

HANS-WALTER KRAUSE

Über organische Katalysatoren, LVI; Apoferment-Modelle, II¹⁾

Nichtenzymatische oxydative Desaminierung des Alanins durch Pyridoxalphosphat

Aus dem Institut für Katalyseforschung Rostock der
Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
(Eingegangen am 31. März 1959)

*Herrn Professor Dr. Wolfgang Langenbeck
zum 60. Geburtstag am 21. Juni 1959 gewidmet*

Die katalytische oxydative Desaminierung von Alanin durch Pyridoxalphosphat und Metallionen wird durch Zugabe von Imidazol und Histidin-anhydrid beschleunigt. Spektrophotometrische Messungen des Kupferchelates der Schiff-schen Base ergeben in Gegenwart von Histidin-anhydrid eine Verschiebung des Absorptionsspektrums, was eine Beteiligung am Chelat nahelegt.

Nach M. IKAWA und E. E. SNELL²⁾ wird die oxydative Desaminierung von Aminosäuren durch PL^{*)} und Metallsalze katalysiert. Die Reaktion wird besonders durch Kupferionen, weniger durch Eisen-, Kobalt- und Nickelionen beschleunigt und verläuft sowohl im sauren wie im basischen Gebiet.

Im Rahmen unserer Arbeiten über Apoferment-Modelle untersuchten wir den Einfluß hydroxylhaltiger und tertiären Stickstoff enthaltender Verbindungen auf diese Reaktion. Die nichtenzymatische Transaminierung und wahrscheinlich auch die oxydative Desaminierung verläuft über das Metallchelate der Schiff-schen Base²⁻⁴⁾. Eine Beschleunigung oder Verzögerung der Reaktion kann durch Beeinflussung des Chelates stattfinden. So fanden D. E. METZLER und E. E. SNELL⁵⁾, daß die Transaminierung von PL mit Glutaminsäure in Citratpuffer gehemmt wird, was durch Komplexbildung der Citronensäure mit dem Metallion erklärt wird. Das Chelat der Schiff-schen Base wird in gleicher Weise durch die stark chelatbildende Äthylendiamintetraessigsäure und das 2,3-Dimercapto-propanol aufgehoben⁶⁾.

Eine Aktivierung ist zu erhoffen, wenn sich der zugesetzte Chelatbildner am Komplex beteiligt, ohne das Metallatom zu entfernen, und die am Chelat ablaufenden Reaktionen beschleunigt. Wie aus den Untersuchungen von P. FASELLA und Mitarbeiter⁷⁾ hervorgeht, ist das Metallion bei Verwendung von PLP einem Molekül, bei

*) Abkürzungen: PL = Pyridoxal; PM = Pyridoxamin; PLP = Pyridoxal-5-phosphat; PMP = Pyridoxamin-5-phosphat.

1) LV. bzw. I. Mitteil.: W. LANGENBECK und H. TKOCZ, Chem. Ber. **92**, 1112 [1959].

2) J. Amer. chem. Soc. **76**, 4900 [1954].

3) J. BADDILEY, Nature [London] **170**, 711 [1952].

4) D. E. METZLER, M. IKAWA und E. E. SNELL, J. Amer. chem. Soc. **76**, 648 [1954].

5) J. Amer. chem. Soc. **74**, 979 [1952].

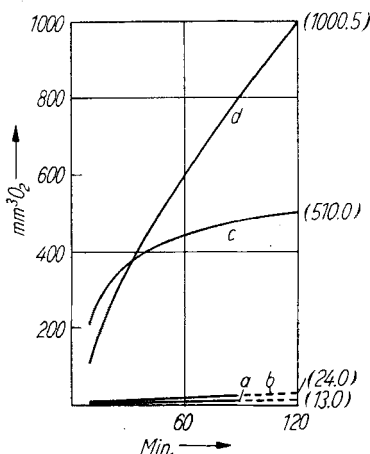
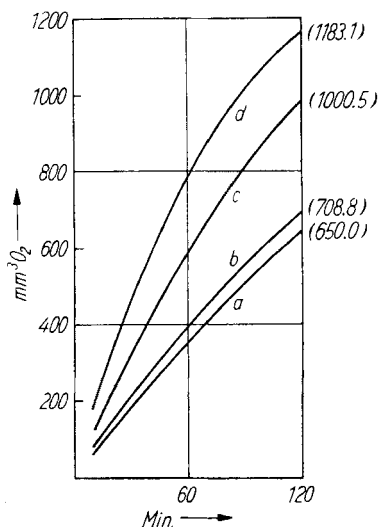
6) Y. MATSUO, J. Amer. chem. Soc. **79**, 2011 [1957].

