

283. Zur Kenntnis der β -Lysin-Mutase-Reaktion: Mechanismus und sterischer Verlauf

von János Rétey¹), Fritz Kunz und Duilio Arigoni

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich

und Thressa C. Stadtman

Laboratory of Biochemistry, National Heart Institute, National Institutes of Health,
Bethesda, Maryland

(26.VII.78)

Investigations on the β -lysine mutase reaction: Mechanism and steric course

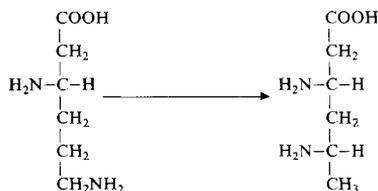
Summary

The steric course and some mechanistic aspects of the coenzyme-B₁₂-dependent β -lysine-mutase reaction, in which (3*S*)- β -lysine is converted to (3*S*, 5*S*)-3,5-diaminohexanoate, have been investigated by means of tritium labelling. The reaction involves migration of an hydrogen atom from C(5) of the substrate to C(5') of coenzyme B₁₂ and back-transfer to C(6) of the product. In the presence of [5'-³H]-coenzyme B₁₂ the enzyme catalyzes the exchange of label between the cofactor and one of the diastereotopic H-atoms at C(5) of the substrate. The exchangeable hydrogen atom is identical with the one specifically involved in the migration reaction. Degradation of the tritiated β -lysine obtained in such experiments yielded a sample of tritiated succinic acid which was shown in an enzymic assay involving partial oxidation with succinate dehydrogenase, to possess the (*S*)-configuration. Thus, the overall substitution at C(5) occurs with inversion of configuration.

β -Lysin-Mutase aus *Clostridium sticklandii* katalysiert die Umlagerung von (3*S*)- β -Lysin zu einer 3,5-Diaminohexansäure, deren absolute Konfiguration als (3*S*, 5*S*) ermittelt wurde [1] [2] (*Schema 1*). Diese Reaktion stellt den coenzym-B₁₂-abhängigen Schritt im anaeroben Abbau des Lysins zu Essigsäure, Buttersäure und Ammoniak dar. Für den Umsatz von (3*S*)- β -Lysin zum Produkt wird ein orange-farbenes cobamidhaltiges Protein benötigt; dieses enthält als weiteren essentiellen

¹) Neue Adresse: Lehrstuhl für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität Karlsruhe.

Schema 1

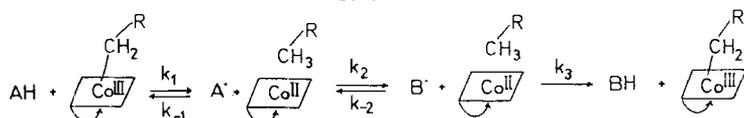


Cofactor Pyridoxalphosphat [3], welches durch eine spezielle Prozedur abgetrennt werden kann. Im Laufe der Reaktion lässt sich eine langsame Zersetzung des Coenzym-B₁₂ nachweisen. Für einen wirkungsvollen Umsatz ist neben zahlreichen Cofaktoren, wie ATP, FAD, Thiole, Mg⁺⁺ und K⁺ [4], eine zweite Proteinfraction erforderlich, die Coenzym-B₁₂-Synthetase-Aktivität aufweist und somit imstande ist, das Coenzym-B₁₂ aus seinem Zerfallsprodukt und ATP zu regenerieren [3]. Trotz der anscheinenden Komplexität des kompletten Systems konnte vermutet werden, dass die von der Mutase katalysierte Wanderung einer Aminogruppe von C(6) auf C(5) des Substratgerüsts mechanistisch ähnlich verläuft wie die 1,2-Verschiebung von Gruppen bei anderen coenzym-B₁₂-abhängigen Reaktionen [5-10]. Gemeinsames Merkmal solcher Reaktionen ist eine in entgegengesetzter Richtung zur wandernden Gruppe stattfindende Verschiebung von H-Atomen, welche durch intermediäre Übertragung auf das C(5')-Atom des Coenzym erfolgt (vgl. *Schema 2*).

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, ob ähnliche Verhältnisse auch für die Umsetzung von β -Lysin zutreffen und darüber hinaus das stereochemische Bild der Reaktion durch Ermittlung einer allfällig vorhandenen Stereospezifität der am C(5) stattfindenden Substitution zu vervollständigen. Ein Teil der erzielten Ergebnisse wurde bereits in kurzer Form veröffentlicht [11].

Die direkte Beteiligung des Coenzym-B₁₂ an der H-Wanderung im Laufe der Reaktion (vgl. Gl. 1) wurde in einem orientierenden Vorversuch mit Hilfe von in den Stellungen 4 und 5 uniform tritiiertem (3*S*)- β -Lysin überprüft, welches aus käuflichem (*RS*)-[4-³H₂-5-³H₂]-Lysin durch Inkubation mit einem coenzym-B₁₂-unabhängigen Enzym aus *Clostridium sticklandii* hergestellt worden war [12-15]. Nach Umsetzung des tritiierten Substrates im β -Lysin-Mutase-System erwiesen sich sowohl das Produkt der Reaktion, die 3,5-Diaminohexansäure, als auch das aus dem enzymatischen Ansatz abgetrennte und gereinigte Coenzym-B₁₂ als radioaktiv. Die spezifische Radioaktivität des Coenzym betrug rund 10% der spezifischen Radioaktivität des Substrates. Anschliessender *Kuhn-Roth*-Abbau der

Schema 2



erhaltenen tritiierten 3,5-Diaminohexansäure gab eine Essigsäure, welche etwa 20% der ursprünglichen Radioaktivität enthielt. Auch in der Annahme einer statistischen Verteilung des Tritiums auf die C(4) und C(5) Stellungen des Ausgangsmaterials ist eine quantitative Deutung dieses Resultats hier nicht möglich, da der theoretisch zu erwartende Wert kritisch von mehreren noch unbekanntem Faktoren, wie z. B. der Grösse eines allfälligen kinetischen Isotopeneffektes, dem prozentualen Umsatz bzw. der Reversibilität der Reaktion abhängt. Immerhin beweist der Abbau zur tritiierten Essigsäure, dass im Laufe der Reaktion eine signifikante Wanderung von Tritium von C(5) nach C(6) stattgefunden haben muss.

