

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CXCI<sup>e</sup> comm., *Helv.* 47, 111 (1964).  
 [2] R. G. JOHNSTON & J. READ, *J. chem. Soc.* 1934, 226, 233; 1935, 1138; voy. ég. N. L. McNIVEN & J. READ, *ibid.* 1952, 159.  
 [3] A. R. BOSE, *Experientia* 8, 458 (1952).  
 [4] P. R. JEFFRIES & B. MILLIGAN, *J. chem. Soc.* 1956, 4384.  
 [5] S. SCHROETER, Inaug. Diss. Göttingue, 1962, 26.  
 [6] E. KLEIN & G. OHLOFF, *Tetrahedron* 19, 1097 (1963).  
 [7] Y. R. NAVES & A. V. GRAMPOLOFF, *Bull. Soc. chim. France* 1960, 39.  
 [8] A. R. COLE, P. R. JEFFRIES & T. G. A. MULLER, *J. chem. Soc.* 1959, 1223.  
 [9] W. HÜCKEL & Y. RIAD, *Liebigs Ann. Chem.* 637, 33 (*cf.* Y. R. NAVES & J. LECOMTE, *Bull. Soc. chim. France* 1955, 792).  
 [10] W. HÜCKEL & J. KURZ, *Liebigs Ann. Chem.* 645, 200 (1961).  
 [11] R. W. LEMIEUX, R. K. KULLNIG, H. J. BERNSTEIN & W. G. SCHNEIDER, <sup>a)</sup> *J. Amer. chem. Soc.* 79, 1005 (1957), <sup>b)</sup> 82, 6098 (1958).  
 [12] R. W. LEMIEUX, R. K. KULLNIG & R. Y. MOIR, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 2257 (1958).  
 [13] J. A. POPLE, W. G. SCHNEIDER & A. J. BERNSTEIN, *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw Hill Book Co. Inc., New York 1959, p. 400, 407, 410.  
 [14] L. M. JACKMANN, *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, Pergamon Press, New York 1959, p. 117.  
 [15] H. S. GUTOWSKI & A. SAJKA, *J. chem. Physics* 27, 1688 (1953).  
 [16] *Voy.* [13], p. 418.  
 [17] M. SWALEH, B. BRUSHAN & G. S. SIDHU, *Perfumery essential Oil Record* 54, 295 (1963).  
 [18] *Cf.* D. H. R. BARTON, *J. chem. Soc.* 1953, 1027.  
 [19] H. KUCZYŃSKI & A. ZABŻA, *Roczn. Chem.* 37, 782 (1963).

### 39. Über die Aktivierung des Biotins

von M. Vallotton und F. Leuthardt

(26. XII: 63)

Damit das Biotin in die Acetyl-CoA-Carboxylase (und andere Apofermente) eingebaut werden kann, muss es in Biotinadenylat übergeführt werden, welches die «aktivierte» Form des Biotins darstellt. Dies geht aus Untersuchungen von LYNEN & ROMINGER [1]<sup>1)</sup> sowie von COON & Mitarb. [2] hervor, welche gezeigt haben, dass das Apoferment der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe mit synthetischem Biotinyladenylat aktiviert werden kann. GILGEN & LEUTHARDT [3] haben in einer früheren Arbeit gezeigt, dass [<sup>14</sup>C]-Biotin bei Inkubation mit Proteinfractionen aus Hühnerleber durch eine Adenosintriphosphat(ATP)-abhängige Reaktion an ein Protein fixiert wird. Wir haben nun zeigen können, dass eine Proteinfraction aus der Leber von normalen wie von Biotinmangelhühnchen ein Ferment enthält, das imstande ist, Biotin in Anwesenheit von ATP und Mg<sup>++</sup> in aktiviertes Biotin überzuführen (Reaktion 1). Wir verwendeten dazu eine Modifikation einer Methode, die von LOFTFIELD & EIGNER [4] für die Bestimmung der Aminosäureaktivierung beschrieben worden ist. Während wir in früheren Versuchen die Aktivität der Proteinfractionen, welche die Biotinyladenylatsynthetase enthalten, auf Grund des Einbaus des [<sup>14</sup>C]-Biotins in das Apoferment

<sup>1)</sup> Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 313.

