

Vitamine als Bausteine von Fermenten

Von P. Karrer

Zu einer Zeit, als man über die stoffliche Natur der Fermente noch sehr wenig wußte, haben PERRIN (1905) und im besondern MATHEWS und GLENN (1911) die Trägertheorie der Enzymwirkung entwickelt, die dem damaligen Stand der Forschung weit voraus-eilte.

“What we ordinarily call an enzyme such as invertase, diastase, pepsin, etc. is a combination of a colloid with an active principle. The active principle is the enzyme itself and should of course be called the enzyme, but it has happened that the substances isolated as enzymes have been generally the combination of the active principle with the inert substance, colloidal in nature.

The colloidal part of the molecule which is inert might with propriety be called the zymophore or ferment bearer, since in cells most of the enzymes are probably thus united or borne, but as this word has been used by EHRLICH to designate the active principle itself, we may call the colloid simply the carrier or bearer, and the active principle the enzyme or Kinase.” (MATHEWS und GLENN.)

Heute wissen wir, daß die von den genannten Autoren entwickelte Theorie für die meisten Fermente zu Recht besteht. Die kolloide «Trägersubstanz» oder das «Apoferment» scheint stets ein Eiweißkörper oder zusammengesetzter Eiweißstoff (Proteid) zu sein, während die Wirkungsgruppe oder «prothetische Gruppe» oder das «Coferment» niedermolekularen Charakter besitzt. Wir wissen auch, daß sich das-selbe Coferment u. U. mit verschiedenen Eiweißstoffen (Apofermenten) verbinden kann, wobei zahl-reiche Enzyme (Holofermente) entstehen, die sich durch verschiedenartige Wirkungsweise unterscheiden und auf verschiedene Substrate spezifisch ein-gestellt sind.

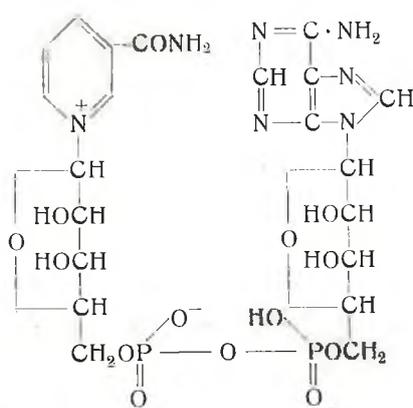
Die moderne Fermentforschung widmet sich so-wohl dem Studium der Apofermente wie jenem der

Cofermente; es liegt in der Natur der Apofermente begründet, daß ihre Bearbeitung besonderen Schwie-rigkeiten begegnet. Denn die hochmolekularen Ei-weißkörper sind der strukturellen Erforschung selbst mit modernen Methoden schwer zugänglich. Immer-hin konnten auch auf diesem Gebiet beachtliche Fort-schritte erzielt werden, insbesondere ist es gelungen, viele Apofermente (und Holofermente) in krystalli-siertem Zustand zu erhalten.

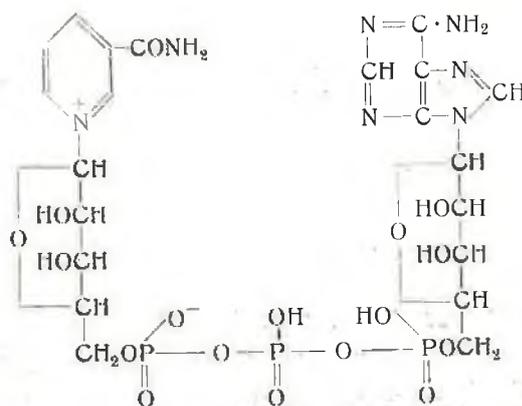
Bedeutende Erfolge hat die Bearbeitung der Co-fermente aufzuweisen. Einige Enzyme enthalten als Wirkungsgruppe oder in ihrer Wirkungsgruppe Me-talle; so die Kohlensäureanhydrase, welche die Zer-legung von H_2CO_3 in H_2O und CO_2 in den Zellen fördert, Zink; die Polyphenol- und Monophenol-oxidasen wahrscheinlich Kupfer oder Mangan, die Carboxylase Magnesium. Eisen ist ein Be-standteil der Cytochrome, der Katalase und Per-oxydase, usw. Einige dieser Metalle sind an Oxy-dations-Reduktionsvorgängen beteiligt, die von den betreffenden Fermenten ausgelöst werden, in ande-ren Fällen wissen wir nicht, wie sie ihre Wirkung entfalten.

