

## 215. Die Fixierung von [<sup>14</sup>C]-Biotin an die Leberproteine des Hühnchens

von A. Gilgen und F. Leuthardt

(14. VII. 62)

Die biochemische Funktion des Biotins konnte kürzlich durch LYNEN u. Mitarb.<sup>1)</sup> aufgeklärt werden. Die Autoren zeigten, dass die  $\beta$ -Methylcrotonyl-CoA-carboxylase Biotin als Wirkungsgruppe enthält; die «aktivierte» Form der Kohlensäure ist an Biotin gebundene Kohlensäure, die bei den Carboxylierungsreaktionen auf andere Verbindungen übertragen werden kann. Neben dem oben genannten Enzym sind noch andere als Biotinproteide erkannt worden, so die Acetyl-CoA-carboxylase (WAKIL u. Mitarb.<sup>2)</sup>), die Propionyl-CoA-carboxylase (LARDY & PEANASKY<sup>3)</sup>), die Methylmalonyl-CoA-Oxalacetat-transcarboxylase (SWICK & WOOD<sup>4)</sup>, STJERNHOLM u. Mitarb.<sup>5)</sup>), die Pyruvat-carboxylase von UTTER & KEECH<sup>6)</sup>. Es hat sich aber gezeigt, dass Biotinmangel eine ganze Reihe weiterer Enzyme auf indirektem Weg beeinflusst. Die Aktivitäten des «Malic enzyme» OCHOA's<sup>7)</sup> wie auch der Phosphoenolpyruvat-carboxykinase von UTTER & KURAHASHI<sup>8)</sup> sind beim Biotin-Mangelhühnchen stark herabgesetzt; doch handelt es sich hier nicht um Biotinenzyme (OCHOA u. Mitarb.<sup>9)</sup>, BETTEX-GALLAND<sup>10)</sup>, SEMENZA u. Mitarb.<sup>11)</sup>). In einzelnen Fällen hat sich die sekundäre Natur dieser Defekte dadurch nachweisen lassen, dass es gelungen ist, sie ohne Zufuhr von Biotin zu korrigieren (DAKSHINAMURTI u. Mitarb.<sup>12)</sup>).

Von der Tatsache ausgehend, dass ein grosser Teil des Biotins in den Geweben sich nicht in freier Form findet, sondern an Protein gebunden ist, haben wir in unserem Laboratorium die Fixierung von [<sup>14</sup>C]-Biotin an die Leberproteine des normalen und des Biotin-Mangelhühnchens untersucht. Wir haben darüber 1960 in einer kurzen vorläufigen Mitteilung berichtet (GILGEN, BETTEX-GALLAND & LEUTHARDT<sup>13)</sup>). Es zeigte sich, dass offenbar zwei Mechanismen der Biotinfixierung bestehen. Ein Teil des Biotins wird schon beim blossen Kontakt mit den Proteinen oder bei der anschliessenden Aufarbeitung so fest an Protein gebunden, dass er auch mit heisser

<sup>1)</sup> F. LYNEN, J. KAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING & E. RINGELMANN, *Angew. Chem.* 71, 481 (1959).

<sup>2)</sup> S. J. WAKIL, E. B. TICHENER & D. M. GIBSON, *Biochim. biophysica Acta* 29, 225 (1958).

<sup>3)</sup> H. A. LARDY & R. PEANASKY, *Physiol. Rev.* 33, 560 (1953).

<sup>4)</sup> R. W. SWICK & H. A. WOOD, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 46, 28 (1960).

<sup>5)</sup> R. STJERNHOLM, H. G. WOOD, S. H. G. ALLEN & B. JACOBSON, *Federation Proc.* 21, 244 (1962).

<sup>6)</sup> M. F. UTTER & D. B. KEECH, *J. biol. Chemistry* 235, PC 17 (1960).

<sup>7)</sup> S. OCHOA, A. MEHLER & A. KORNBERG, *J. biol. Chemistry* 167, 871 (1947).

<sup>8)</sup> M. F. UTTER & K. KURAHASHI, *J. biol. Chemistry* 207, 787, 821 (1954).

<sup>9)</sup> S. OCHOA, A. MEHLER, M. L. BLANCHARD, TH. H. HUKER, C. E. HOFFMANN & M. REGAN, *J. biol. Chemistry* 170, 413 (1947).

<sup>10)</sup> M. BETTEX-GALLAND, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 17, 175 (1959).

<sup>11)</sup> G. SEMENZA, L. S. PRESTIDGE, D. MÉNARD & M. BETTEX-GALLAND, *Helv.* 42, 669 (1959).

<sup>12)</sup> K. DAKSHINAMURTI, V. V. MODI & S. R. MISTRY, *Federation Proc.* 21, 468 (1962).

<sup>13)</sup> A. GILGEN, M. BETTEX-GALLAND & F. LEUTHARDT, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 18, C 31 (1960).

Trichloressigsäure nicht ausgewaschen werden kann («spontane» Fixierung). Der zweite Vorgang ist enzymatischer Natur und ATP-abhängig. Er lässt sich nur bei Leberextrakten von Mangeltieren beobachten. Wir haben am Beispiel der Acetyl-CoA-carboxylase zeigen können, dass es sich z. T. um die Bindung des Biotins an Apoenzyme handelt. Wir werden im folgenden über einen Teil dieser Versuche berichten.

### Material und Methodik

1. *Mangeltiere.* Wir verwendeten für unsere Versuche Hühnchen, die nach dem Schlüpfen schon vom 2. Tag an eine 10–20-prozentige Zulage von rohem getrocknetem Hühnereiweiss zum Grundfutter erhielten («Carnogen» 10 und 11 der Firma HAAB, Baar, Schweiz). Im Verlaufe von 4–6 Wochen entwickelten die Tiere die Biotin-Avitaminose, die sich an den bekannten Symptomen der Dermatitis, des Wachstumsstillstandes und des struppigen Federkleides zu erkennen gab.

Als Kontrollen verwendeten wir Tiere, die als Futterzulage nicht rohes, sondern gekochtes und wieder getrocknetes Eiereiweiss erhielten. Diese Tiere blieben gesund. Wir haben später die Kontrolltiere überhaupt ohne diese Eiweisszulage aufgezogen, da wir feststellten, dass diese Tiere sich gleich verhielten wie ausgewachsene gesunde Hühner.

