

RÉSUMÉ

L'ozonation de l'oléate d'éthyle donne lieu à la formation de l'aldéhyde pèlargonique. Mais les manifestations spectrographiques de la production d'aldéhyde sont moins marquées que dans l'ozonation d'oléfines à Δ conjugué avec un groupe carbonyle.

Si au cours de l'ozonation de l'oléate d'éthyle il n'y a pas de dédoublement de la bande carbonyle, il y a cependant une augmentation de son intensité avec un degré d'ozonation croissant qui s'explique d'une part par la fixation de trois atomes d'oxygène sur la liaison éthylénique, d'autre part par la superposition des bandes carbonyle de l'ester ozoné et de l'aldéhyde pèlargonique formé.

Laboratoire de Chimie Physique, Université de Genève

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. BRINER & E. DALLWIGK, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. *244*, 1695 (1957).
- [2] E. BRINER, S. FLISZÁR & G. P. ROSSETTI, Helv. *47*, 2041 (1964).
- [3] E. DALLWIGK & E. BRINER, Helv. *41*, 1030 (1958); S. M. GOODWIN, N. M. JOHNSON & B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. *75*, 4273 (1953).
- [4] H. STAUDINGER, Ber. deutsch. chem. Ges. *58*, 1088 (1925).
- [5] E. BRINER & S. FLISZÁR, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. *255*, 1829 (1962).
- [6] E. BRINER, Bull. Soc. chim. France *1948*, 1; Advances in Chemistry Series (Amer. chem. Soc.) *1959*, 184.

262. Über die Aktivierung des Biotins und die Bildung der Acetyl-CoA-Holocarboxylase in der Leber des Hühnchens

von M. Vallotton, G. A. Borel, R. Schurter und F. Leuthardt

(14. X. 64)

Wir haben in einer früheren Arbeit gezeigt, dass Biotin an die Proteine eines Extrakts aus Hühnerleber gebunden wird. Es liessen sich dabei *zwei* Arten der Bindung feststellen: eine spontane Fixierung, auf die wir hier nicht eintreten werden, und eine Adenosintriphosphat(ATP)-abhängige, enzymatische Bindung. Die letztgenannte Reaktion liess sich nur in der Leber von biotinfrei ernährten Hühnchen feststellen. Wir schlossen daraus, dass es sich um die Bindung des Biotins an das Protein von Biotinenzymen handelt (GILGEN & LEUTHARDT [1]¹⁾). Wir konnten anschliessend zeigen, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen Biotin an das Apoferment der Acetyl-CoA-carboxylase gebunden wird (v. SCHULTHESS & LEUTHARDT [2], VALLOTTON & LEUTHARDT [3] [4]. Ähnliche Befunde sind von andern Arbeitsgruppen erhoben worden (KOSOW & LANE [5], FOOTE und Mitarb. [6]).

Der Wirkungsmechanismus des Biotinenzymis ist hauptsächlich durch die Arbeiten von LYNEN [7] weitgehend aufgeklärt worden. Das Biotin ist, wie verschiedene Arbeiten gezeigt haben, an einen Lysinrest des Apoferments gebunden. LYNEN & ROMINGER [8] haben gezeigt, dass bei der Synthese der Acetyl-CoA-carboxylase der

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2402.

Hefe aus dem Apoferment das ATP durch Biotinyladenylat ersetzt werden kann. SIEGEL und Mitarb. [9] gelangten bei der Propionyl-CoA-carboxylase der Hefe zum gleichen Resultat. Wir haben in einer vorläufigen Mitteilung über die Reinigung einer Leberfraktion des Hühnchens berichtet, durch welche bei Gegenwart von ATP aktiviertes Biotin gebildet wird (VALLOTTON & LEUTHARDT [3] [4]). In der vorliegenden Arbeit soll über diese Versuche ausführlich berichtet werden. Das aktivierte Biotin wurde durch die Modifikation einer von LOTFIELD & EIGNER [10] zum Nachweis aktivierter Aminosäuren vorgeschlagenen Methode bestimmt: Der Enzymsatz, der [¹⁴C]-Biotin enthält, wird mit Hydroxylamin inkubiert. Ein aliquoter Teil des Ansatzes wird auf Ionenaustauscherpapier aufgetragen; das Chromatogramm wird mit Propanol-Wasser entwickelt. Das Biotin bleibt auf der Startlinie, während das Biotinhydroxamat mitgeführt wird. Das letztere wird mittels eines Radiochromatogramm-Scanner lokalisiert, der Fleck ausgeschnitten und seine Aktivität direkt auf dem Papier im Scintillationszähler gemessen.

Material und Methodik

1. *Biotin-[¹⁴C]*. Das von uns verwendete carboxylmarkierte Biotin hatte eine spezifische Aktivität von 94 $\mu\text{C}/\text{mg}$ und wurde in einer Konzentration von 200 $\mu\text{l}/\text{ml}$ verwendet²⁾.

2. *Biotin-[¹⁴C]-Adenylat*. Das markierte Biotinadenylat wurde aus 2-[¹⁴C]-Biotin (NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION) und AMP (Adenosinmonophosphat) in Gegenwart von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid nach der für die Synthese von Aminoacyl-adenylaten gebräuchlichsten Methode dargestellt (BERG [11]). Das Produkt wurde auf einer Dowex-Säule (1,5 \times 10 cm) mit Säure-Gradient (Wasser/2 N Essigsäure) gereinigt. Die spezifische Aktivität betrug 14,6 $\mu\text{C}/\text{mg}$. Die Ausbeute erreichte 94%.

3. *Hydroxylamin*. Das Hydroxylamin wurde nach LECHER & HOFMANN [12] aus dem Hydrochlorid hergestellt und bei -20° über Calciumchlorid aufbewahrt. Für die Versuche wurde ein Gemisch mit Hydroxylamin-HCl verwendet (Verhältnis 80 mg $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/1$ g NH_2OH), das mit wenig Wasser in Lösung gebracht wurde. Bei 5facher Verdünnung im Inkubationsansatz betrug das pH 7,4. Diese Lösung wurde für jede Serie von Inkubation frisch vorbereitet.

4. *Ammoniumsulfat*. Nach Umkristallisation in Gegenwart von Komplexon III (MERCK) wurde das Ammoniumsulfat in Form einer gesättigten Lösung verwendet. Die Kontrolle der Konzentration während der Fraktionierung erfolgte durch Formoltitration.

5. *Proteinbestimmung*. Sie wurde je nach dem Proteingehalt durch die Biuretmethode oder durch Extinktionsmessung bei 260 $m\mu$ und 280 $m\mu$ im BECKMAN-Photometer gemessen [13].

6. *Cofaktoren*. Wir verwendeten ATP, Coenzym A (CoA) und Glutathion der Firma BOEHRINGER, Mannheim.

