

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Ueber den Abbau der [Alpha]-Amino-[Beta]-Oxybuttersäure durch überlebendes Nierengewebe

Wrann, Margarete

1938

Einleitung

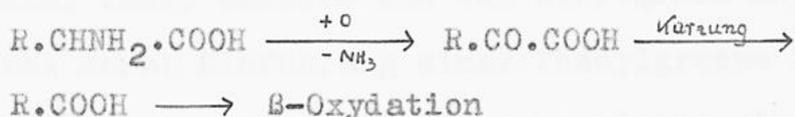
E i n l e i t u n g .

Gegenstand der vorliegenden Dissertation war, einen Beitrag zum Stoffwechsel der Aminosäuren zu liefern.

Die Aminosäuren sind Bausteine des Eiweisses, welches im Wege der Verdauung durch die proteolytischen Fermente über Albumosen, Peptone und niedrige Polypeptide zu den freien Aminosäuren abgebaut wird. Letztere gelangen zur Resorption und können, der jeweiligen Stoffwechsellage im Organismus entsprechend, eine verschiedene Verwendung finden. Wir unterscheiden hierbei Haupt- und Nebenwege des Aminosäure-Stoffwechsels. Hauptwege sind der Aufbau der Aminosäuren zu arteigenem Eiweiss und der Abbau der Aminosäuren im Stoffwechsel als energieliefernder Vorgang; Nebenwege sind die Verwendung einzelner Aminosäuren für Entgiftungsreaktionen (Kopplung von Glykokoll mit Benzoesäure, Phenyllessigsäure und Indollessigsäure zu Hippursäure, Phenacetursäure und Indolacetursäure, Kopplung von Phenyllessigsäure an Glutaminsäure u.s.w.), die Decarboxylierung von Aminosäuren zu biogenen Aminen (Bildung von Thyramin aus Thyrosin, Histamin aus Histidin) und die Kopplungsreaktion des Glykokolls mit den Gallensäuren, z.B. zu Glykocholsäure.

Wenn man vom Stoffwechsel der Aminosäuren spricht, so versteht man darunter in erster Linie die Verbrennung der Aminosäuren. Das Hauptverdienst, in den Abbau der Aminosäuren Einblick geschaffen zu haben, gebührt in erster Linie *Neubauer*, *Knoop* und *Emden*. Hierbei zeigt sich, dass als erster Angriff im Stoffwechsel der Aminosäuren eine oxydative Desaminierung erfolgt, bei der die NH_2 -Gruppe entfernt wird und Sauerstoff in das Molekül eintritt. Nach Kürzung des stickstofffreien Restes um 1-C-Atom

erfolgt der weitere Abbau des Kohlenstoffgerüsts durch β -Oxydation.

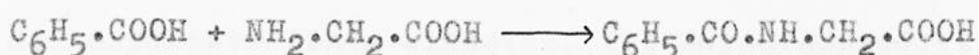


Da somit der Abbau der Aminosäuren mit grösserem Molekulargewicht eine Kombination von oxydativer Desaminierung und β -Oxydation darstellt, sollen im Hinblick auf die nachstehenden Untersuchungen beide Abbaufolgen etwas ausführlicher behandelt werden.

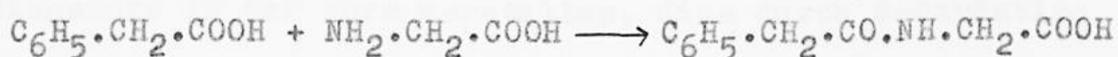
a) Die β -Oxydation.

Der Mechanismus der β -Oxydation ist von K n o o p anlässlich seiner Untersuchungen über den Abbau der Fettsäuren aufgeklärt worden. Grundlegend für die Untersuchungen Knoop's war die Beobachtung, dass eine Verfütterung höherer Fettsäuren mit g e r a d e r C-Anzahl bei hungernden Tieren zur Ausscheidung von Acetessigsäure, β -Oxybuttersäure und Aceton führte. Verfütterte man dagegen unter gleichen Versuchsbedingungen Fettsäuren mit u n g e r a d e r Kohlenstoffanzahl, so blieb das Auftreten der erwähnten Substanzen im Harn aus. Damit war festgestellt, dass nur Fettsäuren mit g e r a d e r Kohlenstoffanzahl zur Bildung von Ketonkörpern befähigt sind. Ueber den engeren Reaktionsmechanismus beim Abbau dieser Fettsäuren konnte naturgemäss noch nichts ausgesagt werden. Eines stand allerdings fest, dass der Abbau der Fettsäuren nicht durch systematische Kürzung der Kohlenstoffkette um e i n C-Atom erfolgen konnte, da in

