

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

III. Mitteilung<sup>1)</sup>.

Von

**E. Annau, I. Banga, A. Blazsó, V. Bruckner, K. Laki, F. B. Straub  
und A. Szent-Györgyi.**

Mit 5 + 2 + 2 + 1 = 10 Figuren im Text.

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

(Der Schriftleitung zugegangen am 11. August 1936.)

**Einleitung, Übersicht, Methoden.**

Von

**A. Szent-Györgyi.**

BRS. = Brenztraubensäure.      FS. = Fumarsäure.  
OES. = Oxalessigsäure.      ÄS. = Äpfelsäure.  
FÄS. = Fumar- plus Äpfelsäure<sup>2)</sup>.

In den beiden ersten Mitteilungen dieser Reihe<sup>3, 4)</sup> wurden Beobachtungen mitgeteilt, die zeigten, daß die FS. an der Gewebsatmung als Katalysator beteiligt ist. Ihre Funktion ist die eines intermediären Wasserstoffacceptors, der zwischen das System der Nährstoffdehydrierung und das System der Sauerstoffaktivierung eingeschaltet ist. Zu dieser Funktion wird die FS. durch eine

<sup>1)</sup> Diese Arbeit wurde durch die Unterstützung der Josiah-Macy-Jr.-Stiftung, New York, ermöglicht.

<sup>2)</sup> Die FS. oder ÄS. wird im Gewebe durch die Fumarase stets in kürzester Zeit zum Gleichgewichtsgemisch beider Substanzen umgesetzt, so daß man stets nur letzteres vorfindet. Die Gesamtmenge von FS. plus ÄS. (FÄS) kann aus dem Resultat der FS.-Bestimmung durch Multiplikation mit 4, aus der ÄS. durch Multiplikation mit 4/3 berechnet werden.

<sup>3)</sup> B. Gözsy u. A. Szent-Györgyi, Diese Z. **224**, 1 (1934).

<sup>4)</sup> Annau, Banga, Gözsy, Huszák, Laki, Straub u. Szent-Györgyi, Ebenda, **236**, 1 (1935).

entsprechende Dehydrase aktiviert. Die aktivierte FS. wird durch das System der Sauerstoffaktivierung ( $O_2$ , Atmungsferment, Cytochrom) zu OES. oxydiert. Die OES. dient dann als Wasserstoffacceptor der Nährstoffdehydrierung. Durch die Aufnahme von 2 H-Atomen wird die OES. wieder zu FS. reduziert. Die Funktion der FS. ist also die, den Wasserstoff der Nährstoffe dem Sauerstoffaktivierungssystem zur Oxydation zuzuführen. Die Versuche wurden z. T. durch Boyland und Boyland<sup>1)</sup> sowie G. D. Greville<sup>2)</sup> bestätigt. Es ist der Zweck vorliegender Arbeit diese Theorie der FS.-Katalyse weiter zu vertiefen.

Es war der Mangel unserer vorgehenden Mitteilung, daß sie sich zum Teil auf qualitative Methoden des OES.-Nachweises stützte. Unsere zunehmende Erfahrung lehrte uns, daß in diesem Gebiete des intermediären Stoffwechsels qualitative Methoden irreführend seien. Selbst quantitative Methoden erlauben die Beantwortung gewisser Fragen nur dann, wenn sie es gestatten, die chemischen Veränderungen in kleinen Gewebismengen binnen kurzer Zeitabschnitte (2—10 Minuten) bilanzmäßig zu verfolgen. Das Ausarbeiten derartiger spezifischer Mikromethoden war um so mehr nötig, da sich zeigte, daß die BRS. nicht nur im fermentativen, sondern auch im oxydativen Kohlenhydrat-Abbau eine zentrale Rolle spielt. Dank der nahen chemischen Verwandtschaft der BRS. und der OES. werden alle bekannten Reaktionen der BRS. auch durch die OES. gegeben, ist doch die OES. nichts als eine Carboxy-BRS., die mit großer Leichtigkeit, auch spontan, in BRS. übergeht. Aus diesem Grunde benötigten wir zunächst Mikromethoden, die es gestatteten, diese beiden Substanzen nebeneinander in spezifischer Weise zu bestimmen.