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß zahlreiche Fermente Vitamine bzw. Vitaminderivate in ihren Wirkungsgruppen enthalten; für die Rolle dieser Vitamine in den Zellreaktionen und im Stoff-wechsel ergaben sich daraus neue Gesichtspunkte. Durch die Erforschung dieser Cofermente wurde es möglich, in die Wirkungsweise von Vitaminen in der lebenden Zelle Einblick zu gewinnen und Zellreak-tionen kennenzulernen, an denen sie beteiligt sind.

Die folgenden Ausführungen beschäftigen sich mit einigen Vitaminen, die als Bausteine von Fermenten erkannt worden sind, sowie mit ihrer Aufgabe im Fermentverband. Sie gehören alle der Gruppe der wasserlöslichen Vitamine (B-Vitamine) an.



Codehydrase I



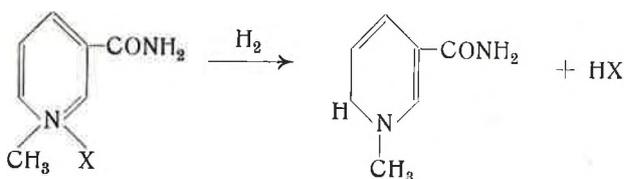
Codehydrase II

Nicotinsäureamid

Das Vitamin Nicotinsäureamid wurde von O. WARBURG¹ als Bestandteil des Ferments Codehydrase II und von H. v. EULER² als Baustein der Codehydrase I (Cozymase) entdeckt; in diesen Cofermenten ist es mit Adenin, Ribose und Phosphorsäure verbunden. (Siehe Formeln Seite 3.)

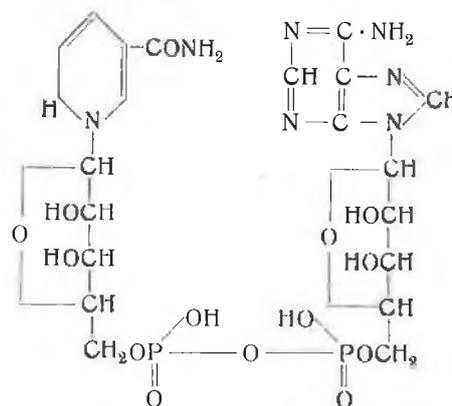
Beide Codehydrasen sind Wirkungsgruppen dehydrierender Enzyme, die aus verschiedenen Substraten Wasserstoff abspalten. Es konnte gezeigt werden³, daß diese dehydrierende Wirkung der Nicotinsäureamid-Gruppe zuzuschreiben ist.

Quartäre Salze des Nicotinsäureamids (solche liegen auch in den beiden Codehydrasen vor) besitzen allgemein die Fähigkeit, leicht Wasserstoff aufzunehmen und dabei in Dihydroderivate überzugehen:



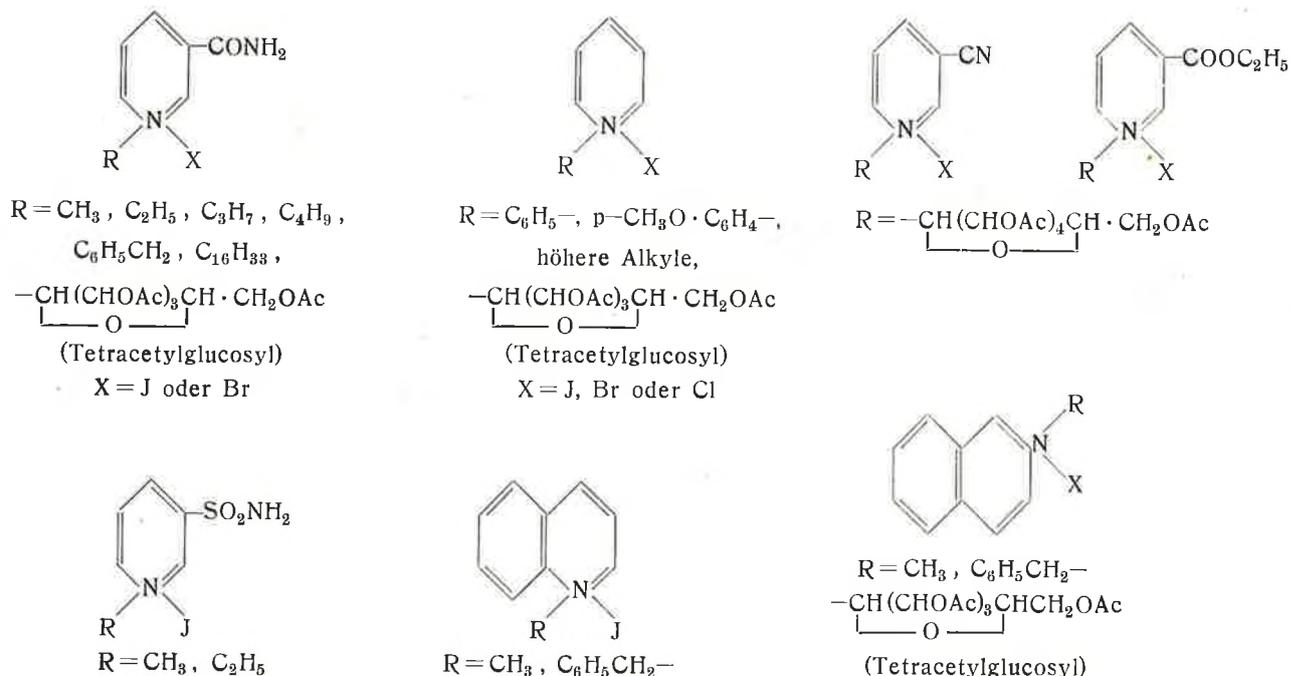
Diese Reaktion spielt sich auch an den beiden Codehydrasen ab, wenn diese einem Substrat (z. B. Hexose-6-phosphat) Wasserstoff entziehen. Die reduzierte Form der Codehydrase I besitzt demnach