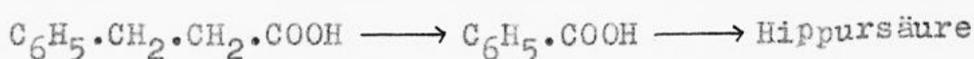
diesem Falle auch eine Bildung von Ketonkörpern aus höheren Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomanzahl zu erwarten gewesen wäre. Knoop wendete nun den Kunstgriff an, das Fettsäuremolekül durch Einführung einer Phenylgruppe in *W*-Stellung zur Karboxylgruppe chemisch zu markieren, da der Benzolkern dem chemischen Abbau im Organismus weitgehend Widerstand leistet. Bei Verfütterung der einfachsten aromatischen Säure, nämlich der Benzoesäure, wurde dieselbe nicht abgebaut, sondern nach Kopplung an Glykokoll, welches der Organismus in beliebiger Menge zu synthetisieren vermag, als Hippursäure ausgeschieden.



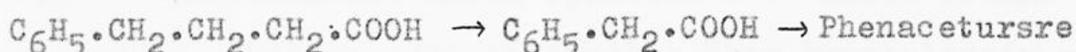
Bei Verfütterung der Phenylelessigsäure trat ebenfalls noch keine Kürzung der aliphatischen Kette im Organismus ein, sondern auch diese Substanz wurde nach vorhergegangener Kopplung an Glykokoll im Harn als Phenacetursäure wiedergefunden.



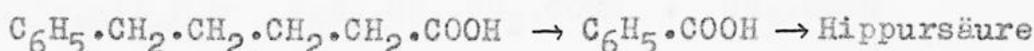
Dieser Fütterungsversuch mit Phenylelessigsäure zeigte somit eindeutig, dass eine oxydative Kürzung der aliphatischen Seitenkette im Sinne einer Bildung von Benzoesäure aus Phenylelessigsäure nicht erfolgt. Bei Verfütterung von *B*-Phenylpropionsäure wurde im Harn Hippursäure wiedergefunden. Daraus schloss Knoop mit Recht, dass beim Abbau dieser Substanz im Organismus in einem Gange *zwei* C-Atome abgespalten worden sein mussten, da andernfalls bei Abspaltung nur *eines* C-Atomes Phenylelessigsäure und damit Phenacetursäure hätte entstehen müssen.



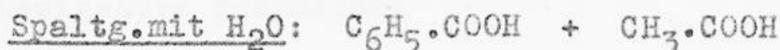
Diese Annahme fand ihre Bestätigung bei Verfütterung von δ -Phenylbuttersäure, die zur Ausscheidung von Phenacetursäure führte.



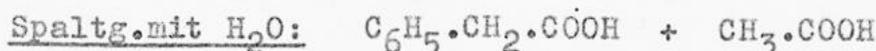
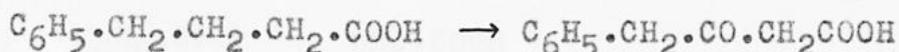
Bei Verfütterung der nächsthöheren ω -phenylierten Fettsäure, der δ -Phenylvaleriansäure, wurde aus dem Harn wieder Hippursäure isoliert:



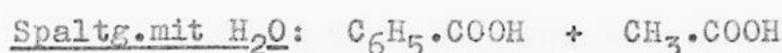
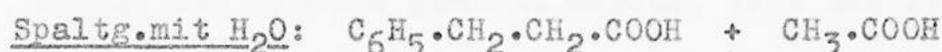
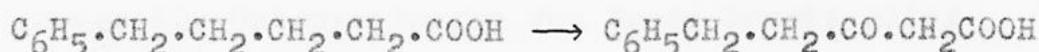
Aus diesen Versuchen geht hervor, dass der erste Angriff der Fettsäuren im Organismus in der Weise erfolgt, dass am β -Kohlenstoffatom, gerechnet von der Karboxylgruppe aus, der oxydative Abbau einsetzt. Als Zwischenprodukt entsteht eine β -Ketonsäure, die mutmasslich unter Wasseraufnahme in Essigsäure und eine Fettsäure zerfällt, welche um 2 C-Atome weniger enthält als das Ausgangsmaterial. Da Benzoesäure und Phenylelessigsäure im Organismus nicht weiter abgebaut werden, so muss man sich den Abbau der Phenylpropionsäure in der Form vorstellen, dass durch β -Oxydation primär Benzoylessigsäure entsteht, welche sekundär in Benzoesäure und Essigsäure unter Wasseraufnahme zerfällt:



Der erste Angriff bei der Phenylbuttersäure führte zu β -Keto- δ -Phenylbuttersäure, die analog Phenylelessigsäure und Essigsäure liefert:

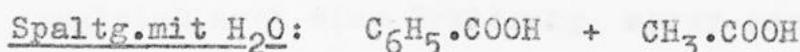
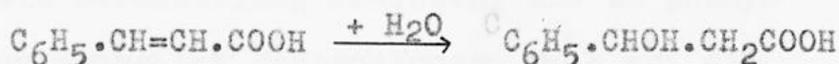


Der Abbau der Phenylvaleriansäure zu Benzoesäure stellt eine zweimalige β -Oxydation dar. Im ersten Gange wird über β -Keto- δ -Valeriansäure durch Spaltung mit Wasser Phenylpropionsäure gebildet, die ihrerseits über Benzoylessigsäure zu Benzoesäure abgebaut wird.

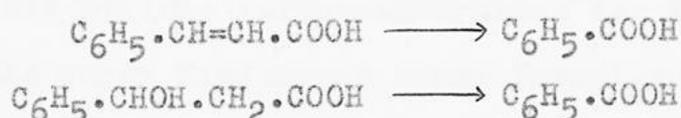


Durch diese Versuche an endständig phenylierten Fettsäuren wurde zum erstenmal der Mechanismus der β -Oxydation im Organismus aufgewiesen. Bezüglich der sich hierbei bildenden Zwischenprodukte wurde ein tieferer Einblick durch die Wieland'sche Dehydrierungstheorie ermöglicht, welche die oxydativen Vorgänge im Organismus als Dehydrierungsvorgänge erklärt.

Die Wieland'sche Dehydrierungstheorie sei kurz am Beispiel der Phenylpropionsäure gezeigt. Nach Wieland entsteht aus Phenylpropionsäure durch Abspaltung je eines Wasserstoffatoms an den beiden CH_2 -Gruppen zuerst Phenylacrylsäure, welche unter Wasseranlagerung in eine β -Oxy- β -Phenylpropionsäure übergeht. Diese wird dehydriert zu Benzoylessigsäure und unter Wasseraufnahme in Benzoesäure und Essigsäure gespalten:



Dass die entsprechende ungesättigte Säure und die Oxysäure tatsächlich Zwischenprodukte darstellen, geht daraus hervor, dass Phenylacrylsäure und β -Oxy-Phenylpropionsäure in gleicher Weise Benzoesäure im Organismus bilden wie die Phenylpropionsäure.

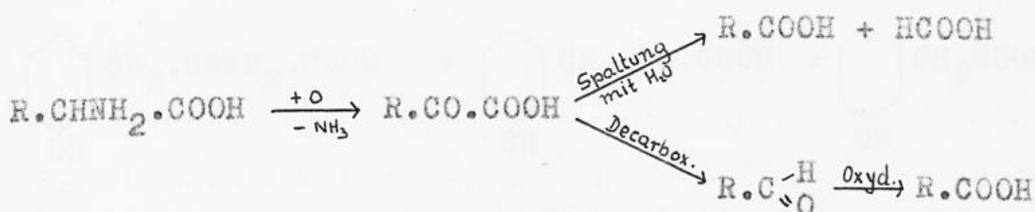


Gegen die Untersuchungen von Knoop konnte allerdings der Einwand gemacht werden, dass der Abbau phenylierter Fettsäuren eine Sonderstellung im Organismus einnimmt, dessen Uebertragung auf die natürlichen Fettsäuren nicht zulässig ist. Versuche mit natürlichen Fettsäuren bestätigten jedoch die Knoop'sche Annahme der β -Oxydation vollständig. Es sind dies die Fütterungsversuche an Hungertieren mit aliphatischen Fettsäuren, von denen, wie eingangs erwähnt, nur Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffatomanzahl zur Bildung von Acetessigsäure, β -Oxybuttersäure und Aceton führten, hingegen niemals Ketonkörper nach Verfütterung von Fettsäuren mit ungerader C-Anzahl auftraten, ferner die Durchblutungsversuche überlebender Lebern mit Fettsäuren, die ein vollständig gleiches Bild ergaben. Der Mechanismus der β -Oxydation in seiner reinsten Form geht aus den Fütterungs- und Durchströmungsversuchen der Leber mit Buttersäure hervor, welche zur Bildung der Acetessigsäure führt.