In unserer früheren Arbeit benützten wir zum OES.-Nachweis die Simon-Piauxsche Probe<sup>3)</sup>, die zum halbquantitativen Nachweis der BRS. schon vielseitig verwendet wurde. Ebenso wie die BRS. gibt auch die OES. in Gegenwart von Ammonsulfat und  $NH_4OH$  mit Nitroprussidnatron eine tiefblaue Farbe. In reinen Lösungen reagieren BRS. und OES. verschieden und lassen sich auch mit dieser Probe unterscheiden. Während indessen die OES. bereits in 2 Minuten eine maximale Farbe gibt, beginnt die Farbe in Gegenwart von BRS. erst nach längerer Zeit (5 Minuten) zu erscheinen, um nach 15—20 Minuten maximal zu werden. Wird die OES.-Lösung durch Kochen oder durch Anilin zu BRS. decarboxyliert, so verschwindet die

<sup>1)</sup> Biochemic. J. 30, 224 (1936).

<sup>2)</sup> Biochemic. J. 30, 877 (1936).

<sup>3)</sup> Bull. Soc. Chim. biol. 6, 477 (1924).

rasche OES.-Reaktion, um der entsprechenden langsamen Reaktion der BRS. Platz zu machen.

Trotzdem aber läßt sich die Reaktion nicht zum gleichzeitigen Nachweis beider Substanzen gebrauchen, weil anwesende BRS. die Reaktion der OES. (Färbung nach 2 Minuten) sehr verstärkt, obwohl sie selber in so kurzer Zeit noch keine Reaktion geben würde. Ebenso wird auch die Reaktion der BRS. durch Spuren von OES., die selber noch keine stärkere Farbe geben, sehr vertieft. Bei Mischungen von OES. und BRS. verschwindet also jede Proportionalität zwischen Farbe und Menge der zu bestimmenden Substanzen.

Dementsprechend fanden wir auch, daß das, was wir in unserer II. Mitteilung als OES. angesprochen haben, oft nur die durch Spuren von OES. verstärkte Reaktion der BRS. war.

Durch diese Feststellung wurde auch die Existenz der in unserer II. Mitteilung postulierten „Zwischensubstanz“ als Vermittler der Oxydation hinfällig. Diese Substanz scheint nicht mit der Oxydation, sondern mit der fermentativen BRS.-Bildung verbunden zu sein.

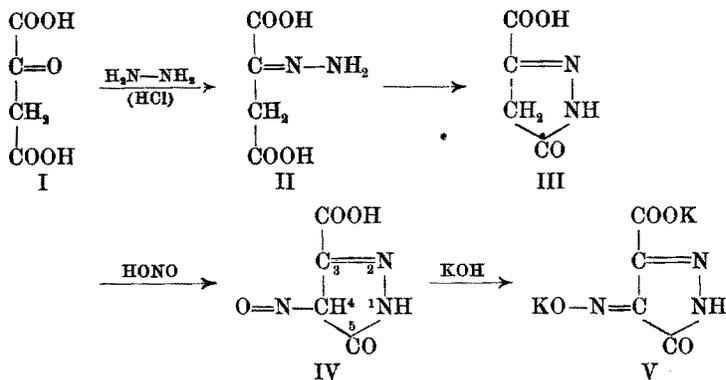
Unsere mühevollen Arbeit führte nun zu Methoden, die die genaue quantitative Bestimmung der OES. und BRS. nebeneinander gestatten.

Die BRS. konnte neben OES. durch Kondensation mit Salicylaldehyd bestimmt werden. BRS. kondensiert mit Salicylaldehyd bei stark alkalischer Reaktion zur tief gefärbten o-Oxybenzalbrenztraubensäure (Perkinsche Synthese). Eine analoge Reaktion wurde bereits durch Csonka<sup>1)</sup> zur Bestimmung des Acetons herangezogen. Unsere Methode der BRS.-Bestimmung lehnt sich an diese Methode Csonkas.

Wie F. B. Straub fand, wird diese Reaktion durch OES. aus theoretisch nicht feststehenden Gründen (weitgehende Enolisierung?) nicht gegeben. Wie Straub findet, ist bei der verwendeten stark alkalischen Reaktion die OES. stabil, so daß eine spontane Decarboxylierung die BRS.-Bestimmung nicht stört.

