

Die biochemische Funktion des Biotins

Von Prof. Dr. F. LYNEN¹⁾, Dr. J. KNAPPE, Dipl.-Chem. E. LORCH, Dr. G. JÜTTING
und E. RINGELMANN

Max-Planck-Institut für Zellchemie, München, und Chemisches Laboratorium der Universität München,
Institut für Biochemie

Zu den wenigen Vitaminen, deren biochemische Funktion bisher ungeklärt war, gehört das Biotin. Es wurde nun gefunden, daß das Enzym β -Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase Biotin enthält und daß dieses mit der Wirkgruppe des Enzyms identisch ist. Durch Austauschversuche mit radioaktiv markierten Verbindungen konnte nachgewiesen werden, daß bei der Carboxylierung intermediär aktives CO_2 in Form einer CO_2 -Biotin-Enzym-Verbindung entsteht. Am CO_2 -Biotin als Modell ließ sich zeigen, daß das CO_2 mit der Biotin-Molekel an einem der beiden N-Atome zu einer allophan-säure-artigen Struktur verknüpft ist, was schließlich durch Synthese des Dimethyl-esters der CO_2 -Biotin-Verbindung bewiesen werden konnte.

Einleitung

Die Entdeckung von György, Kuhn und Wagner-Jauregg²⁾ im Jahr 1933, daß kristallisiertes Vitamin B₂ mit der von Warburg und Christian³⁾ aufgefundenen Wirkungsgruppe des gelben Oxydationsfermentes nahe verwandt ist, leitete einen neuen Abschnitt der Vitaminforschung ein. Sie führte zu der Erkenntnis, daß die Verwertung von Vitaminen zum Aufbau der Wirkungsgruppen von Enzymen ein biologisches Prinzip ist, das für fast alle wasserlöslichen Vitamine, wie Nicotinsäure-amid, Thiamin, Pyridoxin, Pantothersäure, p-Aminobenzoesäure bzw. Folsäure Gültigkeit hat. Zu den wenigen Ausnahmen, bei denen die biochemische Funktion noch ungeklärt war, gehört das Biotin, das Kögl⁴⁾ 1934 bei Untersuchungen über den Wuchsstoffbedarf von Hefezellen entdeckt und nach mühseligen Reinigungsoperationen aus Trockeneigeln kristallisiert hat. Daß diesem neuen Hefewuchsstoff die Funktion eines Vitamins für die höheren Tiere und den Menschen zukommt, ergab sich beim Studium einer Krankheit, die bei der Ernährung mit rohem Hühnereiweiß auftritt. Wenn man Ratten mit einer vollwertigen Diät ernährt, die als einzige Aminosäure-Quelle Hühnereiweiß enthält, so entwickelt sich im Verlauf weniger Wochen eine schwere ekzemartige Dermatitis mit Haarausfall⁵⁾, die man durch Zufuhr eines thermostabilen Faktors aus Hefe und Leber, den man Vitamin H nannte, heilen kann^{6, 7)}. György, Melville, Burk und Du Vigneaud⁸⁾ wiesen 1940 nach, daß dieses Vitamin H und Biotin identisch sind. Eakin, Snell und Williams⁹⁾ fanden schließlich, daß die schädliche Wirkung des rohen Hühnereiweißes auf das Protein Avidin zurückzuführen ist, das Biotin zu einem sehr stabilen Komplex bindet und auf diese Weise die Resorption des Vitamins im Magen-Darm-Trakt verhindert. Die nach Fütterung mit rohem Hühnereiweiß auftretende Krankheit ist somit nichts anderes als eine Biotin-Avitaminose.

Die chemische Konstitution des Biotins wurde in den Laboratorien Kögls und Du Vigneauds bearbeitet¹⁰⁾. 1942

konnten Melville, Moyer, Hofmann und Du Vigneaud¹¹⁾ die richtige Strukturformel (I) aufstellen, die kurz darauf durch die Synthese des Vitamins im Arbeitskreis von Folkers¹²⁾ sichergestellt wurde.

Den chemischen Untersuchungen am Biotin schlossen sich Arbeiten über den Wirkungsmechanismus des Vitamins an. Die Beobachtung, daß sich seine Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen teilweise durch Asparaginsäure und Ölsäure ersetzen läßt¹³⁾, waren die ersten Anhaltspunkte für die Beteiligung des Biotins an biosynthetischen Reaktionen. Die Aufmerksamkeit konzentrierte sich dann mehr und mehr auf Carboxylierungs- und Decarboxylierungs-Vorgänge. So fand man, daß Biotin sowohl die Carboxylierung des Pyruvats, die zur Bildung des Kohlenstoffgerüsts der Asparaginsäure führt¹³⁻¹⁵⁾, als auch die Decarboxylierung der Oxalessigsäure¹⁶⁾ stimuliert. Für diese Effekte könnte der erniedrigte malic-enzyme-Gehalt verantwortlich sein, den Ochoa und Mitarbeiter¹⁷⁾ in der Leber biotinfrei ernährter Truthähne feststellten. Da jedoch hoch gereinigte Präparate dieses Enzyms kein Biotin enthielten, vermutete Ochoa¹⁷⁾, daß das Vitamin zwar bei der Biosynthese des Enzyms eingreift, jedoch nicht als Coenzym der Carboxylierung wirkt.

Lardy und Mitarbeiter beschrieben weitere Enzymschäden bei Biotin-Mangel. Wie sie beobachteten, sind Lebern avitaminotischer Ratten kaum noch befähigt, Ornithin unter Aufnahme von CO_2 und NH_3 in Citrullin überzuführen¹⁸⁾ oder die Carboxylierung der Propionsäure zu Bernsteinsäure zu vollziehen^{19, 20)}. Der umgekehrte Vorgang, die Decarboxylierung von Bernsteinsäure zu Propionsäure durch Propionsäure-Bakterien, ist ebenfalls stark biotinabhängig²¹⁾. Außerdem wirkt sich ein Biotin-Mangel auch auf die CO_2 -Verwertung bei der Biosynthese der Purine aus^{22, 23)}.

¹¹⁾ D. B. Melville, A. W. Moyer, K. Hofmann u. V. Du Vigneaud, J. biol. Chemistry 146, 487 [1942].

¹²⁾ S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mozingo u. K. Folkers, Science [Washington] 97, 447 [1943]; S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mozingo, G. E. Arth, R. C. Anderson, N. R. Easton u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 67, 2096 [1945].

¹³⁾ H. A. Lardy, R. L. Potter u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry 169, 451 [1947].

¹⁴⁾ W. Shive u. L. L. Rogers, ebenda 169, 453 [1947].

¹⁵⁾ H. A. Lardy, R. L. Potter u. R. H. Burris, ebenda 179, 721 [1949].