2. *Herstellung der Extrakte.* Die Lebern wurden nach Entnahme sofort gekühlt, gewogen, mit der Schere zerschnitten, nach Zusatz der 4fachen Menge Pufferlösung  $2\frac{1}{2}$  Min. im Turmix homogenisiert und anschliessend in einer gekühlten Zentrifuge während einer halben Stunde bei 1500 g zentrifugiert. Den überstehenden zellkern- und mitochondrien-freien Extrakt bezeichnen wir im folgenden als Gesamtextrakt. Die Pufferlösung enthielt pro ml folgende Komponenten: 20  $\mu$ Mol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20  $\mu$ Mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20  $\mu$ Mol  $\text{KHCO}_3$ , 20  $\mu$ Mol KCl und 350  $\mu$ Mol Saccharose (ZAMECNIK & KELLER<sup>14</sup>). Wir haben den Puffer auch ohne Saccharosezusatz verwendet; die Resultate werden dadurch nicht verändert.

In späteren Versuchen haben wir nicht frische Leberextrakte, sondern Extrakte aus Aceton-trockenpulver verwendet. Dies bietet den Vorteil, dass man über längere Zeit hinweg einheitliches Material zur Verfügung hat. Für die Herstellung von Aceton-Trockenpulver wurden die Lebern zerschnitten und nach Zusatz der gleichen Menge physiologischer KCl-Lösung (1,1%) während  $2\frac{1}{2}$  bis 3 Min. im «Turmix» zerkleinert. Dann wurde 30 Min. in der Kälte bei 1500 g zentrifugiert und das Überstehende in die 5- bis 10fache Menge destillierten und auf  $-20^\circ$  gekühlten Acetons hineingerührt; der Niederschlag wurde abgenutscht und mit kaltem Aceton nachgewaschen. Der Rückstand auf der Nutsche wurde auf Filtrierpapier verteilt, zerkleinert und während einiger Stunden zum Trocknen liegengelassen. Das auf diese Art gewonnene Aceton-Trockenpulver wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid aufbewahrt. Zur Extraktion wurde das Aceton-Trockenpulver mit 20 Teilen der oben genannten Pufferlösung über Nacht in der Kälte stehengelassen, der nicht aufgelöste Rückstand wurde bei 1500 g während 30 Min. abzentrifugiert. Für einzelne Versuche, insbesondere Fraktionierungsversuche, wurden auch konzentriertere Extrakte verwendet.

3. *Fraktionierung der Extrakte.* In verschiedenen Versuchen wurde der Gesamtextrakt zur Entfernung von Cofaktoren durch Ammoniumsulfat gefällt. Er wurde langsam bei  $0^\circ$  mit festem Ammoniumsulfat bis zu 70% oder 100% Sättigung versetzt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Ammoniumsulfatlösung gleicher Konzentration nochmals gewaschen, in einer kleinen Menge Wasser aufgenommen und anschliessend über Nacht gegen destilliertes Wasser, und zum Schluss für einige Stunden gegen die Pufferlösung dialysiert. In anderen Versuchen unterteilen wir den Extrakt durch Ammoniumsulfat-Fällung in die Fraktionen: 0–25%, 25–50% und 50–70% Sättigung.

In einer besonderen Versuchsreihe untersuchten wir die Biotinfixierung im unveränderten Leberhomogenat und in verschieden daraus durch fraktionierte Zentrifugation erhaltenen Fraktionen.

Zuerst wurden aus dem Homogenat bei 1500 g die Kerne und die Mitochondrien entfernt, so dass wir zum üblicherweise verwendeten Gesamtextrakt gelangten. Durch Ultrazentrifugation (Spinco Modell L) bei 110000 g während 1 Stunde wurden auch noch die Mikrosomen sedimentiert. Die verschiedenen Sedimente wurden in der beschriebenen Pufferlösung aufgenommen.

<sup>14</sup>) P. C. ZAMECNIK & E. B. KELLER, J. biol. Chemistry 209, 337 (1954).

4. *Ansätze*. Den in der oben beschriebenen Weise gewonnenen Extrakte setzten wir je nach Art der Versuche carboxylmarkiertes Biotin und die verschiedenen andern Zusätze zu. Das Endvolumen betrug in den meisten Fällen 1,25 ml, davon 0,6–0,8 ml Leberextrakt. Die Ansätze wurden auf zwei grundsätzlich verschiedene Arten verwendet: Sie wurden entweder mit Biotin und den übrigen Zusätzen (60 Min. bei 38° unter leichtem Schütteln aerob inkubiert, im folgenden als «inkubierte Ansätze» bezeichnet); oder sie wurden nur kurzfristig (einige Sek.) mit dem Biotin in Kontakt gebracht und sofort durch Zusatz konzentrierter Harnstofflösung denaturiert («nicht inkubierte Ansätze»).

5. [<sup>14</sup>C]-*Biotin*. Das von uns verwendete carboxylmarkierte Biotin hatte eine spezifische Aktivität von ca. 100  $\mu$ C/mg. Auf zweidimensionalem Chromatogramm und Radioautogramm zeigte das Präparat neben dem Biotin eine Reihe weiterer radioaktiver Komponenten als Verunreinigungen; unter diesen entsprach die wichtigste dem Biotinsulfoxid. Versuche mit chromatographisch gereinigtem Biotin ergaben aber keine andern Resultate als das ursprüngliche Präparat.

6. *Aufarbeitung der Ansätze*. Die Ansätze (inkubiert oder nicht inkubiert) wurden mit 2 ml konzentrierter Harnstofflösung (100 g/100 ml) versetzt, mit weiteren 2 ml Harnstofflösung in kleine Dialysierschläuche gespült, während mindestens 6 Std. gegen 6 M Harnstofflösung, anschliessend während 3 Stunden gegen 3 M Harnstofflösung und zum Schluss für einige Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Der Zusatz von konzentrierter Harnstofflösung bewirkt Denaturierung, aber keine Fällung der Proteine, so dass während der anschliessenden Dialyse das nicht fixierte überschüssige Biotin entfernt wird. Dadurch wird vermieden, dass freies Biotin rein mechanisch in das ausgefallte Protein eingeschlossen wird. Nach der Dialyse, in deren letzter Stufe das Eiweiss schon teilweise ausfällt, wurden 2 ml Trichloressigsäure (20-proz.) oder – in einigen Versuchen – Perchlorsäure (5-proz.) zugesetzt, um sämtliches Eiweiss zu fällen. Anschliessend wurde zentrifugiert und mit 5 ml Trichloressigsäure (5-proz.) gewaschen, wieder zentrifugiert und zur Entfernung der Nucleinsäuren mit weiteren 5 ml Trichloressigsäure (5-proz.) im Wasserbad während 20 Minuten auf 90° erhitzt. Anschliessend wurde das Protein mit je 5 ml folgender Flüssigkeiten gewaschen: einmal mit Alkohol (94-proz.), 2mal mit einem Alkohol-Äther-Chloroform-Gemisch (2:2:1), und schliesslich 2mal mit Äther.

