

67. Ein Beitrag zum Studium des Reaktionsmechanismus der biologischen Transaminierung

von H. Brandenberger¹⁾ und P. P. Cohen.

(26. I. 53.)

In den letzten Jahren haben Untersuchungen verschiedener Autoren²⁾ gezeigt, dass der biologischen Umaminierung allgemeine Bedeutung zukommt. Die veröffentlichten Versuche zeigen, dass die verschiedenen Umsetzungen durch verschiedene substratspezifische Fermente katalysiert werden. Für die am schnellsten ablaufende und wohl biologisch auch bedeutungsvollste Transaminierung stehen in der „glutamic-oxalacetic transaminase“³⁾ auf verschiedene Weise hergestellte hochaktive Enzympräparate für Untersuchungen zur Verfügung, und neue Bestimmungsverfahren⁴⁾ erleichtern die Verfolgung der Enzymreaktion. Über den Mechanismus der enzymatischen Übertragung der Aminogruppe besteht jedoch nach wie vor völlige Unklarheit, trotzdem viele Hypothesen diesen Punkt diskutieren.

*Braunstein & Kritzmann*⁵⁾, die Entdecker der enzymatischen Transaminierung, haben eine Vereinigung von Amino- und Ketosäure zur *Schiff'schen* Base I formuliert, welche, nach Umlagerung der Doppelbindung, durch hydrolytische Spaltung der neuen Base II die Reaktionsendprodukte liefern könnte. *Karrer, König & Legler*⁶⁾ haben darauf hingewiesen, dass die erwähnte enzymkatalysierte Umlagerung der Doppelbindung durch primäre Hydrierung zur Iminosäure III und nachfolgender Dehydrierung erfolgen könnte. Diese Vermutung wurde von *Karrer & Brandenberger*⁷⁾ erneut diskutiert, die fanden, dass von synthetisch hergestellten Iminosäuren durch rohe Ferment-Präparate aus Nieren und Lebern nur diejenigen abgebaut werden konnten, die Glutaminsäure als Baustein enthielten, welche demnach aus Komponenten aufgebaut sind, deren Zusammenwirkung für eine Transaminierung unerlässlich ist. Die genannten Autoren weisen darauf hin, dass es wünschenswert wäre, die von ihnen nachgewiesenen „ α, α' -Iminosäuren-dehydrogenasen“ mit den „Transaminasen“ zu vergleichen.

¹⁾ Jetzige Adresse: Department of Physiological Chemistry, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., USA.

²⁾ *Cammarata & Cohen*, J. Biol. Chem. **178**, 439 (1950); *Wood & Gunsalus*, Abstracts, A.C.S., Div. of Biol. Chem., 35 C (1950).

³⁾ *O'Kane & Gunsalus*, J. Biol. Chem. **170**, 425 (1947); *Cammarata & Cohen*, J. Biol. Chem. **193**, 53 (1951).

⁴⁾ *Cammarata & Cohen*, J. Biol. Chem. **193**, 45 (1951).

⁵⁾ *Braunstein & Kritzmann*, Enzymologia **2**, 129 (1937); *Nature* **140**, 503 (1937).

⁶⁾ *Karrer, König & Legler*, *Helv.* **24**, 127 (1941).

⁷⁾ *Karrer & Brandenberger*, *Helv.* **34**, 82 (1951).

Wir haben am Beispiel des wichtigsten Transaminierungs-Systems einen solchen Vergleich durchgeführt und konnten zeigen, dass α, α' -Imino-DL-glutarsäure-L-asparaginsäure von hochgereinigter „glutamic-oxalacetic transaminase“¹⁾ nicht abgebaut wird. Dieses Resultat steht im Einklang mit den negativ verlaufenen Abbauprosuchen der gleichen Säure mit einem nach der Vorschrift von *O'Kane & Gunsalus* hergestellten Enzympräparat²⁾, welche im Chemischen Institut der Universität Zürich durchgeführt worden sind³⁾. Wir fanden weiter, dass die katalytische Wirkung der „glutamic-oxalacetic transaminase“ durch Zusatz der erwähnten Imino-tetracarbonsäure zum üblichen Reaktionsgemisch keineswegs unterbunden oder gehemmt wird. Die enzymatische Transaminierung erfolgt demnach — wenigstens was das hier behandelte wichtigste System anbetrifft — nicht über eine Iminosäure als Intermediärprodukt; „ α, α' -Iminosäuren-dehydrasen“ scheinen von „Transaminasen“ verschieden zu sein.