Dass das jeweils wandernde H-Atom intermediär an das C(5') des Coenzym-B₁₂ gebunden wird, konnte in Experimenten mit [5'-³H]-Coenzym-B₁₂, welches mit Hilfe des Propandioldehydrase-Systems [5] zugänglich ist, bewiesen werden. Nichtmarkiertes (3*S*)-β-Lysin wurde bei verschiedenen Konzentrationen des tritiierten Cofaktors mit dem β-Lysin-Mutase-System umgesetzt. Nach chromatographischer Abtrennung des Produktes vom verbleibenden Ausgangsmaterial wurde festgestellt, dass sowohl Reaktand als auch Produkt mit Tritium markiert waren (Tab. 1). Die Gesamtübertragung von Tritium betrug in allen Experimenten etwas über 60%²⁾. Die spezifische Radioaktivität beider Aminosäuren war der Konzentration des zugesetzten [5'-³H]-Coenzym-B₁₂ nahezu proportional. Da das Coenzym gegenüber dem Enzym in grossem Überschuss verwendet wurde, folgt daraus, dass im Laufe der Reaktion ein verhältnismässig rascher Austausch zwischen den an der Aktivstelle gebundenen und den in Lösung befindlichen

Tabelle 1. Übertragung von Tritium von [5'-³H]-Coenzym B₁₂ auf die Substrate in der β-Lysin-Mutase-Reaktion

Exp. Nr.	Coenzym-B ₁₂ -Zusatz		(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Diaminohexansäure gebildet		(3 <i>S</i>)-β-Lysin nach dem Umsatz		Gesamtübertragung %
	μmol	Radioaktivität Ipm/total	Isoliert μmol	Radioaktivität Ipm/μmol	Zurückisoliert μmol	Radioaktivität Ipm/μmol	
0	—	—	31,3	—	205	—	—
1	6,5	35000	34,2	71,5	185	108,5	64,4
2	32,5	179000	34,2	321	205	530	66,7
3	65	358000	37,6	580	199	975	60,2

Jedes Reaktionsgemisch in den Experimenten 0-3 enthielt: 10,9 mg «orange protein» [4]; 33,6 mg «enzyme 2» [4]; 600 μmol 2-Methylimidazol/HCl-Puffer (pH 8); 250 μmol Kaliumpyruvat; 48 μmol ATP-Na₂K; 0,32 μmol FAD; 67 μmol 1,4-Dimercapto-threitol; 80 μmol MgCl₂; 320 μmol (3*S*)-β-Lysin · H₂SO₄ [5'-³H]-(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)-Co 5'-deoxyadenosylcobamid, wie in der Tabelle aufgeführt. Totalvolumen des Reaktionsgemisches 7,89 ml; Reaktionstemperatur 34°; Reaktionsdauer 125 Min.; anaerobe Bedingungen.

²⁾ Wiederholte Radioaktivitätsmessungen von β-Lysin-Proben waren unter sich konsistent, betrug jedoch auf molarer Basis lediglich 46% der in den entsprechenden Proben des *N,N*-Dibenzoyl-β-lysinmethylesters nachweisbaren Radioaktivität. Zur Ermöglichung eines Vergleichs sind in den Tabellen 1 und 2 die korrigierten Werte verwendet.

Coenzym-Molekeln stattfindet. In Anbetracht der Tatsache, dass der aus dem Verhältnis des Produktes zum zurückisolierten Reaktand abgeschätzte Umsatz nur rund 15% betrug und dass in Gegenwart von Pyruvat die Reaktion praktisch irreversibel in Richtung auf 3,5-Diaminohexansäure verläuft, ist die relativ hohe Radioaktivität des jeweils zurückgewonnenen (3*S*)- β -Lysins besonders bemerkenswert. Eine Markierung des Reaktanden bei irreversibler Bildung des Produktes verlangt, dass das Reaktand durch Abgabe eines H-Atoms an das Coenzym in eine Zwischenstufe übergeht, welche durch Übernahme eines verschiedenen H-Atoms aus der 5'-Stellung des so modifizierten Coenzym das Reaktand zu regenerieren vermag, und zwar in einer Reaktion, die rascher erfolgen muss als die alternative Umwandlung zum Produkt (*Schema 2*).

Es muss zur Zeit offenbleiben, ob für die Umwandlung zum Produkt der eigentliche Umlagerungsschritt (k_2 , vgl. *Schema 2*) oder das Abfangen der aus dieser Umlagerung hervorgehenden neuen Zwischenstufe (k_3) geschwindigkeitslimitierend ist.