7. *Bestimmung der Radioaktivität*. Das Protein wird mit einem Glasstab zu möglichst feinem Pulver zerrieben, in Äther suspendiert und auf einem kleinen Rundfilter von 31 mm Durchmesser abgenutscht und gewogen. Die Aktivität der auf diese Art gewonnenen Plättchen wird in einem Endfenster-GM-Zähler gemessen. Die Zählwerte wurden mit Hilfe einer Gewichts-Aktivitäts-Standardkurve auf unendliche Schichtdicke umgerechnet; dies ergibt eine Grösse, welche der spezifischen Aktivität des Proteins proportional ist.

Einige Proben wurden im wesentlichen nach den Angaben von RUTSCHMANN & SCHÖNIGER<sup>15)</sup> verbrannt und das entstandene CO<sub>2</sub> im Proportionalzählrohr gemessen.

8. *Nachweis des gebundenen Biotins im Säurehydrolysat des Proteins*. Um nachzuweisen, dass es sich bei der fixierten Radioaktivität tatsächlich um Biotin und nicht um ein Abbauprodukt desselben handelt, haben wir das Eiweiss 60 Min. mit 3,6 N HCl bei 121° hydrolysiert und das Hydrolysat nach Abdampfen der HCl *in vacuo* auf eine Säule von Dowex 50 (Kationenaustauscher), die vorher mit 1 N HCl und 1 N NH<sub>3</sub> mehrmals gewaschen und zum Schluss mit HCl aktiviert worden war (H<sup>+</sup>-Form), aufgetragen. Das durch die Hydrolyse freigesetzte Biotin wurde mit Wasser, und anschliessend die Aminosäuren und Peptide mit Ammoniak ausgewaschen. Die Eluate wurden eingengt, in kleinen Mengen Wasser aufgelöst und auf Papier (WHATMAN Nr. 1) mit Butanol:Eisessig:H<sub>2</sub>O (20:3:7) chromatographiert. Die radioaktiven Substanzen wurden im Radioautogramm nachgewiesen.

9. *Enzymatische Hydrolyse der biotinhaltigen Proteine*. Dazu verwendeten wir Pepsin (MANN, Biochemical Research Laboratories), Trypsin («Trypur» Novo) oder Chymotrypsin (MANN, Biochemical Research Laboratories). Die durch enzymatische Hydrolyse erhaltenen Lösungen wurden zuerst mit den Mikroorganismen getestet, darauf einer Inkubation mit einer nach den Angaben von THOMA & PETERSON<sup>17)</sup> aus Kalbsleber gewonnenen Biotinidase unterworfen und zum zweiten Mal mit den Mikroorganismen getestet. Die Aktivität der Biotinidase war vorgängig an

<sup>15)</sup> J. RUTSCHMANN & W. SCHÖNIGER, *Helv.* 40, 428 (1957)

<sup>16)</sup> J. RUTSCHMANN, *Helv.* 40, 433 (1957).

einer ebenfalls nach den Angaben von THOMA & PETERSON<sup>17)</sup> aus Kalbsleber gewonnenen Präparation von «Soluble Bound Biotin» (SBB) festgestellt und bestätigt worden.

10. *Mikrobiologische Bestimmung des Biotins.* Zum Nachweis des Biotins verwendeten wir den mikrobiologischen Test mit *Saccharomyces cerevisiae* FB (Nr. 139 American Type Culture Collection), der sowohl auf freies als auch auf gebundenes Biotin anspricht, und mit *Lactobacillus arabinosus* (8014 American Type Culture Collection), der nur mit freiem Biotin wächst.

### Ergebnisse

1. *Einbau des Biotins in die Leberproteine.* Wenn der Gesamtextrakt aus der Leber von Mangel- und Normaltieren ohne weitere Zusätze mit markiertem Biotin zusammengebracht wird, so kann man feststellen, dass bei kleiner Konzentration des Biotins ( $2 \gamma$  pro Ansatz) bei einstündiger Inkubation nur im Mangeltierextrakt Radioaktivität eingebaut wird. Ohne Inkubation nehmen bei dieser Biotinkonzentration weder die Proteine des Mangeltieres noch diejenigen des Normaltieres nennenswerte Aktivität auf (Fig. 1). Bei steigender Biotinkonzentration dagegen nimmt der Einbau des Biotins bei den Mangeltieren wie bei den Normaltieren zu.

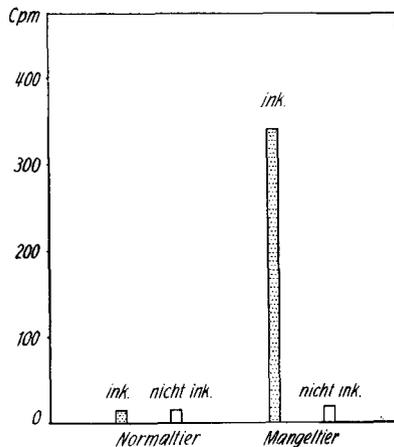


Fig. 1. Einbau von [<sup>14</sup>C]-Biotin in die Leberproteine des Hühnchens. 0,7 ml Gesamtextrakt, 2  $\gamma$  Biotin, Endvolumen 1,25 ml.