nachfolgende Struktur A; sie kann die beiden aufgenommenen H-Atome an andere Substrate weitergeben und wirkt daher gegenüber letzteren als Reduktionsmittel.



Dihydro-codehydrase I
(A)

Die Reduzierbarkeit quartärer Salze von Pyridinderivaten zu ortho-Dihydroverbindungen durch Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ist eine mehrfach beobachtete, aber nicht allgemein verbreitete Eigenschaft solcher Substanzen. Die folgenden sind in unserem Institut zu o-Dihydroverbindungen reduziert worden⁴:



¹ O. WARBURG, W. CHRISTIAN, *Bioch. Z.* **275**, 464 (1935) — O. WARBURG, W. CHRISTIAN, A. GRIESE, *Bioch. Z.* **279**, 143 (1935).

² H. v. EULER, H. ALBERS, F. SCHLENK, *Z. physiol. Ch.* **237**, 1 (1935).

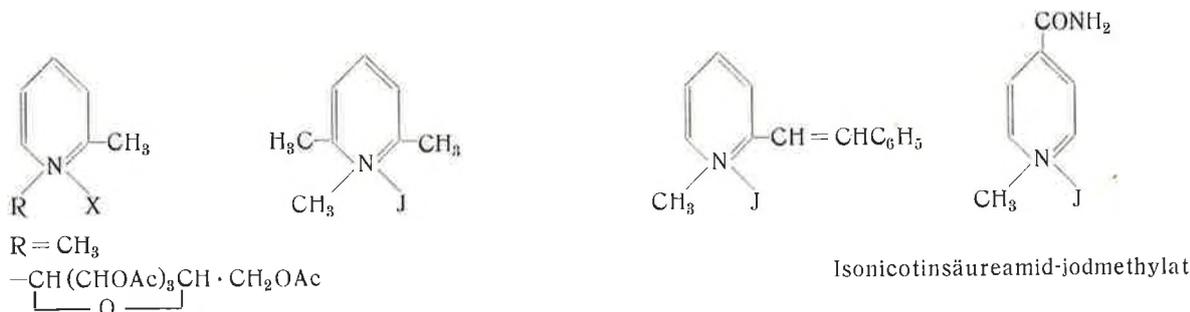
³ P. KARRER, O. WARBURG, *Bioch. Z.* **285**, 297 (1936) — P. KARRER, G. SCHWARZENBACH, F. BENZ, U. SOLMSEN, *Helv.* **19**, 811 (1936).

⁴ P. KARRER und Mitarbeiter, *Helv.* **19**, 811, 1028 (1936), **20**, 55, 72, 418, 622 (1937), **21**, 223 (1938), **29**, 1152 (1946).

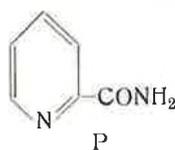
Dipyridyl-dijodmethylat liefert unter analogen Bedingungen ein merichinoides Reduktionsprodukt:



Keine Reduktion zu o-Dihydroderivaten ließ sich bei einigen Pyridiniumsalzen nachweisen, die in o-Stellung zum Stickstoff Substituenten enthalten, sowie beim Isonicotinsäureamid-jodmethylat:



Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß die quartären Salze des Isonicotinsäureamids durch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ nicht zur Dihydrostufe reduziert werden. Aber auch α -Picolinsäureamid (P) kommt als Grundlage eines reversiblen Reduktionssystems nicht in Frage, weil eine Anlagerung von Zuckerresten an den Pyridinstickstoff dieser Verbindung nicht gelingt. So muß man feststellen, daß



die Natur von den 3 isomeren Pyridincarbonsäureamiden dasjenige herausgefunden hat, das als einziges mit Zuckern quartäre Salze bildet, die sich reversibel reduzieren lassen.

