

setzt. Das ausgeschiedene Rohprodukt wurde abgesaugt und aus verdünntem Methanol umkristallisiert. Es konnten nur 7 mg Kristalle (Nadeln) vom Smp. 208–212° gewonnen werden.

$C_{27}H_{43}O_6 \cdot N_3$  (505,64) Ber. N 8,35% Gef. N 8,45%

*3 $\beta$ -Acetoxy-14 $\beta$ -hydroxy-20 $\xi$ -hydroxy-21-nor-cholansäure-lacton-(23  $\rightarrow$  20)* (XIII). 70 mg des Esters XI vom Smp. 130–134° wurden in 3 ml reinem Eisessig gelöst und mit 20 mg PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O bei Normaldruck in Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Die H<sub>2</sub>-Aufnahme war nach 40 Min. beendet und betrug 8,8 ml (berechnet 7,2 ml). Das nach üblicher Aufarbeitung gewonnene rohe Hydrierungsprodukt war neutral und gab aus Aceton-Äther-Petroläther 36 mg feine zu Drusen vereinigte Nadeln vom Smp. 198–223°. Nach dem Umlösen aus Aceton-Äther-Petroläther wies das Lacton XIII den Doppel-Smp. 202–206°/217–222° auf. Da XIII vermutlich ein Gemisch der beiden an C-20 epimeren Lactone darstellt, wurde auf die Bestimmung der spez. Drehung verzichtet.

$C_{25}H_{38}O_5$  (418,55) Ber. C 71,74 H 9,15  $-OCH_3$  00% Gef. C 71,75 H 9,36  $-OCH_3$  00%

Das IR.-Spektrum (Fig. 3) ist im Theoret. Teil wiedergegeben. Die HO-Bande liegt zum Unterschied zu derjenigen des Esters XI bei 2,81  $\mu$  (keine Assoziation).

Die Analysen wurden im Mikrolabor (Leitung E. THOMMEN) und die Aufnahmen der IR.-Spektrn im Spektrallabor (G. ROTZLER) der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

### Zusammenfassung

Bei der Einwirkung von Ozon auf Bufadienolide und anschliessender reduktiver Spaltung der dabei gebildeten Ozonide werden neben Neutralstoffen auch reichliche Mengen von Säuren gebildet, aus denen keine Ätiansäuren, sondern nur 20-Keto-21-nor-cholansäuren isoliert werden konnten. Ozon greift somit nur die sekundär-tertiäre Doppelbindung des zweifach ungesättigten Lactonringes der Bufadienolide an.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel

## 72. Oxalacetat-Carboxylase und Biotin

von G. Semenza, L. S. Prestidge, D. Ménard-Jeker und M. Bettex-Galland

(3. II. 59)

Eine Reihe von Carboxylierungs- und CO<sub>2</sub>-Übertragungsreaktionen scheinen biotinabhängig zu sein. In den meisten Fällen weiss man jedoch noch nicht, auf welche Weise das Biotin in die Reaktion eingreift. Gewöhnlich kann die Aktivität der zellfreien Fermentpräparate aus Mangeltieren durch Zugabe von Biotin oder normalen Gewebsextrakten nicht wieder hergestellt werden. In verschiedenen Fällen konnte gezeigt werden, dass die gereinigten Enzyme kein Biotin oder nur eine unbedeutende Menge davon enthielten: so zum Beispiel das «malic enzyme» OCHOA's<sup>1)</sup>, die Carbamylphosphat-Citrullin-Transcarbamylase aus *Lactobacillus arabinosus*<sup>3)</sup>, die

<sup>1)</sup> S. OCHOA, A. MEHLER, M. L. BLANCHARD, T. H. JUKES, C. E. HOFFMANN & M. REGAN, J. biol. Chemistry **170**, 413 (1947). Später ist jedoch darauf hingewiesen worden, dass die für die Biotinbestimmung verwendete Methode vielleicht nicht geeignet war<sup>2)</sup>.

<sup>2)</sup> H. C. LICHSTEIN, Vitamins and Hormons **9**, 27 (1951).

<sup>3)</sup> J. M. RAVEL, M. L. GRONA, J. S. HUMPHREYS & W. SHIVE, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2344 (1958).

Oxalessigsäure-Decarboxylasen von *Azotobacter vinelandii*<sup>4)</sup> und *Mikrococcus lysodeikticus*<sup>5)</sup>, und die Propionyl-CoA-Carboxylase von Säugetiergeweben<sup>6)</sup>. Es ist daher wahrscheinlicher, dass das Biotin bei der Synthese des Enzyms oder eines Coenzym beteiligt ist, als dass es als Cofaktor oder Baustein der Enzymmolekel eine Rolle spielt. Es ist gezeigt worden, dass durch Zugabe von Biotin die Aktivität der Carboxylphosphat-Citrullin-Transcarboxylase in intakten Biotinmangel-Zellen (*S. lactis*) nur dann zurückgewonnen werden kann, wenn gleichzeitig auch eine Mischung von sämtlichen Aminosäuren zugesetzt wird; dieser Vorgang wird gehemmt durch Analoge von Aminosäuren, Purinen oder Pyrimidinen<sup>7)</sup>; die Reaktivierung des genannten Enzyms scheint also mit der Proteinsynthese verknüpft zu sein.