Dies gilt sowohl für die inkubierten als auch für die nicht inkubierten Ansätze. Dabei stellt man fest (Fig. 2), dass die Radioaktivität in den inkubierten Ansätzen bei den Mangeltieren stets um einen annähernd konstanten Betrag höher ist als in den nicht inkubierten Ansätzen. Bei den Normaltieren besteht dieser Unterschied zwischen inkubierten und nicht inkubierten Ansätzen nicht, oder er ist wesentlich kleiner. Bei dem in Fig. 2 dargestellten Versuch sind die Werte in den nicht inkubierten Ansätzen bei den Normaltieren teilweise etwas niedriger als in den inkubierten Ansätzen; in andern Versuchen sind sie den Werten der Normalextrakte nach Inkubation noch stärker angeglichen oder sie sind sogar etwas höher. Es zeigt sich also, dass es offenbar zwei Arten des Biotineinbaus gibt, einen «spontanen» Einbau, der schon eintritt, wenn das Biotin vor dem Harnstoffzusatz nur wenige Sekunden mit den Proteinen in Kontakt gebracht wird und der bei Normal- und bei

<sup>17)</sup> R. W. THOMA & W. H. PETERSON, J. biol. Chemistry 210, 569 (1956).

Mangeltieren annähernd gleich gross ist, und einen ATP-abhängigen Einbau, der während der Inkubation vor sich geht, nur bei den Mangeltieren zu beobachten ist und wahrscheinlich durch einen enzymatischen Vorgang zustande kommt.

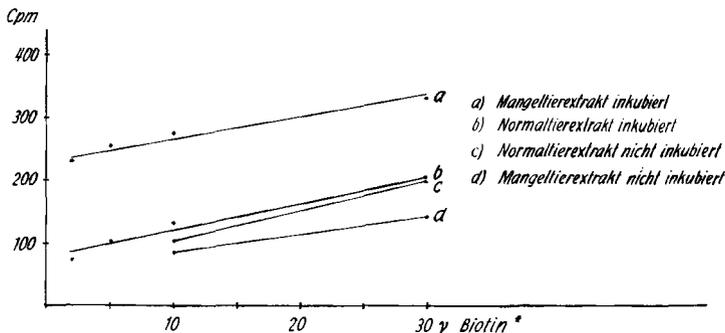


Fig. 2. Einbau von  $[^{14}\text{C}]$ -Biotin in die Leberproteine des Hühnchens in Abhängigkeit von der Biotinkonzentration.

0,7 ml Gesamtextrakt, Endvolumen 1,25 ml.

Die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit des enzymatischen Einbaus zeigt, dass bereits nach einer Inkubation von 20 Min. der Biotineinbau nahezu vollständig ist. Nach 60 Minuten – unserer üblichen Inkubationszeit – ist der enzymatische Einbau sicher vollständig (Fig. 3). Versuche mit fraktioniertem Extrakt haben diese Resultate bestätigt. Inkubation unter anaeroben Bedingungen ändert nichts an den Resultaten.

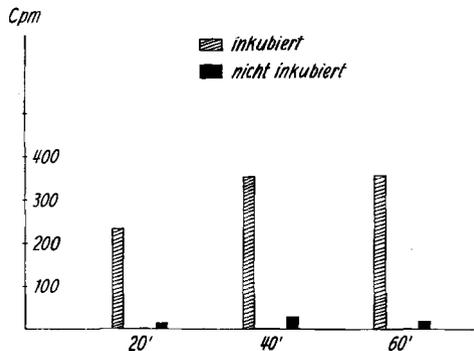


Fig. 3. Zeitlicher Verlauf des Biotineinbaus. Mangeltier.

0,7 ml Gesamtextrakt, 2  $\gamma$   $[^{14}\text{C}]$ -Biotin, Endvolumen 1,25 ml.

Säulen: Einbau nach 20, 40 und 60 min Inkubation.

Um den Vorgang der Biotinfixierung weiter zu analysieren, haben wir Versuche mit fraktionierten Extrakten durchgeführt.

Zunächst wurden die Proteine durch Fällung mit einer hohen Ammoniumsulfatkonzentration (70% oder 100% Sättigung) von den im Rohextrakt vorhandenen Substraten und Cofaktoren getrennt, bevor der Biotineinbau unter den oben beschriebenen Bedingungen untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass diese gereinigten Proteine aus der Leber von Mangeltieren bei Inkubation mit kleinen Biotinkonzen-

trationen ( $2 \gamma$  pro Ansatz) nur dann mehr Biotin fixieren als die Proteine von Normaltieren, wenn dem Ansatz ATP zugesetzt wird. Es muss sich also um eine ATP-abhängige Fermentreaktion handeln (Fig. 4). Die spontane Fixierung dagegen, die erst bei viel höheren Biotinkonzentrationen in Erscheinung tritt, wird weder beim Normaltier noch beim Mangeltier durch ATP beeinflusst.

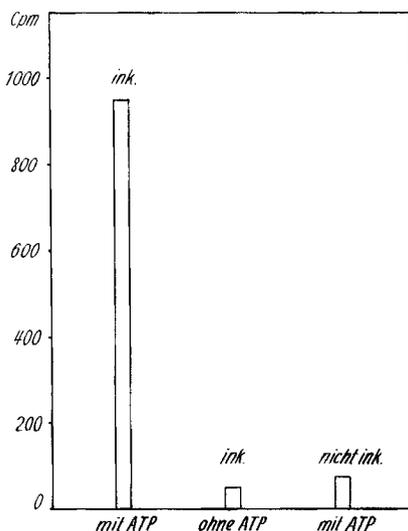


Fig. 4. Einfluss des ATP auf den Biotineinbau. Mangeltier; Proteine durch Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt und dadurch von den Cofaktoren befreit.  
0,7 ml Proteinlösung,  $2 \gamma$  Biotin,  $1 \mu\text{Mol}$  ATP, Endvolumen 1,25 ml.

Um die beiden Vorgänge womöglich voneinander zu trennen, haben wir den Gesamtextrakt in weitere Fraktionen aufgeteilt (0–25%, 25–50%, 50–70% Sättigung). Das Verhalten der beiden ersten Fraktionen ist in Fig. 5 dargestellt. Die Fraktion 25–50% zeigt keinen spontanen Einbau mehr; die dafür verantwortlichen Proteine sind offenbar in dieser Fraktion nicht vorhanden. Dagegen wird bei Inkubation mit ATP Biotin eingebaut. In der Fraktion 0–25% sind die beiden Arten des Einbaus sichtbar, die konzentrationsabhängige spontane Fixierung und der ATP-abhängige Einbau, der bei Biotinkonzentrationen, die grösser sind als etwa  $2 \gamma$  pro Ansatz, konstant bleibt.