der Acetyl-CoA-Carboxylase oder des Einbaus des [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetats in die höheren Fettsäuren bestimmten [5], lässt sich mit der neuen Methode das aktivierte Biotin durch Hydroxylamin abfangen und als Hydroxamat direkt bestimmen. Das unveränderte [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotin und das [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotinylhydroxamat lassen sich auf Anionenaustauscherpapier sauber trennen und die Aktivität kann im Szintillationszähler direkt gemessen werden. Die Summe von Biotin und Biotinylhydroxamat bleibt konstant (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Abnahme des freien [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotins zugunsten des [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotinylhydroxamats im Verlaufe der Inkubation. Aktivität in cpm/20  $\mu\text{l}$  Ansatz*

Inkubationszeit, Min.	0	5	10	20	30	40	50	60	120	240
Freies Biotin	8713	8374	7783	7018	6454	5951	5520	5372	4679	4799
Biotin-Hydroxamat	220	751	1223	2019	2612	3312	3510	3849	4795	4935
Summe	8923	9125	9006	9037	9066	9263	9030	9221	9474	9734

Inkubationsansatz: [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotin 8,18  $\text{m}\mu\text{Mol}$  = 0,2  $\mu\text{C}$ ,  $\text{MgCl}_2$  2,5  $\mu\text{Mol}$ , ATP 2,5  $\mu\text{Mol}$ , Hydroxylamin-HCl 1,2  $\text{mMol}$ , Enzymlösung, K-Phosphat 0,005  $\text{M}$  ad 320  $\mu\text{l}$ .

Es hat sich gezeigt, dass die Aktivierung des Biotins absolut ATP- und  $\text{Mg}^{++}$ -abhängig ist (Tabelle 2). Zusatz von Glutathion fördert die Reaktion und verlängert die Aktivität des Enzyms.

Tabelle 2. *Abhängigkeit der [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotinylhydroxamat-Bildung von ATP,  $\text{Mg}^{++}$  und Glutathion*

Ansatz*)	ATP + $\text{Mg}^{2+}$	ATP + $\text{Mg}^{2+}$ + Glutathion	ATP (ohne $\text{Mg}^{2+}$ ) + EDTA	$\text{Mg}^{2+}$ (ohne ATP)
cpm**) pro 20 $\mu\text{l}$ Ansatz	3600	4430	0	0

\*) Inkubationsansatz: ATP 2,5  $\mu\text{Mol}$ ,  $\text{MgCl}_2$  2,5  $\mu\text{Mol}$ , Glutathion 2,5  $\mu\text{Mol}$ , EDTA 0,2  $\mu\text{Mol}$ . Überall: Enzymlösung, Hydroxylamin-HCl 1,5  $\text{mMol}$ , [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotin 4  $\gamma$  = 0,4  $\mu\text{C}$ , K-Phosphat-Puffer 0,005  $\text{M}$  ad 250  $\mu\text{l}$ . Inkubation bei 37°.

\*\*) Radioaktivität im aliquoten Teil von 20  $\mu\text{l}$ .

Auf Grund der oben erwähnten Versuche von LYNEN & ROMINGER [1], der Versuche von Kosow & Mitarb. [6], sowie von eigenen nicht publizierten Versuchen mit synthetischem Biotinyl-CoA ist eine Beteiligung des CoA an der Aktivierung unwahrscheinlich. Merkwürdigerweise lässt sich aber in unseren Versuchen das ATP teilweise durch CoA ersetzen (Tabelle 3).

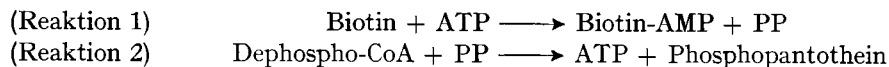
Tabelle 3. *Aktivierung des Biotins durch CoA*

Ansatz	CoA	CoA + PP	ATP
cpm pro 20 $\mu\text{l}$ Ansatz	3391	3950	4720

CoA 2,5  $\mu\text{Mol}$ , Pyrophosphat 2,5  $\mu\text{Mol}$ . Weiterhin s. Legende zu Tabelle 2.

Vermutlich liegt die Erklärung darin, dass in Umkehrung der CoA-Synthese Dephospho-CoA gebildet wird, welches durch Pyrophosphorolyse ATP liefern kann.