WAKIN und Mitarbeiter haben ein CO<sub>2</sub>-abhängiges Enzymsystem aus Vogelleber gereinigt, welches aus Acetat Fettsäuren bildet. Die Aktivität des Enzyms ist bei Biotin-Mangeltieren herabgesetzt. Das Enzym soll eine sehr hohe Menge von gebundenem Biotin (200–250  $\mu\text{g}$  pro mg Protein) enthalten. Es wird durch Avidin *in vitro* gehemmt; die Hemmung kann durch Biotin wieder aufgehoben werden<sup>8)</sup>. Hemmung durch Avidin ist auch bei der WOOD-WERKMAN'schen Reaktion in zellfreien Bakterienextrakten beobachtet worden<sup>9)</sup>. Weitere Enzyme, bei deren Wirkung man eine Beteiligung des Biotins als Coenzym vermutet hat, sind Succinodehydrogenase<sup>10)</sup>, Desaminasen aus Bakterien<sup>2)</sup>, Hefe-Hexokinase<sup>11)</sup>. Diese Enzyme sollen beim Biotinmangelorganismus eine verminderte Aktivität aufweisen, und es wird behauptet, dass die zellfreien Extrakte durch Zugabe von Biotin reaktiviert werden können.

In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob Biotin als Baustein der Oxalacetat-Carboxylase aus Hühnerleber wirkt. Dieses Enzym katalysiert folgende Reaktion: Phosphoenolpyruvat + CO<sub>2</sub> + Inosindiphosphat  $\rightleftharpoons$  Oxalacetat + Inosin-triphosphat<sup>12)</sup>. In einer früheren Veröffentlichung ist gezeigt worden, dass die Aktivität dieses Enzyms bei Biotinmangeltieren herabgesetzt ist<sup>13)</sup>. Die im folgenden beschriebenen Versuche sprechen aber gegen die Annahme, dass Biotin an Oxalacetat-Carboxylase gebunden ist<sup>14)</sup>, und stimmen somit überein mit den oben zitierten Angaben über gereinigte Bakteriooxalacetat-Decarboxylasen<sup>4)5)</sup>. Im Rahmen dieser Untersuchung haben wir die mikrobiologische Biotinbestimmungsmethode etwas modifiziert und einige vorläufige Versuche über die Verwendung von Chromatographiesäulen von Avidin-azo-benzylcellulose angestellt, wobei wir hoffen, dass das letztere Material sich für die Trennung von biotinhaltigen Proteinen als günstig erweisen würde.

<sup>4)</sup> G. W. E. PLAUT & H. A. LARDY, J. biol. Chemistry **180**, 13 (1949).

<sup>5)</sup> D. HERBERT, in S. P. COLOWICK & N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology, New York 1955, **1**, 753.

<sup>6)</sup> S. OCHOA, 1958, persönliche Mitteilung.

<sup>7)</sup> R. F. SUND, J. M. RAVEL & W. SHIVE, J. biol. Chemistry **231**, 807 (1958).

<sup>8)</sup> S. J. WAKIN, E. B. TITCHENER & D. M. GIBSON, Biochim. biophysica Acta **29**, 225 (1958).

<sup>9)</sup> G. E. WESSMAN & C. H. WERKMAN, Arch. Biochem. Biophysics **26**, 214 (1950).

<sup>10)</sup> S. J. AJL, W. R. HART & C. H. WERKMAN, Enzymologia **14**, 1 (1950).

<sup>11)</sup> R. R. STRAUSS & A. G. MOAT, J. biol. Chemistry **233**, 765 (1958).

<sup>12)</sup> M. F. UTTER & K. KURAHASHI, J. biol. Chemistry **207**, 787 und 821 (1954).

<sup>13)</sup> M. BETTEX-GALLAND, Fixation du CO<sub>2</sub> par les tissus animaux et influence de la biotine sur cette fixation. Dissertation Univ. Zürich 1958.

<sup>14)</sup> H. C. LICHTSTEIN, Arch. Biochem. Biophysics **71**, 276 (1957).

### Experimenteller Teil

**Abkürzungen:** PEP: Phosphoenolpyruvat. IDP: Inosindiphosphat. ITP: Inosintriphosphat. OA: Oxalacetat. DPNH: reduziertes Diphosphopyridinnucleotid. EDTA: Äthylendiamin-tetraacetat, Na-Salz. TRIS: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan. DNP-Leucin: Dinitrophenyl-leucin. AedHase: Äpfelsäuredehydrogenase. DEAE-Cellulose: Diäthylamino-äthyl-cellulose.

Unter freiem Biotin verstehen wir diejenige Menge des Vitamins, die in wässrigen Lösungen ohne vorherige Hydrolyse bestimmt werden kann. Unter gebundenem Biotin verstehen wir die Menge Biotin, die durch Hydrolyse freigesetzt wird.

**Chemikalien:** PEP, DPNH, TRIS und AedHase wurden von der Firma BOEHRINGER, IDP von PABST & CIE bezogen.

Das Avidin wurde aus frischem Hühnereiweiss nach einer Methode von WOLLEY & LANGSWORTH<sup>15)</sup> bereitet. Die Ausbeute aus 600 ml Eiweiss betrug 7 mg Avidin Trockensubstanz mit einer Aktivität von ungefähr 9 Antibiotin-Einheiten pro  $\gamma$ . Unsere Ergebnisse stimmen ziemlich genau mit denen von WOLLEY & LANGSWORTH überein, die als Höchstwert eine Aktivität von 10 Antibiotin-Einheiten pro  $\gamma$  angeben.