Die OES. kann, wie Straub fand, neben BRS. als 4-Nitrosopyrazolon-3-carbonsäure bestimmt werden. Mit Hydrazin bildet die OES. ein Hydrazon, das sogleich einen Ringschluß mit der  $\beta$ -Carboxylgruppe eingeht. Mit salpetriger Säure behandelt, gibt dieses Pyrazolon am 4 C-Atom eine Nitroverbindung, die bei stark alkalischer Reaktion tautomerisierend ein Kalisalz bildet, das eine kolorimetrisch verwertbare intensive gelbe Farbe zeigt. Der Gang der Reaktion, der in einem nachstehenden Abschnitt durch V. Bruckner bewiesen wird, ist also der folgende:

<sup>1)</sup> J. of Biol. Chem. 27, 209 (1916).



Diese Reaktion wird nur durch  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Ketone gegeben, die den Ringschluß einzugehen vermögen. BRS., Acetaldehyd oder Aceton geben die Reaktion nicht. Unter den physiologisch in Betracht kommenden Substanzen ist es nur die Acetessigsäure, die die Reaktion zu geben vermag. Der Extinktionskoeffizient des entstandenen Produktes ist aber 100mal geringer, als der E. der OES., so daß die Acetessigsäure die OES.-Bestimmung nicht zu stören vermag (E. der OES. als Nitrosopyrazoloncarbonsäure = 2166, E. der Acetessigsäure als Methylnitrosopyrazolon = 21). Der weitere große Vorteil dieser Bestimmungsmethode der OES. ist der, daß die Blankversuche ganz farblos sind.

Weiterhin beschäftigt sich Straub in der nachstehenden Arbeit mit der Bestimmung der ÄS. und der  $\text{CO}_2$ . Messung der  $\text{CO}_2$  gestattet die decarboxylative Bestimmung der OES. und des RQ. der Atmungsversuche. Methoden zur Bestimmung der FS. und der Bernsteinsäure wurden bereits in unserer II. Mitteilung (S. 42 und 54) angegeben.

Mit Hilfe dieser Methoden unterzogen wir nochmals die einzelnen Phasen der FS.-Katalyse — Oxydation der FS. und Reduktion der OES. — einer eingehenden Untersuchung.

Nachdem der bisherige Nachweis der oxydativen Bildung der OES. aus FS. sich auf die unzulängliche Simon-Piauxsche Probe gründete, versuchte zunächst I. Banga neue Beweise der FS.-Oxydation zu erbringen.

Wie bereits in unserer früheren Mitteilung gezeigt, ist von beiden Vorgängen, Oxydation der FS. und Reduktion der OES., letzterer der weit intensivere Vorgang, so daß selbst bei intensiver OES.-Bildung nicht erwartet werden kann, mehr als Spuren dieser

Substanz vorzufinden. Dieses Verhältnis der Oxydation zur Reduktion kann durch Zugabe von Arsenit zugunsten der ersteren verschoben werden. Durch Zugabe von Arsenit werden deutlich meßbare Mengen von OES. nachweisbar, die aber immer noch zu gering sind, um als Stütze unserer Theorie zu dienen.

Die Menge der nachweisbaren OES. konnte durch Banga durch Heranziehen eines Abfangmittels noch weiter erhöht werden. Zu diesem Zwecke wurde Hydrazin verwendet. Obwohl Hydrazin bei weitem kein ideales Abfangmittel darstellt, konnte doch durch seine Hilfe unter günstigen Bedingungen  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  jener OES.-Menge abgefangen werden, die sich bilden mußte, falls die gesamte Atmung durch Fumarat vermittelt wird. Hierdurch ist nicht nur die oxydative Bildung der OES. aus FS. bewiesen, gleichzeitig zeigen diese Versuche, daß die Dimension dieses Vorganges den durch unsere Theorie gestellten Forderungen entspricht.

Ebenso entspricht der Theorie, wie Banga findet, die Dimension der Reduktion der OES. durch das Gewebe. Der Muskel vermag in 5 Minuten 2—4 mg OES. zum Schwunde zu bringen. Dies ist 2—4mal mehr als nötig, um annehmen zu können, daß die gesamte Sauerstoffaufnahme über FS. verläuft. Gleichzeitig wird gezeigt, daß binnen der durch die Methode gesetzten Grenzen die verschwundene OES. als FÄS. vorgefunden werden kann, ein Beweis dafür, daß der Schwund der OES. tatsächlich durch ihre Reduktion bedingt war und daß im untersuchten Gewebe der Schwund der OES. als ein Maß ihrer Reduktion angesehen werden kann.