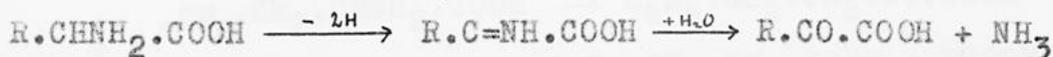
Damit war die Berechtigung erwiesen, die an phenylierten Fettsäuren gemachten Beobachtungen auch auf die natürlichen Fettsäuren zu übertragen. Sie geben dadurch zugleich auch eine Erklärung, warum aus Fettsäuren mit ungerader C-Anzahl durch schrittweise Kürzung um je zwei Kohlenstoffatome niemals ein Abbau zur Buttersäurestufe, welche eine gerade C-Anzahl enthält, möglich ist.

b) Oxydative Desaminierung.

Die gleiche Versuchsanordnung der Markierung des Moleküls durch Einführung einer Phenylgruppe erwies sich auch für die Aufklärung des näheren Mechanismus im Abbau der Aminosäuren erfolgreich. Schon Durchblutungsversuche der überlebenden Leber mit Alanin ergaben die Bildung von Brenztraubensäure. Bei Einführung der Phenylgruppe in Aminosäuren zeigte sich, dass die oxydative Desaminierung den ersten Angriff darstellt, der zur Bildung einer α -Ketonsäure unter gleichzeitiger Abspaltung von NH_3 führt. Die α -Ketonsäure scheint unter Wasseraufnahme zu Ameisensäure und einer Säure gespalten zu werden, welche um ein C-Atom weniger enthält als das Ausgangsmaterial. Zu dem gleichen Ergebnis würde auch eine Abspaltung von CO_2 aus der α -Ketonsäure führen, wenn der intermediär entstehende Aldehyd, welcher um 1 C-Atom weniger enthält als die α -Ketonsäure, zur Säure oxydiert wird.



Nach der Wieland'schen Dehydrierungstheorie wird die oxydative Desaminierung erklärt durch die intermediäre Bildung einer α -Iminosäure, welche unter Wasseraufnahme in die entsprechende α -Ketonsäure und NH_3 gespalten wird.

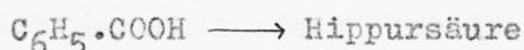


Der weitere Abbau der stickstofffreien Säure erfolgt, eine längere Kette vorausgesetzt, nach den Gesetzen der

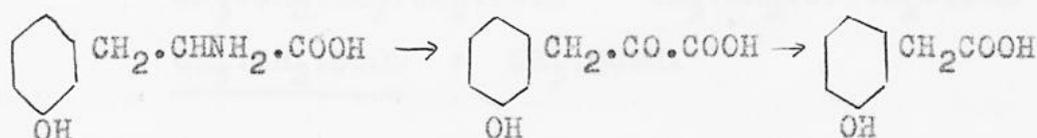
β -Oxydation. Dieses Abbauschema wurde durch die Versuche an phenylierten Aminosäuren bestätigt. So führte z.B. Verfütterung von Phenylamino-Essigsäure zur Bildung von Benzoesäure und Ausscheidung als Hippursäure:



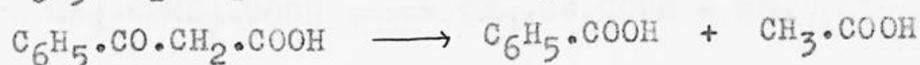
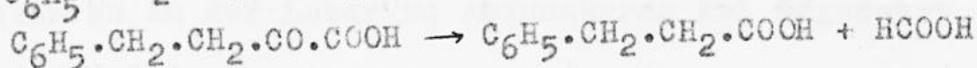
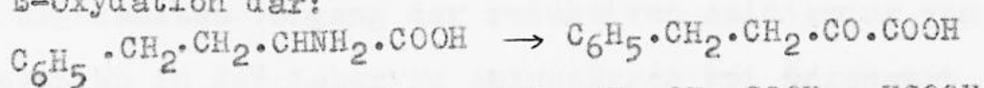
Spaltg.mit H₂O: $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{COOH} + \text{H} \cdot \text{COOH}$