7. *Ionenaustauscherpapier*. Wir verwendeten Anionenaustauscherpapier «Amberlite» SB-2 in der Cl-Form (ROHM & HAAS CO.). Da die einzelnen Bogen Unterschiede an Dicke und Gewicht zeigen, wurden die Papierstreifen für ein und dieselbe Inkubationsserie immer aus demselben Blatt ausgeschnitten.

8. *Hühner*. Die gesunden Tiere wurden direkt von der Geflügelzucht bezogen; die Biotinmangeltiere erhielten das früher bereits beschriebene Futter [1]. Sie wurden vom Abend vor Beginn des Versuchs an nicht mehr gefüttert.

9. *Herstellung des Extraktes*. Die Leber wurde nach Entnahme sofort auf Eis gekühlt, gewogen, mit der Schere grob zerschnitten und nach Zugabe der 2fachen Menge (v/g) von 0,005 M KHCO_3 - KH_2PO_4 -Puffer, 7,4 mit dem Turmix 30–45 Sek. homogenisiert. Das Homogenat (= Rohextrakt) wurde 30 Min. gerührt, dann bei 10000 g 15 Min. zentrifugiert. Das Überstehende wurde durch Glaswolle filtriert und das Filtrat 30 Min. bei 100000 g zentrifugiert. Das Überstehende wurde mit einer Spritze abgesogen.

10. *Fraktionierung des Extraktes*. – a) *Acetyl-CoA-carboxylase* (Enzyme Commission No. 6, 4, 1, 2). Dieses Enzym wurde nach WAITE & WAKIL [15] aus Biotinmangelhühnchenlebern gereinigt.

²⁾ Wir danken der Firma HOFFMANN-LA ROCHE bestens für die Überlassung dieses Präparats.

Wegen der kleinen Menge an Ausgangsmaterial haben wir jedoch – in Anbetracht der niedrigen Ausbeute, welche die genannten Autoren angeben – auf die letzten beiden Reinigungsschritte verzichtet.

b) *Biotin-aktivierendes Enzym*. Das Überstehende des bei 100 000 *g* zentrifugierten Extraktes wurde mit einer 3-proz. Lösung von Protaminsulfat (4:7 *v/v*) langsam, unter ständigem Rühren versetzt und noch weitere 10 Min. gerührt; darauf wurde die Fällung während 15 Min. abzentrifugiert (10 000 *g*). Das Überstehende wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert; der Niederschlag, der zwischen 30% und 45% Sättigung ausfiel, wurde in wenig 0,002*M* K-Phosphatpuffer von pH 7,0, der 0,005*M* Glutathion enthielt, gelöst und über Nacht gegen eine 0,08*M* K-Phosphatlösung von pH 7,0, welche 0,04 *mM* Biotin enthielt, dialysiert. Diese Fraktion wurde nach 10 Min. Zentrifugierung bei 100 000 *g* auf eine Calciumhydroxylapatit-Säule, die nach TISELIUS und Mitarb. [16] vorbereitet wurde, aufgetragen. Die Säule (2,5 × 22 *cm*) wurde nacheinander mit 0,08*M*, 0,15*M* und 1,0*M* K-Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen. Die enzymatisch aktive Fraktion konnte mit dem 0,15*M* Puffer eluiert werden. Sie wurde anschliessend auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1,5 × 12 *cm*) aufgetragen, die mit 0,15*M*, 0,20*M* und 1,0*M* K-Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen wurde. Die aktive Fraktion wurde mit dem 1,0*M* Puffer eluiert. Wenn nötig wurde diese letzte Fraktion noch durch eine Dialysenmembran mit Hilfe von Dextran («Aquadex», CALIFORNIA CORP. FOR BIOCHEM. RESEARCH) eingeeengt (Konzentration auf etwa das 10fache). Wir konnten durch das beschriebene Verfahren eine ca. 50fache Reinigung des Enzyms erzielen. Sämtliche Operationen wurden im Kälteraum bei +4° durchgeführt. Da die Ausbeuten an gereinigtem Enzym ziemlich gering waren, wurden die Versuche über die Abhängigkeit der Enzymwirkung von den verschiedenen Parametern, die im folgenden Abschnitt beschrieben sind, meistens mit der Fraktion zwischen 30 und 45% Ammoniumsulfatsättigung durchgeführt, welche den grössten Teil der Enzymaktivität enthält.

11. *Aktivitätsbestimmung*. – a) *Biotin-Aktivierung*: Dazu wurde die von uns bereits beschriebene Testmethode benützt [3] [4]. Die verschiedenen Komponenten des Inkubationsansatzes wurden mit CARLSBERG-Micropipetten im Kühlraum bei +4° einpipettiert, das Hydroxylamin-HCl zuletzt kurz vor Zugabe des Enzyms zugesetzt. Die Enzymlösung (50–100 μ l) wurde zu Beginn der Inkubation zugegeben. Das Schlussvolumen betrug 250 μ l, Temperatur 37°. Zu Beginn der Inkubationszeit und nach verschiedenen Zeiten wurden aus dem gleichen Ansatz jeweils 20 μ l herauspipettiert und auf die 3 Min. vorher befeuchtete Startlinie der Anionenaustauscherpapierstreifen als Striche aufgetragen. Nach Denaturierung der Proteine über einem Wasserdampfstrahl während 30 Sek. wurden die Streifen mit dem Föhn getrocknet und dann aufsteigend mit Propanol-Wasser (4:1) bis zur vorgezeichneten Frontlinie chromatographiert. Trocknen der Streifen zuerst durch den Föhn, dann im Trockenschrank bei 60°.

Die Radioaktivität wurde im Radiochromatogramm-Scanner unter einem GEIGER-MÜLLER-Durchflusszählrohr lokalisiert. Der dem Biotinhydroxamat entsprechende Fleck (Rf 0,53) wurde ausgeschnitten und der Streifen (22 × 30 *mm*) senkrecht in die Scintillationsflasche eingeführt und mit dem Toluol-Scintillations-Gemisch überdeckt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Scintillationszähler (TRI-Carb, PACKARD).