Anlehnend an diese Resultate wurde von Banga ein weiterer wichtiger Versuch ausgeführt, der gestattet, unsere Theorie von einem neuen Blickpunkte aus zu kontrollieren. Unserer Theorie entsprechend ist es die Funktion des Systems Cytochrom, Atmungsferment und  $O_2$ , die Fumarsäure zu OES. zu oxydieren. Setzt man also OES. zu, so muß man hierdurch, falls die Theorie richtig, das genannte System der Sauerstoffaktivierung bei der Atmung ersetzen können. Die zugesetzte OES. muß mit dem Sauerstoff um den Wasserstoff der Nährstoffe in Konkurrenz treten. Bei Zugabe von OES. muß also die Sauerstoffaufnahme des Gewebes aufhören. Nur wenn OES. den physiologischen Wasserstoffacceptor darstellt, darf erwartet werden, daß sie mit dem natürlichen Acceptor  $O_2$  erfolgreich konkurrieren kann. A priori hätte sich dies nicht erwarten lassen, da doch OES. in vitro keine Elektroaktivität besitzt und kein Oxydationsmittel darstellt.

Die in dieser Richtung ausgeführten Versuche zeigten, daß auf Zugabe der OES. die ganze Sauerstoffaufnahme zum Stillstande kommt, und sogleich mit ihrer gewohnten Aktivität wieder einsetzt, sobald die zugesetzte OES. reduziert wurde. Dies zeigt also, daß die OES. dem ganzen System der Sauerstoffaktivierung äquivalent ist. Zugleich erbringt dieser Versuch den wichtigen Beweis, daß die zugesetzte OES. durch denselben Wasserstoff reduziert wird, der bei der Atmung letzten Endes durch den Sauerstoff verbrannt wird. Es ist also kein künstlicher, unphysiologischer Prozeß, der zur Reduktion der OES. führt. Zugleich zeigt der Versuch, daß, so wie dies auch bei anderen Dehydrasen der Fall, die Oxydation der FS. durch ihr Oxydationsprodukt, die OES. gehemmt wird. Diese Feststellung ist auch aus methodischen Gründen wichtig, da sie es unnötig macht, die Reduktion der OES. unter Sauerstoffabschluß zu messen. Dementsprechend wurde auch gefunden, daß aerob und anaerob ausgeführte kurze Reduktionsversuche mit OES. das gleiche Resultat ergeben. Der aerobe Versuch, dessen Charakter physiologischer ist, scheint sogar noch günstiger zu sein.

Sodann beschäftigt sich Banga mit dem R.Q. des Muskelgewebes. Sie zeigt, daß der R.Q., der beim zerkleinerten, in Phosphat suspendierten Muskel um 0,85 liegt, durch Zugabe von FS. auf die Einheit oder etwas über 1 steigt. Dies ist ein nicht unwichtiger Beweis dafür, daß die FS. die Oxydation der Kohlenhydrate vermittelt.

Zum Schlusse berichtet Banga über einige vergleichende Versuche mit verschiedenen Geweben. Sie findet, daß auch Rattenmuskel die OES. energisch reduziert. Etwas schwächer, aber noch stets wohl ausgesprochen, ist der Schwund der OES. im Lebergewebe. Sehr überraschend sind die mit den drei verschiedenen bösartigen Geschwülsten ausgeführten Versuche. Diese Gewebe greifen die OES. überhaupt nicht, oder nur spurenweise an, obwohl sie im Respirometer deutlich Sauerstoff verbrauchen. Hier scheint also in bezug auf die OES.-Reduktion zwischen normalem und bösartigem Geschwulstgewebe ein wesentlicher Unterschied zu bestehen.

Besonders merkwürdig erscheint dieser Unterschied im Lichte der nachfolgenden Untersuchung A. Blazsós, der findet, daß sich das embryonale Rattengewebe in bezug auf OES. ähnlich verhält, wie das Geschwulstgewebe. Dasselbe ist auch noch bei der Geburt der Fall. Der Umschwung zum normalen Verhalten, d. h. zur Fumarkatalyse, erfolgt in den beiden ersten Wochen des ex-

trauterinen Lebens. Die Bernsteinsäure wird durch embryonale Gewebe stark oxydiert, so daß keine engen Beziehungen zwischen der Bernsteinsäureoxydase und dem Fumaratsystem bestehen können.

Das Verhalten des embryonalen Gewebes sowie der Geschwülste zeigt, daß die FS. sicherlich nicht den einzigen Weg der Atmung darstellt.