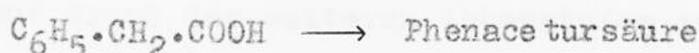
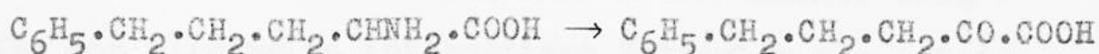
Bei der nächsthöheren Aminosäure, dem β -Phenylalanin, ergaben sich insofern Schwierigkeiten, als Phenylalanin im Organismus bei gleichzeitiger Aufspaltung des Benzolkernes abgebaut werden kann. Die beim Abbau zu erwartende Phenylelessigsäure konnte als Phenacetursäure demnach nicht isoliert werden. Der Abbau des Phenylalanins konnte aber dann in der Phenylelessigsäure-Stufe gestoppt werden, wenn durch Einführung einer OH-Gruppe im Benzolkern in *m*-Stellung die Aufspaltung des Benzolkernes verhindert worden war. In diesem Falle gelang die Isolierung einer *m*-^{oxy}Phenylelessigsäure:



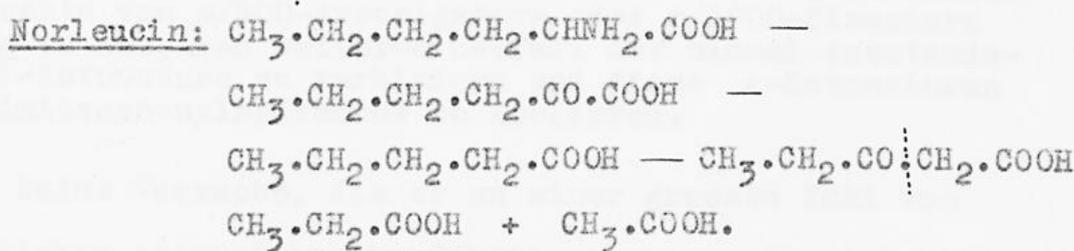
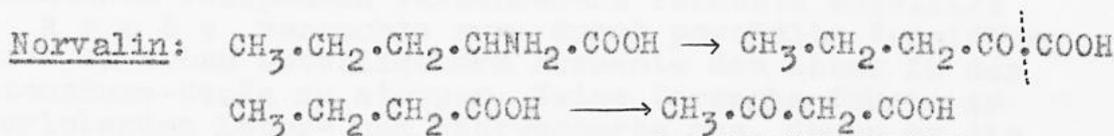
Bei Verfütterung von α -Amino- β -Phenylbuttersäure wurde im Harn Benzoesäure als Hippursäure nachgewiesen. Dieser Abbau stellt die Kombination der oxydativen Desaminierung mit der β -Oxydation dar:



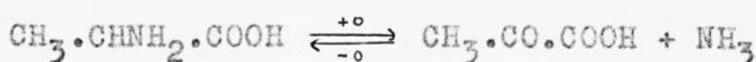
In analoger Weise gab α -Amino- δ -Phenylvaleriansäure Phenylessigsäure, die mit Glykokoll zu Phenacetursäure gekoppelt wurde:



Auch bezüglich der Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass die an phenylierten Aminosäuren gemachten Beobachtungen auf die aliphatischen Aminosäuren übertragbar sind. So erwies sich erwartungsgemäss zum Beispiel Norvalin im Fütterungs- und Durchströmungsversuch als Acetessigsäure-Bildner, während Norleucin keine Ausscheidung von Ketonkörpern verursachte.



Dass Ketonensäuren als Zwischenprodukte bei der oxydativen Desaminierung gebildet werden, geht einerseits aus den Durchströmungsversuchen der Leber mit Alanin hervor (Bildung von Brenztraubensäure), andererseits aber auch aus dem umgekehrten Vorgang der reduktiven Aminierung von α -Ketonensäuren in der Leber zu Aminosäuren bei Gegenwart von Ammoniumsalzen.