**Analytische Methoden.** OA-Carboxylase-Aktivität wurde mit Hilfe eines optischen Tests bestimmt. Wir haben die Reaktion, die aus PEP, CO<sub>2</sub> und IDP Oxalessigsäure bildet, mit der Einwirkung von Äpfelsäure-Dehydrogenase gekoppelt, so dass die Oxydation von DPNH gemessen werden konnte. Für die Bestimmung verwendeten wir ein «EPPENDORF»-Photometer (NETHELER & HINZ, Hamburg) mit dem Filter Hg 366. Bei einer Temperatur von 25° beträgt der Extinktionskoeffizient (bezogen auf  $\mu\text{Mol/ml}$ ) von DPNH 3,3<sup>16)</sup>. Aus den Angaben von UTTER & KURASHI<sup>12)</sup> haben wir berechnet, dass eine Einheit OA-Carboxylase pro ml unter diesen Bedingungen eine Abnahme der optischen Dichte von 0,0044 pro Min. ergibt.

Als Puffer wurde TRIS/HCl mit einer Endmolarität von 0,01 und einem pH von 7,4 verwendet. Zur Aktivierung wurde Mn<sup>++</sup> in einer Endkonzentration von  $7 \cdot 10^{-4}$ -m. zugegeben. Wenn die Elektrophorese in Gegenwart von EDTA durchgeführt wurde, setzten wir bei der Bestimmung Mn<sup>++</sup> in so berechneter Konzentration zu, dass keine Hemmung durch Komplexon mehr möglich war.

Nach der Zugabe von IDP wurde während mindestens 2 Min. alle 10–15 Sek. eine Ablesung gemacht (IDP wurde erst zuletzt zugesetzt, nachdem die Blindreaktion mit PEP, das wahrscheinlich etwas Pyruvat enthält, abgelaufen war). Bei genügend gereinigten Enzympräparaten verlief die Extinktionsabnahme während mindestens 2 Min. linear. Bei Rohextrakten liess die Reaktionsgeschwindigkeit nach ungefähr 20 Sek. nach: in diesem Fall wurde die Neigung der Tangente zu Beginn der Reaktion als Aktivitätsmass benützt.

Die Bestimmung des «malic enzyme» wurde nach OCHOA durchgeführt<sup>1)</sup>.

Die Proteinkonzentration wurde, falls es sich um trübe Lösungen handelte, mit Hilfe der Biuretreaktion<sup>17)</sup>, sonst anhand der optischen Dichte bei 280  $m\mu$  bestimmt.

Für die Bestimmung des Biotins wurde die mikrobiologische Methode von HERTZ<sup>18)</sup> mit einigen Modifikationen verwendet. Wir benützten *Saccharomyces cerevisiae* FB (Nr. 139 American Type Culture Collection).

Die Säurehydrolyse wurde ohne vorherige Extraktion mit Äther durchgeführt. Die Proben wurden mit 3,6-n. oder 6-n. Schwefelsäure 1 Std. bei 121° hydrolysiert. Anstatt mit Ba(OH)<sub>2</sub> neutralisierten wir mit NaOH, wodurch die Prozedur sehr wesentlich vereinfacht wird. Das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* wird nicht beeinträchtigt, solange die Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentration in der Nährlösung die Molarität von 0,3 nicht übersteigt.

Daneben führten wir auch eine enzymatische Hydrolyse durch. Die besten Resultate erreichten wir mit einem Enzymgemisch von Trypsin (Pankreas-Trypsin und Bakterientrypsin 1:1) von Novo und HYDG (= Hydrolasengemisch) von BOEHRINGER bei pH 7,4. Die zu bestimmenden Proteinlösungen wurden, nachdem sie durch 10 Min. langes Erhitzen im kochenden Wasserbad denaturiert worden waren, mit dem Enzymgemisch 24 Std. bei 37° inkubiert. Die Endkonzen-

<sup>15)</sup> D. W. WOLLEY & L. G. LANGSWORTH, J. biol. Chemistry **142**, 285 (1942).

<sup>16)</sup> TH. BÜCHER & R. CZOK, persönliche Mitteilung.

<sup>17)</sup> G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBÄDE, E. MEYER-ARENDT & G. PFLEIDERER, Z. Naturforschung **8b**, 555 (1953).

<sup>18)</sup> R. HERTZ, Proc. Soc. exptl. Biol. Med. **52**, 15 (1943).

trationen im Hydrolysegemisch waren: Protein der Proben 1–5 mg/ml, Trypsin 50  $\gamma$ /ml, HyDG 50  $\gamma$ /ml und 0,1-m. TRIS/HCl-Puffer pH 7,4. Nach der Inkubation wurden die Enzyme durch Erhitzen inaktiviert.

Mit dieser Hydrolyse erhielten wir im Durchschnitt um 20% höhere Biotinwerte als mit der Säurehydrolyse, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass während der Säurehydrolyse ein Teil des Biotins zerstört wird. Nach Fig. 2 zeigen bei der Chromatographie die Biotin-Gipfel nach Säurehydrolyse und Enzymhydrolyse gleiche Lage und das Verhältnis zwischen den beiden bleibt in den verschiedenen Fraktionen ziemlich konstant, woraus man schliessen dürfte, dass beide Methoden zuverlässig sind.

Was das Nährmilieu anbetrifft, so schien uns eine Modifizierung desselben aus folgenden Gründen angezeigt: Es bestand die Gefahr, dass durch die Neutralisation mit NaOH nach der Säurehydrolyse starke Abweichungen vom optimalen pH auftreten könnten. Deshalb setzten wir dem Milieu einen Kaliumcitratpuffer vom pH 4,5 zu, der keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. cerevisiae* ausübt. Es bestand ferner die Möglichkeit, dass einige durch die Hydrolyse der Proteinproben freigesetzte Aminosäuren einen «sparing effect» bewirken konnten. Wir untersuchten sämtliche Aminosäuren einzeln und in Kombinationen auf diese Wirkung, und es stellte sich heraus, dass eine Anreicherung des Milieus an Aminosäuren notwendig war.

