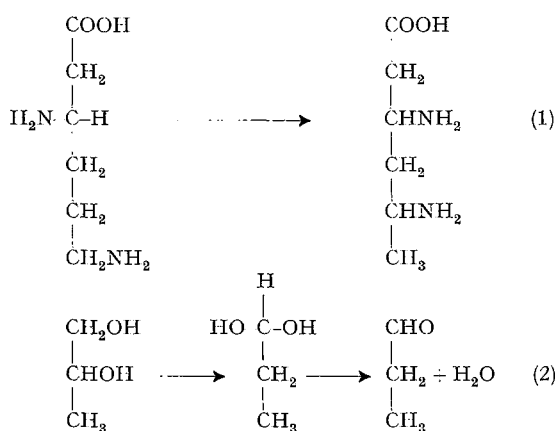


Zum Mechanismus der β -Lysin-Mutase-Reaktion

Ein kürzlich aus *Clostridium sticklandii* isoliertes Enzym, β -Lysin-Mutase¹, katalysiert die Umwandlung von (S)- β -Lysin in eine konfiguratativ unbekannte 3,5-Diaminohexansäure^{2,3} (Gl. 1). Zum Ablauf der Reaktion werden zwei Proteinfraktionen, B₁₂-Koenzym und mehrere andere Kofaktoren benötigt, deren Rolle noch nicht abgeklärt ist. Die im Laufe dieses Prozesses stattfindende Wanderung eines Heteroatoms von C-6 nach C-5⁴ erinnert an die ebenfalls durch B₁₂-Koenzyme katalysierte 1,2-Verschiebung der sekundären Hydroxylgruppe, welche früher im Falle der Dioldhydrase-Reaktion nachgewiesen wurde⁵ (Gl. 2). Es lag deshalb die Vermutung nahe, dass die beiden enzymatischen Prozesse weitere Ähnlichkeiten aufweisen, und wir beschreiben anschliessend Experimente, die diese Vermutung bestätigen.



Eine Probe von (S)-[4-³H₂, 5-³H₂]- β -Lysin, hergestellt auf enzymatischem Wege^{1,6} aus entsprechend markiertem, käuflichem α -Lysin, wurde mit der Mutase in Gegenwart von B₁₂-Koenzym inkubiert. Nach Unterbrechen der Reaktion durch saure Denaturierung des Enzyms isolierte man die gebildete 3,5-Diaminohexansäure mit Hilfe von Ionenaustauscher- und Dünnschichtchromatographie¹. Das mit inaktivem Material⁷ verdünnte Präparat führte man mit methanolischem HCl in 4-Amino-6-methylpiperidon-2⁸ über. Die daraus durch Kuhn-Roth-Oxydation gewonnene Essigsäure erwies sich als radioaktiv (vgl. Tabelle, Exp. 1). Dadurch wird belegt, dass im Laufe der Reaktion ein Teil des Tritiums nach C-6 gewandert ist. Nach enzymatischer Umsetzung von (S)- β -

Lysin mit verschiedenen Mengen des am C-5' tritierten B₁₂-Koenzyms⁹ waren sowohl Produkt als auch verbleibendes Edukt radioaktiv (vgl. Tabelle, Exp. 2-4). Die Gesamtübertragung von Tritium schwankte zwischen 30 und 35% in allen Ansätzen. Zur Bestimmung der Isotopenverteilung wurden die vereinigten Proben der radioaktiven 3,5-Diaminohexansäure durch Kuhn-Roth-Oxydation des entsprechenden Lactams zu Essigsäure abgebaut, welche noch 96% der gesamten Radioaktivität trug.

Die vereinigten Proben des radioaktiven β -Lysins aus den Experimenten Nr. 2-4 wurden erneut mit der Mutase inkubiert, diesmal in Gegenwart eines nicht markierten Koenzyms. Die Werte der Tabelle (Exp. 5) zeigen, dass in der entstandenen 3,5-Diaminohexansäure das schwere Isotop zu 95% in der Methylgruppe lokalisiert war. Die beobachtete Anhäufung von Radioaktivität in dem zurückisolierten Edukt legt nahe, dass die Reaktion mit einem merklichen Isotopeneffekt behaftet ist.

Aus den hier dargestellten Resultaten können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: a) Bei der enzymatischen Umwandlung von (S)- β -Lysin in 3,5-Diaminohexansäure wandert ein H-Atom von C-5 nach C-6 des Gerüsts (Exp. 1). b) Wie bei anderen durch B₁₂-Koenzyme katalysierten Umlagerungen⁹⁻¹² wird das wandernde H-Atom intermediär an das C-5' des Koenzyms gebunden (Exp. 2-4). c) Die β -Lysin-Mutase katalysiert einen Austausch von H-Atomen zwischen C-5' des Koenzyms und

¹ T. C. STADTMAN und P. RENZ, *Archs Biochem. Biophys.* **125**, 226 (1968).