7) P. FASELLA, H. LIS, N. SILIPRANDI und C. BAGLIONI, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **23**, 417 [1957].

PL zwei Molekülen Schiffischer Base zugeordnet. Wir verwendeten deshalb zu unseren Untersuchungen PLP, weil durch das Vorhandensein freier Koordinationsstellen am Metallion die Bildung gemischter Chelate möglich erschien.

Bei den Versuchen wurde in der Warburg-Apparatur gemessen, und zwar die Sauerstoffaufnahme des Systems PLP*)-Alanin in Gegenwart der Metalle Cu, Fe, Al, Zn, ohne und unter Zusatz von Brenzcatechin, Glykol, Oxalsäure, Imidazol, 4(5)-Hydroxymethyl-imidazol und Histidin-anhydrid**).

Abbild. 1 gibt die Sauerstoffaufnahme bei Gegenwart von Kupferion in Abhängigkeit von Zusätzen wieder, Abbild. 2 in Abhängigkeit vom zugegebenen Metallion.



Abbild. 1 (links). O₂-Aufnahme bei 37° bei Gegenwart von Cu²⁺-Ionen in Abhängigkeit von Zusätzen. Konz. der Reaktionspartner $1 \cdot 10^{-4} m$; Mol.-Verhältnis PLP:Cu²⁺: Alanin: Zusatz = 1:1:1:1; 0.2m Acetatpuffer p_H 4; Gesamtvolumen 5 ccm; Bunsen-Koeffizient $\alpha = 0.024$. a) ohne Zusatz; b) 4(5)-Hydroxymethyl-imidazol; c) Imidazol; d) Histidin-anhydrid. Mittelwerte aus 9 Einzelablesungen

Abbild. 2 (rechts). O₂-Aufnahme bei 37° in Abhängigkeit vom Metallion. Konzentration der Reaktionspartner $1 \cdot 10^{-4} m$; Mol.-Verhältnis PLP: Me: Alanin: Imidazol = 1:1:1:1; 0.2m Acetatpuffer p_H 4; Gesamtvolumen 5 ccm; Bunsen-Koeffizient $\alpha = 0.024$. a) Al³⁺; b) Zn²⁺; c) Fe²⁺; d) Cu²⁺. Mittelwerte aus 6 Einzelablesungen

Abbild. 1 zeigt die katalytische Wirkung des Imidazols und Histidin-anhydrids. Ein Zusatz der hydroxylhaltigen Verbindungen Glykol und Brenzcatechin führt zur Hemmung, die bei Oxalsäure vollständig ist. Diese Substanzen beschleunigten teilweise die Desaminierung des Glycins durch Kupfersalze⁸⁾, wobei Mischkomplexe angenommen wurden. Die Sauerstoffaufnahme von 1183 mm³ O₂ im Falle des Histidin-anhydrids entspricht dem oxydativen Abbau von 9.4 mg Alanin, also etwas mehr als 100-proz. Umsatz nach 120 Min. Dabei ist nicht berücksichtigt, daß sich ein Teil

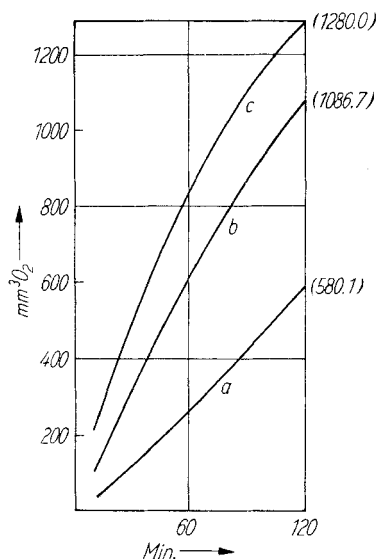
*) Die Firma HOFFMANN-LAROCHE hat uns freundlicherweise das PLP zur Verfügung gestellt, wofür wir unseren besten Dank sagen möchten.