Hauptsächlich von amerikanischen Autoren⁴⁾ wurde wiederholt die Ansicht geäußert, dass bei der Übertragung der Aminogruppe Pyridoxal als NH_2 -Acceptor und Pyridoxamin als NH_2 -Donator eine Rolle spielen könnten. Auch für diesen Fall ist die Bildung von *Schiff*-schen Basen oder Iminosäuren in Erwägung gezogen worden, diesmal zwischen der Aminosäure und Pyridoxal resp. der Ketosäure und Pyridoxamin. Da Glutaminsäure oder α -Keto-glutarsäure an allen bisher bewiesenen Transaminierungsreaktionen beteiligt sind, besitzen in diesem Zusammenhang die Verbindungen IV und V das grösste Interesse. Aber auch in diesen Fällen konnten wir zeigen, dass die zwei Verbindungen von „glutamic-oxalacetic transaminase“ nicht angegriffen werden und als Zwischenprodukte der Enzymreaktion nicht in Frage stehen. Die Tatsache, dass diese Verbindungen die durch unser Ferment katalysierte Reaktion nicht hemmen, spricht nicht dafür, dass ihre phosphorylierten Formen als Intermediärprodukte Bedeutung haben, ist allerdings nicht als Beweis dagegen anzusprechen.

Da Verbindung IV unseres Wissens bisher nicht isoliert worden ist, sondern nur bei der Darstellung von V vorübergehend in Lösung erhalten wurde⁵⁾, haben wir diese gelbe Substanz durch ihr Spektrum charakterisiert. Dieses weist — in Ergänzung der von Pyridoxal gegebenen Banden — ein weiteres Maximum auf, das in Methanol bei $420 \text{ m}\mu$ liegt und sich beim Zusatz von Phosphatpuffer (pH 7,5) gegen $400 \text{ m}\mu$ verschiebt. In rein wässriger Lösung ist die Substanz unbeständig.

¹⁾ *Cammarata & Cohen*, J. Biol. Chem. **193**, 53 (1951).

²⁾ *O'Kane & Gunsalus*, J. Biol. Chem. **170**, 425 (1947).

³⁾ *Karrer, Matter & Brandenberger*, Unveröffentlichte Untersuchungen.

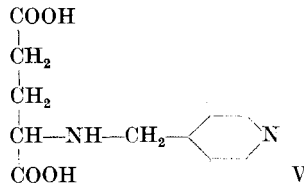
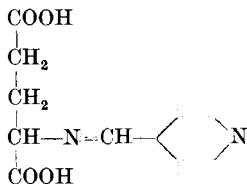
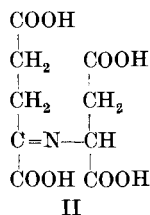
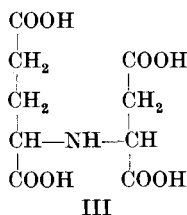
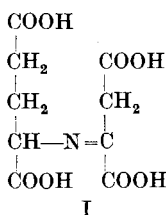
⁴⁾ *Snell*, J. Biol. Chem. **154**, 313 (1944); *Am. Soc.* **67**, 194 (1945); *Schlenk & Fisher*, Arch. Biochem. **12**, 69 (1947).

⁵⁾ *Heyl, Harris & Folkers*, *Am. Soc.* **70**, 3429 (1948).

Zur weiteren Erforschung der Transaminierung besteht ein grosses Bedürfnis nach einem spezifischen Inhibitor dieses Vorganges. Ein solcher Inhibitor würde unter Umständen nicht nur erlauben, die biologische Bedeutung der Reaktion besser zu studieren, er könnte diese auch in einem rohen Enzymsystem blockieren und so ein besseres Studium anderer enzymatischer Vorgänge ermöglichen, an denen Amino- oder Ketosäuren vom gleichen Typus beteiligt sind.

