Dieses Sinken der Atmung wird durch Fumaratzusatz hintangehalten. Das Gewebe enthält normalerweise geringe Mengen Fumarat, die bei der Suspendierung des Gewebes durch Diffusion verloren gehen; deshalb sinkt die Atemhöhe. Wird das Wegdiffundieren durch Kompensationsdialyse (d. h. durch Zufügung von Fumarat zur Außenflüssigkeit) verhindert, so bleibt die Atmung erhalten.

Von großer Bedeutung hierbei ist der Umstand, daß zur Erreichung solcher Wirkungen schon sehr kleine Fumaratkonzentrationen genügen, die der normalen Fumaratkonzentration des Muskels gleich sind. Dieser Umstand entkräftet den Einwand, daß das Fumarat des Muskels wegen seiner geringen Konzentration für die Atmung keine Bedeutung haben könne.

Es lag auf der Hand daran zu denken, daß das Succinat den Wasserstofftransport zwischen Nährstoffdehydrase und WKS vermittele, indem es durch letzteres zu Fumarat oxydiert, durch erstere zu Succinat reduziert wird. Es ist bekannt, daß an der Succinodhydrase nicht nur das Succinat unter Dehydrierung als Donator, sondern ebenso energisch auch das Fumarat unter Hydrierung

⁸⁾ Skand. Arch. Physiol. **24**, 23—86 (1911).

⁹⁾ Skand. Arch. Physiol. **45**, 303 (1924).

als Wasserstoffacceptor aktiviert wird. Diese einfache Theorie hätte all den aufgezählten Beobachtungen eine befriedigende Erklärung gegeben. Die Theorie stand aber im Widerspruch mit folgenden Beobachtungen:

1. Wie Gözsy und Szent-Györgyi fanden, ist die durch Fumaratzusatz stabilisierte Atmung nicht durch Malonat hemmbar. Liefere der Wasserstofftransport über die Succinodehydrase, so müßte die Atmung in jedem Fall durch Malonat gehemmt werden.

2. Das dem Muskel unter anaeroben Bedingungen zugesetzte Fumarat wird nicht oder nur äußerst langsam reduziert.

3. Malonat entfaltet seine Atmungshemmung, Fumarat seine Atmungssteigerung nur in Phosphat und nicht in Ringerlösung. Es konnte nicht angenommen werden, daß ein fundamentaler Prozeß sich je nach der Suspensionsflüssigkeit verschieden verhalte.

4. Das dem gewaschenen Muskel zugesetzte Succinat war nicht imstande, die fehlende Verbindung zwischen Nährstoffdehydrasen und WKS herzustellen.

5. Die Theorie gab keine Erklärung für die Funktion der Fumarase.

Während also einerseits Beobachtungen in zwingender Weise zeigten, daß das Fumarat als Katalysator im Mittelpunkte der Atmung stehe, zeigten Versuche ebenso deutlich, daß die Atmung nicht über die Succinodehydrase, d. h. über den Wechsel Succinat-Fumarat laufen könne. Es wurde also untersucht, ob das Fumarat die Funktion des Wasserstofftransporteurs nicht durch seinen Wechsel mit einer höheren Oxydationsstufe ausüben könne.

Um nun festzustellen, welche von den möglichen nächst höheren Oxydationsstufen in Frage kommen kann, wurde in doppelter Weise vorgegangen. Einerseits untersuchte Banga, welche von den in Betracht kommenden Substanzen das Fumarat in seiner stabilisierenden Wirkung ersetzen könne. Es zeigt sich hierbei, daß in dieser Hinsicht wohl nur die Oxalessigsäure aktiv ist und in jeder Beziehung der Fumarsäure gleich wirkt. Andererseits untersuchte Laki, welche von den in Betracht kommenden Substanzen im Gewebe als Acceptor aktiviert wird. Dies war überhaupt nur mit der Oxalessigsäure der Fall. Ist also das Fumarat mit einer höheren Oxydationsstufe an der Atmung beteiligt, so kann diese höhere Oxydationsstufe nur die Oxalessigsäure sein. Für eine mögliche Bildung von Oxalessigsäure aus Fumarat

haben bereits Hahn, Haarmann und Fischbach¹⁰⁾ Beweise erbracht.

Nachdem also unsere Aufmerksamkeit auf die Oxalessigsäure gelenkt war, mußte zunächst die mögliche Oxydation des Fumarats und Reduktion des Oxalacetats untersucht werden. In diesen, durch Banga ausgeführten, von Gözsy ergänzten Versuchen zeigte sich, daß das untersuchte Gewebe (Taubenbrustmuskel in Phosphat) die zugesetzte Oxalessigsäure mit großer Geschwindigkeit zum Verschwinden bringt. Nach Straub kommt der Schwund durch Reduktion zu Fumarat zustande. Die durch das Gewebe in der Zeiteinheit reduzierbare Menge des Oxalacetats übertraf in Äquivalenten den gesamten, bei der Atmung aufgenommenen Sauerstoff, so daß festgestellt werden konnte, daß Oxalacetat durch das Gewebe mit einer genügenden Geschwindigkeit reduziert werden kann, um die gesamte Atmung bzw. den Transport des gesamten Wasserstoffes zu tragen.

