

Bei der Dehydrierung ist dabei die Carboxylgruppe und damit ein Kohlenstoffatom der Isopropylkette abgespalten worden. Die übrigen vier Sauerstofffunktionen (2 OH, 1 C=O, und ein O aus dem Lactonring) müßten sich auf die Kohlenstoffatome 2, 3, 5, 6 oder 8 verteilen; von diesen kann also im Hexahydrolactucin nur eines als CH₂-Gruppe vorliegen. Da nun im Molekül keine benachbarten OH-Gruppen gefunden wurden und nach dem IR-Spektrum die C=O-Gruppe nicht im Fünfering sitzt, muß letzterer die CH₂- und eine OH-Gruppe enthalten. Ob nun die CH₂-Gruppe den Atomen 2 oder 3 entspricht, läßt sich durch oxydativen Abbau klären. Bei diesem erhielt man neben mittels Hochvoltelektrophorese nachgewiesener Methylmalonsäure und anderen Säuren Methylbernsteinsäure⁴. Da sonst keine CH₂-Gruppen im Molekül vorhanden sind, stammt die CH₂-Gruppe der Säure aus der des Fünferings, wobei die Methylgruppe der Säure dem Methyl am C₁ entspricht. Man muß daher am C₃ eine OH-Gruppe annehmen.

Das Dehydrierungsprodukt Chamazulen läßt ferner darauf schließen, daß der Lactonring von C₇ ausgeht, wobei die veresterte Hydroxylgruppe wahrscheinlich am C₆ sitzt. Für die Carbonyl- und die zweite Hydroxylgruppe bleiben also nur noch die C-Atome 5 und 8.

Dem Vorstand unseres Instituts, Herrn Prof. Dr. *F. Wessely*, möchten wir an dieser Stelle herzlichst für seine vielen Anregungen und sein förderndes Interesse danken.

Nachweis einer enzymatischen Transäthylierung

(Kurze Mitteilung)

Von

H. Tuppy und K. Dus

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 11. April 1958)

In Gegenwart eines Schweineleber-Homogenats findet eine Übertragung der Äthylgruppe des Äthionins auf Glycocyamin statt. Das entstehende N-Äthylglycocyamin wurde sowohl als solches papierchromatographisch nachgewiesen als auch nach Ringschluß in Form von N-Äthylglycocyamidin.

Die von *Dyer*¹ entdeckte und seither vielfach untersuchte toxische Wirkung des Äthionins ist nach allgemeiner Auffassung dadurch erklärlich, daß Äthionin sich gegenüber Methionin als spezifischer Antagonist verhält. Es hemmt den Einbau des Methionins in Proteine und wird selbst

¹ *H. M. Dyer*, J. Biol. Chem. **124**, 519 (1938).

an dessen Stelle eingebaut, wodurch abnormale Proteine entstehen². Auch die Funktion des Methionins als Methylgruppen-Donator ist in Gegenwart von Äthionin beeinträchtigt³. Die Frage, ob im Rahmen der Wirkung des Äthionins auch dessen Äthylgruppe in einem der Transmethylierung analogen Vorgang auf Acceptoren übertragen wird, ist bisher nicht mit Sicherheit in positivem Sinne beantwortet⁴. Für eine Transäthylierung in vivo sprechen Versuche von *Stekol* und *Weiss*⁵: Diese injizierten Ratten Äthionin, dessen Äthylgruppe mit ¹⁴C markiert war, und stellten fest, daß jene aus den Geweben isolierten Basen-Fractionen radioaktiv waren, die Cholin und Kreatin und möglicherweise deren Äthylhomologe enthielten. Da diese Fractionen jedoch chemisch nicht näher untersucht wurden, blieb es ungewiß, ob die markierte Äthylgruppe des Äthionins unverändert übertragen worden oder ob der Radiokohlenstoff nach Abbau der Äthylgruppe in anderer Form in die Basenfraction gelangt war.