Banga und Blazsós Arbeiten enthalten noch einige weitere Beobachtungen über den Werdegang des Hexosediphosphats in verschiedenen Geweben und enthalten Hinweise darauf, daß die Hexose bzw. die aus dieser entstehende Triose durch dasselbe Ferment zur Oxydation (Reduktion der OES.) und Fermentation, (Reduktion der BRS.) aktiviert wird.

In einem weiteren Abschnitte beschäftigt sich F. B. Straub mit der Decarboxylierung der OES. im Gewebe. Dies geschieht mit Rücksicht auf die zahlreichen Theorien des intermediären Stoffwechsels, die sich auf die noch nie bewiesene rasche katalytische Decarboxylierung der OES. gründen. Wäre eine solche aktive Decarboxylierung bzw. eine entsprechend intensive  $\beta$ -Carboxylase im Gewebe tatsächlich vorhanden, so könnte die OES. unmöglich die von uns angenommene katalytische Funktion besitzen, sondern würde zu BRS. decarboxyliert werden. Unsere Versuche gaben keinen Anhaltspunkt für die Existenz einer solchen aktiven Decarboxylase, zeigten vielmehr, daß, falls ein solches Enzym in dem von uns untersuchten Gewebe überhaupt vorhanden ist, seine Aktivität unter unseren Versuchsbedingungen, verglichen mit der Aktivität anderer Vorgänge der Hauptatmung, nur sehr gering sein und das Resultat unserer kurzen Bilanzversuche nicht wesentlich beeinflussen kann.

In dem nachfolgenden Abschnitte wird von K. Laki die so grundlegende Frage der Donatoren der Atmung aufgeworfen. Die Frage war die nach der chemischen Natur der Substanz, die in unseren Atmungsversuchen dehydriert wird und durch ihren abgespaltenen Wasserstoff die OES. reduzierte und bei der Atmung letzten Endes den Sauerstoff verbraucht. Unsere langjährige Erfahrung auf diesem Gebiete gab uns keinen Anhaltspunkt dafür, daß Milchsäure hierbei eine wesentliche Rolle spielt<sup>1)</sup>. Die Atmung

<sup>1)</sup> Möglicherweise spielt die Milchsäure bei der Atmung des Froschmuskels eine größere Rolle. Die meisten Untersuchungen in dieser Richtung beziehen sich auf dieses Material. Nach den geläufigen Schemen der Atmung wird fermentativ zunächst Milchsäure gebildet, diese dann durch Eingreifen

der Muskelsuspension wird durch Lactatzusatz nicht, oder nur unwesentlich befördert. Wird die Bildung von Lactat durch Fluorid oder Jodacetat unterdrückt, so wird die Atmung meistens nicht wesentlich vermindert. Verringert sich die Atmung auf Zusatz dieser Substanzen, so kann die verminderte Atmung nicht durch Lactatzusatz wieder erhöht werden. Sorgt man durch Fumaratzusatz für eine ungestörte Respiration, so findet man sogar oft, daß der Zusatz von Fluorid oder Jodacetat die Atmung nicht nur nicht hemmt, sondern sogar erhöht als Zeichen dafür, daß durch Unterdrückung der Milchsäuregärung das Substrat der Atmung geschützt wurde. Die zum gewaschenen oder ungewaschenen Muskelgewebe zugesetzte Milchsäure vermag auch nicht die Reduktion der OES. zu befördern. Daß Milchsäure als Donator bei der Atmung unseres Muskels keine wesentliche Rolle spielt, zeigt auch der Umstand, daß die dehydrierende Aktivierung des Lactats durch 50 mg-% BRS. weitgehend unterdrückt wird, währenddessen dieselbe Konzentration dieser Substanz die Sauerstoffaufnahme nicht wesentlich hemmt.

Die Reduktion der OES. am gewaschenen Muskel konnte durch Hexosediphosphat, Robisonester oder Glycerinaldehyd — besonders in Gegenwart von Co-Ferment — stark beschleunigt werden. Alle anderen Donatoren, Glucose, Glykogen, Milchsäure, Dioxyaceton,  $\alpha$ -Glycerophosphat, Äthylalkohol und Zitronensäure waren inaktiv.

Laki findet nun, daß bei der Reduktion der zugesetzten OES. stets nicht unwesentliche Mengen von BRS. entstehen. Diese BRS. konnte unmöglich durch Decarboxylierung der OES. gebildet werden. Die Menge der BRS. stieg in den ersten Minuten der Bebrütung, um dann später gleich zu bleiben oder abzufallen. Für diesen Abfall mußte ein Schwund der BRS. verantwortlich gemacht werden. Um also in die quantitativen Verhältnisse eine bessere Einsicht zu gewinnen, mußte die Umsetzung der BRS. hintangehalten werden.