Bestand nun die Atmung gemäß unserer Anschauung aus einer wechselnden Oxydation und Reduktion des Fumarats, so war es aus den genannten Angaben deutlich, daß die Reduktion des Oxalacetats rascher als ihre Bildung aus Fumarat verlaufen müsse und daß man somit beim in Phosphat suspendierten Muskel auch bei Fumaratzugabe kein Oxalacetat nachweisen könne. Die Bildung des Oxalacetats könnte nur nachgewiesen werden, wenn es gelang, seine Reduktion stärker als seine Bildung zu hemmen. Dies gelang mit Arsenit. Wird das Gewebe mit Arsenit aerob bebrütet, so wird die Wasserstoffaktivierung der Nährstoffe weitgehend unterdrückt¹¹⁾. Es scheint, daß durch diese Arsenitbehandlung die Dehydrasen vergiftet werden. Nicht alle Dehydrasen leiden aber in gleicher Weise. Während z. B. die Milchsäuredehydrase ganz vernichtet wird, wird die Succinodehydrase, die Glutaminsäure- und Hexosediphosphatdehydrase nicht oder nur wenig gehemmt. Auch die Fumardehydrase gehört zur Fermentgruppe, die durch die Arsenitbehandlung weniger leidet. Durch das Arsenit wird die Wasserstoffmobilisierung der Nährstoffe in höherem Maße wie die Fumaroxydation unterdrückt, so daß sich also hier die Möglichkeit einer Anreicherung von Oxal-

¹⁰⁾ Hahn, Haarmann, Z. Biol. 87, 465 (1928); Hahn, Haarmann u. Fischbach, Ebenda 88, 587 (1929).

¹¹⁾ Szent-Györgyi, Biochemic. J. 24, 1723 (1930); I. Banga, L. Schneider u. A. Szent-Györgyi, Biochem. Z. 240, 462 (1931); I. Banga, A. Szent-Györgyi, Biochem. Z. 246, 203 (1932).

acetat und damit seines Nachweises ergibt. Es konnte aber nicht erwartet werden, die gesamte gebildete Oxalessigsäure wiederzufinden, da einerseits die Fumardehydrase durch Arsenbehandlung selber auch leidet, andererseits die Wasserstoffmobilisierung, wie auch die gesamte Atmung durch Arsenit nicht gänzlich, sondern bloß zu 70—75% unterdrückt wird. Arsenit verursacht also keine qualitative Änderung, sondern bloß eine Verschiebung der normalen Verhältnisse. Diese Verschiebung ist aber groß genug, um das Oxalacetat zum Nachweis zu bringen. Wurde das Gewebe mit Arsen vorbehandelt, dann mit Fumarat bebrütet, so trat Oxalacetat in nicht unbeträchtlicher Menge auf. Läuft der gesamte Wasserstofftransport über Fumarat-Oxyfumarat, so muß 1 g Gewebe in 10 Minuten insgesamt annähernd 8 mg Oxyfumarat (die dem verbrauchten O₂ äquivalente Menge) bilden. Hiervon konnte mit Hilfe des Arsenits 1 mg tatsächlich nachgewiesen werden. Ähnlich, wie Arsenit, wenn auch schwächer und weniger zuverlässig, wirkte auch Maleinat (0,05 Mol.).

Stand nun die Bildung des Oxalacetats fest, so galt es, ein entsprechend aktives Ferment der Oxydation des Fumarats nachzuweisen. 2mal gewaschener Muskel vermag Farbstoffe in Gegenwart von Fumarat auch mit Co-Dehydrasezusatz nur sehr schwach zu dehydrieren. Also entweder ist keine Fumardehydrase im Gewebe vorhanden, oder aber sie mußte beim Auswaschen verschwinden. Ungewaschenes Gewebe kann aber wegen der starken spontanen Reduktion nicht zum Thunbergversuch verwendet werden. Wurde durch Arsen vorbehandeltes Gewebe herangezogen, das Farbstoffen gegenüber ein stark vermindertes Entfärbungsvermögen hatte, so wurde durch Fumaratzusatz die Entfärbungszeit stark vermindert, als Zeichen dessen, daß das Gewebe eine intensive Fumardehydrase enthielt. Die weitere Analyse zeigte, daß durch das Waschen des Muskels die Fumardehydrase nicht inaktiviert, sondern bloß herausgelöst wurde und aus der Waschflüssigkeit mit hoher Aktivität und relativer Reinheit zurückgewonnen werden konnte. Das auf diese Weise hergestellte Fermentpräparat zeigte, daß die Fumardehydrase eine sehr hohe Aktivität besitzt, die, beurteilt nach der Entfärbungszeit, genügend groß ist, um die gesamte Atmung bzw. den gesamten Wasserstofftransport tragen zu können. Lakis Messungen zeigten auch, daß dieses Ferment — ähnlich der Bernsteinsäuredehydrase — so gebaut ist, daß es fähig ist, schon mit minimalen Substratmengen maximal zu arbeiten, so daß also auch in dieser Beziehung nichts

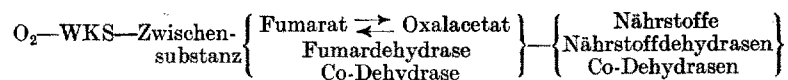
der Annahme im Wege steht, daß dieses Ferment, zusammen mit der natürlicherweise im Muskel anwesenden Fumarsäure, die gesamte Atmung vermittele.