Die Zusammensetzung des endgültigen Nährmilieus ist in Tab. I angegeben. Die Biotinwerte, die wir mit dieser Methode in unseren OA-Carboxylaseextrakten erhalten haben, stimmen mit denjenigen LICHSTEIN's<sup>14)</sup> für Fermentpräparate vom entsprechenden Reinheitsgrad überein.

Tabelle I. *Nährmilieu für Saccharomyces cerevisiae* FB (Nr. 139)  
Mengen pro Liter doppelt konzentrierten Nährmilieus

Saccharose . . . . .	34,0 g	Pyridoxin-hydrochlorid . . . . .	1,0 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	5,0 g	Calciumpantothenat . . . . .	0,5 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O . . . . .	3,9 g	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O . . . . .	522,0 mg
Vitaminfreies		MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	920,0 mg
Caseinhydrolysat (DIFCO) . . . . .	8,0 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> . . . . .	1,0 mg
L-Asparaginsäure . . . . .	170,0 mg	ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	1,79 mg
L-Arginin . . . . .	49,2 mg	MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O . . . . .	1,57 mg
DL-Tryptophan . . . . .	40,0 mg	FeCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,84 mg
Inosit . . . . .	9,0 mg	CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,79 mg
Thiaminchlorid . . . . .	1,0 mg	0,5-m. Kaliumcitratpuffer pH 4,5	200 ml

*Chromatographische und elektrophoretische Methoden.* – A) Wir wandten BOMAN's «one step»<sup>19)</sup> Chromatographie auf (Diäthylamino-äthyl)-cellulose an, die nach PETERSON & SOBER<sup>20)</sup> hergestellt wurde. Die Ergebnisse eines Experimentes sind in Fig. 1 dargestellt. Wir bereiteten aus Normalhühnerleber einen Mitochondrienextrakt nach der Vorschrift von LEUTHARDT & MÜLLER<sup>21)</sup> und bewahrten diesen in Form von Acetontrockenpulver im Exsikkator bei +4° auf. Ein Gramm Trockenpulver wurde mit 9 ml Wasser unter ständigem Rühren während 10 Min. extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bei 22000 g während 20 Min. bei 0° wurde das Überstehende über Nacht gegen einen 0,02-m. TRIS/HCl-Puffer pH 7,4 mit 0,04% EDTA dialysiert. Dann wurden 5 ml auf eine DEAE-Cellulose-Säule (43 cm  $\times$  1,475 cm  $\varnothing$ ) aufgezogen, welche vorher mit dem für die Dialyse verwendeten Puffer behandelt worden war. Nach dem Waschen mit 10 ml desselben Puffers wurde die Elution in einem Schritt mit 0,5-m. TRIS/HCl Puffer pH 7,4 vorgenommen. Die Ausfließgeschwindigkeit betrug ungefähr 3 ml/Std. (Während der Elution des Gipfels stieg sie auf etwa 5 ml/Std. an.) Das Volumen der Fraktionen betrug 0,806 ml. Der ganze Versuch wurde bei 4° durchgeführt.

Wir haben ungefähr 380 Aktivitätseinheiten auf die Säule aufgezogen; die Ausbeute im Eluat betrug 112 Einheiten, d. h. etwa 30%. Es sind fast alle Proteine adsorbiert worden. Wie aus Fig. 1 ersehen werden kann, stimmen die Gipfel des Enzyms, der Proteine und des Total-

<sup>19)</sup> H. G. BOMAN, Ion Exchange Chromatography of Proteins and some Applications to the Study of different Phosphoesterases. Uppsala, Dissertation 1958.

<sup>20)</sup> E. A. PETERSON & H. A. SOBER, J. Amer. chem. Soc. **78**, 751 (1956).

<sup>21)</sup> F. LEUTHARDT & A. F. MÜLLER, Experientia **4**, 478 (1948).

biotins (welches nach 6-n.-Säurehydrolyse bestimmt worden ist) praktisch überein. Die restlichen Proteine können mit 1-proz. NaOH eluiert werden.

Bei der Chromatographie eines Extraktes aus Acetontrockenpulver der ganzen Leber wurde ein rosafarbiges Material (welches Cytochrom C enthielt) nicht adsorbiert und wanderte als erste Zone nach unten. Es enthielt kein Biotin.

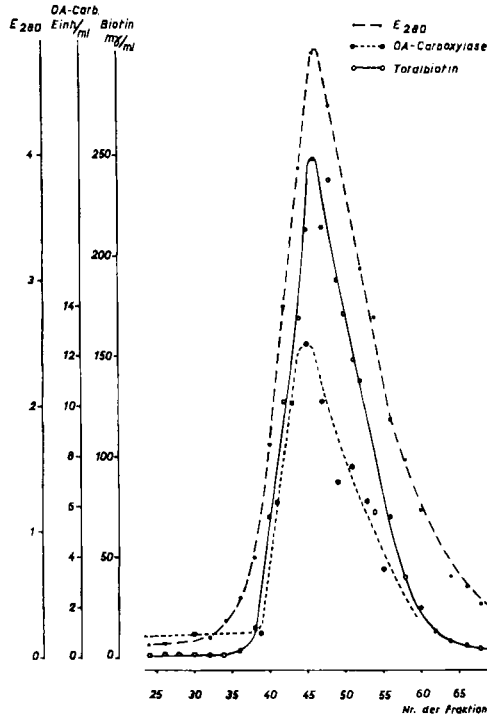


Fig. 1. Chromatographie eines Mitochondrienextraktes aus Hühnerleber auf DEAE-Cellulose