**) Herrn W. TITTELBACH-HELMRICH danken wir für die Überlassung des Histidin-anhydrids.

⁸⁾ J. NYILASI, Magyar Kémiai Folyóirat ([Ung. Z. Chem.] 63, 192 [1957].

des gebildeten PMP durch Transaminierung, die bei p_H 4—5 ihr Maximum aufweist, der Oxydation entzieht. Der geringe Mehrverbrauch ist sicher auf die beobachtete Oxydation des Pyridoxalphosphates²⁾, eventuell auf die sekundäre Oxydation entstandenen Acetaldehyds zurückzuführen.

Die in Abbild. 2 wiedergegebenen Messungen der Abhängigkeit vom Metallion wurden in Gegenwart von Imidazol durchgeführt, wobei für Al und Zn sicher zu



Abbild. 3. O₂-Aufnahme bei 37° bei Erhöhung der Alaninkonzentration auf das Fünffache. Konz. der Reaktionspartner $1 \cdot 10^{-4} m$; Mol.-Verhältnis PLP:Cu²⁺:Alanin:Zusatz = 1:1:5:1; 0.2m Acetatpuffer p_H 4; Gesamtvolumen 5 ccm; Bunsen-Koeffizient $\alpha = 0.024$.
a) ohne Zusatz; b) Imidazol; c) Histidin-anhydrid.
Mittelwerte aus 9 Einzelablesungen

kleine Werte erhalten wurden, da bei Zugabe der Metalle Niederschläge auftraten. Aus dem gleichen Grund konnten die Messungen nicht mit Histidin-anhydrid durchgeführt werden, das sich nur bei Verwendung von Cu mit dunkelblauer Farbe klar löste. Den Messungen kommt deshalb geringere Bedeutung zu; die Metalle untereinander zeigen aber die von IKAWA und SNELL gefundenen Relationen, und auch hier findet bei Zugabe von Imidazol zum Eisenchelat der Schiffschen Base eine Aktivierung statt.

Abbild. 3 gibt die Verhältnisse bei Erhöhung der Alaninkonzentration auf das Fünffache wieder. Die Aktivitätssteigerung ist dabei verhältnismäßig gering. Schon METZLER und SNELL⁵⁾ hatten festgestellt, daß die Transaminierung der Glutaminsäure ungefähr proportional der jeweiligen Metallkonzentration ist.

Von Interesse ist die Art der Beteiligung des Imidazols bzw. Histidin-anhydrids an der Reaktion. Wie schon eingangs erwähnt, nehmen wir eine Koordination am Chelat der Schiffschen Base an. Eine Stütze dafür erhoffen wir uns aus spektrophotometrischen Messungen. Absorptionsmessungen zum Nachweis der Schiffschen Base⁹⁾ und der Chelate des PL mit

Aminosäuren bzw. PM mit Ketosäuren und Metallionen sind von verschiedenen Autoren herangezogen worden^{6,7,10)}. Wir führten die spektralen Messungen bei Raumtemperatur, aber sonst unter den gleichen Bedingungen wie bei den Warburg-Versuchen durch. Abbild. 4 zeigt die Absorptionsspektren der untersuchten Substanzen.

Während bei Zugabe von Imidazol eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Chelates PLP-Cu-Alanin nicht eindeutig feststellbar ist, tritt sie bei Histidin-anhydrid deutlich auf. Diese Verschiebung des Maximums von 670 auf 650 $m\mu$ weist auf eine Beteiligung des Histidin-anhydrids am Chelat unter Ausbildung eines gemischten Chelates hin.

⁹⁾ R. L. BLAKLEY, *Biochem. J.* **61**, 315 [1955].

¹⁰⁾ G. L. EICHORN und J. W. DAVES, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5663 [1954].