Zur Lokalisierung des Tritiums in der entstandenen 3,5-Diaminohexansäure wurden die vereinigten Produkte aus den Experimenten 0-3 zuerst in das bekannte 4-Amino-6-methylpiperidon-2 [1] [13] übergeführt und letzteres nach Verdünnung mit inaktivem Trägermaterial nach *Kuhn-Roth* zu Essigsäure abgebaut, die noch eine Tritiumaktivität von 95% des ursprünglichen Wertes aufwies. Der somit erbrachte Nachweis, dass die 3,5-Diaminohexansäure das vom Coenzym-B₁₂ stammende Tritium ausschliesslich in der Methylgruppe trägt, kann verwendet werden, um zu zeigen, dass der während der Mutase-Reaktion stattfindende Tritiumeinbau in β -Lysin stereospezifisch erfolgt und jenes H-Atom betrifft, welches bei der Entstehung des Produktes eine Wanderung erfährt. Würde dies nicht zutreffen, so wären aus den durch Austausch tritiierten β -Lysin-Molekeln durch nachträgliche H-Wanderung 3,5-Diaminohexansäure-Molekeln entstanden, die Tritium anderswo als nur am C(6) trügen.

Die gefolgerte Identität des austauschbaren mit dem wanderungsfähigen H-Atom liess sich durch weitere Experimente untermauern. Zu diesem Zweck wurde das enzymatisch tritiierte (3*S*)- β -Lysin aus den Experimenten 0-3 in Gegenwart von nichtmarkiertem Coenzym-B₁₂ mit dem β -Lysin-Mutase-System umgesetzt. Nach ca. 60proz. Umsatz wurden sowohl das Produkt als auch das

Tabelle 2. Tritiumwanderung von enzymatisch tritiiertem β -Lysin zu C(6) von 3,5-Diaminohexansäure im Laufe der β -Lysin-Mutase-Reaktion

Exp. Nr.	(3 <i>S</i>)- β -Lysin eingesetzt		(3 <i>S</i>)- β -Lysin zurückisoliert		(3 <i>S</i> , 5 <i>S</i>)-3,5-Diaminohexansäure	
	μ mol	Radioaktivität Ipm/ μ mol	μ mol	Radioaktivität Ipm/ μ mol	μ mol	Radioaktivität ¹⁾ Ipm/ μ mol
4	641	228	180	506	260	56,5

1) Gemessen als 4-Amino-6-methylpiperidon.

Ausgangsmaterial isoliert. Aus den Radioaktivitätsmessungen (vgl. *Tab. 2*) geht hervor, dass in dem unumgesetzten (3*S*)- β -Lysin eine starke Anreicherung des Isotops stattgefunden hatte. Dies ist ein klarer Hinweis dafür, dass der H-Abstraktionsschritt aus dem Substrat mit einem bedeutenden kinetischen Isotopeneffekt behaftet ist. Aus dem Ausmass der Anreicherung und der Grösse des Umsatzes lässt sich ein k_H/k_T -Wert von etwa 9 abschätzen [16]. Die gleichzeitig entstandene radioaktive (3*S*, 5*S*)-3,5-Diaminohexansäure wurde nach der üblichen Prozedur zu Essigsäure abgebaut, welche erwartungsgemäss noch den Hauptteil (95%) des Tritiums enthielt.

Zur Lösung der noch verbleibenden Frage nach der sterischen Lage des in β -Lysin zur Wanderung gelangenden H-Atoms war es notwendig, entsprechend tritiierte Proben des Substrates mit genügend hoher Radioaktivität zugänglich zu machen. Das präparative Problem konnte durch Kopplung der Dioldehydrase- mit der Lysin-Mutase-Reaktion gelöst werden, und zwar unter Verwendung von stark radioaktivem (2*R*)-[1-³H₂]-Propan-1,2-diol als Tritiumlieferant. Obwohl die spezifische Radioaktivität des auf diese Weise gewonnenen β -Lysins nur 0,1% derjenigen des eingesetzten tritiierten Diols betrug, hat dieses Eintopfverfahren den Vorteil, dass im gekoppelten Umsatz tritiiertes Coenzym-B₁₂ ständig regeneriert wird, was eine effektivere Übertragung des Isotops bewirkt, als bei getrennter Führung der beiden Reaktionen und Isolierung des tritiierten Coenzym-B₁₂ möglich ist. Im übrigen belegt der Erfolg dieser Methode, dass ein nutzbarer Austausch zwischen den sich in Lösung befindlichen und enzymgebundenen Coenzym-B₁₂-Molekeln auch bei der Dioldehydrase-Reaktion stattfindet.

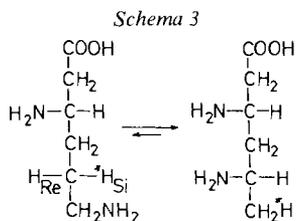
Tabelle 3. Bestimmung der absoluten Konfiguration von durch Abbau von enzymatisch tritiiertem β -Lysin erhaltenen [³H]-Bernsteinsäuren

Enzympräparat	Bezeichnung des Substrates	Radioaktivität der Produkte in bezug auf das Substrat nach 70% Oxydation (in %) zurückgebliebene Bernsteinsäure
I	(<i>R</i>)-[2- ³ H]-Bernsteinsäure ^{a)}	180
	(<i>S</i>)-[2- ³ H]-Bernsteinsäure ^{a)}	147
	[2- ³ H]-Bernsteinsäure aus (3 <i>S</i>)-[5- ³ H ₁]- β -Lysin	143
II	(<i>R</i>)-[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure ^{a)}	169
	(<i>R, S</i>)-[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure ^{a)}	162
	(<i>S</i>)-[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure ^{a)}	152
	[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure aus (3 <i>S</i>)-[5- ³ H ₁]- β -Lysin	144
	[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure aus (3 <i>S</i>)-[5- ³ H ₁]- β -Lysin	153
III	(<i>R</i>)-[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure ^{a)}	166
	(<i>R, S</i>)-[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure ^{a)}	162
	(<i>S</i>)-[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure ^{a)}	139,6
	(<i>S</i>)-[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure ^{a)}	137,3
	[2- ³ H ₁]-Bernsteinsäure aus (3 <i>S</i>)-[5- ³ H ₁]- β -Lysin	139,5

a) Referenz-Bernsteinsäuren, deren Herstellung in [20] beschrieben ist.

