

gehalt an Deuterium am Ende der Reaktion unverändert geblieben ist. Dieses Ergebnis ist nur durch die Annahme einer intermolekularen Wasserstoffwanderung zu deuten. Bei statistischer Übertragung der wandernden Atome würde der theoretisch zu erwartende Wert für das Verhältnis d_1/d_2 9 betragen. Das beobachtete zeitabhängige Absinken dieses Wertes ist eine Folge des hohen Isotopeneffektes, der eine fortschreitende und verhältnismässig rasche Anreicherung der dideutierten Molekeln im verbleibenden Edukt verursacht.

In Anbetracht der oben erwähnten Analogie zwischen den Reaktionen 1–3 schien es angebracht zu überprüfen, ob ähnliche Verhältnisse auch für die Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion gültig sind. Zu diesem Zweck wurde (RS)-1-³H-Propan-1,2-diol mit dem Coenzym B₁₂ in Gegenwart der Propandioldehydrase aus *Aerobacter aerogenes* umgesetzt. Das aus dem Reaktionsgemisch zurückisolierte Coenzym wies nach Reinigung durch Elektrophorese und Papierchromatographie⁷ eine konstante spezifische Radioaktivität von $4,3 \cdot 10^5$ Imp/min pro μM auf⁹. Inkubation dieses tritierten Coenzym (8 $\cdot 10^{-3}$ μM entsprechend $3,45 \cdot 10^3$ Imp/min) mit 20 μM Succinyl-CoA und 40 Einheiten Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii*¹¹ und anschlies-

sende alkalische Hydrolyse des Reaktionsgemisches lieferte nach Zugabe von 80 μM Bernsteinsäure als Träger-substanz eine Probe von radioaktiver Bernsteinsäure mit der konstanten spezifischen Radioaktivität von 11,1 Imp/min/ μM . Dies entspricht einer Übertragung von 32% der ursprünglich am Coenzym gebundenen Tritiumatome. Ein ähnlicher Versuch, in welchem 3 μM Methylmalonyl-CoA anstelle von Succinyl-CoA verwendet wurden, zeigte eine Tritiumübertragung von 16% auf die gebildete Bernsteinsäure. Daraus folgt, dass die Wanderung des Wasserstoffatoms bei der Methylmalonyl-CoA-Succinyl-CoA-Mutase-Reaktion ebenso wie bei der Propandioldehydrase-Reaktion intermolekular erfolgt, und dass in beiden Fällen die gleiche Stelle des Coenzym die wandernden Wasserstoffatome zu binden vermag.

Summary. Tritiated α -(dimethylbenzimidazolyl)-Co-5'-deoxyadenosyl-cobamide, as obtained in the propanediol dehydrase reaction from (RS)-1-³H-propane-1,2-diol, is shown to transfer substantial amounts of radioactivity to the substrate when used as a catalyst for the reversible enzymatic conversion of methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA. Thus, both reactions involve an intermolecular transfer of hydrogen which is mediated by the same site of the coenzyme.

J. RÉTEY und D. ARIGONI

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg.
Technischen Hochschule, Zürich (Schweiz),
30. September 1966.

	Reak- tions- zeit (min)	Umsatz (%)	Isotopenzusammensetzung (%) ^a		
			d_1	d_2	d_1/d_2
Edukt	0	0	0	10	
Produkt	8	~ 50	5,7	1,3	4,4
	14	~ 75	7,1	1,7	4,18
	26	~ 95	10	5	2
	35	~ 100	9,3	5,0	1,86

^a Genauigkeit $\pm 0,3$.

⁹ Die Tritiumanalysen wurden nach der Methode von WILZBACH et al.¹⁰ im Isotopenlaboratorium unseres Institutes (Leitung PD. Dr. P. JORDAN) ausgeführt.

¹⁰ K. E. WILZBACH, L. KAPLAN und W. G. BROWN, Science 118, 522 (1953).

¹¹ R. W. KELLERMAYER, S. H. G. ALLEN, R. STJERNHOLM und H. G. WOOD, J. biol. Chem. 239, 2562 (1964).

Strukturspezifischer Abbau von Polypeptid-Metall-Komplexen. V. Abbau des Cu²⁺-Polymyxin-B-Komplexes durch NH₂OH

ZILLIG et al.¹ haben – mit dem speziellen Ziel neue Methoden für die Sequenzanalyse zu entwickeln – die Reaktionen von Hydroxylamin und Hydrazin mit Ribonukleinsäure untersucht. Kürzlich haben sie diese Arbeiten auf das mit NH₂OH und H₂N·NH₂ isoelektronische H₂O₂² ausgedehnt und dabei gefunden, dass wohl gewisse Nucleotidbasen spezifisch abgebaut werden, dass jedoch diese Spezifität weniger ausgeprägt ist als bei Hydroxylamin.