Während aber die Bernsteinsäuredehydrase in gleicher Weise O_2 und Farbstoffe als Wasserstoffacceptoren zu benutzen vermag, ist die Fumardehydrase unfähig, O_2 als Acceptor zu gebrauchen, d. h. aerob Fumarat zu Oxalacetat zu oxydieren, obwohl die Fumardehydrasepräparate stets eine aktive Succinodehydrase und damit auch ein aktives WKS enthalten.

Die weitere Arbeit Bangas ergab, daß im Muskelgewebe ein thermolabiler Faktor anwesend ist, der die Fumardehydrase befähigt, O_2 als Wasserstoffacceptor zu gebrauchen, d. h. Fumarat aerob zu Oxalacetat zu oxydieren. Die chemische Natur dieser Substanz, die die Fumardehydrase mit dem WKS verbindet, wurde noch nicht näher untersucht. Die Substanz soll fortan „Zwischensubstanz“ genannt werden.

Wie eingangs erwähnt, ist das System: Nährstoffdehydrase, Nährstoff, plus WKS unfähig, Sauerstoff aufzunehmen, da die Verbindung zwischen den beiden Fermenten fehlt. Wird hingegen dieser Komplex mit folgenden Gliedern ergänzt: Fumardehydrase, thermolabiler Faktor plus Fumarat, so erhält man ein System, das alle typischen Eigenschaften der Normalatmung (Malonhemmbarkeit, Steigerung durch Fumarat) zeigt, als Zeichen dafür, daß mit Einfügen dieser Glieder der Atmungszyklus vollständig geworden ist.

Es läßt sich also sagen, daß in der Kette der biologischen Oxydation zwischen WKS und Nährstoffdehydrierung ein System des Wasserstofftransports eingeschaltet ist. Dieser Wasserstofftransport wird durch die Fumarsäure vermittelt, die — aktiviert durch die Fumardehydrase — abwechselnd zu Oxalacetat oxydiert, und wieder zu Fumarat reduziert wird. Die Oxydation des Fumarats wird, dem WKS zu, durch die noch nicht näher definierte Zwischensubstanz vermittelt. Auf Grund dieser Ergebnisse kann also das Atmungssystem folgendermaßen dargestellt werden:



Dieses Atmungsschema gibt aber keine Erklärung für die Atmungshemmung durch Malonat, die in unserer ganzen Arbeit zusammen mit der Fumarkatalyse die fundamentale Beobachtung

bildete. Die Fumardehydrase ist ebenso wie die anderen Glieder dieser Kette, malonunempfindlich.

Das Problem des Mechanismus der Malonathemmung wurde in eindeutiger Weise durch Straub gelöst. Die von Straub ausgebaute Mikrofumarsäurebestimmung gestattete es, das Schicksal der Fumarsäure unter Wirkung des Malonats quantitativ zu verfolgen. Diese Fumarsäurebestimmungen zeigten, daß unter Einwirkung des Malonats die Fumarsäure verschwindet und hierdurch die Fumardehydrase ihr Substrat und die Zelle ihren katalytischen Wasserstofftransporteur verliert, wodurch die Atmung zum Stillstand kommt.

Die Versuche Straubs wurden durch Gözsy ergänzt, der mit seiner Mikrobersteinsäurebestimmungsmethode zeigte, daß das verschwundene Fumarat zu Bernsteinsäure reduziert wird und als solches nachgewiesen werden kann. Hierdurch klärte sich auch der Mechanismus des Fumaratschwundes: im Atmungsprozeß wird stets ein geringer Teil des anwesenden Fumarats zu Bernsteinsäure reduziert. Unter normalen Umständen wird diese Bernsteinsäure durch die Succinoxidase sogleich wieder zu Fumarat reoxydiert und somit ihrer Funktion zurückgegeben. Die besondere Kinetik der Bernsteinsäuredehydrase befähigt dieses Ferment, schon die geringsten Spuren des entstandenen Succinats mit maximaler Geschwindigkeit, unverzüglich zu reoxydieren. Durch Malonat wird die Succinodehydrase vergiftet und somit wird auch diese Reoxydation des Succinats verhindert. Hiermit erklärte sich also nicht nur der Mechanismus der Malonathemmung, sondern zugleich auch die Funktion und besondere Kinetik der Succinodehydrase. Obwohl die, durch die Succinodehydrase in der beschriebenen Weise, durch Reoxydation des Succinats vermittelte Sauerstoffaufnahme nur einen geringen Teil (5%) der gesamten Sauerstoffaufnahme des Gewebes bildet, bleibt bei Vergiftung der Bernsteinsäureoxydase die Atmung stehen, da die geringe Menge der als Katalysator wirkenden Fumarsäure, bald zu Bernsteinsäure reduziert, nicht mehr reoxydiert, und somit ihrer Funktion entzogen wird. Durch Inaktivieren der Succinodehydrase wird durch das Malonat dem Fumarat gleichsam eine Falle gelegt, in dem es als Succinat gefangen und als solches stabilisiert wird.