Die mitgeteilten Meßergebnisse und der spektrophotometrische Befund erlauben noch keine Rückschlüsse auf den Mechanismus der Katalyse. Imidazol und Histidin-anhydrid könnten im gemischten Chelat die Abspaltung des H-Atoms als Proton vom α -C-Atom der Aminosäure⁴⁾, d. h. die Isomerisierung der Schiffschen Base beschleunigen, die basenkatalysiert verläuft¹¹⁾. Theoretisch denkbar ist weiter eine Beschleu-

Abbild. 4. Absorptionsspektren, aufgenommen nach 10 min. Inkubation bei 37° und Abkühlen auf Raumtemperatur. Konz. der Reaktionspartner $1 \cdot 10^{-4} m$;

Mol.-Verhältnis

PLP: Cu^{2+} : Alanin: Histidin-anhydrid = 1:1:1:1;
0.2 m Acetatpuffer pH 4;
Gesamtvolumen 5 ccm

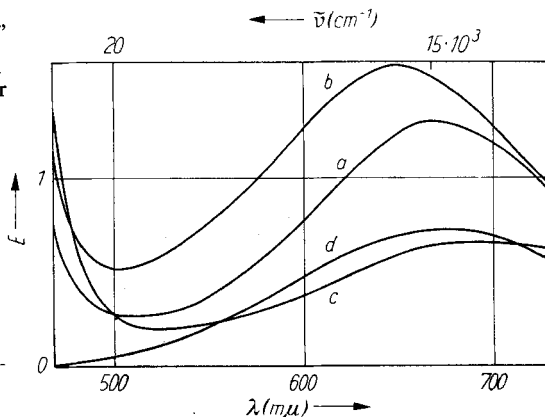
a) PLP + Cu^{2+} + Alanin;

b) PLP + Cu^{2+} + Alanin + Histidin-anhydrid;

c) PLP + Cu^{2+} + Histidin-anhydrid;

d) Histidin-anhydrid + Cu^{2+} + Alanin;

Schichtdicke 1 cm



nigung der PMP-Oxydation, die im Fall des PM durch Cu- und Fe-Ionen und durch PL katalysiert wird, und nicht zuletzt könnte die erhöhte Sauerstoffaufnahme durch beschleunigte Oxydation des nach der Decarboxylierung der Brenztraubensäure entstandenen Acetaldehyds hervorgerufen sein. Eine Entscheidung dieser Fragen bleibt weiteren Versuchen vorbehalten.

Frl. H. WEIDT und Frau CH. NIMMICH danken wir für ihre Unterstützung.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Reagenzien: Der Extinktionskoeffizient des PLP (HOFFMANN-LA ROCHE), gemessen bei 388 mμ in Phosphatpuffer pH 7 betrug 4500 ± 100 , was annähernd mit dem Koeffizienten für das reine Produkt übereinstimmt¹²⁾. Die Metallsalze waren chemisch reinst. Es wurden die Sulfate eingesetzt. Alanin und L-Histidin-anhydrid-2.5 H₂O waren chromatographisch einheitlich. Imidazol, Schmp. 89.5°, und 4(5)-Hydroxymethyl-imidazol-hydrochlorid, Schmp. 107–109°, waren käufliche bzw. selbst hergestellte Präparate. Glykol, Brenzcatechin und Oxalsäure waren chemisch rein. Von den Substanzen wurden Lösungen hergestellt, die $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/ccm enthielten. Die Lösungen des Alanins und der Metallsalze enthielten $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/0.5 ccm. Die Lösung des PLP wurde alle zwei Tage neu angesetzt. Wegen der Schwerlöslichkeit des Histidin-anhydrids wurde es mit dem Kupfersalz zusammen aufgelöst. Die Warburg-Gefäße enthielten folgende Anzahl an ccm der Lösungen: PLP 1, Alanin 0.5, Cu^{2+} 0.5, Puffer 2, Wasser bzw. die Zusätze 1. Der mittlere Einsatz der Gefäße enthielt 0.2 ccm 0.2 m NaOH. Die erste Ablesung geschah nach 8 Min. bei 37°.

Die *spektroskopischen Messungen* wurden im Zeiß-Spektrometer VSU I bei Raumtemperatur durchgeführt, nachdem das Reaktionsgemisch 10 Min. bei 37° geschüttelt worden war.

¹¹⁾ B. WITKOP und T. W. BEILER, J. Amer. chem. Soc. 76, 5589 [1954].

¹²⁾ E. A. PETERSON und H. A. SOBER, J. Amer. chem. Soc. 76, 169 [1954].