

These experiments establish that in the reaction catalyzed by methylmalonyl-CoA mutase, hydrogen is transferred from the C-5' position of the coenzyme to the substrate, as in the reaction catalyzed by dioldehydrase. This similarity between the two reactions indicates that they proceed by similar mechanisms. The same conclusions were reached by RETEY AND ARIGONI⁶ based upon experiments in which tritium transfer to succinate was shown with coenzyme in which tritium had been introduced by dioldehydrase and 1,2-[1-³H]propanediol.

We wish to thank Professor S. OCHOA for a sample of the mammalian methylmalonyl-CoA mutase and Professor H. G. WOOD for a culture of *Propionibacterium shermanii*, 52W. This study was supported by Grant GM-012633 from the National Institutes of Health and Training Grant 2-G-212.

Graduate Department of Biochemistry,
Brandeis University,
Waltham, Mass. (U.S.A.)

GEORGE J. CARDINALE
ROBERT H. ABELES

1 R. H. ABELES AND B. J. ZAGALAK, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 1246.

2 P. A. FREY AND R. H. ABELES, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2732.

3 J. R. STERN, M. J. COON, A. DEL CAMPILLO AND M. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 15.

4 R. W. KELLERMEYER, S. H. G. ALLEN, R. STJERNHOLM AND H. G. WOOD, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 2562.

5 J. J. B. CANNATA, A. FOCESI, JR., R. MAZUMDER, R. C. WARNER AND S. OCHOA, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 3249.

6 J. RETEY AND D. ARIGONI, *Experientia*, in the press.

Received November 10th, 1966

Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 517-518

BBA 63235

Bestimmung der Kynurenin Aminotransferase

Nach einer Ganzkörperbestrahlung werden die Tryptophanmetabolite Kynurensäure und Xanthurensäure von Mäusen vermehrt ausgeschieden¹. In Verbindung mit enzymatischen Messungen nach Einwirkung ionisierender Strahlen² sollte daher die Aktivität der Kynurenin Aminotransferase (L-Kynurenin:Oxoglutarat Aminotransferase, EC 2.6.1.7) gemessen werden. Dabei ergab sich, daß die bisher in der Literatur beschriebenen Methoden zur Messung dieser enzymatischen Aktivität^{3,4} aus verschiedenartigen Gründen unbefriedigend waren. So erschien die Inkubation mit 3-Hydroxykynurenin⁴ für eine Untersuchung mit größeren Testreihen zu kostspielig.

KNOX³ hatte die Kynurenin Aminotransferase bestimmt, indem er nach der Inkubation die Absorption des enteweißten Testansatzes bei 310, 330 und 365 m μ maß. Aus diesen Werten wurde dann mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten der Anthranilsäure, Kynurensäure und des Kynurenins bei den drei genannten Wellenlängen der Gehalt dieser Metabolite ermittelt. Aus der Menge an gebildeter Kynurensäure wurde auf die Aktivität der Kynurenin Aminotransferase geschlossen. Bei unseren Untersuchungen lieferte diese Methode vor allem wegen der hohen Konzentra-

Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 518-520

tion an Kynurenin keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Es wurden daher Versuche unternommen, die Kynurensäure quantitativ vom Kynurenin und von der Anthranilsäure, die durch die anwesende Kynureninase-Aktivität gebildet wurde, abzutrennen.

Die Messungen der enzymatischen Aktivität wurden im Lebergewebe von Mäusen vorgenommen. Das Gewebe wurde wie früher beschrieben aufgearbeitet⁵. Die löslichen Fraktionen des Cytoplasmas und der Mitochondrien wurden mit 40 mM Phosphatpuffer (pH 7.5), 1.6 mM DL-Kynurenin, 4 mM α -Ketoglutarat und 34 μ M Pyridoxal-5'-phosphat inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 2.4 ml. Nach 60 min Inkubation bei 37° wurde die Reaktion mit 2.4 ml 8%iger Überchlorsäurelösung gestoppt. Nach Abzentrifugieren des gefällten Proteins wurde die gebildete Kynurensäure chromatografisch isoliert.

Versuche, die Kynurensäure vom Ionenaustauscher Dowex 50 (H⁺-Form) durch Salzsäure nach BROWN UND PRICE⁶ und SATOH UND PRICE⁷ zu eluieren, führten zu einer starken Schwanzbildung, sodaß ein großes Volumen benötigt wurde, um die Kynurensäure quantitativ von dem Kationenaustauscher herunterzuwaschen. Dagegen verläßt dieser Tryptophanmetabolit die Ionenaustauschersäule in einem steilen Peak bei Elution mit Puffern vom pH-Wert 4.0, während die Anthranilsäure und das Kynurenin auf der Säule zurückgehalten werden.

Zwei Systeme erwiesen sich als brauchbar: (a) Chromatografiesäulen, mit einer Fritte versehen und einem inneren Durchmesser von 1 cm, wurden 8 cm hoch mit Dowex 50-8X, 200–400 mesh gefüllt. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe auf 36 ml/h eingestellt. Der überchlorsäure Extrakt des Inkubationsansatzes wurde auf die Säulen gegeben. Es wurde mit 40 ml 0.1 M Citratpuffer (pH 2.6), 30 ml 0.1 M Natriumacetat-Formiat (pH 4.0) und 80 ml 0.05 M Natriumacetat-Formiat (pH 5.0) eluiert. Wie aus Fig. 1 zu ersehen ist, wird so eine saubere Abtrennung der Kynurensäure bei den Fraktionen 5–8 erreicht, jede Fraktion enthielt 10 ml Eluat.