Das gewonnene, stereospezifisch am C(5) tritiierte β -Lysin wurde nach Verdünnung mit inaktivem Träger durch Kaliumpermanganat-Oxidation ohne Tritiumverlust zu Bernsteinsäure abgebaut, deren Methylengruppen dem C(4) bzw. C(5) des Ausgangsmaterials entsprachen. Die absolute Konfiguration dieser tritiierten Probe konnte in Anlehnung an eine früher entwickelte Methode [17] [18] auf enzymatischem Wege ermittelt werden. Bei der durch Succinat-Dehydrogenase katalysierten Oxydation von tritium-indizierten Bernsteinsäuren zu Fumarsäuren treten je nach sterischer Lage des schweren Isotops verschiedenartige kinetische Isotopeneffekte ($k_{H_{Re}}/k_T \approx 12$ bzw. $k_{H_{Si}}/k_T \approx 1.5$) auf, die sich bei gegebenem Umsatz in verschiedenartigen und für die Konfiguration des Substrates charakteristischen Isotopenanreicherungen im verbleibenden Ausgangsmaterial niederschlagen [18].

Danach wurden mehrere Proben der zu untersuchenden Bernsteinsäure so lange mit Succinat-Dehydrogenase inkubiert, bis der spektrophotometrisch ermittelte Umsatz 70% betrug, worauf das nichtumgesetzte Substrat nach chromatographischer Abtrennung und Umkristallisation auf seinen Tritiumgehalt geprüft wurde. Die jeweils verwendeten Enzympräparate wurden aus Schweineherzen nach der gleichen Methode [19], jedoch zu verschiedenen Zeiten isoliert. Da erfahrungsgemäss eine gewisse Schwankung der kritischen Tritiumanreicherung je nach Enzympräparat unvermeidlich ist, wurde jedes Enzympräparat in Parallelversuchen mit authentischen Proben von [3H_1]-Bernsteinsäuren bekannter absoluter Konfiguration [20] kalibriert. Die in *Tabelle 3* zusammengestellten Resultate lassen wenig Zweifel übrig, dass in der untersuchten Probe der Bernsteinsäure die tritiierten Molekeln vorwiegend, wenn nicht ausschliesslich (*S*)-konfiguriert waren. Entsprechend muss jenes tritiierte β -Lysin, aus dem die Bernsteinsäure durch Oxydation gewonnen wurde, als (3*S*, 5*S*)-[5- 3H_1]- β -Lysin bezeichnet werden. Aus der nachgewiesenen Identität des enzymatisch beanspruchten H-Atoms mit dem H_{Si} -Atom am C(5) von β -Lysin und aus der früher ermittelten (5*S*)-Konfiguration der bei der enzymatischen Umlagerung entstehenden 3,5-Diaminohexansäure folgt unmittelbar, dass der Substitutionsprozess am C(5) des Substrates im Endeffekt unter Inversion verläuft (*Schema 3*).



Die Radioaktivitätsmessungen wurden im Isotopenlaboratorium der ETHZ (Leitung PD. Dr. P. Jordan) ausgeführt. Die NMR.-Spektren wurden in der Abteilung für Instrumentalanalyse des Organisch-chemischen Laboratoriums der ETHZ (Leitung Professor W. Simon) aufgenommen. Die massenspektroskopischen Analysen verdanken wir Herrn Professor J. Seibl. Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der ETHZ (Leitung W. Manser) ausgeführt. Für die Aufnahme der ORD.-Spektren danken wir den Herren Dr. C. de Haen und M. Caviezel vom Laboratorium für Molekularbiologie der ETHZ (Leitung Professor R. Schwyzer).

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Die Smp. wurden in einer unter Hochvakuum abgeschmolzenen Kapillare bestimmt und sind korrigiert. Optische Drehungen wurden in einem Rohr von 10 cm Länge auf einem photoelektrischen Polarimeter *Zeiss* gemessen und sind auf die Na-D-Linie extrapoliert. Die Aufnahme von ORD.-Spektren erfolgte auf einem *Jasco*, Modell ORD./UV. 5 Spektropolarimeter mit einer Zelle von 1 cm Länge. Die NMR.-Spektren wurden mit den *Varian*-Modellen A-60, T-60 und HA-100 aufgenommen. Die Lage der NMR.-Signale ist in δ -Werten (ppm) bezogen auf intertes Tetramethylsilan angegeben; *s*=Singulett, *d*=Dublett, *t*=Triplett, *qa*=Quadruplett, *m*=Multipllett, *Sh*=breite nicht aufgelöste Signalhaufen. *J*=Kopplungskonstante in Hz. Die Massenspektren wurden mit einem *Hitachi-Perkin-Elmer*-RMU-6D-Spektrometer aufgenommen. Die Scintillationsmessungen wurden mit einem *Nuclear-Chicago*-Scintillation Mark-I-Apparat durchgeführt. Die Proben wurden in 0,02 ml Wasser, 0,5 ml Methanol und 15 ml Scintillationsflüssigkeit (1 l Toluol, 7 g Butyl-DBD (*Ciba Geigy AG*)) gelöst. Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgel HF₂₅₄₊₃₆₆ nach *Stahl* (*Merck*) ausgeführt. Die Entwicklung erfolgte durch Joddämpfe, konz. Schwefelsäure oder Ninhydrin-Reagens. Für die Säulenchromatographie kam Kieselgel G nach *Stahl* (*Merck*) und Kieselgel unter 0,08 mm (*Merck*) zur Anwendung.