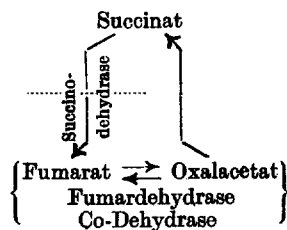
1 g Gewebe reduziert in dieser Weise in 10 Minuten kaum mehr als 0,5 mg Fumarat zu Succinat. Die Menge der natürlich anwesenden Fumarsäure ist aber so klein, daß bereits diese schwache Reduktion genügt, um unter Wirkung des Malonats die gesamte

Menge des natürlichen Katalysators binnen 2 Minuten als Bernsteinsäure zum Schwinden zu bringen.

Durch diese Messungen erlangt auch die zweite, sonst so widerspruchsvoll erscheinende Beobachtung, daß Malonat wohl die natürliche, nicht aber die durch Fumaratzusatz stabilisierte Atmung hemmt, eine einfache Erklärung. Während der Muskel in Gegenwart von Malonat die natürlicherweise anwesenden 0,04 mg Fumarat in 2 Minuten zu Succinat umsetzt, benötigt er zur Umsetzung der gewöhnlich zugesetzten 2,4 mg Fumarat zwei volle Stunden, während welcher Zeit die Atmung trotz der Anwesenheit des Malonats ungehindert weiter gehen kann. Da unsere Versuche nie länger als 1 Stunde fortgesetzt wurden, kam die Hemmung nicht mehr zur Beobachtung. Mit geringeren Mengen des Fumarats erhält man in Gegenwart von Malonat zuerst die erwartete Atmungssteigerung, dann aber, nach der für die Reduktion des Fumarats nötigen Zeit, die erwartete Atmungshemmung.

Unerwarteterweise scheint das Succinat nicht aus Fumarat, sondern durch eine „Überreduktion“ aus Oxalacetat gebildet zu werden, da diese Reduktion zu Succinat nur bei aerober Bebrütung stattfindet, wenn der Fumarsäure Gelegenheit gegeben ist, sich zu Oxalacetat zu oxydieren. Anaerob wird in Gegenwart von Malonat kein Succinat gebildet.

Der mittlere Teil des obigen Atmungsschemas muß also folgendermaßen ergänzt werden:



Die gebrochene Linie gibt die Stelle an, an der Malonat wirkt und den Atmungszyklus unterbricht.

Aus diesem Atmungsschema wird es deutlich, daß Malonat nicht, wie z. B. Cyan, in einer absoluten Weise wirken kann. Das Ausmaß der Malonathemmung wird von dem relativen Verhältnis einer Reihe von Prozessen abhängen. An erster Stelle wird die Succinodehydrase durch Malonat nicht vollständig vergiftet. Eine geringe Oxydation des Succinats geht auch in Gegenwart von

Malonat stets vor sich. Die Geschwindigkeit dieser Oxydation ist von den relativen Mengen des bereits gebildeten Succinats und des zugesetzten Malonats abhängig. Das gebildete Succinat wird also, wenn auch langsam, doch auch in Gegenwart von Malonat mit gut definierbarer Geschwindigkeit oxydiert, so daß Malonat nie eine 100%ige Atmungshemmung geben kann. Das Ausmaß der Malonathemmung wird also von der relativen Intensität der Reduktion des Oxalacetats zu Succinat und der Reoxydation des Succinats abhängen. Die Intensität dieser Reduktion des Oxalacetats zu Succinat muß wieder eine Funktion der relativen Leistungsfähigkeit der Fumaratoxydation und der Wasserstoffmobilisierung der Nährstoffe sein. Ist unter diesen beiden Prozessen die Oxydation des Fumarats relativ stark, so wird der aktivierte Wasserstoff durch dieses aufgebraucht und es bleibt kein Wasserstoffüberschuß, der zu einer Überreduktion des Oxalacetats führen könnte. In diesem Falle muß das zugesetzte Malonat relativ wirkungslos bleiben. Ebenso bleibt auch das Fumarat wirkungslos, da doch bereits ohne Fumaratzugabe Oxalacetat im Überschuß vorhanden ist. Ist hingegen die Wasserstoffmobilisierung relativ stark, wie dies in Phosphat (dank der starken Phosphorylierung) der Fall ist, so wird es eher zu einer Überreduktion des gebildeten Oxalacetats und somit zu einer starken Malonathemmung kommen. Diese intensivere Wasserstoffmobilisierung wird auch in einer intensiveren Atmung ihren Ausdruck finden. Von diesen Bedenken geleitet, hat Straub bei einer größeren Anzahl von Versuchen die gemessene Atmungsintensität mit der Malonathemmung und der Succinatbildung in ein Koordinatensystem gebracht, und gefunden, daß beide Größen, sowohl die Malonathemmung, wie die, mit ihr im Wesen identische Succinatbildung Funktionen der Atmungsintensität sind.