Man kann aus diesen Versuchen schliessen, dass offenbar nicht alle Proteine zum «spontanen» Einbau von Biotin befähigt sind, sondern dass dafür eine bestimmte Proteinfraction verantwortlich ist, die zu einem wesentlichen Teil bei 25% Ammoniumsulfat-Sättigung ausfällt und keine Beziehung zum Biotinmangel zeigt. Es scheint sich um Proteine zu handeln, die in ihrer Fähigkeit Biotin festzuhalten, dem Avidin des Hühnereiklars gleichen. Wir fanden in einigen vorläufigen Versuchen eine ähnliche Spontanfixierung auch bei menschlichem Serumalbumin, bei Rinderserum und bei Insulin. Werden Hühnerleberextrakt, Humanalbumin oder Rinderserum vor dem Kontakt mit Biotin kurz erhitzt und denaturiert, so wird diese Spontanfixierung noch bedeutend verstärkt. Es wäre daher denkbar, dass die

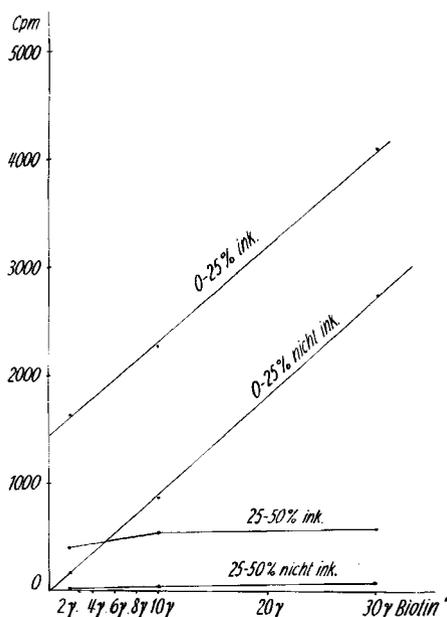


Fig. 5. Einbau von <sup>14</sup>C-Biotin in verschiedene Eiweissfraktionen. Mangeltier.

0–25%: Fraktion bis 25% Ammoniumsulfatsättigung; 25–50%: Fraktion zwischen 25% und 50% Sättigung; ink.: Ansatz eine Stunde mit <sup>14</sup>C-Biotin inkubiert; nicht ink.: Ansatz sofort nach Zusatz des Biotins durch Harnstoff denaturiert. Überall 1 μMol ATP, Endvolumen 1,25 ml. Abszisse: Biotinkonzentration in γ pro Ansatz. Ordinate: Impulse pro Minute, auf unendliche Schichtdicke umgerechnet.

Fixierung des Biotins erst nach der Denaturierung der Proteine stattfindet oder dass sie überhaupt mit dem Vorgang der Denaturierung verknüpft ist. Wir möchten auch, wenn wir hier von einem «Einbau» des Biotins in das Protein sprechen, nichts über die Art seiner Bindung an das Protein aussagen. Immerhin ist daran zu erinnern, dass die fixierte Aktivität sehr fest gebunden ist und auch durch heisse Trichloressigsäure nicht entfernt wird. Ein papierchromatographisch gereinigtes Präparat von <sup>14</sup>C-Biotin ergab die gleichen Resultate (siehe Tab. 1).

Tabelle 1. Fixierung von chromatographisch gereinigtem [<sup>14</sup>C]-Biotin

Biotin pro Ansatz (γ) . . . . .	2	10	30
Aktivität des Proteins (Imp./min)	132	316; 343	938; 1056

Chromatographische Reinigung des Biotins: 200 γ einer Stammlösung carboxylmarkierten Biotins (50 γ/0,1 ml) werden auf WHATMAN-Nr.1-Papier aufgetragen, während 12 Stunden in n-Butanol-Eisessig-Wasser (20:3:7) chromatographiert und anschliessend während 15 Stunden autoradiographiert. Der dem Biotin entsprechende Fleck (Rf=0,73) wird mit destilliertem Wasser eluiert und das Eluat von 78 ml im Vakuum zur Trockenheit eingedampft. Ausbeute ca. 50%.

Versuchsansätze: 0,6 ml Gesamtextrakt, enthaltend 2,10 und 30 γ gereinigtes Biotin, dest. Wasser bis 1,25 ml. Sofort nach Vermischen mit konz. Harnstofflösung denaturiert; weitere Aufarbeitung wie üblich.

Messung: Flowcounter mit dünnen Endfenster; Background 16 cpm.

Es ist daher nicht wahrscheinlich, dass bei der spontanen Fixierung eine dem Biotin beigemischte reaktionsfähige radioaktive Verunreinigung an das Eiweiss gebunden wird. Die Natur der «spontanen» Fixierung ist noch nicht geklärt und bedarf einer eingehenderen Untersuchung.

Wir haben uns vorläufig in erster Linie für den zweiten Mechanismus interessiert, der nur in Mangeltierextrakten vorkommt und nur bei ATP-Zugabe und bei Inkubation zu beobachten ist. Bei einer Zugabe von  $2 \gamma$  Biotin pro Ansatz scheint dieses System bereits mit Biotin gesättigt zu sein, denn durch Zugabe grösserer Biotinmengen kann hier keine Steigerung des Einbaus mehr erreicht werden. Bei diesem Vorgang handelt es sich offenbar um einen enzymatischen Einbau des Biotins in gewisse Proteine.

Bei Zusatz von  $2 \gamma$  Biotin pro Ansatz ist die Spontanfixierung nach dem erst-erwähnten Mechanismus relativ gering, so dass wir bei Verwendung dieser Konzentration vor allem den zweiten, enzymatischen Mechanismus vor uns haben. Erst mit steigender Biotinkonzentration nimmt die Spontanfixierung stark zu, und schon bei  $30 \gamma$  Biotin pro Ansatz ist die Spontanfixierung meistens um ein Mehrfaches grösser als die enzymatische Fixierung.

2. *Einfluss anderer Cofaktoren als ATP.* Bei Verwendung der durch 70% Ammoniumsulfatsättigung von den Cofaktoren abgetrennten Leberproteine sind neben dem ATP und dem ADP noch gewisse andere Nucleotide (ITP, CTP, GTP, UTP), Fructosediphosphat und Phosphoenolpyruvat wirksam. Die abgetrennte Fraktion 0–25% Sättigung baut dagegen Biotin auf enzymatischem Weg nur bei Gegenwart von ATP oder ADP in wesentlichem Umfang ein. Wir nehmen daher an, dass die übrigen Substanzen im Vollextrakt einfach durch Regeneration des ATP wirksam sind.