¹⁶⁾ H. C. Lichstein u. W. W. Umbreit, ebenda 170, 329 [1947].

¹⁷⁾ S. Ochoa, A. Mehler, M. Blanchard, T. Jukes, C. Hoffmann u. M. Regan, J. biol. Chemistry 170, 413 [1947].

¹⁸⁾ P. R. MacLeod, S. Grisolia, P. P. Cohen u. H. A. Lardy, J. biol. Chemistry 180, 1003 [1949]; G. Feldott u. H. A. Lardy, ebenda 192, 447 [1951].

¹⁹⁾ H. A. Lardy u. R. Peanasky, Physiol. Rev. 33, 560 [1953].

²⁰⁾ H. A. Lardy u. J. Adler, J. biol. Chemistry 219, 933 [1956].

²¹⁾ E. H. Chambers u. E. A. Delwiche, J. Bacteriol. 68, 131 [1954].

²²⁾ P. R. MacLeod u. H. A. Lardy, J. biol. Chemistry 179, 733 [1949].

²³⁾ A. G. Moat, C. N. Wilkins, Jr. u. H. Friedman, ebenda 223, 985 [1956].

¹⁾ Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden von F. Lynen am 9. Februar 1959 in der Sitzung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse der Bayerischen Akademie der Wissenschaften vorgetragen und in den Sitzungsberichten der Akademie veröffentlicht.

²⁾ P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Naturwissenschaften 21, 560 [1933].

³⁾ O. Warburg u. W. Christian, Naturwissenschaften 20, 980 [1932]; Biochem. Z. 254, 438 [1932].

⁴⁾ F. Kögl, Ber. dtsh. chem. Ges. 68, A 16 [1935]; F. Kögl u. B. Tönis, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 242, 43 [1936].

⁵⁾ W. G. Baileman, J. biol. Chemistry 26, 263 [1916].

⁶⁾ M. A. Boas, Biochem. J. 21, 712 [1927].

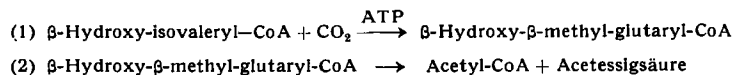
⁷⁾ P. György, Z. ärztl. Fortbildg. 28, 377, 417 [1931].

⁸⁾ P. György, D. B. Melville, D. Burk u. V. Du Vigneaud, Science [Washington] 91, 243 [1940].

⁹⁾ R. E. Eakin, E. E. Snell u. R. J. Williams, J. biol. Chemistry 176, 801 [1940]; 140, 535 [1941].

¹⁰⁾ Übersicht vgl. P. György in W. H. Sebrell, Jr. u. R. S. Harris: The Vitamins. Academic Press, New York 1954, Bd. I, S. 527.

Plaut und Lardy²⁴⁾ machten weiterhin die wichtige Beobachtung, daß in der Leber biotinfrei ernährter Ratten als Folge eines gestörten Leucin-Abbaus über Isovaleriansäure^{25, 26)} auch der Einbau markierter Kohlensäure in Acetessigsäure wesentlich erniedrigt ist. Leber-Mitochondrien aus avitaminotischen Tieren erwiesen sich als unfähig, Isovaleriansäure oder β -Methylcrotonsäure unter Fixierung von CO_2 in Acetessigsäure überzuführen²⁷⁾. In die Details dieses wichtigen Stoffwechselprozesses gaben die Untersuchungen Coons²⁸⁾ einen ersten Einblick. Er konnte zeigen, daß der biologische Abbau dieser Säuren über β -Hydroxy-isovaleryl-CoA²⁹⁾ führt, das unter Mitwirkung von ATP zu β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA carboxyliert wird (Gleichung 1) und dann durch Spaltung Acetyl-CoA neben Acetessigsäure liefert (Gleichung 2).

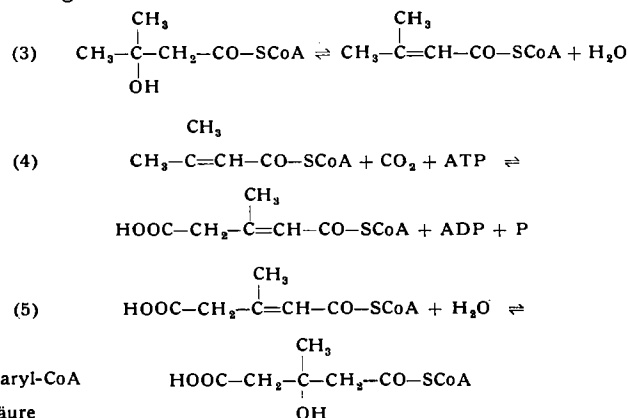


Die Untersuchung der Leberextrakte aus Biotinmangel-Ratten ergab, daß dort das carboxylierende Enzym fehlt³⁰⁾.

Entdeckung und Reinigung der β -Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase

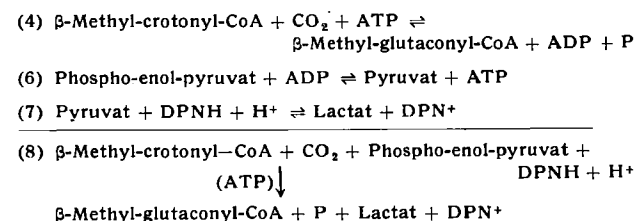
Von einer anderen Fragestellung ausgehend, haben wir seit einigen Jahren die biologischen Bildungsweisen von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA studiert^{31–33)} und beschäftigten uns dabei auch mit der von Coon und Mitarbeitern²⁸⁾ aufgefundenen Carboxylierungs-Reaktion. Für die Isolierung des beteiligten Enzyms wählten wir Bakterienzellen als Ausgangsmaterial, die auf Isovaleriansäure als einziger C-Quelle gezüchtet wurden. Sie waren von H. G. Schlegel aus einer Erdprobe im Wurzelbereich von *Valeriana officinalis* isoliert und als *Mycobacterium* spp. identifiziert worden. Unsere Erwartungen, daß zellfreie Extrakte dieser Bakterien, die ihren gesamten Energiebedarf durch Oxydation von Isovaleriansäure decken müssen, den von Coon studierten Leber- und Herzmuskel-Extrakten weit überlegen sind, wurden erfüllt. Bei der Bestimmung der Carboxylase-Aktivität erwiesen sich die rohen Bakterien-Extrakte bereits 50- bis 100-mal aktiver als die Organ-Extrakte³²⁾. Beim Studium der enzymatischen Fähigkeiten der Bakterien-Extrakte ergab sich, daß die Überführung von β -Hydroxy-isovaleryl-CoA in β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA komplizierter ist als die amerikanischen Forscher angaben und dabei drei Enzyme: Crotonase³⁴⁾, β -Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase³²⁾ und Methyl-glutac-nase³⁵⁾, beteiligt sind³¹⁾. Von diesen katalysiert das erste die Dehydratisierung der Hydroxysäure zur α,β -ungesättigten Säure (Gleichung 3), das zweite die Carboxylierung des gebildeten β -Methyl-crotonyl-CoA zu β -Methyl-glutaconyl-CoA in Gegenwart von ATP (Gleichung 4) und das dritte

die Wasser-Anlagerung an β -Methyl-glutaconyl-CoA unter Bildung von β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA (Gleichung 5).