In Muskelextrakten sind die Resynthesen, die z. T. an die „Struktur“ gebunden sind, geringer als im Muskel. Dementsprechend findet Laki, daß im Extrakt mehr BRS. auf OES.

der Oxydation wieder zum Schwunde gebracht. Diese Sequenz der Vorgänge entspricht der Lebensweise des Frosches, der oft lange Zeit ohne Sauerstoff leben kann, wenn ihm später nur die Gelegenheit geboten wird, sich an der Luft zu regenerieren. Dasselbe scheint aber für den Warmblüter nicht zutreffen, der vielmehr unmittelbar vom Sauerstoff, d. h. von oxydativen Prozessen abhängig ist und keine längere Zeit auf Rechnung fermentativer Prozesse leben kann.

Zusatz erhalten wird, als im zerkleinerten Muskel. Bei kurzer Versuchsdauer sind sogar die gebildeten Mengen der BRS. der gleichzeitig reduzierten OES. äquivalent.

Der Schwund der BRS. konnte noch weiter durch Zusatz von Arsenit unterdrückt werden [H. A. Krebs<sup>1)</sup>]. Bei Arsenitzusatz wird zwar auch die Reduktion der OES. vermindert, aber die Übereinstimmung zwischen BRS.-Bildung und OES.-Schwund kann unter Verwendung dieser Substanz auch auf längere Perioden ausgedehnt werden.

Es läge an der Hand, die gefundene Bildung äquivalenter BRS. der Decarboxylierung der OES. zuzuschreiben. Gleichzeitig konnte aber auch die Bildung äquivalenter Menge FÄS. nachgewiesen werden, ein Beweis, daß die OES. nicht durch Decarboxylierung verschwunden ist, sondern durch das Gewebe reduziert wurde. Die BRS. konnte also nicht aus der zugesetzten OES. entstanden sein, sondern mußte sich aus einer dritten Substanz mit drei C-Atomen durch Oxydation mit je zwei Äquivalenten pro Molekül bilden.

Diese dritte Substanz ist der Wasserstoffdonator der OES.-Reduktion und somit auch das Substrat der durch FS. katalysierten Atmung unseres Gewebes. Aus dem Gesagten geht hervor, daß sie nur eine Triose sein konnte.

Diese Versuche geben auch ein Beispiel dafür, daß eine klare Antwort auf derartige Fragen des intermediären Stoffwechsels nur durch ganz kurze (3—5 Minuten) bilanzmäßig ausgeführte Versuche erhalten werden kann.

Es fragte sich endlich, ob die FS.-Katalyse sich nur auf den Muskel beschränkt, oder aber auch in anderen Geweben nachweisbar ist. Banga zeigte bereits, daß auch die Leber OES. zum Schwunde zu bringen vermag. In unpublizierten Versuchen zeigte sie auch, daß mit Hilfe des Hydrazin-Abfangverfahrens die Bildung von OES. aus FS., ebenso wie im Muskel, in der Leber nachzuweisen ist. Dies wies bereits darauf hin, daß die FS. auch in den Atmungsvorgängen der Leber eine bedeutende Rolle spielt. Immerhin aber schien es wünschenswert, die Funktion der FS. in diesem Organ mit Hilfe eines bekannten H-Donators zu untersuchen. Aus diesem Grunde unterzog Annau in der folgenden Mitteilung die Oxydation der BRS. im überlebenden Lebergewebe einer Untersuchung.

<sup>1)</sup> Diese Z. 217, 191 (1933).

Annau zeigt, daß die Oxydation der BRS. in der Leber tatsächlich durch FS. vermittelt wird. In dieser Arbeit werden sehr merkwürdige Befunde erhoben, die vielleicht auf den Mechanismus der Acetonogenese ein Licht werfen. Wie bereits Embden zeigte und wie Annau bereits früher bestätigen konnte<sup>1)</sup>, vermag das Lebergewebe BRS. in Aceton umzusetzen. In vorliegender Arbeit wird gezeigt, daß, falls durch Zugabe von FS. für die ungestörte Funktion des Fumaratsystems gesorgt ist, pro Mol. BRS. je ein Atom Sauerstoff aufgenommen wird. In diesem Falle kann bei gleichzeitiger Decarboxylierung die BRS. wieder in ein Kohlenhydratisomeres übergehen. Kann aber das Fumaratsystem wegen Mangel an FS. seine Funktion nicht ungestört ausüben, so wird weniger als ein O pro Mol. BRS. aufgenommen und es entsteht Aceton.