Wird der Extrakt von Mangeltieren während einer Stunde mit ATP, aber ohne Biotinzusatz inkubiert und das markierte Biotin erst nach dieser Präinkubation zugesetzt, so entspricht die Menge des fixierten Biotins genau derjenigen von Mangeltierextrakt ohne Inkubation und damit auch der von Normaltierextrakt bei Inkubation oder Nicht-Inkubation. Diese Werte sind – wie oben erwähnt – bei Zusatz von  $2 \gamma$  Biotin sehr klein. Wir können daraus schliessen, dass bei der von uns als enzymatisch bezeichneten Fixierung nicht etwa während der Inkubation mit ATP Strukturen vorgebildet werden, an die sich das Biotin nachher anlagern kann, ohne dass das ATP am Einbauprozess als Cofaktor direkt beteiligt wäre.

3. *Verteilung des Biotin einbauenden Enzyms in der Zelle.* Um die Verteilung des wirksamen Ferments in der Zelle zu studieren, haben wir das Homogenat der fraktionierten Zentrifugation unterworfen. Fig. 6 zeigt, dass in allen Fraktionen der Einbau nur bei Inkubation stattfindet. Beide Sedimente zeigen nur geringe Aktivität; dagegen ist das Überstehende auch nach der Sedimentation der Mikrosomen sehr aktiv. Man kann daraus schliessen, dass die für den Einbau des Biotins verantwortlichen Fermente ganz oder vorwiegend im Cytoplasma der Zelle gelöst sind.

4. *Identifizierung des eingebauten Biotins.* Um festzustellen, ob bei unseren Versuchen tatsächlich Biotin als solches und nicht ein das Leitisotop enthaltendes Derivat am Eiweiss fixiert wird, haben wir das Eiweiss nach Inkubation mit dem Radiobiotin durch saure oder enzymatische Hydrolyse abgebaut und im Hydrolysat

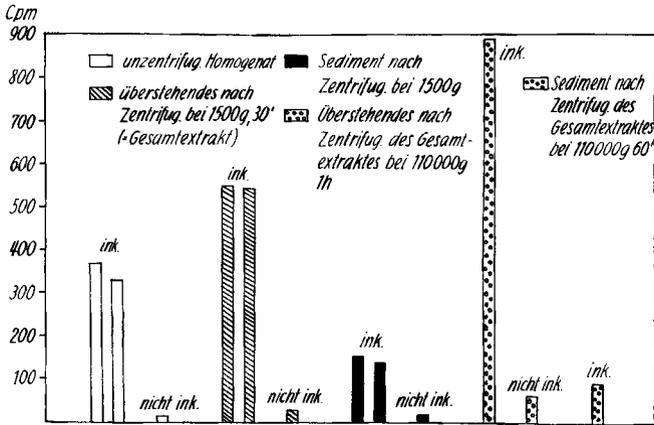


Fig. 6. Einbau von  $[^{14}\text{C}]$ -Biotin in verschiedene Zellfraktionen. Mangeltier. Je 0,7 ml der Fraktionen, Endvolumen 1,25 ml. Zusätze: 1  $\mu\text{Mol}$  ATP, 7,2  $\mu\text{Mol}$  Fructosediphosphat, 1  $\mu\text{Mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 2  $\gamma$  Biotin.

das Biotin durch Papierchromatographie und auf mikrobiologischem Weg zu identifizieren versucht.

Wir verwendeten hierzu Eiweiss der Fraktion 25–50% Ammoniumsulfatsättigung, das mit ATP und 2  $\gamma$  Biotin inkubiert und in der üblichen Weise aufgearbeitet worden war. Um die Aminosäuren und Peptide zu entfernen, wurde das Hydrolysat nach Verdampfen der Salzsäure auf eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50,  $\text{H}^+$ -Form) aufgetragen, welche die Aminosäuren zurückhält. Das Biotin wurde mit Wasser aus der Säule ausgewaschen. Die Aminosäuren und Peptide wurden mit Ammoniak nachträglich ebenfalls eluiert und untersucht. Die mit Wasser von der Dowexsäule eluierte Radioaktivität konnte auf dem Papierchromatogramm radioautographisch eindeutig dem freien Biotin zugeschrieben werden. (Daneben findet sich immer der Fleck des Sulfoxids). Die Aminosäurefraktion zeigte ebenfalls einen radioaktiven Fleck, wahrscheinlich ein biotinhaltiges Peptid. Dass im ammoniakalischen Eluat auch noch eine gewisse, allerdings geringe Radioaktivität gefunden wird, erstaunt deshalb nicht, weil nicht anzunehmen ist, dass die Hydrolyse unter den von uns gewählten Bedingungen vollständig war.

Das durch die saure Hydrolyse freigesetzte Biotin konnte nicht nur durch Papierchromatographie und anschliessende Radioautographie, sondern auch durch mikrobiologische Bestimmung identifiziert werden. Dabei zeigte die von der Dowexsäule mit Wasser eluierte Lösung – wie Tabelle 2 zeigt – wachstumsfördernde Wirkung sowohl auf *Saccharomyces cerevisiae* als auch auf *Lactobacillus arabinosus*.

Da *Saccharomyces cerevisiae* für sein Wachstum nicht nur freies Biotin, sondern auch an Aminosäuren und lösliche Polypeptide gebundenes Biotin verwerten kann, *Lactobacillus arabinosus* dagegen nur freies Biotin, darf aus der wachstumsfördernden Wirkung des Eluates geschlossen werden, dass ein grosser Teil des Biotins durch die saure Hydrolyse als freies Biotin zurückgewonnen wird.