Ein großer Vorzug des neuen Schemas war, daß nunmehr die Carboxylierungs-Reaktion chemisch verständlich wurde. Im β -Methyl-crotonyl-CoA liegt ein vinyloges Acetyl-CoA vor, dessen Methyl-Gruppe unter der Wirkung der Thioester-Gruppierung Kondensationen eingehen kann^{31, 36)}. Die enzymatische Carboxylierung des β -Methyl-crotonyl-CoA läßt sich somit mit der von Flavin³⁷⁾ entdeckten Carboxylierung des Propionyl-CoA zu Methyl-malonyl-CoA und der erst kürzlich aufgefundenen Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA^{38–40)} in einer Gruppe zusammenfassen. All diese Reaktionen haben die Einführung von CO_2 in die reaktive α -Stellung oder eine vinylhomologe α -Stellung des Acyl-CoA gemein³¹⁾. Die Analogie der Carboxylierung des β -Methyl-crotonyl-CoA zu der des Propionyl-CoA betrifft auch die Beteiligung von ATP, das als Energiequelle für beide Prozesse unentbehrlich ist und im Verlauf der Reaktion zu ADP und Orthophosphat aufgespalten wird^{32, 41, 42)}. Auch die enzymatische Carboxylierung des Acetyl-CoA erfordert ATP; hier steht die einwandfreie Identifizierung der Spaltprodukte jedoch noch aus^{38, 40)}.

Die Bildung von ADP bei der Carboxylierung von β -Methyl-crotonyl-CoA ermöglichte es, das beteiligte Enzym in einem zusammengesetzten optischen Test nach Warburg⁴³⁾ zu bestimmen. Dazu koppelten wir die Carboxylase mit Pyruvatkinase (Gleichung 6) und Milchsäure-Dehydrogenase (Gleichung 7) und bestimmten den Verbrauch an DPNH durch Messung der Lichtabsorption bei 366 m μ . Wie sich aus der Bilanz des ganzen Vorganges ergibt (Gleichung 8), wird im zusammengesetzten System je Molekel gebildeten β -Methylglutaconyl-CoA eine Molekel DPNH verbraucht.



In Abb. 1 sind Versuche mit verschiedenen Mengen des carboxylierenden Enzyms wiedergegeben. Wie man sieht,

²⁴⁾ G. W. E. Plaut u. H. A. Lardy, ebenda 186, 705 [1950].

²⁵⁾ M. J. Coon u. S. Gurin, J. biol. Chemistry 180, 1159 [1949].

²⁶⁾ M. J. Coon, ebenda 187, 71 [1950].

²⁷⁾ J. E. Fischer, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 88, 227 [1955].

²⁸⁾ B. K. Bachhawat, W. G. Robinson u. M. J. Coon, J. Amer. chem. Soc. 76, 3098 [1954]; J. biol. Chemistry 279, 539 [1956].

²⁹⁾ In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen benutzt: S-Acyl-CoenzymA-Derivate = Acyl-SCoA oder Acyl-CoA; β -Methyl-crotonyl-CoA = β -MC-CoA; Adenosintriphosphat = ATP oder ADP-P; Adenosindiphosphat = ADP; Orthophosphat = P; Diphospho-pyridin-nucleotid = DPN⁺; reduziertes Diphospho-pyridin-nucleotid = DPNH; Phospho-enol-pyruvat = PEP; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan = Tris.

³⁰⁾ J. F. Woessner, jr., B. K. Bachhawat u. M. J. Coon, J. biol. Chemistry 233, 520 [1958].

³¹⁾ F. Lynen: Proc. International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957. Maruzen, Tokyo 1958, S. 57.

³²⁾ J. Knappe, Dissertation Univers. München, 1957.

³³⁾ F. Lynen, U. Henning, C. Bublitz, B. Sörbo u. L. Kröplin-Rueff, Biochem. Z. 330, 269 [1958].

³⁴⁾ J. R. Stern in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1955, Bd. I, S. 559.

³⁵⁾ H. Hitz, J. Knappe, E. Ringelmann u. F. Lynen, Biochem. Z. 329, 476 [1958].

³⁶⁾ F. Lynen, Federation Proc. 12, 683 [1953].

³⁷⁾ M. Flavin, Federation Proc. 14, 211 [1955]; M. Flavin, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, Nature [London] 176, 823 [1955].

³⁸⁾ S. J. Wakil, J. Amer. chem. Soc. 80, 6465 [1958].

³⁹⁾ J. V. Formica u. R. Brady, ebenda 81, 752 [1959].

⁴⁰⁾ F. Lynen, J. cellular comparat. Physiol., im Druck.

⁴¹⁾ M. Flavin, H. Castro-Mendoza u. S. Ochoa, Biochim. biophysica Acta 20, 591 [1956].

⁴²⁾ A. Tietz u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 234, 1394 [1959].

⁴³⁾ O. Warburg: Wasserstoffübertragende Fermente, Dr. Werner Saenger GmbH., Berlin 1948.

ist der DPNH-Verbrauch dem Carboxylase-Zusatz direkt proportional. Mit dieser einfachen und vor allem in kurzer Zeit auszuführenden Bestimmung konnte die Reinigung der Carboxylase verfolgt werden. Wir trennten die Haupt-

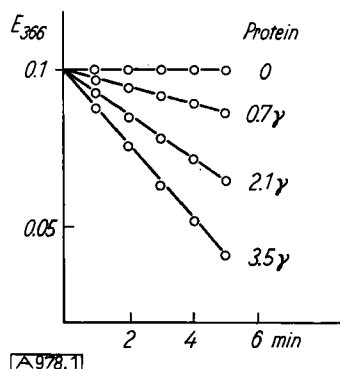


Abb. 1. Optische Bestimmung der β -Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase. Die Glasküvette, $d = 1$ cm, enthielt 280 μ M Triäthanolamin-HCl-Puffer (p_H 7,4), 160 μ M KCl, 40 μ M $MgSO_4$, 10 μ M $KHCO_3$, 1 mg Serumalbumin, 1,35 μ M K-Phosphoenol-pyruvat, 0,3 μ M DPNH, 0,1 μ M β -Methyl-crotonyl-CoA, 10 γ Pyruvatkinase, 25 γ Milchsäuredehydrogenase und die in der Figur angegebenen Mengen Carboxylase-Protein im Gesamtvolumen 1,65 ml. $T = 20^\circ C$. Die Änderung der Extinktion (E) bei 366 m μ wurde gegen eine Vergleichsküvette gemessen, die alle Zusätze außer β -Methyl-crotonyl-CoA enthielt

menge der Nucleinsäuren, die das Enzym im rohen Bakterien-Extrakt begleiten, mit $MnCl_2$ ab und erzielten durch Anwendung der modernen Verfahren der Protein-Chromatographie mit guter Ausbeute eine 180-fache Anreicherung des Enzyms (Tabelle 1).