Das «malic enzyme» wurde ebenfalls bestimmt<sup>22)</sup>. Es zeigte sich, dass der Aktivitäts-Gipfel vor demjenigen der OA-Carboxylase auftritt, und zwar unabhängig von diesem sowie vom Biotin-Gipfel und auch zum grössten Teil aussserhalb des Protein-Gipfels. Durch diesen einzigen Schritt wurde eine ungefähr 20fache Reinigung des «malic enzyme» erzielt. Was die OA-Carboxylase betrifft, so erhielten wir ähnliche Resultate wie beim Mitochondrienextrakt, d.h. der Aktivitäts-Gipfel stimmte mit dem Biotin- und dem Protein-Gipfel überein.

B) Die Säulenelektrophorese (Fig. 2) wurde auf Cellulose (FLODIN & KUPKE<sup>23)</sup>) nach der Methode von J. PORATH<sup>24)</sup> in 0,075-m. TRIS/HCl-Puffer pH 7,4 + 0,02% EDTA durchgeführt. 9 g Acetontrockenpulver von Normalhühnerleber wurden bis zum Schritt C gemäss der Vorschrift von UTTER & KURAHASHI<sup>12)</sup> gereinigt, wobei die Hitze-Inaktivierung weggelassen wurde. Nach einer 14stündigen Dialyse gegen 0,001-m. Phosphatpuffer pH 5,9 wurden 8 ml Extrakt (d. h. 300 mg Protein, 1910 OA-Carboxylase-Einheiten und 120  $\mu$ g Totalbiotin) auf die Säule (87 cm  $\times$  2,3 cm  $\varnothing$ ) aufgezogen. Als Markierungssubstanz verwendeten wir DNP-Leucin. Wir legten während 30 Std. eine Spannung von 950 V (ca. 60 mA) an, wobei die untere Elektrode als Anode benützt wurde. Die elektrophoretisch getrennten Zonen wurden dann mit demselben Puffer nachgewaschen. Fraktionen von ungefähr 4 ml wurden von dem Moment an aufgefangen, da DNP-Leucin auszufließen begann.

<sup>22)</sup> Das «malic Enzyme» kommt in Mitochondrien nicht vor<sup>13)</sup>.

<sup>23)</sup> P. FLODIN & D. W. KUPKE, *Biochim. biophysica Acta* **21**, 368 (1956).

<sup>24)</sup> J. PORATH, *Biochim. biophysica Acta* **22**, 151 (1956).

Aus Fig. 2 geht klar hervor, dass die Wanderungsgeschwindigkeit des Biotins ganz verschieden ist von derjenigen des Enzyms. Das Verhältnis von OA-Carboxylase-Einheiten zu  $m\gamma$  gebundenen Biotins (das durch 3,6-n.-Säurehydrolyse freigesetzt worden war) betrug in den aktivsten Fraktionen 80–90. Sowohl die Ausbeuten an Biotin als auch an Protein waren quantitativ. Die Ausbeute der Aktivität betrug 60%. Diese war jedoch bei anderen Versuchen unterschiedlich, obwohl sich das Gesamtbild gleich blieb. Der Zusatz von EDTA sowie die Verwendung von genügend konzentriertem Extrakt ist wahrscheinlich für die Stabilität des Enzyms ausschlaggebend.

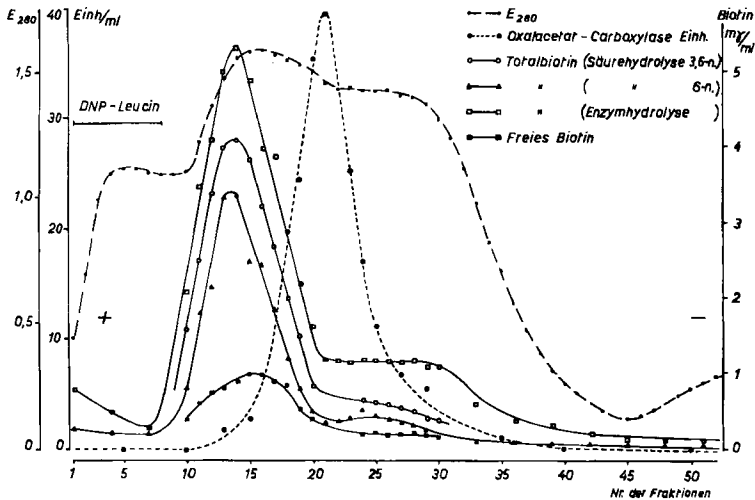


Fig. 2. Säulenelektrophorese eines teilweise gereinigten Extraktes aus Hühnerleber