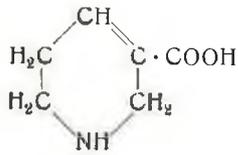
Die beiden Codehydrasen I und II sind befähigt, sich mit verschiedenen Proteinen zu Fermenten zu verbinden, die eine Reihe biologisch wichtiger Reaktionen katalysieren. Darüber orientiert folgende Zusammenstellung:

		Codehydrase	
β -Oxybuttersäure \rightleftharpoons Acetessigsäure	$\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$		I
Milchsäure \rightleftharpoons Brenztraubensäure	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COCOCH}_3$		I
Apfelsäure \rightleftharpoons Oxalessigsäure	$\text{HOOCCHOHCH}_2\text{COOH} \rightleftharpoons \text{HOCCOCH}_2\text{COOH}$		I
Aethylalkohol \rightleftharpoons Acetaldehyd	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CHO}$		
Glucose \rightleftharpoons Gluconsäure	$\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CHO} \rightleftharpoons \text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{COOH}$		I, II
Glutaminsäure \rightleftharpoons Iminoglutarsäure	$\text{HOOC} \cdot \text{CHNH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \rightleftharpoons \text{HOOC} \cdot \underset{\text{NH}}{\text{C}} \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$		I, II
α -Glycerinphosphorsäure \rightleftharpoons Phosphoglycerinsäure	$\text{H}_2\text{O}_3\text{POCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_3\text{POCH}_2\text{CHOHCOOH}$		I
6-Glucosephosphorsäure \rightarrow 6-Phosphogluconsäure	$\text{H}_2\text{O}_3\text{POCH}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_3\text{POCH}_2(\text{CHOH})_4\text{COOH}$		I
Citronensäure \rightarrow α -Ketoglutarsäure	$\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH} \rightarrow \text{HOCCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$		II

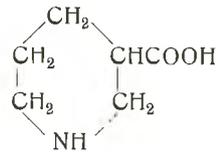
Alle diese biologisch wichtigen Dehydrierungen und Hydrierungen und vermutlich noch manche andere sind auf die Dehydrase I oder II angewiesen, womit die Bedeutung des Nicotinsäureamids für die Lebensvorgänge erwiesen wird.

Nicotinsäureamid (bzw. Nicotinsäure) kann als Wachstumsstoff für Mikroorganismen auch durch das Alkaloid Guvacin und die Hexahydro-nicotinsäure ersetzt werden⁵ (z.B. für Kulturen von *Staphylococcus aureus* und *Bac. proteus*).

⁵ H. v. EULER, B. HÖGBERG, P. KARRER, H. SALOMON, H. RUCKSTUHL, Helv. 27, 382 (1944).



Guvacin



Hexahydronicotinsäure

Diese beiden Verbindungen werden demnach durch Fermentsysteme der Mikroorganismen schnell zur Nicotinsäure dehydriert. *In vitro* ist diese Dehydrierungsreaktion durch Fermente bisher nicht gelungen.

Dehydrierungen von Hexahydrobenzol- und Hexahydropyridinverbindungen zu Benzol- bzw. Pyridinderivaten sind mit den gebräuchlichen Methoden des Laboratoriums nicht leicht auszuführen und erfordern in allen Fällen hohe Temperaturen. Mikroorganismen scheinen solche Reaktionen oft spielend zu vollbringen. So konnte gezeigt werden⁶, daß das für viele Bakterien und Kokken als Wuchsstoff benötigte Vitamin p-Aminobenzoesäure durch Hexahydro-p-aminobenzoesäure ersetzt werden kann, die sehr schnell zu ersterer dehydriert wird.

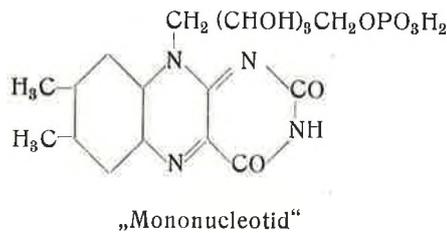
Immerhin führen die Mikroorganismen diese Dehydrierungen nicht wahllos aus, sondern offenbar nur dann, wenn sie das Dehydrierungsprodukt gebrauchen, wie dies für Nicotinsäure und p-Amino-

benzoesäure zutrifft. p-Aminobenzolsulfonsäure (Sulfanilsäure), der Grundkörper der zahlreichen bactericid wirkenden Sulfanilamidpräparate, ist für sie toxisch. Der Versuch zeigte⁷, daß eine Kultur von *Proteus vulgaris* Hexahydrosulfanilsäure nicht zu Sulfanilsäure dehydriert, d. h. nicht in den für sie giftigen Stoff umwandelt.