Unter Verwendung des hochgereinigten Enzyms ließ sich nachweisen, daß die Reaktion vom Enzym reversibel geleitet wird und die Spaltung von β -Methyl-glutaconyl-CoA zu β -Methyl-crotonyl-CoA und CO_2 mit der Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat verknüpft ist⁴⁰). Dieser wichtige Befund offenbart, daß gewisse Decarboxylierungs-Vorgänge in der Zelle Energie zum Aufbau der energiereichen Pyrophosphat-Bindung bereitstellen können und somit die Reihe der ATP erzeugenden Reaktionen des Zellstoffwechsels um einen neuen Typ erweitert werden muß (vgl. auch⁴²)).

	Protein [mg]	Enzym-Einh.* $\times 10^{-3}$	Spez. Akt.	Ausbeute [%]
Extrakt	5470	116,4	21	100
1. $(NH_4)_2SO_4$ -Fraktionierung (0,25–0,60)	3600	112,5	31	97
Überstand $MnCl_2$ -Fällung	1840	92,1	50	79
2. $(NH_4)_2SO_4$ -Fraktionierung (0,38–0,50)	660	87,8	130	75
Chromatographie an DEAE-Cellulose ..	106	52,8	500	45
Chromatographie an Hydroxylapatit ..	11,5	42,4	3700	36

* 1 Enzym-Einheit ist diejenige Menge Enzym, die im optischen Test (vgl. Abb. 1) die Extinktionsänderung $\Delta E_{366 \text{ m}\mu} = 0,001/\text{min}$ bewirkt.

Tabelle 1. Reinigung der β -Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase aus *Mycobacterium spp.* Ausgangsmaterial: 100 g Bakterienmasse (feucht), die nach Suspensidieren in 100 ml m/20 Trispuffer, p_H 7,4, im mechanischen Zellschredder mit Glasperlen zertrümmert wurde

Biotin, die Wirkungsgruppe der Carboxylase

Die nächste Aufgabe bestand nun darin, die chemischen Umsetzungen aufzuklären, welche Decarboxylierung und ATP-Bildung oder, im umgekehrten Prozeß, ATP-Spaltung und Carboxylierung des β -Methyl-crotonyl-CoA miteinander verbinden. Die Vorstellung, daß ein aktives CO_2 ⁴⁴) beteiligt ist, war naheliegend. Kohlensäure-phosphat oder

⁴⁴) Den ersten experimentellen Anhaltspunkt für die Existenz eines aktiven CO_2 fanden E. A. Delwiche, E. F. Phares u. S. F. Carson, Federation Proc. 12, 194 [1953]; 73, 198 [1954], beim Studium der Decarboxylierung von Bernsteinsäure zu Propionsäure in mikrobiellen Systemen.

Kohlensäureadenylat, die Flavin⁴¹) bzw. Bachhawat⁴⁵) dafür vorschlugen, waren vom chemischen Standpunkt aus allerdings wenig befriedigend.

Wir haben nun gefunden, daß die von uns studierte Reaktion tatsächlich über ein aktives CO_2 führt, und zwar über ein Kohlensäure-Derivat des Biotins. Wir konnten zunächst durch Biotin-Bestimmungen beweisen, daß die Carboxylase ein Biotin-Proteid ist. Nicht nur, daß alle Enzympräparate Biotin enthielten, wie sich mit Hilfe des Hefewachstumstests⁴⁶) nach vorhergehender Säurehydrolyse nachweisen ließ, sondern es zeigte sich auch, daß im Verlauf der Enzym-Reinigung Enzym-Aktivität und Biotin-Gehalt im gleichen Verhältnis zunehmen (Abb. 2). In den bisher reinsten Präparaten trifft 1 Mol Biotin auf 344000 g Eiweiß; wenn man ein Molekulargewicht des Enzyms der Größenordnung 100000 und ein Biotin:Enzym-Verhältnis von 1:1 annimmt, so wäre daraus zu folgern, daß der Reinheitsgrad unserer besten Präparate bereits bei 30% liegt.

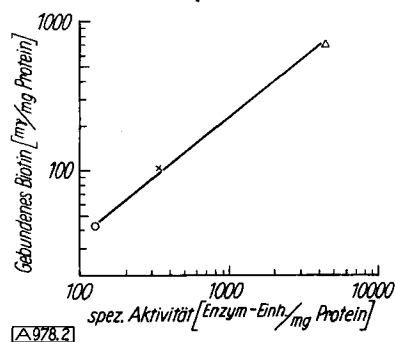


Abb. 2. Proportionalität zwischen Biotin-Gehalt und spezifischer Aktivität der β -Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase. Die Carboxylase-Präparate stammten aus der zweiten Ammoniumsulfat-Fraktionierung (O), der Chromatographie an DEAE-Cellulose (x) oder an Hydroxylapatit (Δ) (vgl. Tabelle 1).

Versuche, das Vitamin reversibel vom Protein abzutrennen, blieben erfolglos. Ein keineswegs überraschendes Ergebnis, denn es ist bekannt, daß Biotin in biologischen Materialien fast ausschließlich in gebundener Form vorkommt und erst beim proteolytischen Abbau freigesetzt wird¹⁰). Wir nehmen deshalb an, daß das Biotin im Enzym über seine Carboxyl-Gruppe amidartig am Eiweiß verankert ist.

Die Identität des Biotins mit der Wirkungsgruppe der Carboxylase gibt sich in der spezifischen Enzymhemmung durch Avidin zu erkennen⁴⁷). Wie der in Abb. 3 wiedergegebene optische Ver-

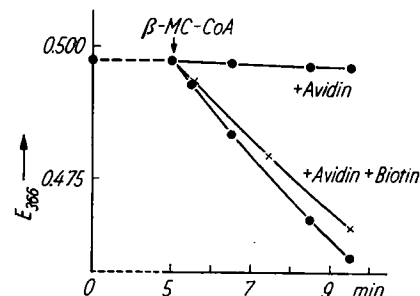


Abb. 3. Enzymhemmung durch Avidin. Ausführung der Versuche vgl. Legende zu Abb. 1. Das Gesamtvolumen betrug 1,8 ml mit 15 γ Carboxylase-Protein (spez. Akt. 700) und eventuell 0,65 Einheiten^{*)} Avidin⁴⁸) bzw. 10 μ M (+)-Biotin. An der durch den Pfeil gekennzeichneten Stelle wurde 0,1 μ M β -Methyl-crotonyl-CoA zugesetzt.