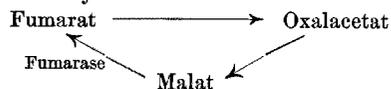
Zuletzt wird durch Laki, in Ergänzung unserer II. Mittlg., der noch ausstehende Beweis erbracht, daß das primäre Produkt der Oxydation der Bernsteinsäure an der Succinodehydrase die FS. ist. Am selben Ferment wird hydrierend auch nur FS., nicht hingegen ÄS. aktiviert. Die Lehmannschen Angaben über fumarasefreie Succinodehydrase werden bestätigt<sup>2)</sup>.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, einige Worte über das Verhältnis der Oxydation und Gärung hinzuzufügen. Unsere Versuche zeigen, daß der H-Donator der OES.-Reduktion und somit der durch Fumarase katalysierten Atmung das Kohlenhydrat ist. Dies geht aus der Messung des RQ. durch Banga hervor. Die Versuche Lakis zeigen, daß unmittelbar eine Triose (oder Triosephosphorsäure) oxydiert wird.

<sup>1)</sup> Diese Z. 224, 141 (1934).

<sup>2)</sup> Es ist nicht geglückt, ein fumarasefreies Präparat herzustellen, das OES. mit genügender Intensität reduzierte, und hiermit die Frage des primären Produktes der OES.-Reduktion und somit auch die Frage der biologischen Funktion der Fumarase definitiv zu lösen. Nachdem aber OES. durch chemische Mittel stets zu ÄS. und nicht zu FS. reduziert wird, so ist dies aller Wahrscheinlichkeit nach auch im Muskel der Fall.

In unserer II. Mittlg. zeigte Laki bereits, daß im Muskel nur die FS., nicht hingegen ÄS. zu OES. oxydiert wird. Dies läßt die Funktion der Fumarase doch mit großer Wahrscheinlichkeit angeben. Die Funktion dieses Fermentes ist es anscheinend, die durch Reduktion der OES. entstandene ÄS. in FS. zu überführen und somit zur erneuten Oxydation zu befähigen. Die Fumarkatalyse stellt also keinen einfachen Wechsel von FS.-OES., sondern einen Zyklus dar:



Meyerhofs Arbeit über den Hauptweg der Milchsäuregärung des Muskels zeigt, daß die Gärung eigentlich eine Oxydation der Triose durch BRS. darstellt. Die Atmung ist nach unseren Untersuchungen eine Oxydation der Triose durch OES. Hieraus geht hervor, daß Atmung und Gärung identische Vorgänge sind mit dem Unterschied, daß bei der Gärung als H-Acceptor BRS., bei der Atmung als H-Acceptor eine Carboxy-BRS., d. h. OES. dient. Die Natur scheint bei der Atmung das System der Gärung beibehalten zu haben, sie hat nur das als Acceptor dienende BRS.-Molekül mit einer Carboxylgruppe beschwert, hierdurch der Resynthese zu Kohlenhydrat entzogen und somit zu einer katalytischen Funktion befähigt<sup>1)</sup>.

Hierdurch wird auch ein neuer quantitativer Zusammenhang der Atmung und Gärung (Pasteursche Reaktion) deutlich. BRS. und OES. müssen für den aktivierten Wasserstoff in Konkurrenz treten. Bei Sauerstoffabschluß wird keine OES. gebildet. Anaerob steht nur BRS. als Acceptor zur Verfügung und das Kohlenhydrat kann nur fermentativ abgebaut werden. Aerob hingegen wird OES. gebildet, die nun mit der BRS. in Konkurrenz tritt, so daß sich die Vorgänge der Oxydation zu verschieben.

Aus dem Blickpunkte dieser Versuche scheint es auch, daß das eigentliche System der Oxydation bzw. Sauerstoffaktivierung (Atmungsferment, Cytochrom) nicht direkt oxydativ in den Kohlenhydratzyklus eingreift, sondern sich in seiner Funktion auf die Oxydation der beiden analogen Reduktionsprodukte, Äpfelsäure (über Fumarat) und Milchsäure beschränkt.

In dem nachfolgenden experimentellen Teil werden die Bestimmungsmethoden ausführlich beschrieben. Jedoch werden der Kürze halber von sonstigen Versuchen nur Beispiele gegeben. Die zitierten Versuche wurden aber so oft ausgeführt, bis wir uns von der Realität ihrer Ergebnisse überzeugten.