Die Bildung des Oxalacetats ist von Phosphaten unabhängig läuft also, wie Banga zeigte, mit gleicher Intensität in Phosphat- oder Ringerlösung. Nicht so die Wasserstoffmobilisierung der Nährstoffe. Schon mit Zuhilfenahme von Farbstoffen oder Oxalacetat läßt sich zeigen, daß in Ringerlösung die Wasserstoffmobilisierung gegenüber Phosphat deutlich vermindert ist. In Ringerlösung verschiebt sich also das Verhältnis der Fumaratoxydation und der Wasserstoffmobilisierung zugunsten des ersteren. Diese Verschiebung konnte durch Banga in eindeutiger Weise demonstriert werden. In einer größeren Anzahl von Versuchen zeigte Banga, daß, während der in Phosphat suspendierte Muskel aus

Fumarat kein Oxalacetat bildet bzw. dieses ebenso rasch wieder reduziert, wie es gebildet wird, im Muskel, der in Ringerlösung suspendiert und mit Fumarat bebrütet wird, stets Oxyfumarat in deutlich nachweisbaren Mengen vorgefunden wird. Dementsprechend fand auch Straub, daß der in Ringerlösung suspendierte Muskel auch in Gegenwart von Malonat kein Fumarat zu Succinat reduziert, oder aber diese Reduktion ist, verglichen mit Phosphat, nur äußerst gering und kommt nur bei sehr geringen zugesetzten Fumaratmengen zur Beobachtung (bei denen nur wenig Succinat angehäuft werden kann, somit die Geschwindigkeit der Reoxydation des Succinats gering bleibt). Dies erklärt dann auch die sonst so widerspruchsvoll erscheinende Beobachtung, daß zugesetztes Malonat und Fumarat in Ringerlösung viel weniger wirken oder ganz unwirksam bleiben.

Das auf S. 16 wiedergegebene Atmungsschema gibt also eine befriedigende Erklärung für alle in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen. Nur einer der eingangs aufgezählten Punkte blieb unbeantwortet, die Frage nach der Bedeutung der Fumarase. Diese Frage hängt mit dem zur Zeit noch ungelösten Problem der primären Reaktionsprodukte zusammen. Die Möglichkeit steht gänzlich offen, daß bei der Oxydation des Succinats nicht, wie allgemein angenommen, Fumarat, sondern Malat entsteht und die Fumarase die Aufgabe hätte, dieses Malat in Fumarat umzusetzen. Ebenso wenig wissen wir mit Sicherheit, was das primäre Reduktionsprodukt der Oxalessigsäure ist. Dieses kann kaum eine andere Substanz sein als Äpfelsäure und die wahrscheinliche Funktion der Fumarase ist die, diese Äpfelsäure zu Fumarat umzusetzen, da Malat, wie durch Laki gezeigt, selber nicht dehydriert wird.

Unbekannt ist auch das primäre Oxydationsprodukt des Fumarats. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist dies das Oxyfumarat, das sich in neutraler Lösung rasch zum größten Teil in die Ketoform umsetzt. Ob Oxyfumarat in den Geweben schon als solches oder erst als Oxalacetat reduziert wird, wird wohl von den noch unbekanntem relativen Geschwindigkeiten der einzelnen Prozesse abhängen*). Da Oxyfumarat, Oxymaleinat und Oxalacetat in neutraler Lösung miteinander im Gleichgewichte stehen, ist es

*) Wird der gesamte Wasserstofftransport von Fumarat getragen, so muß jedes Molekül des „Fumarats“ im Muskel annähernd 8mal in der Minute oxydiert und reduziert werden.

unmöglich, experimentell unter diesen drei Substanzen zu unterscheiden. Darum wird in vorliegender Arbeit durchweg nur über „Oxalacetat“ gesprochen, mit dem Vorbehalte, daß es ganz offen bleibt, mit welcher Form die Substanz tatsächlich in Reaktion tritt.

Es sei nun zum Schluß nachdrücklich betont, daß alle unsere Untersuchungen sich in erster Linie auf zerkleinerten, in Phosphat suspendierten Brustmuskel der Taube beziehen. Solch ein Muskel ist kein ruhender, normaler Muskel und die Verhältnisse in diesem System sind den normalen gegenüber stark verzerrt. Es kam uns aber nicht darauf an, die Verhältnisse des normalen, ruhenden Muskels festzustellen, sondern den Mechanismus zu erforschen, der die Grundlage der Atmung bildet. Erst durch diese Verzerrung der normalen Verhältnisse ist die vorliegende Analyse ermöglicht worden. Es ist eine Grundbedingung für die Analyse eines so komplexen, innerlich ausgeglichenen Systems, wie die Atmung, den Mechanismus zu verzerren oder zu zerlegen und hierdurch seine einzelnen Teile in Erscheinung treten zu lassen.

Es fragte sich zuletzt, ob sich die mit zerkleinertem Muskel erhobenen Befunde auch auf andere Gewebe übertragen lassen, eine Verallgemeinerung erlauben, oder aber nur einen Spezialfall bilden. Es war wünschenswert, die Versuche mit einer Methode zu wiederholen, die den physiologischen Bedingungen näher steht. Dieser Aufgabe hat sich Annau unterzogen. Er findet, daß die erhobenen Befunde sich auf andere Gewebe, wie Leber und Niere, übertragen lassen. Aus diesen Geweben können, im Gegensatz zum Muskel, auch Schnitte angefertigt werden, die durch manche Forscher als mit normalem Gewebe gleichwertig betrachtet werden. Daher wurde die Untersuchung auf Schnitte ausgedehnt, und Annau findet, daß im Verhalten der Schnitte und des an der Latapimaschine hergestellten Gewebsbreies keine wesentlichen Unterschiede bestehen. Gleichzeitig zeigte Annau, daß das auf den Fumaratzyklus spezifisch einwirkende Malonat tiefgreifende Verschiebungen im chemischen Mechanismus des intermediären Stoffwechsels verursacht, ein weiterer wichtiger Beweis, daß der durch Malonat beeinflusste Mechanismus im oxydativen Zellstoffwechsel eine zentrale Rolle spielt.