Die Resultate in cpm wurden nach folgender Formel umgerechnet:

$$\mu\text{M Biotinhydroxamat/ml Ansatz} = \frac{X_t - X_0}{a \cdot S} \cdot 50$$

X_t = cpm zur Zeit *t*

X_0 = cpm zu Beginn

a = Zählausbeute unter den gegebenen Versuchsbedingungen

S = spezifische Aktivität des verwendeten Biotins in dpm/ μ Mol.

b) *Apocarboxylase-Aktivierung*. Den Inkubationsansätzen (für jede Inkubationszeit ein besonderer Ansatz) wurden zu Beginn der Inkubation die beiden Leberfraktionen zugegeben. Die enzymatische Reaktion wurde mit 2 ml 0,2*N* HCl unterbrochen. Das Gemisch wurde 36 Std. gegen 0,1*N* HCl (Dialyseflüssigkeit 3mal gewechselt) und anschliessend gegen Wasser bis zu leichter Trübung dialysiert. Dadurch wurde das freie Biotin-[¹⁴C] und die andern dialysierbaren Substanzen entfernt. Die Proteine des Inkubationsgemisches wurden wie in einer früheren Mitteilung bereits beschrieben [1] gefällt und gewaschen. Die auf Rundfiltern getrockneten und gewogenen Proteine wurden mit Hilfe von Hyamin-HCl (PACKARD) in den Gefässchen gelöst und ihre Radio-

aktivität im Toluol-Scintillations-Gemisch³⁾ in der TRI-Carb, PACKARD-Zählapparatur gemessen. Mit Hilfe von radioaktiver Benzoesäure wurde die Zählausbeute berechnet und die Resultate entweder in Gesamt-dpm oder in dpm/mg Protein ausgedrückt.

Um zuverlässige statistische Mittelwerte zu bekommen, haben wir jeweils sämtliche Proben 8–10mal 10 Min. gezählt.

12. *Fraktionierung der Zellbestandteile.* Die verschiedenen subzellulären Fraktionen wurden in 0,88M Saccharose nach HOGBOOM und Mitarb. [14] durch fraktionierte Zentrifugation getrennt.

Ergebnisse

A. Biotin-Aktivierung⁴⁾. – Unter den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Bedingungen wurde jeweils dann kein Biotinhydroxamat gebildet: wenn kein ATP zugegeben worden war, wenn bivalente Kationen fehlten, wenn EDTA zugesetzt wurde, wenn der Ansatz kein Enzym enthielt oder wenn das Enzym denaturiert wurde.

1. *Hydroxylamin-Abhängigkeit.* Fig. 1 zeigt die Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Hydroxylamins im Inkubations-

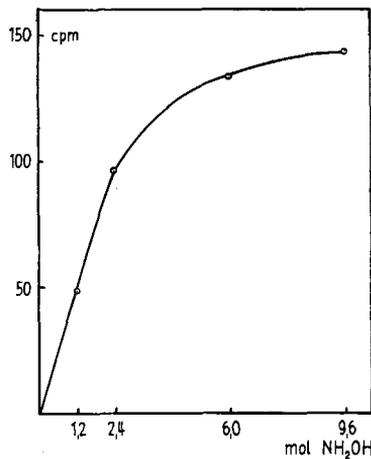


Fig. 1. *Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Hydroxylamin-Konzentration* Die Inkubationsansätze enthielten je 2,5 μ Mol ATP, Mg⁺⁺ und Glutathion, 16,4 $m\mu$ Mol Biotin-[¹⁴C]; ferner die als Abszisse angegebene Menge Hydroxylamin (Mol/l), K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), Protein (3,2 mg) und Wasser ad 250 μ l. Inkubation bei 37°. Die cpm-Werte entsprechen dem nach 20 Min. gebildeten Biotinyl-[¹⁴C]-adenylat. Die Reaktionsgeschwindigkeit blieb bis zu der Konzentration von 6,0M NH₂OH während 30 Min. linear.

ansatz. Im Bereich der von uns gewählten Konzentration von 6,0M ist diese Abhängigkeit gering. Bei höherer Konzentration verlief die Reaktion wegen Denaturierung des Enzyms weniger lang linear.

2. *Enzym-Abhängigkeit.* Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit nimmt, wie Fig. 2 zeigt, mit der Menge des Enzyms linear zu. Die Reaktionsgeschwindigkeit blieb

³⁾ Zusammensetzung: 100 mg PPO (2,5-Diphenyloxazol) + 4 g POPOP (2,2-*p*-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)) pro l Toluol.

⁴⁾ Wir werden im folgenden das Biotin-aktivierende Enzym auch als Biotin-Adenylat-Synthetase bezeichnen.

während 30 Min. bis 60 Min. konstant (Fig. 3). Zugabe von Glutathion schützt das Enzym gegen Denaturierung; wir setzten, wenn nicht anders angegeben, immer Glutathion in einer Endkonzentration von 10 mMol/l zu.

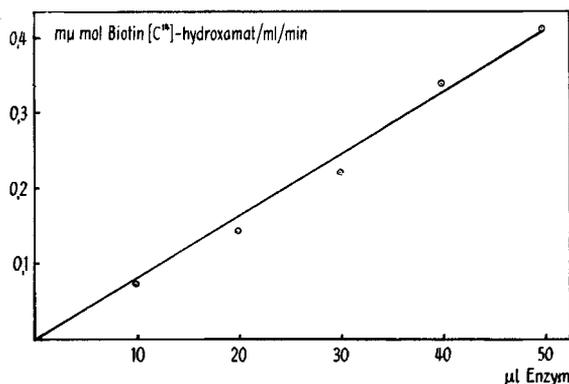


Fig. 2. *Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzym-Konzentration*
Die Inkubationsansätze enthielten je 2,5 μ Mol ATP, Mg^{++} und Glutathion, 16,4 $m\mu$ Mol Biotin- $[^{14}C]$, 1,5 mMol NH_2OH sowie K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), Proteinfraction in angegebener Menge und Wasser ad 250 μ l. Abszisse: Fermentmenge, 50 μ l Lösung enthalten 3,2 mg Protein. Inkubation bei 37°.

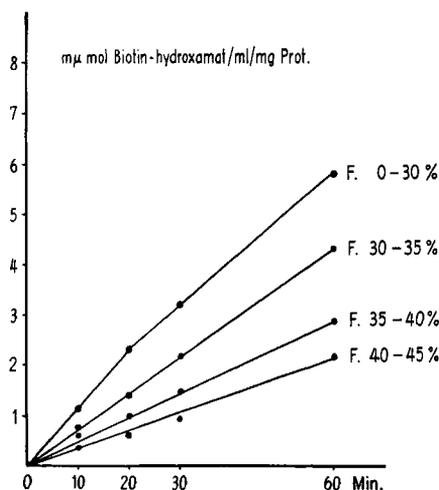


Fig. 3. *Zeitlicher Verlauf der Reaktion bei Inkubation bei 37°, mit verschiedenen Ammoniumsulfat-fractionen*

Die Inkubationsansätze enthielten je 2,5 μ Mol ATP, Mg^{++} und Glutathion, 16,4 $m\mu$ Mol Biotin- $[^{14}C]$, 1,5 mMol NH_2OH ; ferner K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), Protein und Wasser ad 250 μ l.

F: Sättigungsgrad an Ammoniumsulfat, bei der die betr. Fraction gefällt worden war.