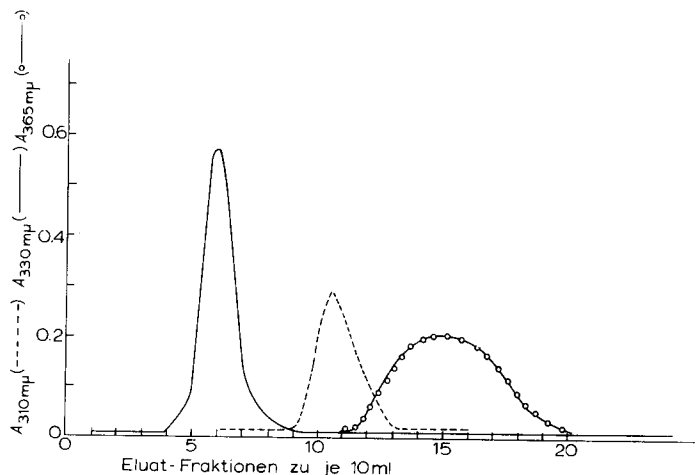


Fig. 1. Elutionschromatogramm für Kynurensäure (—), Anthranilsäure (---) und Kynurenin (○—○) an Dowex 50-X8, 200–400 mesh. Es wurde eluiert mit 40 ml 0.1 M Citratpuffer (pH 2.6), 30 ml 0.1 M Natriumacetat-Formiat (pH 4.0) und anschließend mit 0.05 M Natriumacetat-Formiat (pH 5.0). Gemessen wurde die Absorption bei 310 mμ (---), 330 mμ (—) und 365 mμ (○—○). Ordinate: Absorptionen bei 310, 330 und 365 mμ. Abszisse: Zahl der Fraktionen zu je 10 ml.

(b) Bei dem zweiten System betrug die Austauscherfüllung an Dowex 50 nur 3 cm. Nach Aufgeben des überchlorsauren Extraktes wurde mit 10 ml 0.2 M Citratpuffer (pH 3.0) und 5 ml 0.2 M Citratpuffer (pH 4.0) nachgewaschen. Die Kynurensäure wurde darauf mit 20 ml 0.2 M Citratpuffer (pH 4.0) eluiert. In beiden Verfahren wurde der Kationenaustauscher mit 1 M NaOH-Lösung und anschließendem Waschen mit 0.2 M Citratpuffer (pH 2.6) regeneriert. Die Kynurensäure wurde in den Eluatenspektrophotometrisch auf Grund der Absorption bei 330 m μ oder spektrofluorometrisch nach SATOH UND PRICE⁷ bestimmt.

Das schlagartige Austreten der Kynurensäure von der Säule bei pH 4.0 ist wohl auf die elektrostatische Abstoßung der dissoziierten Carboxylgruppe des Metaboliten und der ebenfalls negativ geladenen Sulfonatgruppe des Austauschers zurückzuführen, sodaß die stark adsorptiven Kräfte zwischen beiden Partnern überwunden werden. Mit Hilfe dieser Methode wurden im Lebergewebe der Maus folgende enzymatische Aktivitäten der Kynurenin Aminotransferase—ausgedrückt in μ Mol gebildeter Kynurensäure pro h pro g Feuchtgewicht — gefunden: Lösliche Fraktion des Cytoplasmas 0.32 ± 0.10 , lösliche Fraktion der Mitochondrien 1.04 ± 0.21 . Die Inkubation mit L-Kynurenin (0.8 mM) ergab dieselbe Aktivität wie mit DL-Kynurenin (1.6 mM). Es findet unter diesen Bedingungen also keine Hemmung der Aminotransferase durch die D-Form des Substrates statt.

Das beschriebene Verfahren entspricht den Anforderungen, die an einen enzymatischen Test zu stellen sind. Hinsichtlich Zeit und eingesetzter Enzymmenge ergab sich Proportionalität zur gebildeten Kynurensäure. Was die Zeit betrifft, die zur Durchführung der Bestimmungsmethode benötigt wird, so ist sie mit dem zeitlichen Aufwand für die Messung ähnlicher enzymatischer Aktivitäten durchaus vergleichbar.

*Radiologisches Institut der
Universität Freiburg,
Freiburg im Breisgau (Deutschland)*

CHRISTIAN STREFFER
HANS-ULRICH LANGENDORFF

- 1 H. LANGENDORFF, H.-J. MELCHING UND C. STREFFER, *Strahlentherapie*, 114 (1961) 525.
- 2 C. STREFFER UND H.-U. LANGENDORFF, *Intern. J. Radiation Biol.*, im Druck.
- 3 W. E. KNOX, *Biochem. J.*, 53 (1953) 379.
- 4 F. WEBER UND O. WISS, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 331 (1963) 124.
- 5 C. STREFFER, *Biochim. Biophys. Acta*, 92 (1964) 612.
- 6 R. R. BROWN UND J. M. PRICE, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 985.
- 7 K. SATOH UND J. M. PRICE, *J. Biol. Chem.*, 230 (1958) 781.

Eingegangen am 20. Oktober, 1966

Biochim. Biophys. Acta, 132 (1967) 518–520