Im folgenden wird ein direkter Nachweis einer Transäthylierung beschrieben. In Schweineleber-Homogenat findet in Gegenwart von Adenosintriphosphat eine Übertragung der Äthylgruppe des Äthionins auf Glycoeyamin statt, wobei N-Äthylglycoeyamin („Negmin“⁶), das Äthylhomologe des Kreatins, entsteht. Aus Negmin bildet sich bei Erhitzen in saurer Lösung durch Cyclisierung N-Äthylglycoeyamidin („Negmidin“), das sich aus dem Versuchsansatz durch Adsorption an Frankonit KL* abtrennen und nach Elution papierchromatographisch identifizieren läßt. Auch das Negmin selbst kann chromatographisch nachgewiesen werden.

Der Österreichischen Akademie der Wissenschaften wird für die Gewährung einer Subvention aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung bestens gedankt.

Experimenteller Teil

Zusammensetzung der Inkubationsmischung: 30 ml Leberhomogenat (1 Teil frische Schweineleber in einem Glashomogenisator mit 3 Teilen eines m/15-Phosphatpuffers von pH 7,4, der 0,72% NaCl und 0,79% MgSO₄ · 7 H₂O enthält, homogenisiert), 25 ml m/15-Phosphatpuffer (pH 7,4), 10 ml m/100-Äthio-

² *M. V. Simpson, E. Farber und H. Tarver, J. Biol. Chem.* **182**, 81 (1950); *M. Levine und H. Tarver, ibid.* **192**, 835 (1951); *D. Gross und H. Tarver, ibid.* **217**, 169 (1955); *M. Rabinovitz, M. E. Olson und D. M. Greenberg, ibid.* **227**, 217 (1957).

³ *F. Simmonds, E. B. Keller, J. P. Chandler und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem.* **183**, 191 (1950).

⁴ *M. E. Swendseid, A. L. Swanson und F. H. Bethell, J. Biol. Chem.* **201**, 803 (1953).

⁵ *J. A. Stekol, K. Weiss und S. Weiss, J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2309 (1950); *J. A. Stekol und K. Weiss, J. Biol. Chem.* **185**, 577 (1950).

⁶ *A. H. Ennor, H. Rosenberg und M. D. Armstrong, Nature* **175**, 120 (1955).

* Für die freundliche Überlassung von Frankonit KL danken wir der Firma Pfirschingen Mineralwerke, Kitzingen am Main.

nin, 20 ml m/1000-Glycoeyamin, 5 ml m/50-Adenosintriphosphat (frisch bereitet) und 10 ml m/1000-Fumarsäure. Magnesiumsalz, Adenosintriphosphat und die Fumarsäure, die im Leberhomogenat in Gegenwart von Sauerstoff Adenosintriphosphat nachbilden kann, sind in die Inkubationsmischung aufgenommen worden, weil bekannt ist, daß Mg^{2+} und ATP bei enzymatischen Transmethylierungen erforderlich sind⁷.

Inkubation und Aufarbeitung des Versuchsansatzes: Die Mischung wurde 1 Std. bei 37° unter Luftdurchsaugen inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion durch Zusatz von 75 ml einer 20%igen Trichloressigsäurelösung, Abzentrifugieren des gefällten Proteins und Waschen des Niederschlags mit 75 ml 5%iger Trichloressigsäure wurden die vereinigten überstehenden Lösungen, deren pH 0,6 betrug, 20 Min. im Druckautoklaven bei 2 atü gehalten; unter diesen Bedingungen⁸ entstehen quantitativ aus Kreatin Kreatinin und aus Negmin Negmidin; der Ringschluß wurde vorgenommen, weil für die Isolierung von Kreatinin und Negmidin eine geeignete Methode zur Verfügung stand, nicht jedoch für eine Abtrennung der nichtcyclisierten Verbindungen.

Kreatinin läßt sich aus saurer Lösung an *Lloyds* Reagens⁹ oder an Frankonit KL¹⁰ adsorbieren. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß 1 g Frankonit KL aus n/10-HCl-Lösung nicht nur bis zu 5 mg Kreatinin, sondern auch ebensoviel Negmidin quantitativ aufnehmen kann. Auf Grund dieser Vorversuche wurde die autoklavierte trichloressigsäure Lösung mit 1 g Frankonit KL versetzt, 20 Min. gerührt und sodann zentrifugiert. Der mit Kreatinin und Negmidin beladene Frankonit wurde anschließend zweimal mit je 50 ml n/20-HCl und dreimal mit je 50 ml Wasser gewaschen.