3. *ATP-Abhängigkeit.* Die Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der ATP-Konzentration ist aus Fig. 5 zu ersehen. Die graphische Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Konstante nach LINEWEAVER-BURK ergab für das ATP einen Wert von ca. $4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l.

In einer früheren Mitteilung [4] erwähnten wir, dass das Coenzym A besonders in Anwesenheit von Pyrophosphat das ATP teilweise ersetzen kann, d. h. dass in Gegenwart von CoA sich aktiviertes Biotin nachweisen lässt. Wir erklärten diese Tatsache dadurch, dass, in Umkehrung der CoA-Synthese, Dephospho-CoA durch Pyrophosphorolyse ATP liefern kann. Wir beobachteten diese Reaktion hauptsächlich mit den früheren Enzympräparaten, bei denen wir noch nicht als ersten Schritt die Protaminfällung eingeführt hatten. Bei den mit Protamin behandelten Präparaten

Tabelle 1. *Biotinhydroxamatbildung unter verschiedenen Bedingungen*

Cofaktoren:	Biotinhydroxamat-Bildung	
	Enzympräparat ohne Protamin-Fällung 2 mg Protein pro Ansatz	Enzympräparat nach Protamin-Fällung 2,4 mg Protein pro Ansatz
ATP	4720 cpm	5500 cpm
CoA	3391 cpm	a) 0 cpm*) b) 1100 cpm**)

*) chromatographisch praktisch reines CoA (0,15% ATP).

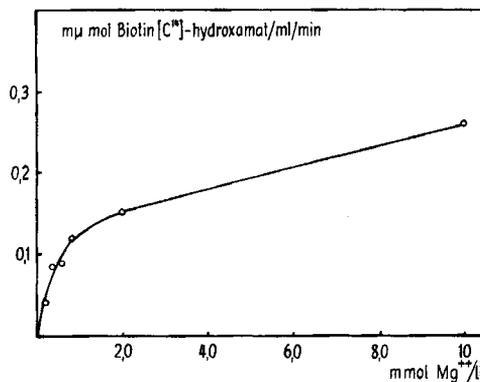
***) chromatographisch weniger reines CoA (1,5% ATP, 12% Dephospho-CoA).

Der Inkubationsansatz enthielt folgende Zusätze (Endkonzentration pro l): 10 mMol ATP oder CoA, 65 μ Mol Biotin-[14 C]; 10 mMol Mg^{++} ; 6 Mol NH_2OH ; 10 mMol Glutathion; ferner K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), Enzym und Wasser ad 250 μ l.

Tabelle 2. *Einfluss verschiedener Kationen und von EDTA auf die Bildung von Biotinhydroxamat*

	Mg^{++}	Mn^{++}	Zn^{++}	EDTA
m μ Mol Biotin-Hydroxamat in ml Inkubationsansatz nach 60 Min.	4,07	3,30	3,33	0,23

Der Inkubationsansatz enthielt die verschiedenen Kationen und EDTA in einer Endkonzentration von 10 mMol pro l sowie: 10 mMol Glutathion, 10 mMol ATP, 65,6 μ Mol [14 C]-Biotin, 6 Mol NH_2OH ; ferner K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), Enzym (3,2 mg) und Wasser ad 250 μ l.

Fig. 4. *Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Mg^{++} -Konzentration*

Die Inkubationsansätze enthielten je 2,5 μ Mol ATP und Glutathion, 16,4 m μ Mol Biotin-[14 C], 1,5 mMol NH_2OH ; ferner K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), Proteinfraction (3,2 mg) und Wasser ad 250 μ l. Die Ordinate gibt die Endkonzentration des Mg^{++} an. Inkubation bei 37°.

ist der Effekt des CoA sehr gering (siehe Tab. 1). Offenbar wird das für die Pyrophosphorolyse notwendige Ferment durch Protamin ausgefällt. Die CoA-Präparate enthalten meistens eine kleine Menge Dephospho-CoA. Mit einem Präparat, das chromatographisch weitgehend rein war, konnten wir denn auch keine Biotinhydroxamatbildung beobachten.

4. *Magnesium-Abhängigkeit.* Die Unentbehrlichkeit des bivalenten Kations ist aus Tab. 2 zu ersehen.

Die Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Kations wird am Beispiel des Magnesiums in Fig. 4 gezeigt.

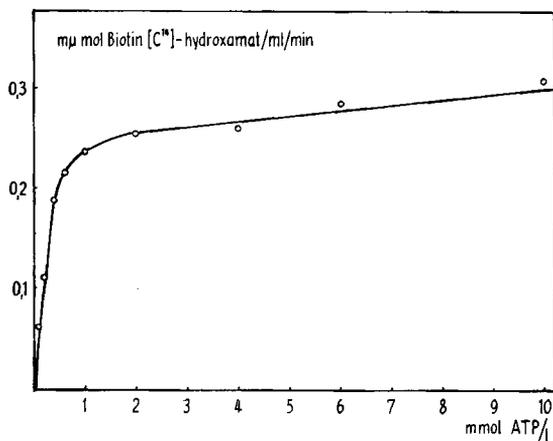


Fig. 5. *Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der ATP-Konzentration*
Die Inkubationsansätze enthielten 2,5 $\mu\text{Mol Mg}^{++}$, Glutathion, 16,4 $\mu\text{Mol Biotin-}^{[14}\text{C]}$, 1,5 mMol NH_2OH , ferner K-Phosphat-Puffer ($\text{pH} = 7,4$), Proteinfraction (3,2 mg) und Wasser ad 250 μl . Die Ordinate gibt die Endkonzentration des ATP an. Inkubation bei 37°.

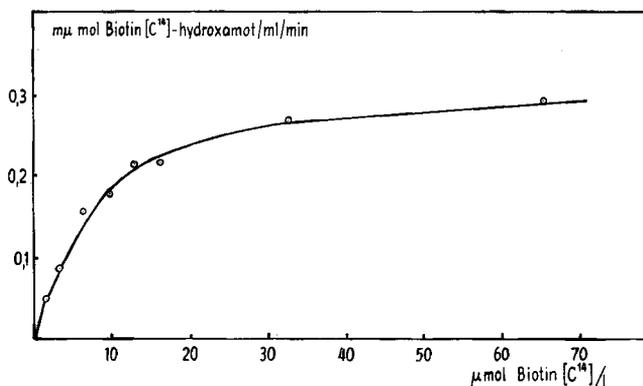


Fig. 6. *Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Biotin-^{[14}C]-Konzentration mit Enzym von normalen Hühnchen*

Die Inkubationsansätze enthielten je 2,5 $\mu\text{Mol ATP}$, Mg^{++} und Glutathion, 1,5 mMol NH_2OH ; ferner K-Phosphat-Puffer ($\text{pH} = 7,4$), Proteinfraction (3,2 mg) und Wasser ad 250 μl . Die Ordinate gibt die Endkonzentration des Biotins-^{[14}C] an. Inkubation bei 37°.