Neben den Verbindungen III, IV und V haben wir als weitere N-Derivate der Glutaminsäure auch DL-N-Äthyl-glutaminsäure und L-N-Formyl-glutaminsäure mit negativem Erfolg als Inhibitoren anzuwenden versucht. Das gleiche negative Resultat ergab ein Versuch mit Kynurenin, welches als β -Carboxy-Derivat der Asparaginsäure aufgefasst werden kann. Frühere Versuche in diesem Laboratorium¹⁾ haben gezeigt, dass auch zwei Amido-N-alkyl-glutaminsäuren [DL-N-(γ -Glutamyl)-äthylamin und DL-N-(γ -Glutamyl)-allylamin] sowie eine Verbindung mit substituiertem α -Wasserstoff [DL- α -Methyl-glutaminsäure] sich nicht als Inhibitoren eignen. Es erscheint daher, dass alle drei funktionellen Gruppen unsubstituiert vorhanden sein müssen, damit unser Ferment auf ein Substrat oder einen Inhibitor ansprechen kann.

Als Beispiel für eine solche Verbindung haben wir α, α' -Acetondicarbonsäure gewählt und feststellen können, dass diese Verbindung die von „glutamic-oxalacetic transaminase“ katalysierte Umaminierung zwischen α -Keto-glutarsäure und L-Asparaginsäure hemmt. Um die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion auf die Hälfte zu reduzieren, ist es notwendig, die Aceton-dicarbonsäure in einer Konzentration anzuwenden, welche dem 2,5fachen der Substratkonzentration entspricht, und die Enzymreaktion bei 28° statt bei 38° auszuführen, um die Decarboxylierung des nicht sehr beständigen Inhibitors nicht zu fördern.



¹⁾ Unpublizierte Studien von *Lichtenstein, Ross & Cohen*, welche auch fanden, dass DL-N-Äthyl-glutaminsäure ein schwacher Inhibitor der „glutamic-pyruvic transaminase“ ist.

Experimenteller Teil.

A. Präparatives.

1. α, α' -Imino-DL-glutarsäure-L-bernsteinsäure (III) wurde nach der Vorschrift von *Karrer & Brandenberger*¹⁾ über den Tetraäthylester hergestellt. Dieser konnte wie die beschriebenen Tetramethyl- und Diäthyl-dimethylester durch Chromatographie an Aluminiumoxyd gereinigt werden. Die freie Säure wurde durch wiederholtes Umkristallisieren ihres Bleisalzes gereinigt.

2. Zur Herstellung von Pyridoxyliden-glutaminsäure²⁾ [N-(2-Methyl-3-hydroxy-5-hydroxymethyl-4-pyridylmethyl)-glutaminsäure] (IV) wurde $1 \cdot 10^{-3}$ Mol Glutaminsäure in 30 ml absolutes Methanol eingetragen, welches $3 \cdot 10^{-3}$ Mole KOH enthielt. Unter leichtem Schwenken wurde $1 \cdot 10^{-3}$ Mol Pyridoxal-hydrochlorid zugegeben, wobei sich die Lösung sogleich tiefgelb färbte und klärte. Nach 15 Min. wurde filtriert, das Filtrat im Vakuum auf halbes Volumen eingengt und das K-Salz der *Schiff*'schen Base durch Zutropfen von Äther ausgefällt. Die Reinigung erfolgte durch Umfällen aus Methanol-Äther.

Das Spektrum der Verbindung in absolutem Methanol zeigt zwischen 200 und 500 $m\mu$ die folgenden Extreme:

Min.	Max.	Min.	Max.	
310	339	380	420	$\lambda(m\mu)$
1,50	3,36	1,38	2,10	$\epsilon \cdot 10^{-3}$

Das langwellige Maximum verschiebt sich beim Zusatz von 0,05-m. Phosphatpuffer vom pH 7,5 gegen 400 $m\mu$, unter gleichzeitiger Erhöhung der Extinktion. In rein wässriger Lösung konnten wir das Spektrum infolge der Unbeständigkeit der Verbindung nicht aufnehmen. In einem Gemisch von 5 Teilen Methanol und 2 Teilen Phosphatpuffer hingegen und bei 0° sinkt die Extinktion bei 400 $m\mu$ im Verlaufe von 12 h. nur um ca. 15%.

Die Verbindung verfärbt sich bei längerem Aufbewahren, sowohl in Lösung als auch im festen Zustande.

3. Pyridoxyl-glutaminsäure [N-(2-Methyl-3-hydroxy-5-hydroxymethyl-4-pyridylmethyl)-glutaminsäure] (V) wurde nach der Vorschrift von *Heyl, Harris & Folkers*³⁾ bereitet.

4. α, α' -Aceton-dicarbonensäure stellten wir nach dem Verfahren von *Ingold & Nickolls*⁴⁾ dar.