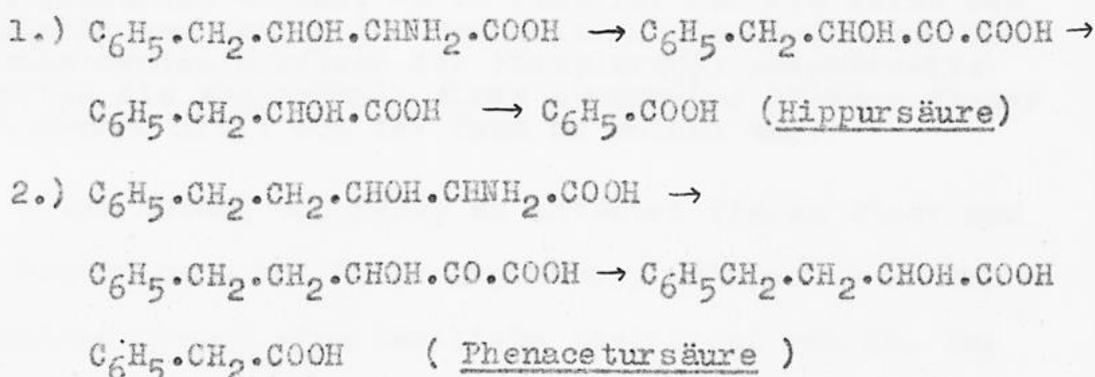
Die Anführung dieses letzteren Umstandes in diesem Zusammenhange ist insofern gerechtfertigt, als Reaktionsfolgen im Organismus vielfach reversibel verlaufen können. Immerhin fehlte bis vor wenigen Jahren ein exakter Nachweis für das allgemeine intermediäre Entstehen von α -Keton-säuren. Ihre Bildung im Abbau der Aminosäuren musste vielmehr auf Grund der weiteren Abbaustufen zwingend gefolgert werden.

Der exakte Nachweis für die tatsächliche Entstehung der α -Ketonsäuren bei der oxydativen Desaminierung der Aminosäuren wurde erstmalig von K r e b s erbracht. (Zeitschr.f.physiol.Chemie 217/191 (1933)).

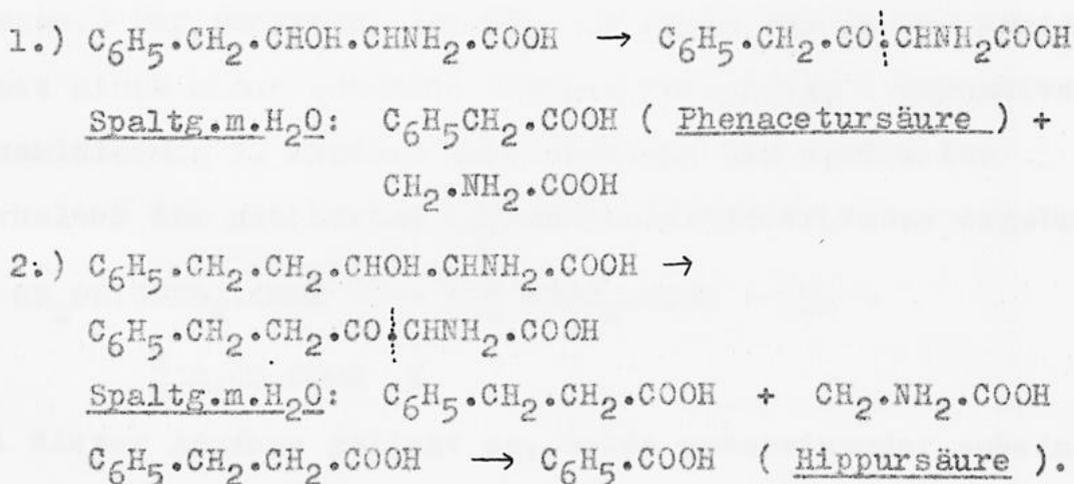
Seine Versuchsanordnung war folgende: Der Abbau der Aminosäuren im Organismus stellt wie jede andere Abbaureaktion einen fermentativen Vorgang dar. Es war daher die Annahme gerechtfertigt, dass am Abbau der Aminosäuren in den einzelnen Teilphasen verschiedene Fermente beteiligt sind. K r e b s versuchte nun, durch partielle Vergiftung der sich am Abbau beteiligenden Fermente den Abbau in der α -Ketonsäure-Stufe zu stoppen. Seine Versuche führte er an überlebendem Leber- und Nierengewebe aus, denen er die zu untersuchenden Aminosäuren zusetzte. Durch gleichzeitigen Zusatz von m/500-Arsenigsäure oder m/1000-Blausäure gelang es nun, den weiteren Zerfall der einmal entstandenen α -Ketonsäure zu verhindern und diese α -Ketonsäuren als Dinitrophenylhydrazone zu isolieren.

Seine Versuche, die er an einer grossen Zahl von natürlichen Aminosäuren ausführte, ergaben ein einheitliches Bild für das Auftreten von α -Ketonsäuren als Intermediärprodukte des Aminosäurestoffwechsels. Dieses einheitliche Bild wurde jedoch vor kurzer Zeit durch Versuche von K n o o p und Mitarbeitern (Zeitschr.f.physiol.Chemie 239/30 (1936)) durchbrochen, der auf Grund der Verfütterung phenylierter α -Amino- β -Oxysäuren eine Ausnahmestellung für die Oxyaminosäuren nachweisen konnte.