5. *Abhängigkeit von der Biotinkonzentration.* Fig. 5 und 6 zeigen die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Biotinkonzentration bei einem Enzympräparat aus normalen und einem Präparat aus Biotinmangelhühnchen. Nach LINEWEAVER-BURK ergeben sich daraus K_M -Werte von ca. $1 \cdot 10^{-5}$ bzw. $2 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. Wir teilen diese Werte mit Vorbehalt mit. Es hat sich gezeigt, dass auch unsere am meisten gereinigten Präparate von aktivierendem Enzym noch eine Enzymaktivität enthalten, durch welche Biotinyl-adenylat gespalten wird. Möglicherweise sind daher die obigen Werte zu klein.

6. *Wirkung von Biotinanalogen.* Von verschiedenen (nicht markierten) Biotinderivaten, die wir dem Inkubationsansatz zusetzen, zeigte Biotinol eine deutliche, Homobiotin eine schwache Hemmwirkung auf die Biotinaktivierung (siehe Tab. 3).

Tabelle 3. *Einfluss von Biotinanalogen auf die Bildung von Biotinhydroxamat*

Zusatz	Homobiotin	Biotinol	Biocytin	Desthiobiotin	ohne Zusatz
Enzymatische Bildung von [14 C]-Biotin-Hydroxamat in cpm	3160	747	3678	4093	3883

Die Inkubationsansätze enthielten je 2,5 μ Mol ATP, Mg^{++} und Glutathion; 1,5 mMol NH_2OH ; 16,4 $m\mu$ Mol Biotin- ^{14}C . Die verschiedenen Biotinderivate wurden im grossen Überschuss (200 $m\mu$ M) zugesetzt; K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), Proteinfraction (30–45% Ammoniumsulfat-sättigung, 3,1 mg Protein) und Wasser, ad 250 μ l. Inkubation bei 37°.

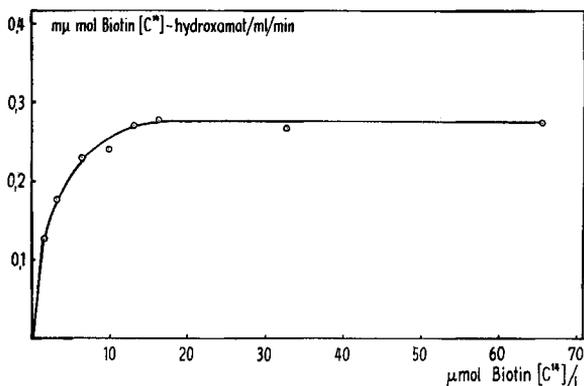


Fig. 7. *Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Biotin- ^{14}C -Konzentration mit Enzym aus Biotinmangelhühnchen*

Die Inkubationsansätze und die Versuchsbedingungen sind dieselben wie bei Fig. 5.

7. *Reaktion der Enzymfraction mit Biotinyladenylat.* Bei Gegenwart von Hydroxylamin läuft die Reaktion einseitig in Richtung der Biotinyladenylat-Bildung; das Adenylat reagiert sofort mit Hydroxylamin und wird auf diese Weise abgefangen. Bei Inkubation des Enzyms mit Biotinyladenylat verschwindet aber das letztere rasch. Um diese Reaktion zu verfolgen, gingen wir folgendermassen vor: Zu einer Serie von Inkubationsansätzen wurden die gleichen Komponenten zugefügt wie in den übrigen Versuchen, mit dem Unterschied, dass das Biotin- ^{14}C durch Biotinyl- ^{14}C -adenylat ersetzt wurde. Am Ende der Inkubationszeit wurde Hydroxylamin

zugesetzt, um das übrigbleibende Biotinyl- ^{14}C -adenylat zu bestimmen. Dazu wurden dem Inkubationsansatz 20 μl entnommen und chromatographiert wie bereits beschrieben. Ein Versuch ohne Enzym diente als Kontrolle für die Stabilität des Biotinyladenylats unter unsern Versuchsbedingungen. Aus der Tab. 4 ist zu sehen, dass das Adenylat rasch verschwindet.

Die Tatsache, dass beim obigen Versuch kein anorganisches Pyrophosphat zugesetzt wurde, schliesst die Möglichkeit nicht völlig aus, dass es sich um eine Umkehrung der folgenden Reaktion handelt:

$\text{ATP} + \text{Biotin} \rightleftharpoons \text{Biotinadenylat} + \text{PP}_i$. Die benötigte Menge Pyrophosphat ist sehr klein und könnte in der verwendeten Enzymlösung vorhanden sein. Wahrscheinlich handelt es sich aber um die Hydrolyse des Biotinyladenylats durch eine im Enzympräparat enthaltene Desacylase.

8. *Intrazelluläre Lokalisation des Enzyms*. Wie im experimentellen Teil beschrieben, benützten wir als Ausgangsfraction für die weitere Aufarbeitung des Enzyms den Überstand nach Zentrifugation bei 100000 g. Tatsächlich fanden wir etwa 90% der Aktivität in der partikelfreien Zellfraction und 10% in der Mitochondrienfraction, wahrscheinlich als Verunreinigung, während die Mikrosomenfraction sich als inaktiv erwies.

Tabelle 4. *Reaktion der Enzymfraction mit Biotinadenylat*

Inkubationszeit bei 37° Min.	Übrigbleibendes Biotinyl- ^{14}C -adenylat in cpm mit Enzym	ohne Enzym
0	1558	2450
5	587	2316
30	464	2569

Die Inkubationsansätze enthielten 2,5 μMol ATP, 2,5 μMol Mg^{++} , 2,5 μMol Glutathion, 16,4 $\text{m}\mu\text{Mol}$ Biotin- ^{14}C ; ferner K-Phosphat-Puffer (pH 7,4), eine Enzym-Fraction (zwischen 30–45% Ammoniumsulfatsättigung; 3,5 mg Protein) und Wasser ad 250 μl . Am Ende der Inkubation wurden 3 mMol NH_2OH zugegeben, 20 μl aus dem Inkubationsansatz abpipettiert und chromatographiert.