² E. E. DEKKER und H. A. BARKER, *J. biol. Chem.* **243**, 3232 (1968).

³ L. TSAI und T. C. STADTMAN, *Archs Biochem. Biophys.* **125**, 210 (1968).

⁴ R. C. BRAY und T. C. STADTMAN, *J. biol. Chem.* **243**, 381 (1968).

⁵ J. RÉTEY, A. UMANI-RONCI, J. SEIBL und D. ARIGONI, *Experientia* **22**, 502 (1966).

⁶ R. N. COSTLOW, O. M. ROCHOVANSKY und H. A. BARKER, *J. biol. Chem.* **241**, 1573 (1966).

⁷ Man verwendete ein synthetisches Diastereomergemisch⁸, welches zu ca. 70% aus dem Razemat der enzymatisch aktiven Isomeren bestand.

⁸ E. FISCHER und F. SCHLOTTERBECK, *Chem. Ber.* **37**, 2357 (1904).

⁹ P. A. FREY und R. H. ABELES, *J. biol. Chem.* **241**, 2732 (1966).

¹⁰ J. RÉTEY und D. ARIGONI, *Experientia* **22**, 783 (1966).

¹¹ G. J. CARDINALE und R. H. ABELES, *Biochem. Biophys. Acta* **132**, 517 (1967).

¹² H. A. BARKER, *Biochem. J.* **105**, 1 (1967).

Exp. Nr.	Radioaktivität des eingesetzten Koenzyms B ₁₂ Imp/min total	(S)- β -Lysin vor dem Umsatz	Spezifische Radioaktivität (Imp/min pro μ M)			
			(S)- β -Lysin nach dem Umsatz	3,5-Diaminohexansäure	4-Amino-6-methylpiperidon-2	p-Phenylphenacylazetat nach Kuhn-Roth-Oxydation
1	0	376 000	—	330 ^a	—	66,3
2	35 800	0	50,1	71,5	—	—
3	179 000	0	245	321	50,5 ^a	47,8
4	358 000	0	451	580	—	—
5	0	105 ^a	233	56,5	3,83 ^a	3,63

Jedes Reaktionsgemisch in den Experimenten 2-4 enthielt: 10,9 mg «orange protein»¹; 33,6 mg «enzyme 2»¹; 600 μ M 2-Methylimidazol/HCl-Puffer (pH 8); 250 μ M Kaliumpyruvat; 48 μ M ATP-Na₂K; 0,32 μ M FAD; 67 μ M 1,4-Dimercaptothreitol; 80 μ M MgCl₂; 320 μ M (S)- β -Lysin. H₂SO₄. Zu den Experimenten 2, 3 und 4 wurden 6,5, 32,5 bzw. 65 nmoles [5-³H]-(Dimethylbenzimidazolyl)-Co-5'-deoxyadenosylcobamid (spez. Radioaktivität 5,51 $\times 10^6$ Imp/min pro μ M) gegeben. Totalvolumen des Reaktionsgemisches 7,89 ml; Reaktionstemperatur 34°C; Reaktionsdauer 125 min; anaerobe Bedingungen. ^a Nach Verdünnung mit inaktivem Träger.

der C-5-Methylengruppe von (S)- β -Lysin. Dieser Austausch ist rascher als die unter den angewendeten Bedingungen praktisch irreversible Wanderung der Aminogruppe (Exp. 2-4). d) Austauschreaktion und H-Wanderung sind beide stereospezifisch, und zwar diskriminieren sie auf gleiche Art zwischen den diastereotopen H-Atomen am C-5 des Substrates (Exp. 5).

Über die genaue Stereochemie der Reaktion soll an anderer Stelle berichtet werden.

Summary. Using tritium labelled substrates it is shown that in the rearrangement of (S)- β -lysine to 3,5-diaminohexanoic acid catalysed by β -lysine mutase a stereospecific hydrogen migration from C-5 to C-6 of the sub-

strate occurs. When the reaction is carried out in the presence of [5'- 3 H]-coenzyme B₁₂, the heavy isotope is transferred both to C-6 of 3,5-diaminohexanoate and to C-5 of β -lysine. In the latter the labelled atom occupies the same diastereotopic position as the H atom that is transferred to C-6 of the product.