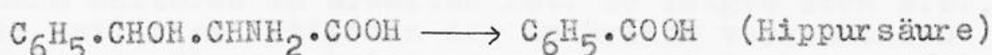
Knoop's Versuchsordnung fusste auf seinen früheren Erfahrungen, die er bei den Untersuchungen an phenylierten Fettsäuren und phenylierten α -Aminosäuren gemacht hatte. Knoop hat an Hunde einerseits ω -Phenyl- α -Amino- β -Oxybuttersäure, andererseits ω -Phenyl- α -Amino- β -Oxyvaleriansäure verfüttert. Wären diese beiden Säuren nach den Gesetzen der oxydativen Desaminierung abgebaut worden, dann hätte man aus der ersteren Hippursäure, aus der letzteren Phenacetursäure erhalten müssen.



Tatsächlich fand er aber im Harn nach Verfütterung von 8 gr β -Phenyl- α -Amino- β -Oxybuttersäure während einer Versuchsperiode von 2 Tagen 910 mgr Phenacetursäure und nach Verfütterung von 6 gr β -Phenyl- α -Amino- β -Oxyvaleriansäure 210 mgr Hippursäure. Auf Grund dieser Versuche schloss er, dass der Abbau dieser Oxyaminosäuren nicht durch oxydative Desaminierung, sondern durch sofortige β -Oxydation erfolgt war, wobei als zweites Spaltprodukt vielleicht Glykokoll gebildet wurde.

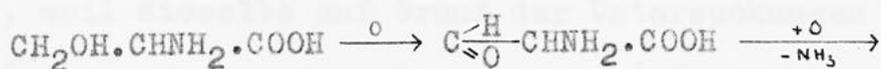


Dieser Befund stand auch im Einklang mit einer früheren Beobachtung desselben Autors, dass nämlich β -Phenylserin im Fütterungsversuch zur Ausscheidung von Benzoesäure (als Hippursäure) führte.



Dieser Bildung von Benzoesäure aus Phenylserin war von Knoop seinerzeit deshalb keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt worden, da im Hinblick auf die Kürze des aliphatischen Restes im Serinmolekül einerseits und dem abbauhemmenden Einfluss der Phenylgruppe andererseits immerhin die Möglichkeit eines abnormalen Abbaues dieser Aminosäuren nicht von der Hand zu weisen war.

Dem Befund von Knoop an intakten Tieren steht nun die Beobachtung von Krebs gegenüber, welcher im Nieren - schnittenversuch eine deutliche Abspaltung von NH_3 bei Verwendung von Serin als Substrat gefunden hat, die von ihm im Sinne einer oxydativen Desaminierung gedeutet worden ist. Eine Uebereinstimmung mit den von Knoop gemachten Beobachtungen würde sich ohne weiteres bei der Annahme erzielen lassen, dass aus Serin durch β -Oxydation primär der Halbaldehyd der Aminomalonsäure gebildet wird, welcher als Derivat eines 1,2-Aminoaldehydes unter Sauerstoffaufnahme leicht NH_3 abspaltet und in den Halbaldehyd der Mesoxalsäure übergeht. (Ueber dieses spezielle Verhalten der 1,2-Aminoaldehyde und 1,2-Aminoketone siehe später.) Das Auftreten des NH_3 im Falle des Serins würde somit nicht einen primären Vorgang vorstellen (Oxydative Desaminierung), sondern sich erst aus dem speziellen Verhalten des gebildeten 1,2-Aminoaldehydderivates ergeben.



Bei dieser Annahme gelingt es, beide untereinander scheinbar abweichenden Befunde in Einklang zu bringen.

Ich möchte aber bei dieser Gelegenheit darauf hinweisen, dass ein vollständig übereinstimmendes Verhalten einer Substanz in überlebenden Organversuchen einerseits und in Fütterungsversuchen am ganzen Tier andererseits nicht ohne weiteres zu erwarten ist. So zeigte sich z.B., dass die optischen Antipoden der natürlich vorkommenden Aminosäuren im Nierenschnittenversuch nach Krebs ungefähr 20 mal so rasch oxydativ desaminiert werden als die natürlichen Aminosäuren, während die ersteren beim Fütterungsversuch überhaupt nicht angegriffen, sondern unverändert im Harn ausgeschieden werden. Dieser Befund von Krebs ist auch von anderen Autoren bestätigt worden. Eine vollständige Parallele zwischen den Ergebnissen der Versuche an überlebenden Organen und den Fütterungsversuchen besteht somit nicht.