⁴⁶) M. J. Coon, Federation Proc. 14, 762 [1955]; B. K. Bachhawat u. M. J. Coon, J. Amer. chem. Soc. 79, 1505 [1957].

⁴⁷) H. C. Lichtstein, J. biol. Chemistry 272, 217 [1955]; Federation Proc. 16, 211 [1957].

⁴⁸) Von der Möglichkeit, die Beteiligung des Biotins bei enzymatischen Reaktionen durch Hemmungsversuche mit Avidin nachzuweisen, haben erstmalig G. E. Wessman u. C. H. Werkman, Arch. Biochem. Biophysics 26, 214 [1950], Gebrauch gemacht.

⁴⁹) Avidin wurde aus Hühnerweiß nach der Vorschrift von D. W. Woolley u. L. G. Longworth, J. biol. Chemistry 142, 285 [1942], isoliert.

sich zeigt, läßt sich die Carboxylierung von β -Methylcrotonyl-CoA durch ein gereinigtes Avidin-Präparat aus Hühnereiweiß fast vollständig hemmen. Setzt man dem Reaktionsansatz jedoch gleichzeitig etwas freies Biotin zu, so findet man praktisch die gleiche Aktivität wie in der avidin-freien Kontrolle: Das Avidin wird durch das freie Biotin abgesättigt und kann das gebundene Biotin der Carboxylase nicht mehr blockieren. Damit steht aber die Wirkungsgruppe des Enzyms der Katalyse wieder voll zur Verfügung.

Die katalytische Funktion des Biotins

Einen detaillierteren Einblick in die Biotin-Katalyse geben Versuche mit radioaktiven Verbindungen. Wie wir fanden, wird beim Inkubieren der gereinigten Carboxylase mit Adenosin-triphosphat und $\text{H}^{32}\text{PO}_4^{2-}$ radioaktives Phosphat in ATP eingebaut (Abb. 4). Da die Austauschreaktion durch Avidin gehemmt werden kann, der Zusatz freien Biotins die Hemmung aber beseitigt, muß das Biotin des

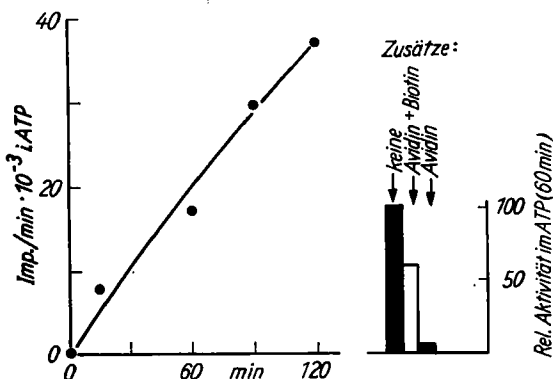
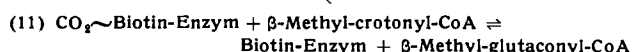
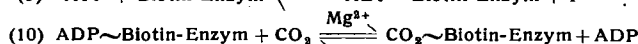
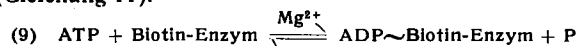
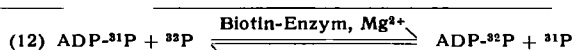
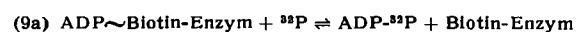
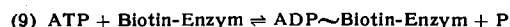


Abb. 4. Enzymatische Katalyse des ^{32}P -Einbaus in ATP. Die Reaktionsansätze, bestehend aus 90 μM Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH 7,2), 5 μM MgSO_4 , 2 μM $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ (375 000 Imp./min), 160 γ Carboxylase-Protein (spez. Akt. 380) und eventuell 3,25 Einheiten Avidin⁴⁸ bzw. 7 μM (+)-Biotin in einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden bei 37 °C inkubiert. Das im ATP eingebaute ^{32}P -Phosphat wurde nach der Vorschrift von Berg⁴⁹ bestimmt. Die linke Kurve stellt den zeitlichen Verlauf der ^{32}P -Inkorporation dar; rechts ist die relative Radioaktivität des ATP nach 1 h ohne Zusatz (= 100), mit Avidin und mit Avidin + Biotin wiedergegeben. Daß die Einbaureate im Versuch mit Avidin + Biotin den Wert des zuzusätz-freien Versuchs nicht erreicht, ist möglicherweise auf das in der Avidin-Stammförmung enthaltene HCO_3^- zurückzuführen (vgl. Abb. 5)

Enzyms auch an dieser Reaktion maßgeblich beteiligt sein. Wir nehmen daher an, daß zunächst aus ATP und Biotin-Enzym unter Abspaltung von Orthophosphat ein energiereiches ADP~Biotin-Enzym entsteht (Gleichung 9), das anschließend mit CO_2 bzw. Bicarbonat reagiert und unter Austausch des gebundenen ADP gegen CO_2 das aktive CO_2 -Biotin-Enzym liefert (Gleichung 10). Dieses überträgt dann im letzten Schritt Kohlendioxyd auf das Substrat unter Regeneration des freien Biotin-Enzyms (Gleichung 11).



Der enzymatische Einbau des radioaktiven Orthophosphats in das ATP (Gleichung 12) kommt über die reversible Reaktion 9 zustande. Das in der Hinreaktion gebildete ADP~Biotin-Enzym (Gleichung 9) wird in der Rückreaktion unter Aufnahme von radioaktivem Orthophosphat wieder gespalten (Gleichung 9a).



⁴⁸) P. Berg, J. biol. Chemistry 222, 991 [1956].

Die Existenz des CO_2 -Biotin-Enzym ließ sich auf zwei verschiedenen Wegen beweisen. Einmal wird die ^{32}P -Inkorporation in ATP durch Bicarbonat stark gehemmt (Abb. 5).