Da wir nun mit ähnlichem Ziel den Abbau von Polypeptid-Metall-Komplexen mittels H₂O₂ untersuchten und dabei im Falle der Cu²⁺-³ bzw. Ni²⁺-Komplexe⁴ von Polymyxin B und von Angiotensin⁵ fanden, dass ein vom Metallion gesteuerter Abbau – also keine statistische «Zerstörung» – stattfindet (vgl. auch ⁶), lag es nahe, unsere Untersuchungen auf Hydroxylamin als Reagens auszudehnen.

Wir fanden hierbei, dass der Cu²⁺-Komplex des Dekapeptids Polymyxin B⁷ tatsächlich durch NH₂OH in dünn-schichtchromatographisch gut differenzierbare Spaltprodukte abgebaut wird (vgl. Figur).

¹ D. W. VERWOERD, H. KOHLHAGE und W. ZILLIG, Nature 192, 1038 (1961); D. W. VERWOERD, W. ZILLIG und H. KOHLHAGE, Hoople-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 184 (1963); D. W. VERWOERD und W. ZILLIG, Biochim. biophys. Acta 68, 484 (1963).

² H. PRIESS und W. ZILLIG, Hoople-Seyler's Z. physiol. Chem. 342, 73 (1965).

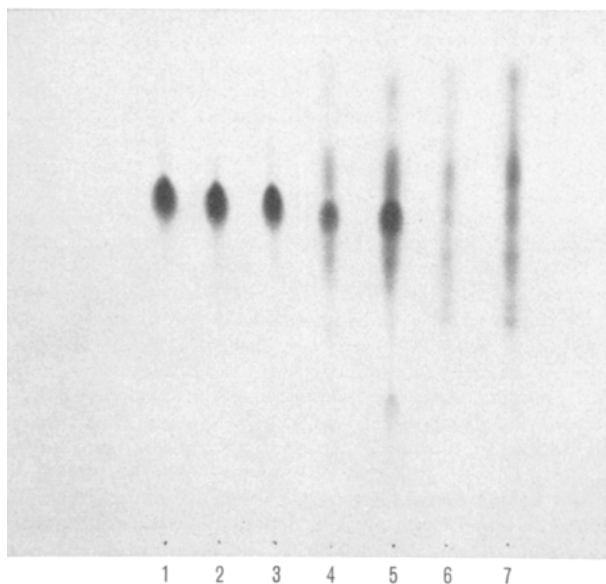
³ H. ERLMAYER, H. SIGEL, H. CH. CURTIUS und P. ANDERS, Helv. chim. Acta 49, 19 (1966).

⁴ H. CH. CURTIUS, P. ANDERS, R. ZELL, H. SIGEL und H. ERLMAYER, Helv. chim. Acta 49, 260 (1966).

⁵ H. SIGEL und H. CH. CURTIUS, Experientia 22, 649 (1966).

⁶ H. SIGEL und H. ERLMAYER, Helv. chim. Acta 49, 1266 (1966).

⁷ Das verwendete Polymyxin B war ein Gemisch aus B₁ (Fettsäure: (+)-6-Methyloctansäure) und B₂ (Fettsäure: 6-Methylheptansäure). Zur Struktur und Synthese von Polymyxin B₁ vgl. K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER und E. BÖHNI, Helv. chim. Acta 48, 1161 (1965).



(4)/(5) Dünnschichtchromatographische Auftrennung des mittels NH_2OH abgebauten Cu^{2+} -Polymyxin-B-Komplexes: $1,5 \mu\text{M}$ CuCl_2 bzw. Polymyxin B $\cdot 5\text{HCl}$ wurden in 1 ml Wasser gelöst, mit NaOH pH 8,5 eingestellt und mit einem 18fachen NH_2OH -Überschuss versetzt, nach 8 h wurde durch Zufügen von EDTA die Reaktion abgebrochen (aufgetragen bei (4) 4 und bei (5) 8 μl). Zum Vergleich mit aufgetragen: (1) Polymyxin B allein; (2) Cu^{2+} -Polymyxin + EDTA; (3) Polymyxin B mit NH_2OH ; ((1), (2) und (3) standen ebenfalls je 8 h bei pH 8,5; aufgetragen je 4 μl). (6)/(7) mit H_2O_2 abgebauter Cu^{2+} -Polymyxin-Komplex³ (aufgetragen bei (6) 4 und bei (7) 8 μl); Steighöhe des Fließmittels – *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser = 50:20:6:24 – 16 cm vom Auftragepunkt. Platten: Kieselgel S-HR der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren.