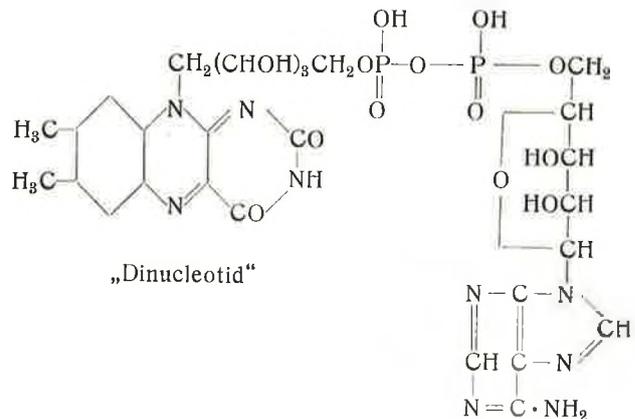
Riboflavin (Lactoflavin), Vitamin B₂

Auch das Vitamin B₂ oder Riboflavin ist Bestandteil der prosthetischen Gruppen zahlreicher Fermente, die wegen ihrer — durch das Riboflavin bedingten — gelben Farbe als «gelbe Fermente» bezeichnet werden. Sie sind, wie die vorerwähnten Dehydrasen, dehydrierende Enzyme und stehen mit den ersteren häufig in engster Beziehung, indem sie von den hydrierten Formen der Dehydrasen den labilen Wasserstoff übernehmen, d. h. diese dehydrieren.

Wir kennen zwei «gelbe» Cofermente, welchen Riboflavin zugrunde liegt; das eine wird als «altes gelbes Coferment» oder «Mononucleotid» bezeichnet und ist eine Riboflavinphosphorsäure; das zweite, das «neue gelbe Coferment» oder «Dinucleotid», enthält außerdem Adenin und Ribose.



„Mononucleotid“



„Dinucleotid“

Die Chemie der Flavine ist sehr eingehend bearbeitet worden; insbesondere wurden die hydroxylhaltige Seitenkette, welche im Riboflavin die Ribose-Konfiguration besitzt, sowie die Substituenten im Benzolring variiert⁸. Das Ergebnis dieser Untersuchungen läßt sich dahin zusammenfassen, daß jede Änderung in der Struktur oder sterischen Konfiguration der hydroxylhaltigen Seitenkette zu biologisch unwirksamen Verbindungen führt und daß auch in der Substitution des Benzolringes nur geringfügige

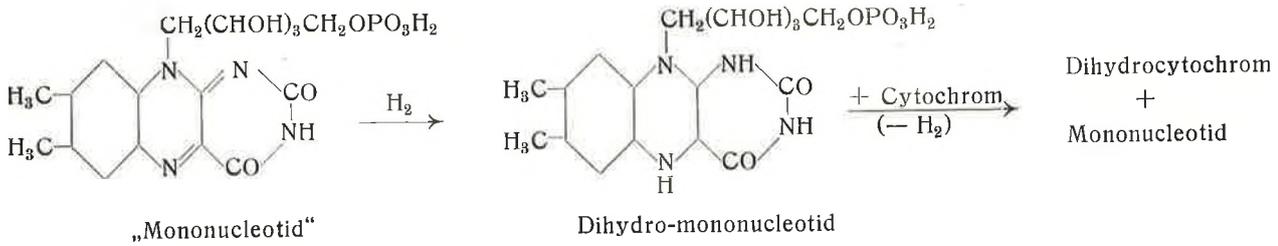
Änderungen (wie Ersatz von CH₃ durch C₂H₅) erlaubt sind, ohne daß die Vitaminwirksamkeit völlig verschwindet.

Die dehydrierende Wirkung der gelben Fermente beruht darauf, daß sie an ihre Riboflavingruppe 2 H-Atome anlagern, wobei Dihydroriboflavinverbindungen entstehen. Letztere können hierauf den aufgenommenen Wasserstoff an ein anderes Ferment (Cytochrom) oder an Sauerstoff weiterleiten.

⁶ H. V. EULER, P. KARRER, Helv. 27, 1697 (1944).

⁷ P. KARRER, H. RUCKSTUHL, unveröffentlicht, Vgl. Diss. H. RUCKSTUHL, Zürich 1946.

⁸ Vgl. z. B. die Zusammenfassungen: Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung. Bd. II, p. 381 (1939).