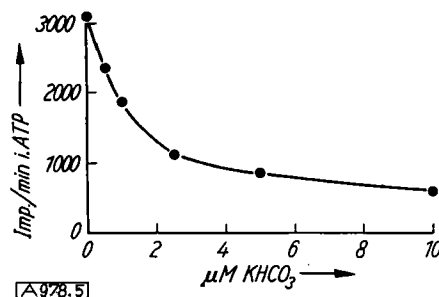
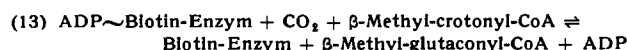


Abb. 5. Hemmung des ^{32}P -Einbaus durch Bicarbonat. 90 μM Triäthanolamin-HCl-Puffer (pH 7,2), 5 μM MgSO_4 , 2 μM ATP, 1 μM $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ (170 000 Imp./min), 90 γ Carboxylase-Protein (spez. Akt. 400) und KHCO_3 , wie auf der Abszisse angegeben, in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml, 60 min bei 37 °C inkubiert. ^{32}P -Einbau im ATP nach Berg⁴⁹ bestimmt

Unter diesen Bedingungen konkurrieren CO_2 und ^{32}P -Phosphat um das ADP~Biotin-Enzym (Gleichung 10 und 9a), wobei CO_2 Sieger bleibt. Schon $4 \cdot 10^{-5}$ m KHCO_3 hemmen die in $2 \cdot 10^{-3}$ m Phosphat studierte Austauschreaktion meßbar, weshalb wir annehmen, daß das Gleichgewicht des zweiten Reaktionsschrittes (Gleichung 10) weit nach der rechten Seite verschoben ist und folglich ADP~Biotin-Enzym energiereicher ist als CO_2 -Biotin-Enzym.

Den zweiten Beweis für die Existenz von CO_2 -Biotin-Enzym erbrachten Versuche mit 1,3,5- ^{14}C - β -Methylglutaconyl-CoA⁵⁰. Wurde diese Verbindung mit unmarkiertem β -Methylcrotonyl-CoA in Gegenwart der Carboxylase inkubiert, so entstand radioaktives β -Methylcrotonyl-CoA. Die Geschwindigkeit dieser Austauschreaktion, die durch den dritten reversiblen Teilschritt der Enzymkatalyse (Gleichung 11) erklärt werden kann, ist wesentlich größer als die des ATP- ^{32}P -Orthophosphat-Austauschs, was sich wiederum darauf zurückführen läßt, daß CO_2 -Biotin-Enzym energieärmer ist als ADP~Biotin-Enzym.

Im Gegensatz zum ATP-Orthophosphat-Austausch (Gleichung 9) erfolgt der Austausch zwischen β -Methylglutaconyl-CoA und β -Methylcrotonyl-CoA auch in Abwesenheit von Mg^{2+} . Im dritten Teilschritt der Enzymkatalyse ist das Metall-Ion also nicht mehr beteiligt. Daß hingegen der zweite Teilschritt (Gleichung 10) Mg^{2+} noch benötigt, ergab sich beim Studium des Einbaus von $^{14}\text{CO}_2$ in β -Methylglutaconyl-CoA über die Reaktionsfolge 13:



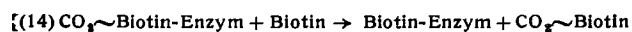
die Bilanz der Reaktionen 10 und 11. Übereinstimmend mit dieser Gleichung 13, stellten wir weiterhin fest, daß die Inkubation der gereinigten Carboxylase mit β -Methylglutaconyl-CoA, β -Methylcrotonyl-CoA, Mg^{2+} und $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ nur in Gegenwart von ADP zur $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung führt. Der Zusatz von Orthophosphat war in dieser Hinsicht wirkungslos, was sich als zweiter Beweis für die intermediäre Bildung von ADP~Biotin-Enzym heranziehen läßt. Die Umsetzung des ATP nach Gleichung 9, wobei ADP unter Eliminierung von Orthophosphat auf den Acceptor übertragen wird, ist neuartig. Sie stellt das seit längerem gesuchte Gegenstück zur Reaktionsweise der Kinasen dar, von denen unter ADP-Eliminierung Orthophosphat übertragen wird⁵¹.

⁵⁰) Zu seiner Darstellung wurde 1,3,5- ^{14}C - β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (vgl. F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, J. Knappe, I. Kessel u. E. Ringelmann: Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols. I. & A. Churchill Ltd., London 1959, S. 102) mit Methylglutaconase⁵² inkubiert.

⁵¹) Vgl. F. Lipmann in D. Richter: Metabolism of the Nervous System. Pergamon Press, London 1957, S. 329.

Das CO₂-Biotin

Nachdem die Austauschversuche überzeugende Beweise für die Existenz der aktiven Kohlensäure in Form des CO₂-Biotin-Enzyms erbracht hatten, galt es noch, die Bindungsweise des CO₂ an die Biotin-Molekel zu ergründen. Hierbei erwies uns die Carboxylase einen großen Gefallen. Sie kann nämlich im letzten Reaktionsschritt, der zur Synthese des β -Methyl-glutaconyl-CoA führt, an Stelle des natürlichen Substrats β -Methyl-crotonyl-CoA auch freies Biotin gemäß Gleichung 14 verwerten.



Wie die in Abb. 6 gezeigten Versuche belegen, verschwindet DPNH im optischen Enzymtest auch nach Zugabe von (+)-Biotin, allerdings wesentlich langsamer als nach Zugabe von β -Methyl-crotonyl-CoA. Zieht man noch in Betracht, daß in dieser Versuchsreihe die Biotin-Konzentration 300-mal größer war als die des β -Methyl-crotonyl-CoA,

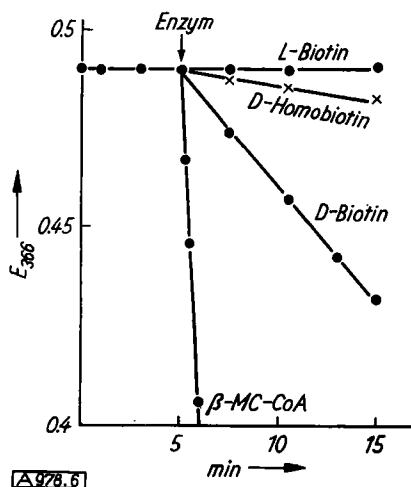


Abb. 6. Die enzymatische Carboxylierung von Biotin. Reaktionsansatz vgl. Legende zu Abb. 1. 200 γ Carboxylase-Protein (spez. Akt. 300), als Substrat 0,1 μ M β -Methyl-crotonyl-CoA bzw. 30 μ M (+)-Biotin, 30 μ M (–)-Biotin oder 30 μ M (+)-Homobiotin. Gesamtvolumen 1,8 ml; T = 37 °C

so wird die weit überlegene Stellung des natürlichen Substrats deutlich. Für entscheidend halten wir jedoch die hohe Spezifität der Reaktion mit Biotin. Wie die Prüfung verschiedener Verbindungen ergab, sind das schwefel-freie Desthio-biotin¹⁰⁾, die durch Hydrolyse des Harnstoff-Rings aus (+)-Biotin erhältliche Diamino-carbonsäure¹⁰⁾ und vor allem (–)-Biotin, der Antipode des natürlichen Vitamins, völlig wirkungslos. Nur mit Biocytin⁵⁸⁾, mit (+)-Homobiotin und (+)-Norbiotin fanden wir eine, allerdings geringere, Reaktion. Bei der Umsetzung des (+)-Biotins handelt es sich somit um eine CO₂-Übertragung von so hoher Spezifität, daß man berechtigt ist, das hierbei entstehende CO₂-Biotin als Modell für die Bindungsverhältnisse der Kohlensäure im CO₂-Biotin-Enzym zu betrachten.