5. DL-N-Äthyl-glutaminsäure wurde uns in freundlicher Weise von Dr. *N. Lichtenstein* zur Verfügung gestellt; L-N-Formyl-glutaminsäure verdanken wir Dr. *A. H. Mehler*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., und Kynurenin Dr. *C. Heidelberger*, McArdle Memorial Laboratories, University of Wisconsin, Madison, Wis.

6. „Glutamic-oxalacetic transaminase“ wurde aus Schweineherzmuskel nach der Vorschrift von *Cammarata & Cohen*⁵⁾ bereitet, wobei wir die von *Ross & Cohen*⁶⁾ eingeführten Modifikationen innegehalten haben.

B. Enzymologisches.

Die Verfolgung der Enzymreaktion erfolgte nach der spektrophotometrischen Methode von *Cammarata & Cohen*⁷⁾ durch Messung der entstehenden oder verschwindenden Oxallessigsäure bei 280 $m\mu$. Wir verwendeten ein *Beckman*-Spektrophotometer Modell

¹⁾ *Karrer & Brandenberger*, Helv. **34**, 82 (1951).

²⁾ Für Namengebung siehe Fussnote 1 in *Heyl, Harris & Folkers*, Am. Soc. **70**, 3429 (1948).

³⁾ *Heyl, Harris & Folkers*, Am. Soc. **70**, 3429 (1948).

⁴⁾ *Ingold & Nickolls*, Soc. **121**, 1642 (1922).

⁵⁾ *Cammarata & Cohen*, J. Biol. Chem. **193**, 53 (1951).

⁶⁾ *Ross*, Master of Science thesis, University of Wisconsin, 1952.

⁷⁾ *Cammarata & Cohen*, J. Biol. Chem. **193**, 45 (1951).

DU mit einem Wassermantel, durch den Wasser von einer konstanten Temperatur geleitet wurde. Gewöhnlich arbeiteten wir bei 38°, für die Versuche mit Aceton-dicarbonsäure bei 28°. Da unser mittels Alkohol-Fraktionierung gereinigtes Ferment durch Pyridoxal-phosphat nur ganz geringfügig aktiviert werden kann, verzichteten wir bei diesen Versuchen auf einen solchen Zusatz.

Ein Inhibitor-Versuch wurde in der Regel wie folgt angesetzt:

<i>Beckman-Zelle</i>	1	2	3	4
Ferment	—	100 γ	—	100 γ
L-Aminosäure . .	20 μm	20 μm	20 μm	20 μm
α -Ketosaure . . .	20 μm	20 μm	20 μm	20 μm
Inhibitor	—	—	20 bis 100 μm	20 bis 100 μm
eventuell Puffer bis zu einem totalen Volumen von 3,2 ml.				

Alle Substanzen waren in 0,05-m. Phosphatpuffer vom pH 7,4 gelöst, saure Substanzen mit KOH auf das gewünschte pH eingestellt. Nach Ablauf des Enzymversuches wurde das pH in jeder einzelnen Zelle potentiometrisch gemessen; es wurde darauf Wert gelegt, dass die 4 Werte sich um nicht mehr als 0,1 pH-Einheiten unterschieden.

Für die Abbauprobungen der Iminosäuren III und V haben wir diese mit und ohne Enzym in *Beckman-Zellen* inkubiert, wobei die Extinktion bei 280 $\text{m}\mu$ während 20 Min. kontrolliert wurde. Da auf diese Weise keine Entstehung von Oxalessigsäure festgestellt werden konnte, wurde allen Ansätzen L-Asparaginsäure zugesetzt. Diese müsste durch Umaminierung mit eventuell entstandener α -Keto-glutarsäure Oxalessigsäure ergeben, was aber wiederum nicht der Fall war. Schlussendlich wurde die Aktivität des Enzyms durch Zusatz von α -Keto-glutarsäure kontrolliert. Da unsere Enzymlösung keine Ninhydrin-Reaktion gibt, kann dieser Test herangezogen werden, um die Entstehung von Aminosäuren festzustellen. Aber auch diese, mit grösseren Enzym- und Substratmengen durchgeführten Teste, verliefen negativ.