Das Pyrophosphat (PP) wirkt in Bezug auf die Gesamtreaktion (Reaktion 1 + Reaktion 2) katalytisch:



Tatsächlich lässt sich – wie Tabelle 3 zeigt – die Reaktion durch Zugabe von Pyrophosphat noch etwas beschleunigen.

Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von Biotin (LINEWEAVER-BURK-plot) ergaben mit gereinigten Fraktionen eine MICHAELIS-Konstante des Enzyms von ungefähr 1 bis  $2 \times 10^{-10}$ . Über unsere Versuche zur Reinigung des Enzyms werden wir später berichten.

*Methodischer Teil:* Wir verwendeten als Enzymlösung meistens eine Eiweissfraktion, welche bei 40% Amoniumsulfatsättigung ausfiel und weiter durch Adsorption an Phosphatgel [7] gereinigt wurde [5]. Die zur Untersuchung stehende Proteinfraction wird mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Biotin, ATP und  $\text{Mg}^{++}$  in Anwesenheit von Hydroxylamin (durch Ausfrieren nach LECHER & HOFMANN [8] gereinigt) im Überschuss inkubiert, welchem soviel Hydroxylamin-HCl zugesetzt worden ist, dass die Lösung ein pH von 7,0 aufweist [7]. Vor Beginn der Inkubation und dann zu verschiedenen Zeiten wird ein aliquoter Teil von 20  $\mu\text{l}$  dem Ansatz entnommen und auf die Startlinie eines Streifen Anionenaustauschpapier «Amberlite SB-2» (ROHM & HAAS Co.) aufgetragen. Durch Wasserdampfstrahl (während 20–30 Sek.) werden die Proteine denaturiert. Die Chromatogramme werden aufsteigend mit Wasser-*n*-Propanol (4:1 *v/v*) entwickelt. Unter den vorgegebenen Bedingungen bleibt das Biotin-Anion auf der Startlinie sitzen; das aus dem Biotinyladenylat entstandene, nicht ionisierte und so vom Lösungsmittel mitgeführte Biotinylhydroxamat weist einen Rf-Wert von 0,7 auf. Nach Trocknen bei 60° lokalisiert man die Radioaktivität mittels des Radiochromatographen (GEIGER-MÜLLER-Durchflusszählrohr) oder durch Autoradiogramm. Man schneidet die radioaktive Zone aus dem Papierstreifen aus und taucht sie senkrecht in das Toluol-Szintillator-Gemisch ein. Zählung der Radioaktivität im PACKARD «TRI-Carb» (Zählausbeute 43%).

Für die Überlassung des Radiobiotins sind wir Herrn Prof. O. WISS von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Basel zu Dank verpflichtet.

Wir möchten Frau U. HESS-SANDER für ihre wertvolle Mitarbeit herzlich danken.

Die Untersuchungen wurden zum Teil mit Mitteln des SCHWEIZ. NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG durchgeführt.

#### SUMMARY

Biotin hydroxamate is formed when [ $^{14}\text{C}$ ]-biotin is incubated with a partially purified extract of chicken liver in the presence of ATP,  $\text{Mg}^{++}$  and an excess of hydroxylamine. Free biotin and the hydroxamate have been separated by chromatography on anion-exchange paper. Hence we conclude that biotin was activated to form biotin-adenylate.

Biochemisches Institut  
der Universität Zürich

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. LYNEN & K. L. ROMINGER, *Federation Proc.* 22, 537 (1963).
- [2] M. J. COON, persönliche Mitteilung.
- [3] A. GILGEN & F. LEUTHARDT, *Helv.* 45, 1833 (1962).
- [4] R. B. LOFTFIELD & E. A. EIGNER, *Biochim. biophys. Acta* 72, 372 (1963).
- [5] F. v. SCHULTHESS & F. LEUTHARDT, *Helv.* 46, 1244 (1963).
- [6] D. P. KOSOW, S. C. HUANG & M. D. LANE, *J. biol. Chemistry* 237, 3633 (1962).
- [7] D. KEILIN & E. F. HARTER, *Proc. chem. Soc. London* 124 B, 397 (1938).
- [8] H. LECHER & S. HOFMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 55, 912 (1922).