Enzyme und Substrate. (3*S*)- β -Lysin (Smp. 142,5–143,5°) wurde nach *van Tamelen & Smismann* [21], 3,5-Diaminohexansäure nach *Fischer & Schlotterbeck* [22] (vgl. auch [1]) hergestellt. Coenzym-B₁₂ (5,6-Dimethylbenzimidazolyl-Co-5'-deoxyadenosylcobamid) war eine Gabe der Firma *Richardson-Merrell S.p.A.*, Firenze. Dioldehydrase aus *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes* ATCC No. 8724) wurde nach [23], β -Lysin-Mutase («orange protein» und «enzyme 2») nach [3] bzw. [4] und Succinatdehydrogenase aus Schweineherzen nach [19] gewonnen.

ATP, FAD und Kaliumpyruvat wurden von der Firma *Boehringer Mannheim GmbH*, Serumalbumin aus Rind von *Sigma*, St. Louis, Missouri, USA, und 1,4-Dimercaptothreitol (*Cleland's reagent*) von *Calbiochem*, San Diego, USA, bezogen. [³H]-NaBH₄ (spezifische Radioaktivität 6 Ci/mmol) erhielt man von *The Radiochemical Centre*, Amersham, England, und verwendete es für die Reduktion von (2*R*)-Lactaldehyd [24] zu (2*R*)-[1-³H₂]-Propan-1,2-diol [5]. [5'-³H]-Coenzym-B₁₂ erhielt man nach [5] und (3*S*)-[4-³H₂, 5-³H₂]- β -Lysin durch die Einwirkung von Lysin-2,3-amino-mutase [12–15] auf käufliches (DL)-[4-³H₂, 5-³H₂]-Lysin [25].

Umsetzung von (3S)-[4,5-³H₄]- β -Lysin mit der Mutase. (3*S*)-[4-³H₂, 5-³H₂]- β -Lysin wurde mit inaktivem Träger auf eine spezifische Radioaktivität von $3,76 \times 10^5$ Ipm/ μ mol verdünnt. Für die Umsetzung wurde folgendes Gemisch bereitet: 4,80 ml «orange protein» [3] [4] (12,6 mg/ml, partiell gereinigt); 4,80 ml «enzyme 2» [3] [4] (30 mg/ml, partiell gereinigt); 1,60 ml 1M 2-Methylimidazol/HCl-Puffer (pH 8); 0,64 ml 1M Kaliumpyruvat; 0,70 ml 0,1M ATP-Na₂K; 0,64 ml 0,001M FAD; 0,64 ml 0,2M Dimercaptothreitol; 1,60 ml 0,1M MgCl₂; 0,10 ml 0,0685M (3*S*)-[4-³H₂, 5-³H₂]- β -Lysin; 0,20 ml 0,0045M Coenzym-B₁₂; 0,72 ml H₂O. Totalvolumen des Reaktionsgemisches 17,34 ml; Reaktionstemperatur 30°; Reaktionsdauer 2,5 Std. unter H₂ und Lichtausschluss. Nach Abkühlen auf 0° wurde das Protein durch Zugabe von 1 ml 40proz. Trichloressigsäure ausgefällt und bei 48000 U/Min. abzentrifugiert. Der Überstand, eine gelbe Lösung, wurde in zwei Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde auf eine *Dowex-50W*-Säule (0,8 cm \times 11 cm) gegeben, mit 100 ml Wasser gewaschen und die Aminosäuren mit 50 ml 0,5M wässriger Ammoniaklösung eluiert. Das Dünnschichtchromatogramm (CHCl₃/CH₃OH/H₂O/25proz. NH₃ in H₂O 40:40:7,5:7,5) zeigte sowohl β -Lysin als auch 3,5-Diaminohexansäure. Nach Zugabe von 20 mg (137 μ mol) unmarkierter 3,5-Diaminohexansäure und 10 mg (68,5 μ mol) β -Lysin als Träger wurden die beiden Aminosäuren durch 2malige Dünnschichtchromatographie (System wie oben) getrennt. So wurden 8 mg (54,8 μ mol) radioaktive 3,5-Diaminohexansäure (Rf 0,17) erhalten, welche nach nochmaliger Verdünnung mit 68 mg (466 μ mol) Träger eine spezifische Radioaktivität von $3,3 \times 10^2$ Ipm/ μ mol zeigte. Das abgetrennte β -Lysin (Rf 0,05), welches nicht mehr verdünnt wurde, zeigte eine spezifische Radioaktivität von $1,06 \times 10^4$ Ipm/ μ mol. Die zweite Hälfte der gelben Lösung wurde 10mal mit je 20 ml Äther extrahiert, um die Trichloressigsäure zu entfernen. Dabei erfolgte ein Farbumschlag von gelb nach orange. Die Coenzym-B₁₂ und Aminosäuren enthaltende Wasserphase wurde i.R.V. unter Lichtausschluss eingedampft und der rotgefärbte Rückstand durch Papierelektrophorese und Papierchromatographie [5] gereinigt. Das Coenzym-B₁₂, dessen Konzentration spektrophotometrisch bei 530 nm bestimmt wurde, zeigte eine spezifische Radioaktivität von $1,93 \times 10^4$ Ipm/ μ mol.