Der Wasserstoff, der die gelben Fermente hydriert, kann aus verschiedenen Substanzen, wie d- und l-Aminosäuren, Aldehyden, Xanthin, ferner aus den hydrierten Codehydrasen I oder II stammen. Folgende Tabelle gibt über diese Verhältnisse eine kurze

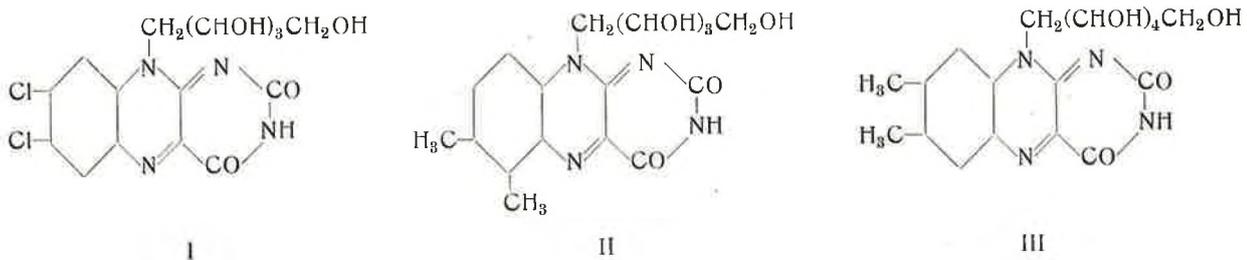
Übersicht. Auch hier gilt das bei der Besprechung der Dehydrasen Gesagte, daß die Cofermente mit einer ganzen Reihe verschiedener Proteine zu verschiedenen Fermenten zusammentreten, von denen jedes eine andere Dehydrierungsreaktion katalysiert.

Ferment	Coferment	Wasserstoffdonator	Wasserstoffacceptor
Altes gelbes Ferment	Mononucleotid	Dihydro-codehydrase I und II	Molekularer O ₂
Cytochrom-2-reduktase	Mononucleotid	Dihydro-codehydrase II	Cytochrom
Diaphorase I	Dinucleotid	Dihydro-codehydrase I	Cytochrom a und b
Diaphorase II	Dinucleotid	Dihydro-codehydrase II	Cytochrom a und b
Aldehydoxydase } Xanthinoxydase }	Dinucleotid	{ Dihydro-codehydrase I } { Aldehyde, Xanthin }	Cytochrom a und b
d-Aminosäureoxydase	Dinucleotid	d-Aminosäuren	Cytochrom a und b
l-Aminosäureoxydase	Dinucleotid	l-Aminosäuren	?
Diaminoxydase	Dinucleotid	Di- und Polyamine	Cytochrom a und b
Chinolinoxidase	?	Chinolin-, Isochinolin-, Pyridinderivate, Chinin	?

Der Riboflavin-phosphorsäureester (Mononucleotid) war das erste Coferment, das man synthetisch herstellen konnte⁹. Die Verbindung ist allerdings bisher weder krystallisiert noch chemisch rein erhalten worden, läßt sich aber mit spezifischen Eiweißkörpern (Apofermenten) zu aktiven Enzymen vereinigen.

Angeregt durch die Vitamin-Antivitamin-Theorie hat man in neuerer Zeit auch nach Antagonisten des

Riboflavins gesucht, die das durch Riboflavin stimulierte Wachstum von Mikroorganismen oder Tieren herabsetzen oder ganz unterbinden. Es gelang, einige solche Flavine aufzufinden¹⁰, welche die Vitamin-B₂-Wirkung des Riboflavins mehr oder weniger stark vermindern, z. B. 6,7-Dichlor-9-ribityl-isoalloxazin (I), 5,6-Dimethyl-9-(d, 1'-ribityl)-isoalloxazin (II), 6,7-Dimethyl-10-(d, 1'-ribityl)-isoalloxazin, 6,7-Dimethyl-9-(d, 1'-dulcetyl)-isoalloxazin (III) u. a. m.



⁹ R. KUHN, H. RUDY, F. WEYGAND, B. **69**, 1543 (1936) — R. KUHN, H. RUDY, B. **69**, 1774 (1936).

¹⁰ R. KUHN, F. WEYGAND, E. F. MÖLLER, B. **76**, 1044 (1943) — G. A. EMERSON, M. TISCHLER, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.

55, 184 (1944) — D. W. WOOLLEY, J. biol. Ch. **154**, 31 (1944) — G. A. EMERSON, E. WURTZ, O. H. JOHNSON, J. biol. Ch. **160**, 165 (1945).