Anstelle der sauren Hydrolyse haben wir das inkubierte und aufgearbeitete Eiweiss der Ammoniumsulfatfraktion 25–50% Sättigung auch enzymatischer Hydrolyse

mit Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin unterworfen und anschliessend mit *Saccharomyces cerevisiae* und *Lactobacillus arabinosus* getestet. Während die saure Hydrolyse, wie schon erwähnt, freies Biotin liefert, liegt nach der enzymatischen Hydrolyse das Biotin hauptsächlich in Form des «soluble bound biotin» (SBB) vor, wie es von THOMA & PETERSON<sup>17)</sup> beschrieben wurde, d. h. in Form biotinhaltiger Peptide. *Lactobacillus arabinosus* zeigt daher nach Zusatz der durch enzymatische Hydrolyse erhaltenen Lösung kein Wachstum. Wir haben deshalb das durch enzymatische Verdauung gewonnene «soluble bound biotin» anschliessend einer mehrstündigen Einwirkung von Biotinidase unterworfen und dadurch tatsächlich – wie in Tab. 2 dargestellt – auch freies Biotin erhalten, das für *Lactobacillus arabinosus* verwertbar war. Die Mengen freien Biotins, die man nach Pepsinverdauung und 16-stündiger Biotinidaseeinwirkung mit *Lactobacillus arabinosus* nachweisen konnte, entsprachen grössenordnungsmässig denjenigen, die im «soluble bound biotin» nach Pepsinverdauung allein, ohne anschliessende Biotinidaseeinwirkung mit *Saccharomyces cerevisiae* gemessen wurden. Biotinidase ist demnach imstande, den grössten Teil des im «soluble bound biotin» enthaltenen Biotins freizusetzen. In Tab. 2 sind auch diese Resultate dargestellt.

Tabelle 2. *Biotinnachweis im Proteinhydrolysat nach Inkubation mit [<sup>14</sup>C]-Biotin.*  
Die angegebenen Biotin-Werte beziehen sich auf 5 mg Protein der zwischen 25 und 50% Ammoniumsulfatsättigung ausfallenden Fraktion. Werte in my.

Organismus	Hydrolyse durch		
	HCl	Pepsin ohne mit Biotinidase	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . .	23,0	8,4	11,7
<i>Lactobacillus arabinosus</i> . . . .	19,7	0	

Die Verdauung mit Trypsin oder Chymotrypsin ergab ähnliche Resultate. Die Verhältnisse werden bei Trypsin und Chymotrypsin noch dadurch kompliziert, dass diese beiden Verdauungsfermente nicht alles Eiweiss aufzulösen vermögen. Um festzustellen, ob der Biotingehalt in dem durch die Wirkung der beiden Verdauungsfermente erhaltenen «soluble bound biotin» gleich war wie im nicht aufgelösten Anteil, wurde das nicht gelöste Material zusätzlich mit Säure hydrolysiert und das freie Biotin mit *Lactobacillus arabinosus* oder *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nach Trypsinverdauung der Biotingehalt des gelösten und ungelösten Materials einander entsprechen; nach Chymotrypsinverdauung dagegen ist der Biotingehalt im gelösten Material wesentlich grösser.

Im Zusammenhang mit der Frage nach der Natur des im Eiweiss fixierten radioaktiven Materials haben wir auch den eventuellen Einbau in das Eiweiss von [<sup>14</sup>C]-Hydrogencarbonat und [<sup>14</sup>C]-Acetat untersucht, denn es wäre denkbar, dass diese Verbindungen aus dem Carboxyl-markierten Biotin entstehen könnten. Unter den zur Untersuchung des Biotineinbaus verwendeten Versuchsbedingungen konnte aber weder ein Einbau von Hydrogencarbonat noch von Acetat festgestellt werden.

5. *Kein Austausch des gebundenen und freien Biotins.* Wie wir oben erwähnt haben, lässt sich der enzymatische Einbau des Biotins nur in Extrakten beobachten,

die von Mangelhühnchen stammen. Die Proteine, an welche das Biotin gebunden werden kann, scheinen demnach beim Normaltier mit Biotin gesättigt zu sein und ausserdem scheint die Bildung der Biotinproteide ein irreversibler Vorgang zu sein, denn sonst müsste eine Aufnahme von Radiobiotin durch Austausch möglich sein. Auch *in vitro* kann das enzymatisch fixierte Biotin nicht ausgetauscht werden.

Schütteln einiger mg aufgearbeiteten Eiweisses in 2 ml unmarkierter Biotinlösung (100  $\gamma$ /ml) während 60 Minuten vermag kein enzymatisch fixiertes Biotin vom Eiweiss abzutrennen; die Zählungen der Radioaktivität vor und nach dieser Behandlung stimmen genau überein. Auch das spontan fixierte Biotin wird durch diese Behandlung nicht ausgetauscht und vom Eiweiss nicht abgetrennt.

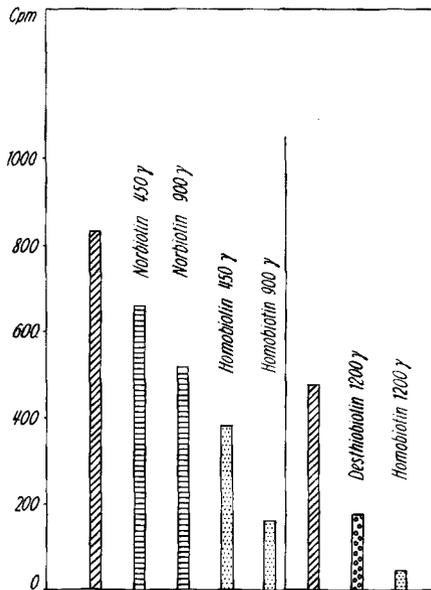


Fig. 7. Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf den Biotineinbau. Mangeltier. Gesamtextrakt 0,7 ml, Biotin 2  $\gamma$ , Endvolumen 1,25 ml, 1 Std. bei 38° inkubiert.

6. Hemmung des Biotineinbaus durch Biotinanaloga und durch Komplexon. Der enzymatische Einbau des Biotins in die Proteine des Leberextrakts lässt sich durch gewisse biotinähnliche Verbindungen in hoher Konzentration hemmen. In Fig. 7 sind zwei solcher Hemmversuche dargestellt. Da diese Versuche nicht mit Aceton-trockenpulver, sondern mit frischem Gesamtextrakt ausgeführt wurden, ist der Einbau des Biotins ohne Hemmstoffzusatz entsprechend der verschiedenen Ausprägung des Biotinmangels bei den verwendeten Tieren etwas verschieden. Von den drei geprüften Biotinanaloga ist das Homobiotin der stärkste Hemmstoff. Er bewirkt schon bei Zusatz von 450  $\gamma$  eine Reduktion des Einbaus auf die Hälfte und bei 1200  $\gamma$  auf 10%. Nor- und Dethio-biotin verhalten sich ungefähr gleich, hemmen aber weniger als Homobiotin. Diphenylhydantoin ergibt auch bei Zusatz von 1000  $\gamma$  gar keine Hemmung des Einbaus.