Der Abbau der *Schiff'schen* Base IV wurde durch Kontrolle der Extinktionsabnahme bei 420 und 400 $\text{m}\mu$ in Ansätzen mit und ohne Enzym gemessen. Die Abnahme geht in beiden Ansätzen parallel. α -Keto-glutarsäure entsteht nicht.

SUMMARY.

1) α, α' -Imino-glutaric-succinic acid is not decomposed by a highly purified preparation of glutamic-oxalacetic transaminase; „ α, α' -iminoacid dehydrases” must be different from transaminases.

2) Pyridoxyl-glutamic acid [N-(2-methyl-3-hydroxy-5-hydroxymethyl-4-pyridylmethyl)-glutamic acid] and pyridoxylidene-glutamic acid [N-(2-methyl-3-hydroxy-5-hydroxymethyl-4-pyridylmethyl)-glutamic acid] are inactive with the same enzyme, so that these compounds can not be intermediates in the enzymatic transamination.

3) The three mentioned N-derivatives of glutamic acid, N-ethyl-glutamic acid, N-formyl-glutamic acid and kynurenine have no inhibitory effect on the glutamic-oxalacetic transamination.

4) α, α' -Acetone-dicarboxylic acid inhibits the transamination between α -ketoglutaric acid and aspartic acid and is the only highly active inhibitor found so far for this system.

Diese Untersuchung wurde teilweise durch Mittel der *Rockefeller Foundation* unterstützt. Einer von uns (*H. B.*) dankt der *Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie* für ein Stipendium, welches ihm die Durchführung dieser und zweier weiteren Arbeiten ermöglicht hat. Die Autoren danken dem mikroanalytischen Laboratorium des Chemischen Institutes der Universität Zürich für die Kontrolle der verwendeten Iminosäuren, sowie Herrn Prof. Dr. *Paul Karrer* für das Interesse und die Förderung, welche er dieser Arbeit hat angedeihen lassen.

Department of Physiological Chemistry,
University of Wisconsin, Madison, Wis., USA.

68. Odorosid D und Odorosid F.

Die Glykoside von *Nerium Odorum Sol.* 5. Mitteilung¹⁾ 2).

Glykoside und Aglykone, 108. Mitteilung³⁾

von **W. Rittel** und **T. Reichstein**.

(27. I. 53.)

In der Stamm- und Zweigrinde von *Nerium odorum Sol.* sind von *Rangaswami & Reichstein*^{a)} neben anderen Stoffen die Odoroside A–G⁴⁾ nachgewiesen worden. Von *Rittel* und Mitarbeitern^{b)} wurde ein weiteres Glykosid isoliert und als Odorosid H bezeichnet. Die Konstitution der Odoroside A^{c)}, B^{c)} und H^{d)} sowie des Odorotriosids G^{d)} wurde bereits früher ganz oder teilweise aufgeklärt. Hier wird über diejenige der Odoroside D und F berichtet.

Odorosid D. Für diesen Stoff wurde früher^{a)} als wahrscheinlichste Formel $C_{36}H_{56}O_{13}$ abgeleitet. Das Glykosid zeigte aber je nach Kristallwassergehalt verschiedene, meist sehr unscharfe Smp. Es wurde hervorgehoben, dass die Reinheit des alten Präparats unsicher war. Eine viel bessere Gewähr für Einheitlichkeit bot jedoch das gut krist. Acetat^{a)}. Aus den Mutterlaugen von Odorosid D der ersten Arbeit^{a)} haben wir daher nochmals eine etwas grössere Menge rohes Odorosid D isoliert und dieses ins Acetat übergeführt, das vollständig gereinigt mit dem alten Präparat identisch war. Verseifung des reinen Acetats mit $KHCO_3$ in wässrigem Methanol lieferte ein Präparat von Odorosid D, das wir als einheitlich betrachten. Es war acetylfrei. Wie weiter unten gezeigt wird, besitzt das Acetat Formel II, ist also nur im Glucose-Anteil acetyliert, so dass die Verseifung keine Schwierig-

¹⁾ 4. Mitteilung: *W. Rittel, A. Hunger & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 434 (1953).

²⁾ Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten siehe Seite 556.

³⁾ 107. Mitteilung: *W. Rittel, A. Hunger & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 434 (1953).

⁴⁾ Das alte „Odorosid G“ wurde inzwischen als unreines Monoacetat erkannt. Das zugrundeliegende, bis heute noch nicht bereitete freie Triglykosid wurde als Odorotriosid G bezeichnet^{d)}.