C) Um das Avidin an ein für Chromatographie günstiges Material zu binden, verwendeten wir eine Methode von CAMPBELL *et al.*<sup>25)</sup> zur Koppelung von Proteinen mit Cellulose. Das Diazoniumsalz von ca. 0,7 g p-Aminobenzylcellulose wurde mit 3 mg Avidin in 0,3 ml 0,02-m. Boratpuffer pH 8,75 + 0,6% NaCl gekuppelt. Mit diesem Material wurde eine Säule (8 cm  $\times$  0,7 cm  $\varnothing$ ) aufgefüllt und mit 0,02-m. TRIS/HCl-Puffer pH 7,4 durchgewaschen. Der aufgetragene Extrakt war bis zum Schritt C nach UTTER & KURAHASHI<sup>12)</sup> gereinigt worden. Bei dieser Präparation war die Hitze-Inaktivierung ausgelassen und auch die Dauer der Dialyse gegen 0,001-m. Phosphatpuffer pH 5,9 auf 3 Std. und gegen 0,02-m. TRIS/HCl-Puffer pH 7,4 auf 1 Std. abgekürzt worden. Nach der Dialyse wurde das pH mit verdünnter Essigsäure auf 6 gebracht und die Fällung abzentrifugiert; das Überstehende wurde nach Einstellen des pH auf 7,4 für die Chromatographie verwendet. Die Abkürzung der Dialyse führte zu einem sehr aktiven Extrakt: er enthielt 11,56 mg Protein, 885 OA-Carboxylase-Einheiten und 82,5  $m\gamma$  gebundenes Biotin pro ml (d. h. 95  $m\gamma$  Totalbiotin, bestimmt nach 3,6-n.-Säurehydrolyse, und 12,5  $m\gamma$  freies Biotin).

1 ml dieses Extraktes wurde auf die Säule aufgetragen. Sobald er in die Kolonne eingedrungen war, wurde der Durchlauf während 45 Min. bei Zimmertemperatur unterbrochen. Dann wurde zuerst mit 0,02-m. TRIS/HCl-Puffer pH 7,4 (3 ml), darauf mit 0,05-m. TRIS/HCl Puffer + 4-m. NaCl durchgewaschen. So erhielten wir zwei Hauptfraktionen: eine nicht adsorbierte in 0,02-m. TRIS und eine mit 0,5-m. TRIS + NaCl eluierte. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Fig. 3 dargestellt. Es geht daraus hervor, dass das gebundene Biotin auf der Säule zurückgehalten wird (87%) und teilweise mit TRIS + NaCl eluiert werden kann (36%). Die OA-Carboxylase wird auf Avidin-azo-benzylcellulose nicht zurückgehalten. Die Ausbeute beträgt 37%.

<sup>25)</sup> D. H. CAMPBELL, E. LÜSCHER & L. S. LERMAN, Proc. nat. Acad. Sci. (Washington) **37**, 575 (1951).

*Versuch, die OA-Carboxylase in vitro zu hemmen.* Wir versuchten, die OA-Carboxylase durch Avidin *in vitro* zu hemmen. Ein Rohextrakt von Hühnerlebermitochondrien wurde in zwei parallelen Ansätzen während 20 Min. bei 23° mit 150  $\gamma$  Avidin pro ml, ohne und mit 20  $\gamma$  Biotin pro ml, 0,02-m. TRIS-HCl-Puffer, pH 7,4 präinkubiert. Wir fanden die genau gleiche Aktivität wie beim Kontrollversuch (s. Fig. 4a). Dasselbe Ergebnis erhielten wir mit einem reineren und aktiveren Extrakt, den wir während 3 Std. mit 300  $\gamma$  Avidin pro ml präinkubierten (s. Fig. 4b).

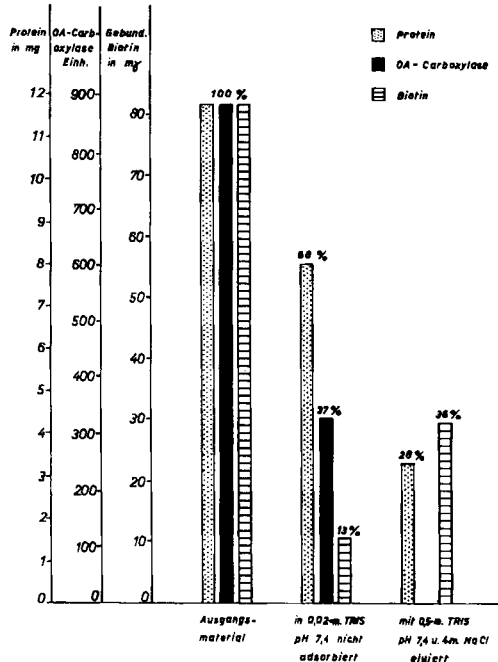


Fig. 3. Chromatographie eines teilweise gereinigten Extraktes auf Avidin-Cellulose

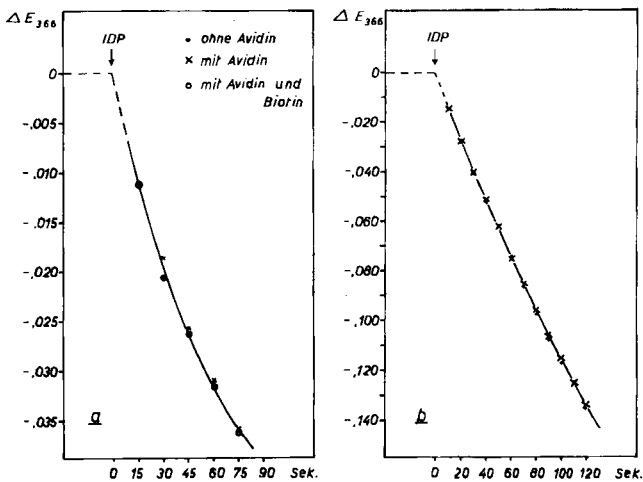


Fig. 4. Prüfung der Wirkung des Avidins auf die Oxalacetat-Carboxylase-Aktivität

### Ergebnisse und Diskussion

*Beobachtungen über das «malic enzyme».* Wir haben durch Chromatographie auf (Diäthylamino-äthyl)-cellulose eine 20fache Reinigung dieses Enzyms erreicht und haben festgestellt, dass der Aktivitäts-Gipfel dieses Enzyms von demjenigen der OA-Carboxylase verschieden ist und dass die aktiven Fraktionen kein Biotin enthalten. Wir haben also mit einer verschiedenen Methode die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen können<sup>1)</sup>.