Immerhin aber hat man keine Sicherheit, daß selbst die Gewebeschnitte die normalen Verhältnisse widerspiegeln. Darum hat es Huszák unternommen zu untersuchen, ob die Verschiebungen im Chemismus des Stoffwechsels, die in vitro be-

obachtet wurden, auch im ganzen Tier reproduzierbar sind. Wie im letzten Teile dieser Arbeit berichtet werden soll, ist dies tatsächlich der Fall.

Zum Schlusse seien noch zwei Umstände namhaft gemacht, die die beschriebene Rolle des Fumarats bedenklich erscheinen lassen könnten. Seit Neuberg und Tirs¹²⁾ Untersuchungen ist es bekannt, daß Oxalessigsäure durch Gewebe zu Brenztraubensäure decarboxyliert wird. Nach Wieland¹³⁾ soll sogar gekochter Muskel ähnlich wirken. Hahn, Haarmann und Fischbach¹⁴⁾ haben sich mit diesem Prozeß eingehend beschäftigt. Wird das Oxalacetat decarboxyliert, so ist es für die katalytische Funktion des Wasserstofftransportes verlorengegangen. Diese Decarboxylierung ist aber ein relativ langsamer Prozeß, während dessen die Lebensdauer der einzelnen Oxalessigsäuremoleküle dank der raschen Reduktion nur sehr kurz sein kann. Sollte sich Oxalacetat aus irgendeinem Grunde anhäufen, so kann die Decarboxylierung sicherlich zum Schwunde der Substanz führen. Huszáks und Straubs Arbeiten geben direkte Beweise dafür, daß dies auch tatsächlich der Fall sei, und daß das Fumarat, das nicht zur Katalyse nötig ist und somit nicht mit genügender Geschwindigkeit reduziert wird, tatsächlich auch auf diesem Wege verschwindet. Sollten im Stoffwechsel stets geringe Mengen Succinats bzw. Fumarats gebildet werden, so wird ihr zur Katalyse unnötiger Überschuß durch diese von Hahn und Mitarbeitern beschriebene Reaktion entladen, die gleichsam wie der Abfluß am Wasserbade wirkt.

Es mag vielleicht befremdend wirken, einer so einfachen Substanz wie Fumarat eine so grundlegende Funktion zuzuschreiben. Es sei aber darauf hingewiesen, daß Succinat bzw. Fumarat — strukturell betrachtet — ganz einzig dastehende Substanzen sind. Bekanntlich haben die α - und β -C-Atome stets besondere Eigenschaften, die sich in ihrer besonderen Reaktionsfähigkeit kundgeben. Nun gibt es bloß eine Substanzgruppe, die zwei vizinale C-Atome enthält, die beide zugleich α - und β -C-Atome sind: die Gruppe der C₄-Dicarbonsäuren.

In vorliegender Arbeit wird die Literatur und Geschichte möglichst kurz gehalten. An Stelle der ausführlicheren Besprechung verweisen wir auf die von H. v. Euler herausgegebene Mono-

¹²⁾ Biochem. Z. 32, 330 (1911).

¹³⁾ Liebigs Ann. 496, 229 (1923).

¹⁴⁾ Vgl. a. a. O. S. 11.

Messer das in die Löcher dringende Gewebe in rascher Folge abschneiden. Der Durchmesser des größten Teiles der Stückchen liegt um 0,3—0,5 mm*).

Es ist wohl wichtig, diese Verhältnisse zu betonen, da ein so gemahlener Muskel von manchen Forschern als ein Gewebsbrei aufgefaßt wird, in dem die Zellstruktur vernichtet ist. Dies trifft nicht zu. Der „Brei“ besteht aus relativ intakten Gewebstückchen und kann mit den Gewebsschnitten verglichen werden. Solch ein Gewebstück ist eigentlich ein Gewebsschnitt, mit dem Unterschied, daß der Schnitt nicht in einer, sondern in drei aufeinander senkrechten Ebenen angelegt ist. Werden Leber oder Niere in dieser Weise zerkleinert, so enthalten die einzelnen Stückchen im Durchschnitt 10000 Zellen**).

Sollte das Muskelgewebe „gewaschen“ werden, so wurde der Brei im 20fachen Volumen destillierten, eisgekühlten Wassers suspendiert, hier unter sanftem Rühren 10 Minuten lang belassen, durch ein Tuch filtriert und dann ausgepreßt. Je nach Bedürfnis wurde dieses Waschen 1—3mal wiederholt.

Zum Zwecke der respirometrischen oder der Thunbergversuche wurde der gemahlene, gewaschene oder ungewaschene Muskel in 2,65/15 Mol. eisgekühlten Phosphats von p_H 7 suspendiert. Auf je 10 g Gewebe wurden 30 ccm Pufferlösung gebraucht. Das Mahlen und Suspendieren wurde möglichst rasch ausgeführt und der Versuch womöglich sogleich vorgenommen, die Suspension sonst bei 0° bewahrt.

Zum respirometrischen oder Thunbergversuch wurde von dieser Muskelsuspension stets 1,5 ccm (annähernd 0,4 g Gewebe entsprechend) abpipettiert. Im Versuchsgefäß wurde das Volum mit Wasser oder sonstigen Zusätzen stets auf 4 ccm aufgefüllt, so daß die Endkonzentration des Phosphats $\frac{1}{15}$ Mol. entsprach.