B. Apocarboxylase-Aktivierung. – Wir bestimmten die Aktivierung der Apocarboxylase durch Messung des Einbaus von radioaktivem Biotin in die Proteine der Enzymlösung. Dafür benützten wir einerseits die an Acetyl-CoA-carboxylase angereicherte Leberfraction aus Biotinmangelhühnchen, die noch etwas Biotin-aktivierendes Ferment und eventuell auch andere Carboxylasen enthielt, andererseits die das biotinaktivierende Ferment enthaltende Fraction aus normalen Hühnchen. Die beiden Enzympräparate wurden zusammen mit Biotin- ^{14}C inkubiert; gleichzeitig wurden Kontrollen mit den einzelnen Enzymen angesetzt. Die in Tabelle 5 mitgeteilten Resultate sind in dpm ausgedrückte Mittelwerte aus zwei parallelen Bestimmungen. In der zweiten Kolonne ist ein entsprechender Versuch mit Biotinyl- ^{14}C -adenylat mitgeteilt.

Ein besonderer Hinweis ist auf das Verhalten des gereinigten Biotin-aktivierenden Enzyms gegenüber dem Biotinyladenylat nötig. Wenn man Biotinyl- ^{14}C -adenylat mit dem aktivierenden Enzym zusammenbringt, wird es sehr rasch an die Proteine fixiert, aber bei Inkubation rasch abgebaut. Im mitgeteilten Versuch betrug der spontane Einbau 18200 dpm, während nach 20 Min. Inkubation nur noch 695 dpm

an Eiweiss gebunden waren, Findet die Inkubation in Gegenwart von Apocarboxylase statt, so wird Biotin in dieselbe eingebaut (vgl. Tab. 6). Bei Gegenwart von ATP ist die beschriebene spontane Fixierung des Biotins an aktivierende Enzyme etwas geringer, dagegen der Einbau in die Carboxylase höher, weil offenbar in Gegenwart des ATP der Zerfall des Enzym-Biotinyladenylat-Komplexes durch die Synthetase kompensiert wird. Die Tatsache, dass Biotin auch in Abwesenheit von ATP oder

Tabelle 5. *Enzymatischer Einbau von Biotin-^[14C] in Acetyl-CoA-Apocarboxylase*

Zusatz	Enzymatischer Einbau von Biotin- ^[14C] in dpm	Enzymatischer Einbau des Biotins bei Gegenwart von Biotinyl- ^[14C] -adenylat in dpm
Acetyl-CoA-Apocarboxylase (2,7 mg Protein)	3462	1808
aktivierendes Enzym (6,5 mg Protein)	1189	–*)
Acetyl-CoA-Carboxylase + aktivierendes Enzym (9,2 mg Protein)	6783	3817
Zusätzlicher Einbau bei Kombination der beiden Enzyme	2132	2009

Als enzymatischen Einbau bezeichnen wir die Differenz zwischen Totalaktivität nach einer bestimmten Inkubationszeit und Aktivität ohne Inkubation zu Beginn (spontane Fixierung). Die Inkubationsansätze enthielten 2,5 μ Mol Mg⁺⁺, 2,5 μ Mol Glutathion, 0,1 mMol K-Phosphat-Puffer (pH = 7,4), 16,4 $m\mu$ Mol Biotin-^[14C] bzw. 22,4 $m\mu$ Mol Biotinyl-^[14C]-adenylat; ferner die Enzymfraktionen und Wasser ad 1,0 ml Endvolumen. Die Inkubationsansätze mit Biotin-^[14C] enthielten ausserdem 2,5 μ Mol ATP; die mit Biotinyl-^[14C]-adenylat enthielten kein ATP. Inkubationszeit: 20 Min. bei 37°. Bestimmung des Einbaus vgl. experimenteller Teil. Das verwendete Biotinyladenylat hatte eine geringere spezifische Aktivität als das Biotin; dieselbe wurde auf die spezifische Aktivität des letzteren umgerechnet.

*) Erklärung des Verhaltens des Biotinyladenylats gegen das aktivierende Enzym siehe Text.

Tabelle 6. *Reaktion von Biotinyl-^[14C]-adenylat mit der das aktivierende Enzym enthaltenden Fraktion*

	Biotinyl- ^[14C] -adenylat (22,4 $m\mu$ Mol)	
	ohne ATP	mit ATP
Spontane Fixierung an das Biotinaktivierende Enzym	dpm 18200	dpm 12950
Nach 20 Min. Inkubation des Gemisches von aktivierendem Enzym und Biotinyladenylat	695	
Enzymatischer Einbau nach Inkubation mit aktivierendem Enzym und Acetyl-CoA-Apocarboxylase	3817	7390
Ohne Mg ⁺⁺ , mit EDTA 10mm		4200

Inkubationsansatz: siehe Tab. 5. Der Ansatz enthielt 22,4 $m\mu$ Mol Biotinyladenylat der spezifischen Aktivität von 3,56 mc/mMol. Es wurden somit im Versuch ohne ATP spontan 2,3 $m\mu$ Mol oder 10% der zugesetzten Menge am Protein fixiert.

Mg⁺⁺ auf der Apocarboxylase fixiert wird, wenn der Ansatz Biotinyladenylat enthält, deutet darauf hin, dass das letztere tatsächlich eine Intermediärverbindung bei der Synthese des Holoferments ist.

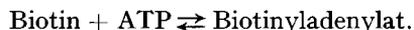
C. Reinigung des Biotin aktivierenden Enzyms. – Tab. 7 zeigt die Reinigung des Enzyms aus der Leber eines normalen Hühnchens nach der im experimentellen Teil beschriebenen Methode.

Tabelle 7. *Reinigung des Biotin aktivierenden Enzyms* (Erklärung s. Text)

Fraktionen:	mg Protein/ml	Gebildetes Biotinhydroxamat, ausgedrückt in μMol pro mg Protein-Ansatz und 60 Min. Inkubationszeit	Reinigungsgrad
Überstehendes der Zentrifugierung des Extrakts bei 100 000 g	2,23	0,25	1
Überstehendes der Protaminfällung	1,19	0,27	1,06
Ammoniumsulfatfraktion 30–45% Sättigung	2,21	0,86	3,4
Eluat Hydroxylapatit (0,15 M K-Phosphat pH 7,4)	0,127	1,35	5,4
Eluat DEAE-Sephadex (1 M K-Phosphat pH 7,4)	0,255	13,4	54

Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit und in früheren Publikationen beschriebenen Versuche zeigen, dass sich aus der Hühnerleber ein Enzym isolieren lässt, welches Biotin in eine «aktivierte» Form überführt. Es katalysiert offenbar die Reaktion:



Wenn es mit dem Apoferment der Acetyl-CoA-carboxylase in Gegenwart von ATP und Biotin inkubiert wird, entsteht aktives Biotinenzym. Das aktivierende Enzym kann als Biotinyladenylat-Synthetase bezeichnet werden. Die Biotin aktivierenden Enzyme können durch die Hydroxamatbildung in Gegenwart von Hydroxylamin, durch den biotinabhängigen Austausch von ³²P zwischen ATP und PP_i oder durch Bildung von ATP aus Biotinadenylat und Pyrophosphat nachgewiesen werden.