Die antagonistische Wirkung der «Antivitamine» ist von verschiedenen Forschern so gedeutet worden, daß das «Antivitamin» das Vitamin aus einem Fermentsystem *mechanisch* verdrängt¹¹. Da sich die durch die gelben Fermente bewirkten Dehydrierungsreaktionen leicht und in übersichtlicher Weise verfolgen lassen, schien hier ein Fall vorzuliegen, welcher zur Prüfung der «mechanischen Verdrängungstheorie» geeignet ist.

Es wurde daher untersucht¹², ob die Fermente d-Aminosäureoxydase aus Leber sowie Xanthindehydase und Aldehyddehydase aus Milch, welche Riboflavinphosphorsäure als Wirkungsgruppen enthalten, bei Zusatz eines großen, bis 1000fachen Überschusses von 6,7-Dichlor-9-ribityl-isoalloxazin oder 6,7-Dichlor-9-ribityl-isoalloxazin-5'-phosphorsäureester in ihrer Wirkung geschwächt werden. Wenn die antagonistische Wirkung letzterer Verbindung zu Riboflavin auf einer mechanischen Verdrängung des Riboflavins durch die Chlorverbindung beruhen würde, müßten 6,7-Dichlor-9-ribityl-isoalloxazin oder sein Phosphorsäureester im Enzymversuch hemmend wirken. Die «gelben» Fermente dissoziieren leicht in die prosthetischen Gruppen (Cofermente) und Apofermente (Eiweißkomponente); für eine mechanische Verdrängung der Riboflavinphosphorsäure durch den Antagonisten (6,7-Dichlor-9-ribityl-isoalloxazinphosphorsäure) wären die Voraussetzungen daher günstig. Die Versuche fielen jedoch völlig negativ aus; in keinem Fall ließen sich die durch die gelben Fermente katalysierten Reaktionen durch Zusatz von 6,7-Dichlor-9-ribityl-isoalloxazin oder dessen Phosphorsäureester verzögern.

Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß die antagonistische Wirkung des 6,7-Dichlor-9-ribityl-isoalloxazins gegenüber Riboflavin nicht auf eine mechanische Verdrängung des letzteren aus dem Ferment durch die Chlorverbindung zurückgeführt werden kann. Die Hemmungswirkung ist offenbar komplizierterer Art und in ihrem Verlauf unbekannt. Es erscheint wahrscheinlich, daß man Ähnliches auch von anderen Antivitaminwirkungen anzunehmen hat.

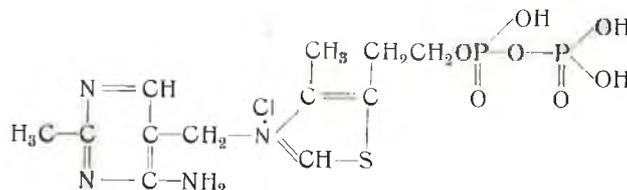
Aneurin (Thiamin) Vitamin B₁

Zu den Vitaminen, die als Bestandteile von Wirkungsgruppen von Fermenten erkannt worden sind,

¹¹ FILDES, Brit. J. Exp. Pathol. **21**, 67 (1940) — STAMP, Lancet **237**, 10 (1939) — GREEN, Brit. J. Exp. Pathol. **21**, 38 (1940) — MC INTOSH, Lancet **236**, 431 (1939) — WOODS, Brit. J. Exp. Pathol. **21**, 74 (1940) — SELBIE, Brit. J. Exp. Pathol. **21**, 90 (1940) — KUHN, B. **74**, 1617 (1941) — Die Chemie **55**, 1 (1942).

¹² P. KARRER, H. RUCKSTUHL, Bl. Schweiz. Akad. Med. Wiss. **1**, 236 (1945).

gehört auch das Vitamin B₁ oder Aneurin. K. LOHMANN¹³ zeigte, daß Vitamin B₁-pyrophosphat (Aneurinpyrophosphat) die Cocarboxylase ist, das Coenzym der Carboxylase, die bei der alkoholischen Gärung die Decarboxylierung der Brenztraubensäure zu Acetaldehyd durchführt.



Vitamin B₁ (Aneurin)-pyrophosphat = Cocarboxylase

Bei diesem Abbau der Brenztraubensäure



spielt Magnesium eine wichtige, in seiner Funktion aber noch nicht erkannte Rolle¹⁴; es ist Bestandteil des Fermentes Carboxylase, und durch gewisse andere, zweiwertige (Mn, Fe), nicht aber ein- und dreiwertige Metalle ersetzbar.