Kuhn-Roth-Oxydation der 3,5-[4-³H₂, 5-³H₁, 6-³H₁]-Diamino-hexansäure. Apparatur und Reagentien wurden wie in [26] beschrieben verwendet: zu 35,7 mg 3,5-[4-³H₂, 5-³H₁, 6-³H₁]-Diaminohexansäure (3,3 × 10² Ipm/μmol) wurden 4 ml Chromsäurelösung [26] gegeben. Nach 1,5 Std. unter Rückfluss wurde die gebildete Essigsäure wasserdampfdestilliert und sofort mit 0,1N NaOH gegen Phenolphthalein titriert, wobei nach Eindampfen des Wassers 11 mg Natriumacetat erhalten wurden. Reaktion des letzteren mit 36,2 mg *p*-Phenylphenacylbromid in 2,25 ml Methanol gab nach Chromatographie 19,5 mg *p*-Phenylphenacylacetat vom Smp. 110–111,5° und einer spezifischen Radioaktivität von 66,3 Ipm/μmol.

Einsatz von [5-³H]-Coenzym-B₁₂ in die β-Lysin-Mutase-Reaktion. Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische ist unter *Tabelle 1* angegeben. Die enzymatische Reaktion wurde nach Abkühlung auf 0° durch Zugabe von je 1,5 ml 1,2M Perchlorsäure beendet. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins wurden die Überstände mit je 1,5 ml 1,2M KOH neutralisiert und das auskristallisierende Kaliumperchlorat entfernt. Nach Wegnahme eines Aliquots für den Ninhydrintest [13] wurden sowohl das β-Lysin als auch die gebildete 3,5-Diaminohexansäure aus den Gemischen wie oben beschrieben isoliert. Die isolierten Mengen bzw. deren Radioaktivität ersieht man aus *Tabelle 1*. Von den Experimenten 0–3 vereinigte β-Lysin- (86 mg) und 3,5-Diaminohexansäure-Proben (15,5 mg) wurden mit 30 mg bzw. 70 mg des entsprechenden radioinaktiven Trägers verdünnt. Nach nochmaliger Dünnschichtchromatographie (CHCl₃/CH₃OH/H₂O/25% NH₃ in H₂O 40:40:7,5:7,5) wurden 93,4 mg reines (3*S*)-β-Lysin (105 Ipm/μmol) und 46 mg 3,5-Diaminohexansäure (42,6 Ipm/μmol) erhalten. Letztere wurde in 100 ml wasserfreien HCl-haltigen Methanol 2 Std. unter Rückfluss erhitzt und die Lösung anschliessend eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 ml Methylenchlorid suspendiert, die Suspension mit Ammoniak gesättigt, das ausgefällte Ammoniumchlorid abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Sublimation bei 90° und 0,001 Torr ergab 7,4 mg 4-Amino-6-[6-³H₁]-methylpiperidon-2 mit Smp. 101–104° und der spezifischen Radioaktivität von 50,5 Ipm/μmol. Für die Kuhn-Roth-Oxydation wurde dieses Material mit inaktivem Träger verdünnt, was insgesamt 26 mg δ-Lactam (spezifische Radioaktivität 12,6 Ipm/μmol) lieferte. Zwei parallele Oxydationsexperimente (wie weiter oben beschrieben) führten zu Proben von *p*-Phenylphenacylacetaten mit den spezifischen Radioaktivitäten von 12,1 bzw. 11,9 Ipm/μmol.

Umsetzung des (3*S*)-[5-³H]-β-Lysins mit β-Lysin-Mutase. Für die vereinigten Proben des β-Lysins aus den Experimenten 0–3 wurde folgendes Gemisch bereitet: 113 mg «orange protein» [3] [4]; 260 mg «enzyme 2» [3] [4]; 6000 μmol 2-Methylimidazol/HCl-Puffer (pH 8); 3000 μmol Kaliumpyruvat; 500 μmol ATP-Na₂K; 3 μmol FAD; 600 μmol 1,4-Dimercapto-threitol; 800 μmol MgCl₂; 640 μmol (3*S*)-[5-³H₁]-β-Lysin; 2 μmol Coenzym-B₁₂. Totalvolumen: 100,5 ml; Reaktionstemperatur 31°; Reaktionsdauer 4 Std., unter Wasserstoff und Lichtausschluss. Nach Abkühlung auf 0° wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml 1,2M Perchlorsäure abgebrochen und die zentrifugierte klare Lösung mit 15 ml 1,2M KOH neutralisiert. Die weiter oben beschriebene Trennungsgang lieferte die in *Tabelle 2* angegebenen Mengen der beiden Aminosäuren. Die 3,5-Diaminohexansäure wurde in das δ-Lactam umgewandelt und letzteres durch 2malige Sublimation gereinigt. Dabei wurden 3,1 mg 4-Amino-6-[6-³H₁]-methylpiperidon-2 mit Smp. 102–104° und mit einer spezifischen Radioaktivität von 56,5 Ipm/μmol erhalten. Das NMR.-Spektrum in D₂O war identisch mit demjenigen des synthetischen (±) *trans*-4-Amino-6-methylpiperidon-2 [1]. Das ORD.-Spektrum zeigte einen positiven Cotton-Effekt, [α]₂₃₅ = –45° (c = 0,129, CHCl₃). Eine auf 3,83 Ipm/μmol verdünnte Probe des δ-Lactams (11,2 mg) wurde nach Kuhn-Roth oxydiert [26]. Das *p*-Phenylphenacyl-Derivat der gebildeten Essigsäure zeigte eine spezifische Radioaktivität von 3,63 Ipm/μmol.