Nachweis und Isolierung des CO₂-Biotins gelangen in Versuchen mit ¹⁴C-Bicarbonat. Die Inkubation von ATP, Biotin und KH¹⁴CO₃ in Gegenwart der Carboxylase führte zur Bildung eines radioaktiven Carboxylierungs-Produktes, daran erkenntlich, daß nach Entfernung des überschüssigen ¹⁴CO₃ (20 min langes Durchleiten von CO₂) in dem auf 0 °C abgekühlten Reaktionsansatz beträchtliche Radioaktivität verbleibt; in den Kontrollen ohne ATP

oder ohne Biotin wurde dagegen keine Aktivität mehr gefunden (Tabelle 2). Beim Studium des chemischen Verhaltens der gebildeten Verbindung fiel ihre hohe Säure-Empfindlichkeit als hervorstechendste Eigenschaft auf.

	komplett	ohne ATP	ohne Biotin
Imp./min	130000	0	0
μ M ¹⁴ CO ₂ fixiert (aus Radioaktivität berechnet) ...	0,43	0	0

Tabelle 2. Fixierung von ¹⁴CO₂ durch (+)-Biotin. Der komplette Reaktionsansatz bestand aus 20 μ M Trispuffer, p_H 8, 2 μ M MgSO₄, 20 μ M (+)-Biotin, 0,5 μ M ATP, 3,3 μ M KH¹⁴CO₃ (10⁶ Imp./min) und 50 γ Carboxylase-Protein (spez. Akt. 800) im Gesamtvolumen 0,5 ml. Die Ansätze wurden 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann auf 0 °C abgekühlt und 20 min mit einem kräftigen CO₂-Strom durchgast. Zur Radioaktivitätsmessung wurden aliquote Teile der Lösung eingetrocknet und ausgezählt. Die Zahlenwerte der Tabelle geben die auf die ganze Lösung bezogene gemessene Radioaktivität an (Tracerlab-Superscaler mit Fensterzählrohr TGC 2, Glimmerfenster 1,9 mg/cm²)

Beim Versetzen der wäßrigen Lösung mit Mineralsäuren wurde das fixierte ¹⁴CO₂ praktisch momentan freigesetzt, was man daran erkennen kann, daß der CO₂-Strom aus der angesäuerten und sofort wieder neutralisierten Lösung alle Radioaktivität vertreibt. Wir fanden dann, daß bereits bei p_H 4,5 im Eisbad 97% des gebundenen Kohlendioxids innerhalb 25 min abgespalten wurden. Alkali gegenüber erwies sich die Verbindung als wesentlich beständiger. In n/30 KOH werden bei 0 °C innerhalb 30 min 7%, bei 20 °C 22% gespalten. Mit diesen Eigenschaften des CO₂-Biotins war eine allophansäure-artige Struktur am Harnstoffring des Biotins gut vereinbar. Allophansäure selbst, bzw. ihre Alkalisalze haben Liebig und Wöhler⁵⁹⁾ 1846 durch alkalische Verseifung des Allophansäure-äthylesters erhalten. Sie erkannten bereits, daß die freie Säure nicht beständig ist und, aus ihren Salzen abgeschieden, sofort in Kohlendioxid und Harnstoff zerfällt.

Um das gebildete Carboxylierungs-Produkt näher zu charakterisieren, unterwarfen wir den Reaktionsansatz der Gefriertrocknung, behandelten den in 90-proz. Methanol aufgenommenen Trockenrückstand mit Diazomethan und erhielten auf diese Weise den stabilen Methylester des CO₂-Biotins. Er ließ sich mit Äther extrahieren und konnte dann durch Papierchromatographie in Propanol-Wasser (15:85) vom Biotin-methylester, der aus unverbrauchtem Biotin stammte, abgetrennt werden (Abb. 7).

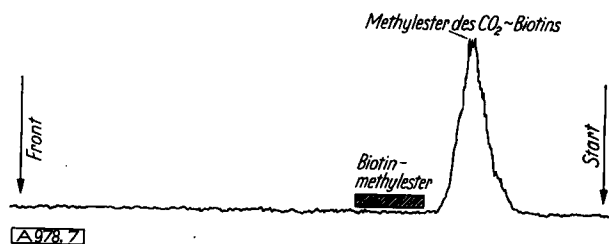


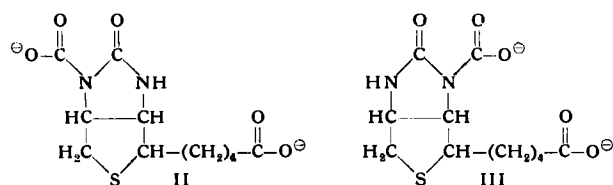
Abb. 7. Papier-chromatographische Trennung von Carboxylierungs-Produkt und Biotin-methylester. Reaktionsansatz vgl. Tabelle 2; die nach Methylierung mit Diazomethan erhaltenen Methylester wurden auf Filterpapier (Schleicher und Schüll 2043b acetyliert) in n-Propanol/Wasser (15:85) aufsteigend chromatographiert. Auswertung im Radiopapierchromatograph von Frieske und Hoepfner, Erlangen-Bruck

Der R_F-Wert der radioaktiven Verbindung liegt bei 0,23, der des Biotin-methylesters bei 0,37. Beim Vergleich der Radioaktivität der gereinigten Substanz und ihres Biotin-gehaltes – gemessen im Hefewachstumstest nach saurer Hydrolyse – wurde gefunden, daß CO₂ und Biotin im Verhältnis 1:1 verbunden sind. Außerdem erwies sich die Verbindung als frei von Phosphorsäure und Adenin, wie sich durch die Phosphat-Bestimmung und die Messung der

⁵⁸⁾ L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, T. R. Wood, R. L. Peck, D. E. Wolf u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 74, 1996 [1952]; D. E. Wolf, J. Valiant, R. L. Peck u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 74, 2002 [1952].