Es müssen hier zwei Reaktionen unterschieden werden: Die Überführung des Biotins in die aktivierte Form, die nach allem, was wir wissen, mit dem Biotinyladenylat zu identifizieren ist, und die Synthese der biotinhaltigen Holo-carboxylase aus der Apocarboxylase. Verschiedene Beobachtungen zeigen, dass die Biotinyladenylat-Synthetase nicht mit dem Enzym identisch ist, welches die Apocarboxylase aktiviert (Apocarboxylase-aktivierendes Enzym) oder jedenfalls durch ein weiteres Protein ergänzt werden muss, das für die Einführung des Biotins in das Apoferment verantwortlich ist (SIEGEL und Mitarb. [9]).

Biotin aktivierende und Apocarboxylase aktivierende Enzyme sind in verschiedenen Organismen nachgewiesen worden. SIEGEL und Mitarb. [9] haben aus Kaninchenleber ein Enzym erhalten, welches Propionyl-CoA-apocarboxylase aktiviert

und ein Biotin-aktivierendes Enzym aus Schweineleber; KNAPPE & HÖPNER [17] fanden in Extrakten aus *Achromobacter* ein Enzym, welches die Einführung des Biotins in die β -Methylcrotonyl-CoA-apocarboxylase bewirkt; LANE & YOUNG [18] haben das Enzym aus *Propionibacterium shermanii*, welches die Methylmalonyloxalat-transcarboxylase aktiviert, 250fach gereinigt.

Es stellt sich nun die Frage, welche Beziehung zwischen der Aktivierung des Biotins (Bildung seines Adenylats) und der Einführung des aktivierten Biotins in das Apoenzym besteht, bei welcher der Biotinylrest auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests übertragen wird [7a]. Für diese zweite Stufe der Reaktion bestehen zwei Möglichkeiten: 1. Das Biotinyladenylat wird vom aktivierten Enzym abgespalten und reagiert unabhängig von ihm mit dem Apoferment. 2. Das Enzymgebundene Biotinyladenylat reagiert entweder direkt oder durch Vermittlung eines weiteren Proteins (einer Biotinyltransferase).

LYNEN & ROMINGER [8] haben die Acetyl-CoA-apocarboxylase aus Hefe gereinigt und gefunden, dass dieses Enzympräparat durch Biotin *plus* ATP nicht mehr aktiviert wird, wohl aber durch synthetisches Biotinyladenylat. Dieser Befund spricht für die erste Möglichkeit. In diesem Fall ist keine Spezifität der Biotinyladenylat-Synthetase in bezug auf die Carboxylase zu erwarten. Es wäre allerdings auch möglich, dass dem Enzym von LYNEN & ROMINGER noch eine Biotinyltransferase beigemischt ist, welche für die Übertragung des Biotins verantwortlich ist.

Es gibt aber Befunde, welche auf die zweite Möglichkeit hindeuten. SIEGEL und Mitarb. [9] haben gefunden, dass in ihrem System, welches aus der Propionyl-CoA-apocarboxylase der Rattenleber und dem Apocarboxylase aktivierenden Enzym der Kaninchenleber besteht, das letztere nicht durch ein 100fach angereichertes, Biotin-aktivierendes System aus Schweineleber ersetzt werden kann⁵⁾. Unsere Versuche mit Acetyl-CoA-carboxylase haben zu ähnlichen Resultaten geführt. Ob die Acetyl-CoA-apocarboxylase der Hühnerleber in gleicher Weise wie das Hefeenzym von LYNEN & ROMINGER für sich allein mit Biotinadenylat reagiert, können wir nicht entscheiden, da unsere Carboxylase nicht genügend rein war und sicher noch aktivierendes Enzym enthielt (Tab. 5 und 6). Dagegen können wir annehmen, dass auch in unserem System Biotinyladenylat als Zwischenprodukt auftritt, weil eine Fixierung des Biotins auf der Apocarboxylase auch ohne ATP und ohne Mg^{++} stattfindet. In diesem Zusammenhang ist auch der Befund von Interesse, dass beim Vermischen des aktivierenden Enzyms mit radioaktivem Biotinyladenylat eine recht beträchtliche Menge des letzteren spontan an das Protein gebunden wird. Bei Inkubation des Gemisches ohne Apocarboxylase verliert das Protein die Radioaktivität, weil das Enzympräparat wahrscheinlich noch eine Desacylase enthält, welche das Biotin abspaltet, wenn es nicht mit der Apocarboxylase reagieren kann. Da unser Biotinaktivierendes Enzym nicht rein ist, können wir nicht mit Sicherheit angeben, ob es selbst für die Bindung des Adenylats verantwortlich ist oder ob möglicherweise ein anderes Protein, das im Sinne einer Biotinyltransferase wirkt und sich in der Enzymfraktion vorfindet, das Biotinyladenylat bindet. Diese Fragen

⁵⁾ Es ist hier daran zu erinnern, dass eine Aktivierung des Biotins, die über das Adenylat zu Biotinyl-CoA führt, eine Vorstufe für den Abbau der Seitenkette des Biotins darstellt (FOOTE und Mitarb. [6]). Das Vorkommen Biotin-aktivierender Enzyme, welche nichts mit der Aktivierung der Apocarboxylase zu tun haben, könnte in dieser Tatsache ihre Erklärung finden.

können erst mit Sicherheit entschieden werden, wenn die beteiligten Fermente in reiner Form vorliegen.

Nachtrag. Nach Abschluss des Manuskriptes erschienen die beiden ausführlichen Arbeiten von LANE, LYNEN und Mitarb. [19] über die Apotranscarboxylase aus *Propionibacterium shermanii*. Die genannten Autoren haben aus dem Bacterium das Biotin-aktivierende Enzym (Biotin-Apotranscarboxylase-Synthetase) 250fach gereinigt. Die Apotranscarboxylase wurde ebenfalls isoliert und teilweise gereinigt. Es zeigte sich, dass synthetisches Biotinyladenylat nur in Gegenwart der Synthetase mit der Apotranscarboxylase reagiert. Dies zeigt, dass offenbar das Biotin-aktivierende Enzym spezifisch auf die Apotranscarboxylase eingestellt ist und dass die letztere nur mit dem an die Synthetase gebundenen Biotinyladenylat reagiert.

Frau U. HESS-SANDER danken wir bestens für ihre wertvolle Mithilfe. Die Untersuchungen wurden z. T. durch den SCHWEIZ. NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG unterstützt, dem wir für seine Hilfe bestens danken.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Hühnchenleber wurde eine Enzymfraktion abgetrennt, welche Biotin in Gegenwart von ATP in eine «aktivierte» Form, sehr wahrscheinlich Biotinyladenylat überführt.