*Die Avidin-azo-benzylcellulose.* Angaben der Literatur weisen darauf hin, dass das Avidin auch proteingebundenes Biotin fixieren kann. Man hat z. B. beobachtet, dass einige Enzyme durch Avidin *in vitro* gehemmt werden<sup>8) 9)</sup>. CHANG & PETERSON konnten biotinhaltige Polypeptide auf Avidin-Celit anreichern<sup>20)</sup>. (Wir machten aber von dieser Methode keinen Gebrauch, da sie bei pH 3 durchgeführt wird; bei pH 7,4 erhielten wir keine reproduzierbaren Werte.)

Wir fixierten das Avidin nach der oben erwähnten Methode an Cellulose. Wie aus Fig. 3 hervorgeht, erzielten wir mit diesem Material günstige Ergebnisse. Für die allgemeine Anwendung dieser Methode zur Reinigung von biotinhaltigen Proteinen muss jedoch noch abgeklärt werden, warum ein kleiner Teil des Biotins nicht zurückgehalten worden ist, und es müssen bessere Bedingungen für eine quantitative Zurückgewinnung des fixierten Biotins erreicht werden.

*Beobachtungen über die Oxalacetat-Carboxylase.* LICHTSTEIN hat nachgewiesen, dass das Verhältnis von Aktivität zu Biotin über einige Reinigungsstufen eines Präparates von OA-Carboxylase konstant bleibt. Auf Grund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass Biotin an OA-Carboxylase gebunden sei<sup>14)</sup>. Innerhalb des Reinigungsbereiches mit konstantem Aktivität/Biotin-Verhältnis wird die spezifische Aktivität jedoch nur 5–6mal erhöht. Der erreichte Reinheitsgrad des Enzyms würde einer Zusammensetzung von nur einem Teil Enzym auf 1000 Teile inaktives Protein entsprechen, wenn man ein Biotin/Enzym-Verhältnis von 1:1 und ein Molekulargewicht des Fermentproteins der Grössenordnung 100000 annimmt. Es ist also sehr wohl möglich, dass bei der Reinigung der OA-Carboxylase ein biotinhaltiges Protein mitgeführt wird. Dies ist umso wahrscheinlicher, als das Enzym<sup>27)</sup> und auch der grösste Teil des Biotins in den Mitochondrien vorkommen (Tab. II).

Tabelle II. *Verteilung des Biotins in den Zellfraktionen*  
Die Werte beziehen sich auf ein Gramm Hühnerleber

	Totalbiotin mγ	Freies Biotin mγ	Gebund. Biotin mγ
In 1 g Leber . . . . .	3000 (100%)	175 (100%)	2825 (100%)
Mikrosomen + «Überstehendes» . .	336 (11%)	46,5 (26,6%)	290 (10,3%)
Mitochondrien (gewaschen) . . .	1900 (63,5%)	50,4 (29%)	1850 (66%)
Kerne, intakte Zellen usw. . . . .	175 (5,8%)	0,75 (0,4%)	174 (6,2%)

Um weitere Auskunft über eine eventuelle Beziehung zwischen OA-Carboxylase und Biotin zu erhalten, schien es uns zweckmässig, nicht die Reinigungsprozedur von

<sup>26)</sup> W. S. CHANG & W. H. PETERSON, J. biol. Chemistry **193**, 587 (1951).

<sup>27)</sup> R. S. BANDURSKI & F. LIPMANN, J. biol. Chemistry **219**, 741 (1956); K. KURAHASHI, R. J. PENNINGTON & M. F. ÜTTER, *ibid.* **226**, 1059 (1957).



UTTER & KURAHASHI<sup>12)</sup> weiterzuführen (da das Enzym sehr instabil ist), sondern unabhängige und wirksamere Trennungsmethoden anzuwenden, wobei wir von einem stabileren, wenn auch weniger reinen Präparat ausgingen, nämlich vom Produkt des ersten Reinigungsschrittes, bei welchem das Aktivität/Biotin-Verhältnis schon dasselbe ist wie beim letzten. Eine enge Übereinstimmung zwischen Biotingehalt und OA-Carboxylase in den zahlreichen chromatographischen und elektrophoretischen Fraktionen würde eine immer noch indirekte, aber beweiskräftigere Unterstützung von LICHSTEIN'S<sup>14)</sup> Resultaten ergeben, während unabhängiges Verhalten oder eine Steigerung des Verhältnisses von Aktivität zu Biotin im Lauf der Reinigung gegen eine spezifische Bindung des Biotins an die OA-Carboxylase nach Art eines Coferments sprechen würde.

Fig. 1 zeigt eine chromatographische Trennung eines Mitochondrienextraktes von Normalhühnerleber auf (Diäthylamin-äthyl)-cellulose. Der Biotin-Gipfel stimmt mit dem Aktivitäts-Gipfel überein, was jedoch keinen entscheidenden Schluss zulässt, da der Haupt-Proteingipfel ebenfalls mit den beiden zusammenfällt. Die Verwendung eines vorher fraktionierten Mitochondrienextraktes oder eines Präparates aus Biotin-Mangelheber für die Chromatographie führte auch nicht zu eindeutigen Resultaten. Da höhere pH-Werte die Stabilität des Enzyms beeinträchtigen und die Chromatographie bei saurem pH einige technische Schwierigkeiten bietet<sup>28)</sup>, gingen wir zu einer anderen Trennungsmethode über.