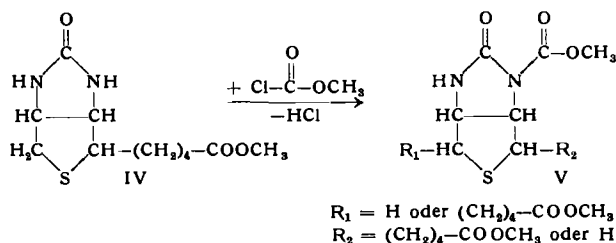
⁵⁹⁾ J. Liebig u. F. Wöhler, Liebigs Ann. Chem. 59, 293 [1846].

Lichtabsorption bei 260 m μ zu erkennen gab. Wir gelangten damit zu folgenden Strukturformeln (II und III) für CO₂~Biotin, zwischen denen wir vorderhand noch nicht entscheiden können.



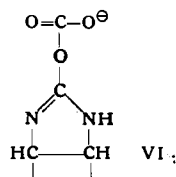
Im stabilen Umsetzungsprodukt mit Diazomethan läge dann der Dimethylester einer der beiden Dicarbonsäuren vor.

Der endgültige Beweis für diese Struktur konnte schließlich auf synthetischem Wege erbracht werden. Durch Umsetzung von (+)-Biotin-methylester (IV) mit Chlorameisensäure-methylester in Chloroform wurde ein in farblosen Prismen kristallisierender N-Carbomethoxy-biotin-methylester (V) vom Fp 130–131 °C erhalten, der sich papierchromatographisch so wie die radioaktive Verbindung aus den Enzym-Versuchen verhielt. Außerdem nahm das synthetische Produkt als Träger beim Versetzen mit der natürlichen, durch ¹⁴C markierten Verbindung Radioaktivität an und behielt die spezifische Radioaktivität auch bei wiederholtem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther oder aus Wasser unverändert bei.



Dem CO₂~Biotin-Enzym, das durch unsere Austauschversuche nachgewiesen ist, wird man eine analoge Struktur zuschreiben können, nur daß dort die Carboxyl-Gruppe des Biotins wahrscheinlich mit einer Amino-Gruppe des Enzym-Proteins – möglicherweise der ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes⁵²⁾ – amid-artig verknüpft ist.

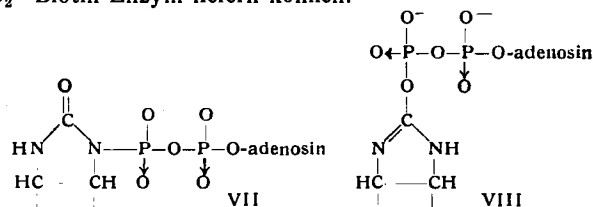
Daneben muß man vorderhand auch noch die Struktur eines Kohlensäure-esters, der sich von der Isoharnstoff-Struktur des Biotins (VI) ableitet, in Betracht ziehen. Ein solches O-Derivat wäre zweifellos reaktionsfähiger als die bisher diskutierten allophansäure-artigen Strukturen, weshalb man erwarten könnte, daß dieses Produkt zwar im



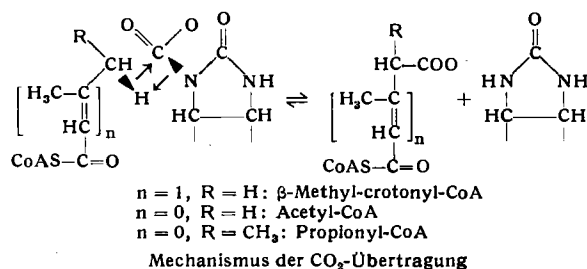
Eiweißverband des Enzyms beständig ist, sich aber im Falle des freien Biotins binnen kurzem durch Umlagerung in das N-Derivat stabilisiert. Die Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten wird sich durch enzymatische Versuche mit synthetischem N-Carboxybiotin fällen lassen.

Von der Struktur des CO₂~Biotin-Enzyms ausgehend, läßt sich auch auf die Struktur des ADP~Biotin-Enzyms

zurückschließen, das als erstes Produkt bei der Umsetzung von ATP mit der Carboxylase entsteht. Dort könnte ADP über den terminalen Phosphatrest am Stickstoff (VII), oder am Sauerstoff (VIII) des Biotins gebunden sein. Beide Verbindungen würden durch Umsetzung mit Kohlensäure CO₂~Biotin-Enzym liefern können.



Die chemische Reaktivität eines aktiven CO₂ der Struktur II oder III läßt sich aus der Tatsache ableiten, daß der cyclische Harnstoff Biotin ebenso wie Harnstoff selbst schwach saure Eigenschaften aufweist und somit die sich davon ableitende Allophansäure mit einem Säureanhydrid verglichen werden kann. Die polarisierte C–N-Bindung ermöglicht dann die Reaktion der CO₂-Gruppe des CO₂~Biotins mit dem Carbeniat-Anion am α -C-Atom bzw. am vinylogem α -C-Atom des Acyl-CoA. Auf ähnliche Weise könnte auch die Übertragung der CO₂-Gruppe vom protein-gebundenen Biotin auf freies Biotin erklärt werden.



Durch diese chemische Gleichung ließe sich nicht nur die enzymatische Carboxylierung von β -Methyl-crotonyl-CoA zu β -Methyl-glutaconyl-CoA, sondern wahrscheinlich auch die des Propionyl-CoA zu Methyl-malonyl-CoA oder die des Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA beschreiben. Lardy und Adler²⁰⁾ fanden, daß die Carboxylierung von Propionyl-CoA an ausreichende Biotin-Zufuhr mit der Nahrung gebunden ist, während Wakil⁵³⁾ nicht nur in angereicherten Präparaten der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hühnerleber größere Mengen Biotin antraf, sondern auch eine Hemmung durch Avidin beobachtete⁵⁴⁾. Wir dürfen deshalb annehmen, daß es viele Biotin-Enzyme gibt, so wie es viele Flavin-Enzyme gibt. Und so wie die Wirkungsgruppe Flavin in den verschiedenen Flavin-Enzymen ausnahmslos durch die reversible Oxydoreduktion Wasserstoff überträgt, so ist zu erwarten, daß die Wirkungsgruppe Biotin in den verschiedenen Biotin-Enzymen durch die reversible Aufnahme und Abgabe von CO₂ Kohlensäure überträgt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützung, Herrn Dr. O. Isler (Hoffmann-La Roche AG., Basel) für die Überlassung von Biotin, Desbio-, Homo- und Norbiotin, Herrn Dr. K. Folkers (Merck u. Co., Rahway) für die Überlassung von Biocytin.

Eingegangen am 15. Juli 1959 [A 978]

⁵⁴⁾ S. J. Wakil, E. B. Titchener u. D. M. Gibson, Biochim. biophysica Acta 29, 225 [1958].