Zum Vergleich ist in der Figur auch eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der mit H_2O_2 erhaltenen Spaltprodukte dargestellt. Zum Teil weisen die Spaltprodukte in beiden Fällen ähnliche oder gleiche R_f -Werte auf, was darauf hindeutet, dass wenigstens teilweise dieselben Peptid-Bruchstücke gebildet werden. Auch mit NH_2OH erfolgt ein Abbau nur beim Vorliegen des Peptides als Metallkomplex. Die Degradation wurde wiederum bei pH 8,5 durchgeführt – die Komplexbildung ist dann vollständig⁸ –, allerdings war ein 18facher Überschuss an NH_2OH – bezogen auf den Cu^{2+} -Polymyxin-Komplex – notwendig, während mit H_2O_2 ein 6facher genügte³, auch die Reaktionszeit musste von 2 auf 8 h erhöht werden, damit ein gut nachweisbarer Abbau eintrat. Dies zeigt, dass NH_2OH im Cu^{2+} -Polymyxin-Komplex weniger reaktiv ist als H_2O_2 ⁹.

Summary. NH_2OH as well as H_2O_2 (previous results^{3,4}) decompose the Cu^{2+} complex of polymyxin B as can be shown with thin layer chromatography; the spots of the peptide fragments of both reactions were compared.

C. FLIERL, H. SIGEL
und H. ERLNMEYER

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel (Schweiz), 28. September 1966.

⁸ H. BRINTZINGER, *Helv. chim. Acta* 44, 744 (1961).

⁹ C. FLIERL dankt der Firma Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, für die Gewährung einer Unterstützung. Für die Überlassung von Polymyxin B sind wir den Herren Dr. K. Vögler, Dr. R. O. Studer und W. Lergier (Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel) dankbar.

Direct Metabolism of 7α - ^3H -DHEA-3- ^{14}C -Glucuronoside

Recently, the metabolism of C_{19} -steroid 17β -glucuronoside without cleavage of the glycosidic linkage has been demonstrated^{1,2}. The present communication deals with the direct metabolism of C_{19} -steroid 3β -glucuronoside.

After i.v. administration of 0.32 μg Na- 7α - ^3H - 3β -hydroxyandrost-5-en-17-one (dehydroepiandrosterone) 3β - ^{14}C -glucuronoside with 2,684,000 dpm ^3H and 1,320,000 dpm ^{14}C ($^3\text{H}/^{14}\text{C} = 2.02$), prepared biosynthetically³ and chromatographically pure, the 24 h urine of a 51-year-old female subject was assayed for labelled C_{19} -steroid conjugates. Employing anion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50⁴ and thin layer chromatography on silica gel G in chloroform-methanol-ammonia (20:5:0.2 v/v), 12.55% of injected ^3H -activity was obtained in the form of double-labelled steroid glucuronosides with a $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio of 2.10. By rechromatography of this fraction on silica gel G in chloroform-methanol-ammonia (10:10:0.2 v/v), on paper in hexane-ethyl acetate-acetic acid-water (80:120:60:140 v/v)⁵ and dichloroethane-*t*-butanol-acetic acid-water (15:5:6:14 v/v)⁶, the 3-glucuronosides of dehydroepiandrosterone, androst-4-en-3,17-dione (androstendione), 17β -hydroxy-androst-4-en-3-one (testosterone), 3α -hydroxy- 5α -androst-17-one

(androsterone), 3β -hydroxy- 5α -androst-17-one (epiandrosterone) + 3α -hydroxy- 5β -androst-17-one (etiocolanolone), as well as a fraction of polar glucuronosides could be isolated; all fractions exhibiting a practically unchanged $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio (Table I). Following the enzymic hydrolysis of the various fractions with β -glucuronidase, the liberated steroids were chromatographed on paper in propylene glycol/methylcyclohexane⁷ and propylene glycol/toluene⁸. In addition to the above mentioned C_{19} -steroids, androst-5-en- 3β , 17β -diol (androstendiol), 3β , 16α -dihydroxy-androst-5-en-17-one (16α -hydroxydehydroepi-

¹ P. ROBEL, R. EMILIOZZI, and E. E. BAULIEU, *J. biol. Chem.* 241, 20 (1966).

² P. ROBEL, R. EMILIOZZI, and E. E. BAULIEU, *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* 261, 4886 (1965).

³ U. GOEBELSMANN, E. DICZFALUSY, J. KATZ, and M. LEVITZ, *Steroids* 6, 859 (1965).

⁴ G. W. OERTEL, E. KAISER, and W. ZIMMERMANN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 331, 77 (1963).

⁵ J. J. SCHNEIDER and M. L. LEWBART, *Recent Prog. Horm. Res.* 15, 201 (1959).

⁶ K. DAHM and H. BREUER, *Acta Endocr. Copenh.* 52, 43 (1966).

⁷ K. SAVARD, *J. biol. Chem.* 202, 457 (1953).

⁸ A. ZAFFARONI, *Recent Prog. Horm. Res.* 8, 51 (1953).