Beim ATP-abhängigen, enzymatischen Einbau des Biotins kann man annehmen, dass es sich um die Bildung einer Ester- oder Amidbindung der Carboxylgruppe handelt. Da das Biocytin die Struktur eines Biotinyllysins besitzt, ist die letzte Annahme wahrscheinlicher. Wie oben erwähnt, lässt sich das Biotin aus dieser Verbindung durch Säurehydrolyse wieder abspalten. Es wäre denkbar, dass die Aktivität des Proteins ganz oder teilweise von einem Abbauprodukt des Biotins herrührt, welches z. B. in Form einer Aminosäure eingebaut werden könnte. Dies scheint aber nicht der Fall zu sein. Als Abbauprodukte von Carboxyl-markiertem Biotin kommen vor allem  $\text{CO}_2$  und Acetat in Frage. Nach Zusatz von [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat oder [ $^{14}\text{C}$ ]-Hydrogencarbonat wurde aber in unsern Ansätzen keine Aktivität in die Proteine eingebaut. Für die Spezifität des enzymatischen Biotineinbaus spricht auch die Tatsache, dass es sich durch Biotinanaloge hemmen lässt (Fig. 7).

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass sich der enzymatische Einbau nur bei Mangeltieren beobachten lässt. Offenbar werden bei Biotinmangel die Proteine, an welche das Biotin als prosthetische Gruppe gebunden wird, noch gebildet, wenn vielleicht auch, wegen der allgemeinen Verlangsamung der Proteinsynthese, in geringerer Menge als beim Normaltier. Wegen des Biotinmangels können sie aber nicht in die Biotinverbindungen übergeführt werden. MISTRY<sup>19)</sup> hat gezeigt, dass bei Biotinmangel in der Hühnerleber das freie Biotin vollständig verschwindet. Die Bildung der Biotinproteide ist aber möglich, wenn der Extrakt mit überschüssigem Biotin *in vitro* inkubiert wird. Beim Normaltier sind offenbar alle Proteine mit Biotin gesättigt, und es findet unter den Bedingungen unserer Versuche auch kein Austausch zwischen freiem und gebundenem Biotin statt; daher kann man beim Normaltier auch keinen enzymatischen Biotineinbau nachweisen.

Es ist wenig wahrscheinlich, dass der Biotineinbau unmittelbar mit der Proteinsynthese verknüpft ist. Wir haben gezeigt, dass auch das Überstehende der Extrakte nach Zentrifugation bei 100000 g noch zum Einbau befähigt ist (Fig. 6); im Gegensatz zur Eiweissynthese hängt der Vorgang also nicht von den Mikrosomen ab. Ausserdem wird er durch Chloramphenicol nicht gehemmt.

Wir haben im experimentellen Teil erwähnt, dass in der durch Fällung der Gesamtproteine mit Ammoniumsulfat gewonnenen Fraktion neben dem ATP noch eine Reihe anderer Phosphorsäureverbindungen als Cofaktoren wirksam sind. Dazu gehören einmal die Triphosphate des Inosins, des Cytidins, des Guanosins und des Uridins. Wir können nicht angeben, worauf die Wirksamkeit dieser andern Triphosphate beruht. Sie können zwar kleine Mengen von ATP als Verunreinigung enthalten. Da aber bereits die Verminderung des ATP-Zusatzes von 1  $\mu\text{Mol}$  auf 0,1  $\mu\text{Mol}$  pro Ansatz zu einer Verminderung des Einbaus führt, ist es nicht wahrscheinlich, dass die Wirkung der übrigen Nucleotide auf einer Verunreinigung durch ATP beruht. Noch schwieriger zu erklären ist die Wirkung des Fructosediphosphats, welches im ungereinigten Extrakt und in gewissen Fraktionen ebenso wirksam ist wie ATP. Da das Hexosediphosphat aber in der durch 25% Ammoniumsulfat-sättigung fällbaren Fraktion nur wenig wirksam ist, nehmen wir an, dass es im Rohextrakt und den übrigen Fraktionen in irgendeiner Weise der Regeneration des ATP dient, das in diesen Fraktionen enthalten ist. Ähnliches kann auch für die

<sup>19)</sup> S. P. MISTRY, persönl. Mitteilung.

oben genannten Triphosphate gelten. Phosphoenolpyruvat ist unter den gleichen Bedingungen nur wenig wirksam.

Es entsteht nun noch die Frage, welches die Natur der enzymatisch gebildeten Biotinproteine ist. Zum Teil handelt es sich zweifellos um Biotinenzyme. In Versuchen, die wir in einer folgenden Arbeit beschreiben werden, haben wir gefunden, dass die Acetyl-CoA-carboxylase in Extrakten aus der Leber von Mangelhühnchen sich durch Inkubation mit Biotin reaktivieren lässt. Ähnliche Resultate haben in jüngster Zeit NEUJAHN & MISTRY<sup>20)</sup>, KOSOW & LANE<sup>21)</sup>, sowie COON u. Mitarb.<sup>22)</sup> bei der Propionyl-CoA-carboxylase aus der Säugetierleber erhalten. Diese Autoren haben auch Anhaltspunkte dafür gefunden, dass in den Biotinenzymen das Biotin wie im Biocytin an Lysin gebunden ist.

Wir möchten Herrn Prof. O. WISS von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, für die Überlassung des Radiobiotins unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

#### SUMMARY

The fixation of carboxyl-labelled biotin by chicken liver homogenate has been studied. Two independent mechanisms could be shown to exist: the first, a spontaneous and concentration dependent one, could be compared with the fixation of biotin to avidin. It is operative in extracts from both normal and biotin-deficient animals. The second one, enzymic, requiring incubation in the presence of ATP, is inhibited by biotin analogues and can only be detected in extracts from biotin-deficient animals. Part of the biotin-proteins formed are enzymes. The proteins responsible for the spontaneous and for the enzymic fixation of biotin could partly be separated by ammonium sulfate fractionation.

Biochemisches Institut der Universität Zürich

---

<sup>20)</sup> H. V. NEUJAHN & S. P. MISTRY, *Federation Proc.* 21, 239 (1962).

<sup>21)</sup> D. P. KOSOW & M. D. LANE, *Biochem. Research Comm.* 5, 191 (1961); *Federation Proc.* 21, 286 (1962).

<sup>22)</sup> J. L. FOOTE, J. E. CHRISTNER & M. J. COON, *Federation Proc.* 21, 239 (1962).

---