Fig. 2 zeigt eine elektrophoretische Trennung eines teilweise gereinigten Extraktes von Normalhühnerleber. Aus diesem Versuch geht klar hervor, dass die Gipfel von freiem, von gebundenem und von Totalbiotin ganz unabhängig vom Aktivitäts-Gipfel sind, so dass das Verhältnis Aktivität zu Biotin in den Enzymfraktionen stark erhöht ist. In den aktivsten Fraktionen beträgt das Verhältnis zwischen Enzymeinheiten und  $m\gamma$  gebundenen Biotins 80–90. Die gereinigten Enzymfraktionen von LICHSTEIN ergaben ein Verhältnis von 30<sup>29)</sup>.

Mit dem Ziel, eine ähnliche Trennung auf andere Weise zu erhalten, wurde der Extrakt auf einer Avidin-azo-benzylcellulose-Säule chromatographiert. Fig. 3 zeigt, dass die Enzymaktivität auf diesem Material nicht zurückgehalten wird; im Ausfließenden lässt sich eine Ausbeute von 37% bestimmen, was bei der Instabilität des Enzyms doch als befriedigender Wert angesehen werden dürfte. Das Biotin wird beinahe quantitativ zurückgehalten (87%).

Es ist bekannt, dass einige biotinabhängige Enzyme durch Avidin *in vitro* gehemmt werden<sup>8)</sup><sup>9)</sup>. Diesen Versuch machten wir auch mit der OA-Carboxylase. Fig. 4 zeigt, dass die Aktivität der untersuchten Enzympräparate überhaupt nicht von Avidin beeinflusst wird. Natürlich lässt solch ein negatives Experiment keinen definitiven Schluss zu, da es ja auch denkbar wäre, dass ein Komplex von Avidin und Enzym aktiv sein könnte.

<sup>28)</sup> Bekanntlich sollte ja für ein Proteinchromatogramm auf Anionenaustauscher ein Kationpuffer verwendet werden: H. G. BOMAN, *Nature* **175**, 898 (1955).

<sup>29)</sup> Es besteht die theoretische Möglichkeit, dass ein Antibiotin-Faktor dieselbe elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit wie die Oxalacetat-Carboxylase hat und Säure-unempfindlich ist, was zu den niedrigen Biotinwerten in den entsprechenden Fraktionen hätte führen können. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Ausbeute an Biotin quantitativ war.

Unsere Versuche zeigen, dass sich OA-Carboxylase und Biotin in ihrem Verhalten bei Verwendung geeigneter Trennungsmethoden stark unterscheiden und dass durch Avidin die Reaktion *in vitro* nicht gehemmt wird. Die oben erwähnte Konstanz des Verhältnisses von Aktivität zu Biotin verliert durch die Tatsache stark an Bedeutung, dass wir einen dreimal höheren Wert gefunden haben. Nach unseren Versuchen muss das Verhältnis von Aktivität zu Biotin des reinen Enzyms 85 oder mehr sein, so dass das an OA-Carboxylase gebundene Biotin, das LICHSTEIN in seinen reinsten Präparaten bestimmt hat, nicht mehr als ein Drittel des proteingebundenen Biotins betragen kann. Das heisst:  $3 \times 10^8$  g Protein würden nur ein Mol OA-Carboxylase enthalten oder in anderen Worten, auf mindestens 3000 Teile Protein käme nur ein Teil Enzym vom Molekulargewicht 100000. Wenn aber der Reinheitsgrad des Präparates von LICHSTEIN tatsächlich so gering ist, kann man sicher aus dem Biotin-gehalt des Präparates nicht schliessen, dass das darin enthaltene Biotin an das Enzym gebunden ist.

Zum Abschluss möchten wir betonen, dass unsere Resultate die Möglichkeit nicht vollkommen ausschliessen<sup>30)</sup>, dass das Biotin ein Baustein der OA-Carboxylase ist. Es müsste sich jedoch um geringere Mengen handeln, als bisher angenommen worden ist.

An dieser Stelle möchten wir Herrn Prof. LEUTHARDT für seine ständigen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit unseren besten Dank aussprechen. Wir danken ebenfalls Prof. H. C. LICHSTEIN und Prof. S. P. MISTRY für ihre interessanten und wertvollen Ratschläge sowie der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE AG. für die Gewährung eines Stipendiums an Frau L. S. PRESTIDGE.

#### SUMMARY

By previous authors biotin has been suggested to occur as a building block of oxalacetic acid carboxylase from chicken liver. We have subjected a partially purified extract to some independent purification procedures. Column electrophoresis showed very different electrophoretic mobilities of oxalacetic acid carboxylase and of protein-bound biotin. On avidin-azo-benzylcellulose too, the enzyme and the vitamin had different chromatographic behaviours. The enzyme is not inhibited by avidin *in vitro*.

These data, and a higher activity/biotin ratio than reported previously, are interpreted as contrary to the above quoted suggestion.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich

---

<sup>30)</sup> Die Hauptschwierigkeit, die sich uns bei der vorliegenden Arbeit entgegenstellte, war die sehr geringe Stabilität des Enzyms. (Wir vermuten, dass durch bessere Ausbeuten das Aktivität/Biotin-Verhältnis bedeutend erhöht wäre.) Bei einer Enzymlösung, die wir 15 Std. bei +4° und dann noch 3 Std. bei +21° in 0,02-m. TRIS/HCl-Puffer vom pH 7,4 stehen gelassen haben, stellten wir einen Aktivitätsverlust von ca. 91% fest.

---