Zuletzt möchte ich nun darauf hinweisen, daß vorliegende Arbeit die einfache Messung einer neuen charakteristischen Größe des respiratorischen Stoffwechsels ermöglicht. Nachdem die OES. vorwiegend durch Reduktion verschwindet, kann der Schwund dieser

---

<sup>1)</sup> Durch den Eintritt der zweiten Carboxylgruppe erhalten auch die beiden mittleren C-Atome besondere Eigenschaften, die möglicherweise für die katalytische Funktion von Bedeutung sind. Wie ich bereits früher darauf hingewiesen habe, gibt es in der Natur nur eine Substanzgruppe, in der es in einem minimalen Volumen zwei benachbarte C-Atome gibt, die beide zugleich  $\alpha$ - und  $\beta$ -C-Atome sind: die 4 C-atomigen Dicarbonsäuren.

Substanz binnen gewisser Grenzen als Maß ihrer Reduktion betrachtet werden. Der Schwund läßt sich mit den beschriebenen Methoden leicht in genauer Weise verfolgen. Die OES.-Reduktion gibt die Menge des in der Zeiteinheit labilisierten und übertragbar gemachten Wasserstoffes. In der Thunbergschen Methode, bei der relativ geringe Mengen von Farbstoffen reduziert werden, wird mehr die Intensität des Reduktionsvermögens der Gewebe gemessen. Diese wird aber auch nicht eindeutig zum Ausdrucke gebracht. Bei der Verwendung der OES. als Indicator hat man weiterhin den Vorteil, mit dem natürlichen Acceptor der Gewebe zu arbeiten.

Es ist mir ein Vergnügen, diese Besprechung mit dem Ausdrucke meines Dankes an Herrn Prof. St. Szegedy für sein Mitarbeiten und seine wertvollen Ratschläge zu schließen.

#### Methoden.

Die allgemeine Methodik unserer Versuche glich annähernd der unserer vorhergehenden Mitteilung.

Als Material diente, wo nicht anders hervorgehoben, auch hier der Brustmuskel der Taube. Die Tiere wurden durch Decapitieren getötet, der Brustmuskel sogleich ausgeschnitten und das Gewebe in der auf 0° vorgekühlten Latapie-Mühle gemahlen. (Eigenschaften und Dimensionen des Breies vgl. II. Mtlg. S. 16.) Der Brei wurde sogleich im eisgekühlten 2,65/15 M Sörensen-Phosphat von  $p_H$  7 suspendiert. Auf je 1 g Muskel wurden 3 ml Phosphat gebraucht. Diese Suspension wurde dann mit einer graduierten Pipette zum Versuch verteilt. Vor dem Pipettieren wurde die Suspension mit einem elektrischen Rührer einige Sekunden energisch durchgerührt, wodurch die Muskelteilchen sich in der Lösung gleichmäßig verteilten und ein genaues Pipettieren ( $\pm 6\%$ , gemittelter Fehler  $\pm 3\%$ ) ermöglichten.

Zum Versuch wurde stets 1,5 ml dieser Suspension verwendet und mit Wasser oder sonstigen Zusätzen auf 4 ml verdünnt. Die Endkonzentration des Phosphates war also m/15. Die zu einem Versuch gebrauchte Menge des Muskels war 0,4 g. Die also zubereiteten Suspensionen wurden unverzüglich zum Versuch herangezogen.

Die respirometrischen Versuche wurden, abgesehen von besonders hervorgehobenen Ausnahmen, im Warburgschen Respirometer ausgeführt. Die Hähne wurden nach den ersten 10 Minuten geschlossen, die zur Erreichung des Temperaturgleichgewichtes nötig waren.  $t = 37^\circ C$ .

Zum Zwecke sonstiger Versuche wurde die Suspension in kleine 50 ml-Erlenmeyerkölbchen eingetragen. Kölbchen und Respirometer wurden in gleicher Weise im Wasserbade von  $37^\circ C$  versenkt und geschüttelt.

Zur Enteiweißung wurde auf je 4 ml der Suspension 0,5 ml 10% ige  $H_2SO_4$  und 0,5 ml 10% iges Natriumwolframat zugesetzt, die Mischung durchgeschüttelt, zentrifugiert. Die klare Lösung wurde dann zu den weiteren Bestimmungen verwendet.