Übertragung von Tritium durch Kopplung der Dioldehydrase-Reaktion mit der β-Lysin-Mutase-Reaktion. Das Reaktionsgemisch enthielt 5 ml Extrakt aus *Klebsiella pneumoniae* (110 mg Protein und 2,5 Einheiten Dioldehydrase enthaltend); 223 μmol (2*R*)-[1-³H₂]-Propan-1,2-diol (2,31 × 10⁷ Ipm/μmol); 100 μmol KCl; 156 mg β-Lysin-Mutase aus *Clostridium M-E* enthaltend sowohl das «orange protein» als auch «enzyme 2» in hochgereinigtem Zustand³⁾; 2000 μmol 2-Methylimidazol/HCl-Puffer (pH 8); 300 μmol Kaliumpyruvat; 0,3 μmol FAD; 50 μmol ATP-Na₂K; 80 μmol 1,4-Dimer-

³⁾ β-Lysine-Mutase aus *Clostridium sticklandii* und *Clostridium M-E* bilden dieselbe stereoisomere Form der 3,5-Diaminohexansäure.

capto-threitol; 50 μmol MgCl_2 ; 220 μmol (3*S*)- β -Lysin \cdot H_2SO_4 ; 0,5 μmol (5,6-Dimethylbenzimidazolyl)-Co-5'-deoxyadenosylcobamid (Totalvolumen 13,07 ml); Reaktionstemperatur 35°; Reaktionsdauer 4 Std.; unter H_2 und Lichtausschluss. Nach Abkühlen auf 0° wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 1,2M Perchlorsäure abgebrochen und die zentrifugierte Lösung mit 1 ml 1,2M KOH neutralisiert. Chromatographie an Dowex-50 (H^+ -Form) lieferte zwei Fraktionen. Aus der ersten Fraktion wurden nach Dünnschichtchromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/25\% \text{NH}_3$ in H_2O 40:40:7,5:7,5) 20 mg β -Lysin (spezifische Radioaktivität 2770 Ipm/ μmol) erhalten, welches mit 40 mg β -Lysin verdünnt und nochmals chromatographiert wurde (50 mg, 890 Ipm/ μmol). Aus der zweiten Dowex-50-Fraktion wurden auf ähnliche Weise nochmals 8 mg β -Lysin erhalten, welches auf eine spezifische Radioaktivität von 352 Ipm/ μmol verdünnt wurde (42 mg). Aus dieser Fraktion wurden ebenfalls etwa 4 mg 3,5-Diaminohexansäure mit einer totalen Radioaktivität von 150000 Ipm erhalten.

Oxydation mit Kaliumpermanganat des enzymatisch tritierten β -Lysins. Eine enzymatisch tritierte Probe von (3*S*)- β -Lysin wurde mit inaktivem Träger auf 32,4 Ipm/ μmol verdünnt (der entsprechende *N,N'*-Dibenzoylmethylester zeigte demgegenüber eine spezifische Radioaktivität von 70,6 Ipm/ μmol)²). 192 mg der verdünnten Probe wurden in 28 ml Wasser gelöst, unter starkem Rühren mit 1,23 g Kaliumpermanganat versetzt und 3 Std. bei 80° reagieren lassen. Nach Abkühlen wurde die braune Mischung tropfenweise bis zur Entfärbung mit Natriumhydrogensulfid versetzt, die entstandene leicht gelbliche Lösung mit 1N H_2SO_4 angesäuert und nach Sättigung mit Ammoniumsulfat 18 Std. mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wurde getrocknet, eingedampft und das Rohprodukt an Dowex-1 mit 1,1M Ameisensäure als Eluiermittel chromatographiert. Umkristallisation aus Wasser ergab 15,5 mg [^3H]-Bernsteinsäure mit einer spezifischen Radioaktivität von 70,2 Ipm/ μmol .

**N,N'*-Dibenzoyl-(3*S*)- β -lysinmethylester.* 40 mg (3*S*)- β -Lysin wurden in 2,2 ml 1N NaOH gelöst im Eisbad gekühlt und 1 Std. bei 0° unter Rühren mit 164 mg Benzoylchlorid reagieren lassen. Nach Ansäuern mit 2N HCl wurde der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat eingedampft, der Rückstand in abs. Äthanol aufgenommen und das Ungelöste abgetrennt. Das Filtrat wurde wiederum eingedampft und der farblose Rückstand zusammen mit dem ersten Niederschlag 6 Std. i.HV. getrocknet. Die Lösung der vereinigten Niederschläge in 10 ml abs. Äthanol wurde bis zur bleibenden Gelbfärbung mit einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt. Das getrocknete Rohprodukt wurde an 20 g Silicagel (unter 0,08 mm) im System Chloroform/Aceton 2:1 chromatographiert. Es resultierten 35 mg eines farblosen Produktes mit Smp. 148–150°. $[\alpha]_D^{25} = -33,6^\circ$ ($c = 0,905$, CHCl_3). - $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 1,72 (*m*, 4 H); 2,63 (*d*, *J* = 6, 2 H); 3,49 (*m*, 2 H); 3,67 (*s*, 3 H); 4,52 (*m*, 1 H); 6,98 (*m*, 2 H); 7,34 (*m*, 6 H); 7,78 (*m*, 4 H). - MS.: u. a. *m/e* 368 (5, M^+), 337 (2), 263 (9), 246 (14), 234 (3), 174 (4), 163 (3), 148 (3), 142 (4), 134 (5), 122 (4), 105 (100), 77 (44), 69 (3), 57 (4), 51 (8), 43 (6), 41 (5), 28 (3), 18 (97).