Solche Abweichungen bei Versuchsergebnissen unter verschiedenen Versuchsbedingungen sind aber bei physiologischen Fragestellungen schon sehr oft beobachtet worden und haben sich insofern als sehr nutzbringend erwiesen, da sie vor zu grosser Verallgemeinerung von Einzelbefunden geschützt haben. Auch in diesem speziellen Falle sind für den Abbau der optischen Antipoden der natürlich vorkommenden Aminosäuren schon Erklärungsversuche gemacht worden. Erst die Gesamtheit der Versuchsergebnisse, die unter den verschiedensten Bedingungen erzielt worden sind, haben eine Deutung für den tatsächlichen Stoffwechselablauf zugelassen.

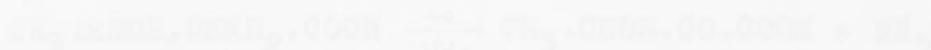
Da es immerhin möglich war, dass das Serin als Anfangsglied der aliphatischen Oxyaminosäuren eine Sonderstellung im Stoffwechsel einnimmt, habe ich mir nun zur Aufgabe gestellt, zu untersuchen, wie höhere aliphatische α -Amino- β -Oxysäuren durch überlebendes Nierengewebe verändert werden.

Als Ausgangsmaterial plante ich ursprünglich die α -Amino- β -Oxybuttersäure und die α -Amino- β -Oxyvaleriansäure zu verwenden. Hierbei erschienen mir die Versuche mit der zuerst genannten Säure auch aus dem Grunde wertvoll, weil dieselbe auf Grund der Untersuchungen von M c C o y, M e y e r und R o s e (Journ. biol. Chem. 112/283 (1935/36)) als Nahrungs- und Wachstumsfaktor der

Ratte besondere Bedeutung hat⁺⁾. Beide Substanzen sind schon früher von **A b d e r h a l d e n** und **H e y n s** (Ber.d.Deutsch.Chem.Ges. 67/530 (1934)) synthetisiert worden.

Unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse von **Erbe** an **Staphylococcus aureus** und der Versuchsergebnisse von **Erbe** an **Überlebenden Mierostoma** waren somit bei der **1-Isomer-2-Oxybuttersäure** und der **1-Isomer-2-Oxyvaleriansäure** Isomere **1-Isomer-2-Oxybuttersäure** und **1-Isomer-2-Oxyvaleriansäure** als **Wachstumsinhibitoren** der **1-Isomer-2-Oxybuttersäure** zu Grunde gelegt:

1) Relative Inaktivierung der 1-Isomer-2-Oxybuttersäure durch die 1-Isomer-2-Oxyvaleriansäure nach Erbe:

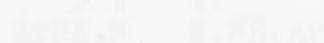
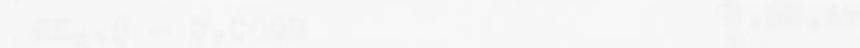
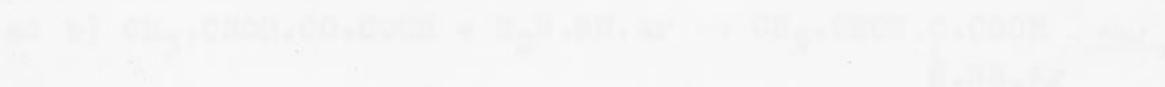


Es sei der Erbe'schen Versuchsanordnung der weitere Verlauf der **1-Isomer-2-Oxybuttersäure** durch **1-Isomer-2-Oxyvaleriansäure** gegenüber ist, so wäre mit Hilfe eines **Chemohydrolyseinstruments**

a) in der **1-Isomer-2-Oxybuttersäure** eine **Hydrolyse**.

+) Vergl. auch: **Erbe**, **Chem. Abh. 1937/8**

Carter, Journ.biol.Chem. 112/769 (1935/6)
 Carter u. Mitarbeiter, Journ.biol.Chem. 117/1 (1937)
 " " Journ.biol.Chem. 119/103 (1937)
 " " Journ.biol.Chem. 119/109 (1937)
 " " Journ.biol.Chem. 122/605 (1937/8)
 " " Journ.biol.Chem. 122/611 (1937/8)



(**Erbe**)

(**Pyruvaldehyd**)