Da für eine Isolierung von Kreatinin und Negmidin aus dem Adsorbens die bei der quantitativen kolorimetrischen Bestimmung von Kreatinin bewährte Aufarbeitung mit alkalischer Pikratlösung⁹ nicht in Frage kam, mußte eine andere Elutionsmethode gesucht werden. Vorversuche ergaben, daß man sowohl Kreatinin als auch Negmidin mit 8%igem wäbr. Ammoniak oder mit 50%igem wäbr. Pyridin quantitativ wieder vom Frankonit ablösen kann. Der beladene Frankonit KL wurde daher zweimal mit je 15 ml 8%igem NH_3 behandelt; die goldgelben Eluate wurden vereinigt, im Exsikkator über Schwefelsäure von Ammoniak befreit und zur Trockne gebracht. Der feste Rückstand wog 93 mg; er enthielt neben Kreatinin und Negmidin, von denen insgesamt nur etwa 50 bis 100 μg zu erwarten waren, noch große Mengen von Begleitstoffen, vor allem von Salzen. Eine teilweise Abtrennung gelang durch zweimaliges Ausziehen des Rückstandes mit je 9 ml kaltem absol. Äthylalkohol, in dem Kreatinin und Negmidin löslich sind, nicht jedoch viele Salze. Die vereinigten alkohol. Lösungen hinterließen 16 mg Trockensubstanz.

Papierchromatographischer Nachweis von Negmidin: Durch eindimensionale absteigende Chromatographie auf Whatmanpapier Nr. 4 lassen sich mit wassergesättigtem n-Butanol als Lösungsmittel Kreatinin (R_F 0,22) und Negmidin (R_F 0,39) klar voneinander trennen, während Glycoeyamidin den gleichen R_F -Wert zeigt wie Kreatinin. Zum Nachweis wird nach Entfernung des Lösungsmittels zuerst mit 1%iger alkohol. Pikrinsäurelösung und nach Trocknen

⁷ H. Borsook und J. W. Dubnoff, J. Biol. Chem. **171**, 363 (1947); G. L. Cantoni, J. Biol. Chem. **189**, 203 (1951); S. Cohen, ibid. **201**, 93 (1953).

⁸ O. Folin und H. Wu, J. Biol. Chem. **38**, 98 (1919).

⁹ H. Borsook, J. Biol. Chem. **110**, 481 (1935).

¹⁰ H. K. Barrenscheen und T. v. Valyi-Nagy, Z. physiol. Chem. **277**, 97 (1943).

bei Zimmertemp. mit 5%iger alkohol. Kalilauge gleichmäßig besprüht¹¹; Glycoeyamidin, Kreatinin und Negmidin geben in Mengen von je 5 µg kräftige orangegefärbte Flecke auf gelbem Grund.

Zur Identifizierung des Negmidins im Alkoholextrakt wurden von den insgesamt 16 mg Trockensubstanz je Chromatographie 1,7 mg eingesetzt. Um gute Trenneffekte zu erzielen, dehnten wir die chromatographische Entwicklung auf 15 Stdn. aus; das Lösungsmittel hatte dann die untere Kante des Papiers erreicht und tropfte von dieser ab. Bei der anschließenden Farbreaktion erschien neben einem sehr starken Fleck mit dem R_F -Wert von Glycoeyamidin und Kreatinin ein schwächerer, aber noch sehr deutlicher mit dem R_F -Wert des Negmidins.