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ Ber. C 68,46 H 6,57 N 7,60% Gef. C 68,22 H 6,44 N 7,71%

Enzymatische Oxydation von tritierten Bernsteinsäure-Proben. Die folgenden Stammlösungen wurden bereitet: A) 0,1M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; B) 1M Kaliumphosphat ($\text{K}_2\text{HPO}_4:\text{KH}_2\text{PO}_4$ 9:1); C) 1M Äthylendiamintetraessigsäure-dikaliumsalz. 60 ml Lösung A, 100 ml Lösung B und 1 ml Lösung C wurden vermischt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Dies ergab die «Reaktionslösung», welche 6 mM an $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ war und bei 450 nm eine optische Dichte von ca. 1500 zeigte. Für die enzymatische Oxydation wurden Proben von [^3H]-Bernsteinsäuren (33–55 mg, spezifische Radioaktivität 40–200 Ipm/ μmol) in Erlenmeyer von 250 ml Inhalt eingewogen und mit der stöchiometrischen Menge der «Reaktionslösung» versetzt (für die Oxydation von 1 mol Bernsteinsäure werden zwei mol $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ benötigt). Nach Zugabe von 10 mg Serumalbumin wurde die Reaktion durch Zusatz von 15–20 Einheiten Succinatdehydrogenase (spezifische Aktivität 4–5 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) [19] gestartet und die Änderung der optischen Dichte bei 450 nm in einem Unicam-SP 1800 Spektrophotometer (Reaktionstemperatur 25°, Reaktionsdauer 20–25 Min.) verfolgt. Nachdem die optische Dichte auf 30% ihres Startwertes (etwa auf 0,450) gesunken war, wurden die Proben schnell auf 0° abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml 5N H_2SO_4 (0°) beendet. Nach Hinzufügen von ca. 25 g Ammoniumsulfat wurden die Proben mit Essigester im Kutscher-Steudel-Apparat 24 Std. extrahiert. Das erhaltene Gemisch von Bernsteinsäure, Fumarsäure und etwas Apfelsäure wurde durch Chromatographie an Dowex 1 (Formiat-Form) aufgetrennt und die Bernsteinsäuren noch aus Wasser umkristallisiert. Die Fumarsäuren wurden als Dimethylester durch Sublimation und Umkristallisation aus Äther/Pentan gereinigt. Die aus den Radioaktivitätsmessungen hervorgegangenen Resultate sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *F. Kunz, J. Rétey, D. Arigoni, L. Tsai & T. C. Stadtman*, *Helv.* 61, 1139 (1978).
- [2] *S. L. Hong & H. A. Barker*, *J. biol. Chemistry* 248, 41 (1973).
- [3] *J. J. Baker, C. van der Drift & T. C. Stadtman*, *Biochemistry* 12, 1054 (1973).
- [4] *T. C. Stadtman & P. Renz*, *Archiv. Biochemistry Biophysics* 125, 226 (1968).
- [5] *P. A. Frey & R. H. Abeles*, *J. biol. Chemistry* 241, 2732 (1966).
- [6] *J. Rétey & D. Arigoni*, *Experientia* 22, 783 (1966); *G. J. Cardinale & R. H. Abeles*, *Biochim. biophys. Acta* 132, 517 (1967).
- [7] *R. H. Abeles & W. S. Beck*, *J. biol. Chemistry* 242, 3589 (1967); *H. P. C. Hogenkamp, R. K. Ghambeer, C. Brownson, R. L. Blakely & E. Vitols*, *J. biol. Chemistry* 243, 799 (1968).
- [8] *B. Babior*, *Biochim. biophys. Acta* 167, 456 (1968).
- [9] *R. L. Switzer, B. G. Baltimore & H. A. Barker*, *J. biol. Chemistry* 244, 5263 (1969).
- [10] *C. G. D. Morely & T. C. Stadtman*, *Biochemistry* 10, 2325 (1971).
- [11] *J. Rétey, F. Kunz, T. C. Stadtman & D. Arigoni*, *Experientia* 25, 801 (1969).
- [12] *R. N. Costilow, O. M. Rochovansky & H. A. Barker*, *J. biol. Chemistry* 241, 1573 (1966).
- [13] *L. Tsai & T. C. Stadtman*, *Archiv. Biochemistry Biophysics* 125, 210 (1968).
- [14] *T. P. Chirpich, V. Zappia, R. N. Costilow & H. A. Barker*, *J. biol. Chemistry* 245, 1778 (1970).
- [15] *R. C. Bray & T. C. Stadtman*, *J. biol. Chemistry* 243, 381 (1968).
- [16] *C. J. Collins* in *Adv. Physical org. Chemistry* (V. Gold, Editor) 2, 75 (1964).
- [17] *J. Rétey, J. Seibl, D. Arigoni, J. W. Cornforth, G. Ryback, W. P. Zeylemaker & C. Veeger*, *European J. Biochemistry* 14, 232 (1970).
- [18] *W. P. Zeylemaker, C. Veeger, F. Kunz, J. Rétey & D. Arigoni*, *Chimia* 24, 33 (1970).
- [19] *W. P. Zeylemaker, D. V. Der Vartanian, C. Veeger & E. C. Slater*, *Biochim. biophys. Acta* 178, 213 (1969); *C. Veeger, D. V. Der Vartanian & W. P. Zeylemaker*, «*Methods in Enzymology*» (S. P. Colowick & N. O. Kaplan, Editors), XIII, 81 (1969).
- [20] *F. Kunz*, Dissertation Nr. 4519, ETH Zürich 1970.
- [21] *E. E. van Tamelen & E. E. Smismán*, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 2031 (1953).
- [22] *E. Fischer & F. Schlotterbeck*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 37, 2357 (1904).
- [23] *H. A. Lee, Jr. & R. H. Abeles*, *J. biol. Chemistry* 238, 2367 (1963).
- [24] *E. Huff & H. Rudney*, *J. biol. Chemistry* 234, 1060 (1959).
- [25] *T. C. Stadtman*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 112, 728 (1964).
- [26] *E. Wiesenberger*, *Mikrochim. Acta* 33, 51 (1948).