Die respirometrischen Versuche wurden, wo nicht anders hervorgehoben, in dem mit Seitengefäß versehenen Barcroftapparat von 45 ml Volum vorgenommen (Fig. 1). Die CO_2 wurde durch ein mit NaOH befeuchtetes Filterpapier gebunden, das in einem Becherrchen im Halse des Manometers an einem Stahldrahtbügel aufgehängt wurde***) (Fig. 1). Alle Versuche wurden bei 37° ausgeführt. Es wurde stets 10 Minuten vorgeschüttelt, dann die Hähne geschlossen und das Manometer alle 10 Minuten abgelesen. Länger als 1 Stunde wurden die Versuche — abgesehen von Annaus besonderen Experimenten — wegen Ausschluß von Autolyse und Mikrobentätigkeit nicht ausgedehnt.

*) Das Maß der Stückchen ist von dem Drucke und von der Geschwindigkeit der Messer abhängig.

**) In der Latapimühle, wie sie in den Handel kommt, hat die gelöcherte Scheibe eine konvexe, rohe hintere Oberfläche, die gegen eine zweite konkave Scheibe anliegt. Zwischen beiden Flächen wird der Gewebsbrei zermahlen, wodurch ein großer Teil der Zellen beschädigt wird. In unseren Versuchen wurde diese zweite konkave Scheibe entfernt, so daß die Gewebstückchen in dem Zustande weiter verwendet wurden, wie sie die gelöcherte Scheibe passierten.

***) Die früher von Ambrus, Banga und Szent-Györgyi [Biochem. Z. 240, 473 (1931)] beschriebene Methode der Adsorption der CO_2 wurde verworfen, da sich das Abtropfen der Lauge nicht ausschließen läßt.

Die Dehydrierungsversuche wurden in den von mir früher modifizierten Thunbergrohren vorgenommen. Da es nötig war, größere Serien von Versuchen unter vergleichbaren Bedingungen vorzunehmen, wurden je 12 Röhrchen im Sinne der Fig. 2 an ein weites, mit Hahn versehenes Rohr

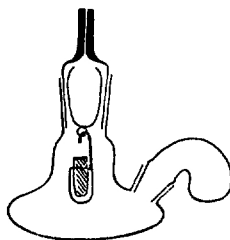


Fig. 1.

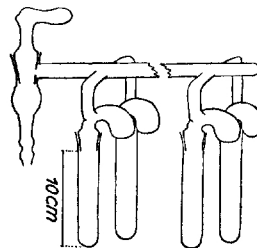


Fig. 2.

angeschmolzen. Diese Anordnung hat den großen Vorteil, daß sie es gestattet, größere Serienversuche unter identischem O_2 -Druck anzustellen. Der Farbstoff wurde in die Seitengefäße einpipettiert und erst nach Evakuieren dem Gewebsbrei zugegeben.

In unserer Arbeit war es öfters von Bedeutung, den der Dehydrierung entgegengesetzten Prozeß, die Hydrierung, zu messen. Zum Messen dieses Vorganges stand bis jetzt keine Apparatur zur Verfügung. Bei diesem Versuch muß an Stelle von Farbstoff Leukofarbstoff dem Reaktionsgemisch zugesetzt werden. Die Schwierigkeit des Versuches ist die, daß das Ausmessen des Leukofarbstoffes *in vacuo* vorgenommen werden muß.

Wir haben uns folgender, auf Fig. 3 dargestellter Apparatur bedient. Wie bei Fig. 2 wurden 12 Thunbergrohren an ein Hauptrohr angeschmolzen.

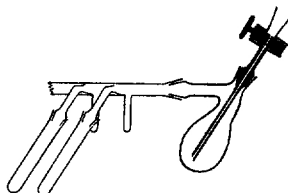


Fig. 3.

Gegenüber jedem Rohr wurde ein kleines, blind endendes Röhrchen angebracht. Das Volumen dieses Röhrchens war 1,5 ml. Am einen Ende des Hauptrohres befand sich ein etwa 35 ml fassendes Gefäß. In dieses wurde die Farbstofflösung eingebracht. Nach erfolgter Evakuierung wurde aus dem Ansatzrohr Natriumhydrosulfitlösung ($Na_2S_2O_4$) zugelassen, bis der Farbstoff entfärbt war. In einigen Versuchen war es nötig, einen geringen Überschuß von Sulfit zuzugeben, um den Sauerstoff, der aus dem Muskel nicht gänzlich entfernt werden konnte, zu kompensieren.

Durch Drehen seines Rezeptakels wurde die Leukofarbstofflösung in das lange zentrale Rohr einlaufen gelassen und füllte die kurzen Röhrchen. Sein Überschuß wurde in das Reservoir zurückgegossen. Durch entsprechendes

Neigen des Apparates wurde nun die also verteilte Leukofarbstofflösung den Versuchsröhren, in die der Muskelbrei mit sonstigen Zusätzen eingefüllt war, zugegossen. Die Farbänderungen konnten nun im Wasserbade beobachtet werden. Nur die Reaktionsröhren werden in das Wasser versenkt. Für besonderes Schütteln war nicht gesorgt. Ab und zu wurde der ganze Apparat mit der Hand energisch durchgeschüttelt. Ist der Apparat genügend evakuiert, so sorgt das fortwährende Kochen der Flüssigkeit für das nötige Mischen.