Papierchromatographischer Nachweis von Negmin: Die Feststellung des Negmidins ließ sich auch so durchführen, daß es durch Einwirkung von Alkali wieder zu Negmin aufgespalten und letzteres papierchromatographisch identifiziert wurde. 2,4 mg Alkoholextrakt wurden in einem Tropfen n/10-NaOH gelöst und 22 Stdn., in eine Glaskapillare eingeschmolzen, bei 38° inkubiert. Die Lösung wurde eingedunstet, der Rückstand auf Whatmanpapier Nr. 4 mit wassergesättigtem Butanol 24 Stdn. chromatographiert. Zum Nachweis diente die Farbreaktion mit α -Naphthol und Diacetyl¹¹: Besprühen mit 1%iger Lösung von α -Naphthol in alkohol. Natriumäthylatlösung (1 g Natriummetall auf 30 ml Äthanol), Trocknen bei Zimmertemp. und Besprengen mit 0,1%iger alkohol. Diacetylösung. Dabei entstand ein starker rosagefärbter Fleck mit dem R_F -Wert der zum Vergleich mitgelaufenen Proben von Kreatin und Glycoeyamin und ein zweiter schwächerer Fleck mit dem R_F -Wert des Negmins. Die zum Vergleich verwendeten Glycoeyamin-, Kreatin- und Negmin-Proben waren aus Glycoeyamidin, Kreatinin und Negmidin mit Hilfe der gleichen Alkali-Behandlung erhalten worden, der wir auch den Alkoholextrakt unterzogen hatten, und enthielten daher etwa gleich viel verunreinigende Salze wie die untersuchte Probe; auf diese Weise wurde der Tatsache Rechnung getragen, daß die Anwesenheit von Salzen den R_F -Wert beträchtlich verändern kann.

Kontrollversuch: In einem Versuchsansatz, der sich von dem beschriebenen Transäthylierungsexperiment nur dadurch unterschied, daß kein Äthionin zugesetzt worden war, konnte — erwartungsgemäß — Negmin bzw. Negmidin nicht gefunden werden.

Besprechung

Durch die Feststellung, daß aus Äthionin und Glycoeyamin in Gegenwart von Adenosintriphosphat unter der Einwirkung von Enzymen eines Leberhomogenats N-Äthylglycoeyamin entsteht, ist die Befähigung eines Säugetiergewebes zu einer Transäthylierung sicher erwiesen. Wenn Äthylhomologe normaler methylgruppenhaltiger Stoffwechselprodukte in Organismen in der Regel nicht auftreten, so mag dies weniger am Fehlen eines Mechanismus zur Übertragung von Äthylgruppen als daran liegen, daß natürlich vorkommende Äthylgruppen-Donatoren fehlen¹².

¹¹ H. Tuppy, Mh. Chem. **84**, 342 (1953).

¹² Als seltene Beispiele für ein natürliches Vorkommen von O- und N-Äthylverbindungen lassen sich im Pflanzenreich einige Aconitum-Alkaloide anführen.

Man muß nun auch ernstlich mit der Möglichkeit rechnen, daß zu der toxischen Wirkung des Äthionins abnormale Stoffwechselprodukte beitragen, die aus ihm durch Transäthylierung entstehen. Über eine schädigende Wirkung des Negmins ist unseres Wissens nichts bekannt; wohl aber hat sich das Triäthylcholin schon vor Jahren als akut toxisch und als wirksamer Cholin-Antagonist erwiesen¹³.

Der Mechanismus der Transäthylierung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Es ist aber anzunehmen, daß er dem der Transmethylierung analog ist und daß in beiden Fällen die gleichen Enzyme beteiligt sind: Eines, welches Methionin bzw. Äthionin unter Mitwirkung von ATP durch Umwandlung in eine Sulfoniumverbindung aktiviert¹⁴, und ein zweites, das die Alkylgruppe von der Sulfoniumverbindung auf den Acceptor, in unserem Falle auf Glycocyamin, überträgt¹⁵; beide Enzyme würden somit eine verhältnismäßig geringe Substratspezifität besitzen. Ein ähnlicher Mangel an Spezifität ist übrigens von *Ennor*, *Rosenberg* und *Armstrong*⁶ auch für die Kreatinphosphokinase beschrieben worden, welche imstande ist, Negmin zu einer dem Phosphagen homologen N-Äthylverbindung zu phosphorylieren.

¹³ A. S. Keston und S. B. Wortis, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **61**, 439 (1946).

¹⁴ G. L. Cantoni, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 2942 (1952).

¹⁵ G. L. Cantoni und P. J. Vignos, J. Biol. Chem. **209**, 647 (1954).