2. Um die Aktivierung des Biotins nachzuweisen, wurde die Enzymfraktion mit Hydroxylamin und Biotin- ^{14}C inkubiert; das gebildete Hydroxamat wurde vom unveränderten Biotin auf Anionenaustauscherpapier getrennt und seine Radioaktivität direkt auf dem Papier im Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt.

3. Bei Inkubation von aktivierendem Enzym mit Biotin- ^{14}C oder Biotinyl- ^{14}C -adenylat und Acetyl-CoA-apocarboxylase (aus der Leber von Biotin-Mangelhühnchen) wurde Biotin in das Apoferment eingebaut.

4. Das aktivierende Enzym wurde ca. 50fach gereinigt.

Biochemisches Institut der Universität Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. GILGEN & F. LEUTHARDT, *Helv.* **45**, 1833 (1962).
- [2] F. v. SCHULTHESS & F. LEUTHARDT, *Helv.* **46**, 1244 (1963).
- [3] M. VALLOTTON & F. LEUTHARDT, *Verhandlg. Schw. Ver. Physiol. Chem.* **62.**, Bern: 1963. *Helv. physiol. Acta* **22**, C 48 (1964).
- [4] M. VALLOTTON & F. LEUTHARDT, *Helv.* **47**, 311 (1964).
- [5] D. P. KOSOW & M. D. LANE, *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **5**, 191 (1961); **7**, 439 (1962).
- [6] J. L. FOOTE, J. E. CHRISTNER & M. J. COON, *Biochim. biophysica Acta* **67**, 676 (1963).
- [7] F. LYNEN, J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING & E. RINGELMANN, *Angew. Chem.* **74**, 481 (1959); J. KNAPPE, *Abstr. 6th Intern. Congr. Biochemistry New York 1964*, **5**, 355; vgl. auch Zusammenfassung S. P. MISTRY & K. DAKSHINAMURTI, in *Vitamins and Hormones* **22** (1964) (im Druck).
- [7a] M. D. LANE & F. LYNEN, *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **49**, 379 (1963).
- [8] F. LYNEN & K. L. ROMINGER, *Fed. Proc.* **22**, 537 (1963).
- [9] L. SIEGEL, J. L. FOOTE, J. E. CHRISTNER & M. J. COON, *Biochem. biophysica Res. Comm.* **73**, 307 (1963).
- [10] R. B. LOFTFIELD & E. A. EIGNER, *Biochim. biophysica Acta* **72**, 372 (1963).
- [11] P. BERG, *J. biol. Chemistry* **233**, 608 (1958).
- [12] H. LECHER & S. HOFMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **55**, 912 (1922).

- [13] G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).
- [14] G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER & G. E. PALADE, *J. biol. Chemistry* 172, 619 (1948).
- [15] M. WAITE & S. J. WAKIL, *J. biol. Chemistry* 237, 2750 (1962).
- [16] A. TISELIUS, S. HJERTEN & O. LEVIN, *Arch. Biochemistry Biophysics* 65, 132 (1956).
- [17] J. KNAPPE & T. HÖPNER, *Fed. Europ. biochem. Soc., 1st. Meeting, London 1964, Abstract A8*; J. KNAPPE, B. WENGER & U. WIEGAND, *Biochem. Z.* 337, 232 (1963).
- [18] M. D. LANE & F. L. YOUNG, *Fed. Proc.* 23, 481 (1964).
- [19] M. D. LANE, K. L. ROMINGER, D. L. YOUNG & F. LYNEN, *J. biol. Chemistry* 239, 2865 (1964); 239, 2858 (1964).

263. Optische Spaltung des 5-Hydroxy-DL-Tryptophans

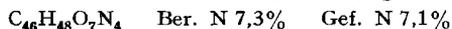
von Heinrich Rinderknecht

(30. X. 64)

Die Erkenntnis, dass das 5-Hydroxytryptophan, Vorläufer des neurophysiologisch wichtigen Serotonins, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren vermag, hat in den letzten Jahren zunehmendes Interesse an dieser Aminosäure angefacht. Da bekanntlich die L- und D-Antipoden der meisten Aminosäuren im Stoffwechsel verschiedene Wege beschreiten, was auch auf das 5-Hydroxytryptophan zutrifft [1]¹⁾, so ist die Anwendung der optisch reinen Isomeren, insbesondere der L-Form, in vielen Untersuchungen fast unumgänglich. Die optische Spaltung der racemischen Aminosäure durch fraktionierte Kristallisation der Chininsalze des N-Benzylloxycarbonyl-5-benzyloxy-DL-tryptophans wurde zwar 1957 von MORRIS & ARMSTRONG [2] beschrieben (der D-Antipode bildet das weniger lösliche Salz). Die Arbeitsweise dieser Autoren ist jedoch sehr mühsam und mit dem Nachteil zahlreicher Umkristallisationen behaftet.

Es gelang uns nun, durch nacheinanderfolgenden Gebrauch des Stereoisomerenpaares Chinidin und Chinin diese Methode so zu vereinfachen, dass schon nach 1–2 Umkristallisationen optisch reine Salze des N-Benzylloxycarbonyl-5-benzyloxy-L- bzw. -D-tryptophans in 60–65-proz. Ausbeute erhalten wurden. Die L- und D-Antipoden konnten durch Freisetzen aus ihren Salzen fast quantitativ isoliert werden, und Hydrierung über Palladiumkohle lieferte die L- und D-Formen des 5-Hydroxytryptophans in 85% Ausbeute. Die Kombination stereoisomerer Basen zur optischen Spaltung von racemischen Säuren war uns nur aus einer einzigen Literaturangabe [3] bekannt und dürfte wohl von allgemeinem Interesse sein.

Experimentelles. – *Chinidinsalz des N-Benzylloxycarbonyl-5-benzyloxy-L-tryptophans.* Eine Lösung von N-Benzylloxycarbonyl-5-benzyloxy-DL-tryptophan (9,6 g) und 7,2 g Chinidin in 250 ml siedendem Benzol wurde langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt und schliesslich 30 Min. in Eiswasser stehengelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und *in vacuo* bei 45° getrocknet. Ausbeute: 8,5 g. Smp. 135°. Nach zweimaliger Umkristallisation aus 450 ml und 300 ml Benzol wurden 5,5 g (65% d. Th.) Reinprodukt erhalten. Smp. 156°; $[\alpha]_D^{23} = +127,5^\circ$ ($c = 1$ in Äthanol).



Chininsalz des N-Benzylloxycarbonyl-5-benzyloxy-D-tryptophans. Die Benzolfiltrate des Chinidinsalzes wurden mit 150 ml Wasser versetzt und unter Umrühren mit 6N HCl auf pH 1,5 ein-

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2404.