Je nach den Umständen wurden verschiedene Farbstoffe als Redox-Indicatoren verwendet. Sollten Dehydrierungen in Gegenwart von Fumarat nachgewiesen werden, so mußte ein stark positiver Farbstoff verwendet werden, dessen Leukoform die Fumarsäure nicht mehr zu reoxydieren vermag, dessen E_0 also um mindestens 100 mV positiver ist als das E_0 des Succinat-Fumarat-systems. Beliebig positiv konnte aber der Farbstoff auch nicht sein, da um 200 mV das Protoplasma stark zu reduzieren beginnt. Am geeignetsten wurde das 1-Naphthol-2-sulfonat-indo-2,6-dichlorphenol gefunden, dessen E_{ho} nach Gibbs, Cohen und Cannan¹⁶⁾ bei +119 mV liegt (p_H 7).

Als Farbstoff von mittlerem E_0 wurde Methylenblau gebraucht. Als Farbstoff negativeren Charakters wurde Indigo-Carmin (5,5'-Indigosulfonat) verwendet, dessen E_{ho} nach Sullivan, Cohen und Clark¹⁷⁾ bei -125 mV liegt (p_H 7).

Als stark negativer Farbstoff wurde das Neutralrot verwendet ($E_{ho} = -330$)¹⁸⁾.

Als Co-Ferment diente in allen unseren Versuchen das von Banga¹⁹⁾ und mir beschriebene, als Hg-Salz isolierte und über Phosphorwolframsäure gereinigte Co-Ferment der Milchsäureoxydation. Die Substanz wird kurz „Co-Dehydrase“ genannt. Bei allen Versuchen wurden 0,5 mg dieser Substanz verwendet.

Das in dieser Arbeit gebrauchte Hydroxyfumarat und Hydroxymaleinat wurde nach der Methode von Wohl und Österlin hergestellt²⁰⁾. Es ist recht schwierig, oxymaleinatfreies Oxyfumarat oder oxyfumaratfreies Oxymaleinat herzustellen, da sich die Isomeren rasch ineinander umwandeln und eine Gleichgewichtsmischung geben. Die Reinheit kann durch den Schmelzpunkt beurteilt werden (Schmelzpunkt Oxyfumarat nach Wohl und Österlin 184°, Oxymaleinat 152°). Der Schmelzpunkt der gebrauchten Präparate wird an entsprechender Stelle angegeben.

In neutraler Lösung setzen sich beide Substanzen augenblicklich in die Ketoform um, so daß wir unter „Oxalessigsäure“ in vorliegender Arbeit eine frisch zubereitete neutrale Lösung des Gleichgewichtsgemisches von Oxyfumarat und Oxymaleinat verstehen*).

¹⁶⁾ Hyg. Lab. Bull. Washington 151, 159 (1928).

¹⁷⁾ Hyg. Lab. Bull. Washington 151, 78 (1928).

¹⁸⁾ K. G. Stern, Tab. biol. 10, 4 (1934).

¹⁹⁾ Diese Z. 217, 39 (1933).

²⁰⁾ Ber. chem. Ges. 34, 1139 (1901).

*) Ich bin für die Herstellung einiger Präparate der I. G. Farbenindustrie A.-G., Frankfurt a. M.-Höchst, zum Danke verbunden. Dieselbe Firma hat sich auf meine Bitte hin bereit erklärt, diese Substanz als Laboratoriumspräparat herzustellen und hiervon auf besonderen Wunsch kleinere Mengen als „Enol-oxalessigsäure“ abzugeben.

Es war öfters nötig, zwischen Oxalacetat und Pyruvat zu unterscheiden, die beide eine identische Nitroprussidreaktion geben. Dies konnte mit Hilfe von Anilin geschehen, das bekanntlich Oxalacetat, nicht aber Pyruvat zersetzt.

Wir lösen 5% Anilin im 0,2 mol.-pH 5-Acetatpuffer und geben von dieser Lösung gleiche Teile zur zu untersuchenden Flüssigkeit. Dann wird 15 Minuten bei 37° bebrütet, mit NaOH alkalisiert, 2mal mit Äther ausgeschüttelt (wodurch das überschüssige Anilin entfernt wird).

Um Wiederholungen zu vermeiden, sei noch ein Wort über die Fumarase gesagt. Wie bekannt, enthält der Muskel, selbst auch noch im gewaschenen Zustande, eine hochwirksame Fumarase. Wird also Fumarat dem Muskel zugesetzt, so wird, wenn keine ganz besonderen Maßnahmen getroffen werden, dieses in kürzester Zeit zu $\frac{3}{4}$ in Äpfelsäure umgesetzt und somit der Bestimmung entzogen. Dasselbe gilt auch für das natürlich anwesende Fumarat. Die analytisch gefundenen Fumaratwerte müssen also stets mit 4 multipliziert werden, um die gesamte, in der Oxydationsstufe des Fumarats befindliche Substanz zu ergeben. Diesen Wert, der also dem Vierfachen des analytisch gefundenen Fumarats entspricht, werden wir kurzweg als „Fumarat“ (Fumarat in Anführungszeichen) bezeichnen.