J. RÉTEY, F. KUNZ,
T. C. STADTMAN und D. ARIGONI

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich (Schweiz), und The Laboratory of Biochemistry, Section on Enzymes, National Heart Institute, National Institutes of Health, Bethesda (Maryland, USA), 8. Mai 1969.

A Method for the Fluorimetric Determination of 4-(2-Hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)-indole (LB 46), a β -Blocking Agent, in Plasma and Urine

For the determination of plasma levels of LB 46¹, a β -blocking agent, we needed a sensitive method, since only low doses of the drug are employed for clinical treatment. A very sensitive method was obtained by reacting LB 46 with *o*-phthalaldehyde. The condensation product has a 10⁴-times higher intensity of fluorescence than the parent molecule in 3*N* hydrochloric acid.

Ortho-phthalaldehyde has been described as a reagent for the fluorimetric determination of several amines (histamine², spermidine³ and indoles⁴). By condensation of LB 46 with *o*-phthalaldehyde in acidic solution an intensely fluorescent product is obtained. The fluorophor formed is not very stable, especially in the assay of minute amounts of LB 46, but it can be stabilized by the addition of ascorbic acid solution, which also lowers the blank readings.

Extraction of LB 46 from aqueous solution. The optimum conditions for extraction of LB 46 from aqueous solution into a nonpolar solvent have been tested by studying the distribution of the compound between various buffer solutions and ethyl acetate. 100 μ g of the drug in 3 ml of buffer were shaken with 10 ml of ethyl acetate for 15 min, then the LB 46 content of the organic phase was determined (Table I). The data in Table I demonstrate that for the transfer of LB 46 from an aqueous into an organic phase a pH larger than 11 has to be applied, and that re-extraction into water should occur at a pH lower than 3.

Extraction from plasma and urine. The extraction of the compound from plasma into several organic solvents was tested. The highest recoveries were obtained with diethyl ether, about 89% of the drug added to plasma samples being recovered. Saturation of the aqueous phase with sodium chloride did not improve this yield.

The recovery of LB 46 from urine by extraction with ether is low and depends on the volume of urine assayed: Only 15% of 1 μ g of the drug added to 5 ml of urine was recovered. An improved yield of approximately 40% was obtained by substituting benzene for the ether. Treatment of the urine samples with zinc sulphate improved the results further, and the combination of these modifications resulted in a recovery of almost 80% of the amount added to urine.

Sensitivity and specificity of the method. The method allows the measurement of 20 ng of LB 46 in a plasma

sample of 1-4 ml and approximately 50 ng of the substance in 5 ml of urine.

Since the *o*-phthalaldehyde seems to react with the indole nucleus of the LB 46 molecule, it was to be expected that propranolol⁵, a naphthalene derivative with the same side chain, would not interfere with the determination of LB 46. Indeed, it was found that the fluorescence intensity of propranolol in a concentration up to 10 μ g corresponds to the blank reading of the LB 46-assay.

Stability of LB 46 in plasma. Adding the drug to cattle blood or plasma and keeping the samples for 72 h at room temperature did not cause a significant decrease of fluorescence. Similar results were obtained with plasma from LB 46-treated patients, where again no change of fluorescence intensity was observed when the samples were allowed to stand for 48 h at room temperature.

Procedure. (A) Reagents. LB 46 standard solution: Prepared by dissolving 10 mg of the drug in 100 ml of 0.1*N* hydrochloric acid. From this stock solution standards are obtained by dilution with the same acid. 0.1*N* hydrochloric acid; 1*N* sodium hydroxide. Zinc sulphate: 10% solution in distilled water. Diethyl ether: Ether, free of peroxides, is redistilled. Impurities can cause complete failure of the determination. Benzene: A reagent grade benzene is redistilled and 1.5% (v/v) isoamyl

Table I. Influence of pH on the extraction of LB 46

pH	3	5	7	11
% extracted*	1	6	33	96

* Ratio of the LB 46 content in ethyl acetate to total amount $\times$ 100.

¹ 4-(2-Hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)-indole.

² P. A. SHORE, A. BURKHALTER and V. A. COHN, J. Pharmac. exp. Ther. 127, 182 (1959).

³ B. ELLIOT and I. A. MICHAELSON, Analyt. Biochem. 19, 184 (1967).

⁴ R. P. MAICKEL and F. P. MILLER, Analyt. Chem. 38, 1937 (1966).

⁵ 1-(Isopropylamino)-3-(1-naphthyl)-2-propanol.

⁶ The blood samples were kindly provided by the courtesy of Dr. B. STRÄSSLE of the Medizinische Universitäts-Poliklinik, Basel.