Es ist nicht sicher bekannt, ob sich die Decarboxylierung der Brenztraubensäure durch die Carboxylase auch im tierischen Organismus abspielen kann. Wahrscheinlich gehört aber Aneurinpyrophosphat als Wirkungsgruppe Fermenten an, die in der tierischen Zelle an der Einführung von CO₂ in andere Substanzen beteiligt sind. Die wichtigste Reaktion dieser Art scheint die Bildung von Oxalessigsäure aus CO₂ und Brenztraubensäure zu sein¹⁵:

Oxalessigsäure ist eine Stufe im sog. Citronensäurecyclus der Zellen, der eine Form des Kohlenhydratabbaues darstellt. Aneurinpyrophosphat ist somit mit dem Kohlenhydratumsatz im tierischen Organismus verbunden. Wir wissen, daß ein vermehrter Gehalt an Kohlenhydraten in der menschlichen und tierischen Nahrung eine erhöhte Zufuhr von Vitamin B₁ notwendig macht. Oxalessigsäure ist ferner mit der α-Ketoglutarinsäure HOOCCH₂CH₂COCOOH genetisch verknüpft, die selbst bei der Transaminierung der Aminosäuren und bei der Oxydation der Essigsäure eine Rolle spielt. Für alle diese Umsetzungen hat daher das Coferment Aneurinpyrophosphat große Bedeutung.

Während wir uns aber über die Wirkungsweise der Codehydrasen und der gelben Cofermente ge-

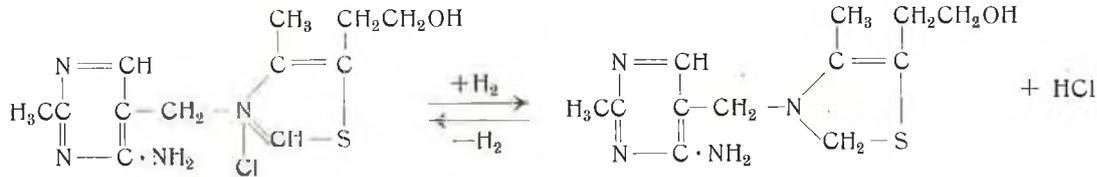
¹³ K. LOHMANN, P. SCHUSTER, Naturwiss. **25**, 26 (1937). Angew. Chem. **50**, 221 (1937) — Biochem. Z. **294**, 188 (1937).

¹⁴ K. LOHMANN, P. SCHUSTER, Biochem. Z. **294**, 188 (1937) — D. E. GREEN, D. HERBERT, V. SUBRAHMANYAN, J. biol. Chem. **135**, 795 (1940), **138**, 327 (1941).

¹⁵ Vgl. z. B. H. G. WOOD, J. biol. Chem. **159**, 153 (1945), **160**, 375 (1945) mit weiteren Literaturangaben.

naue und begründete Vorstellungen machen und ihre chemischen Umsetzungen in Formeln zum Ausdruck bringen können, wissen wir über die Natur der chemischen Reaktionen des Aneurinpyrophosphates noch nichts Sicheres. Wohl sind darüber verschiedene Theorien gemacht worden. LIPMANN¹⁶ glaubte,

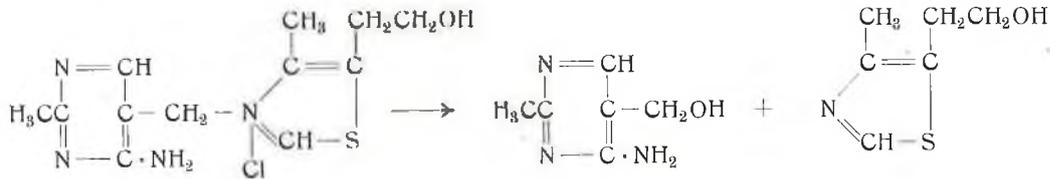
daß sich Aneurin (bzw. sein Pyrophosphorsäureester) in bicarbonatalkalischer Lösung durch Na₂S₂O₄ in ein Dihydroderivat überführen lasse, und gründete darauf die Annahme, Aneurin könne in der Zelle mit seinem Dihydroderivat ein Redoxsystem bilden und dadurch wirksam sein.



Diese Auffassung wurde aber wenig wahrscheinlich, als es sich erwies, daß die mit Natriumdithionit reduzierte Aneurinlösung physiologisch inaktiv war. Wir konnten dann zeigen¹⁷, daß dieser Reduktionsvorgang in anderer Weise verläuft. Aneurin wird durch Na₂S₂O₄ reaktiv gespalten, wobei sich 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol bildet.

welches diese Substanz durch eine ähnliche Spaltung inaktiviert. Dieses Antivitamin findet sich in inneren Organen (Milz, Leber usw.) und in den Muskeln vieler Fische. Es ist ein Eiweißkörper von Fermentcharakter und kann Aneurin leicht und vollständig in 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol und 2-Methyl-4-amino-5-oxyethylpyrimidin zerlegen¹⁹ und damit inaktivieren.

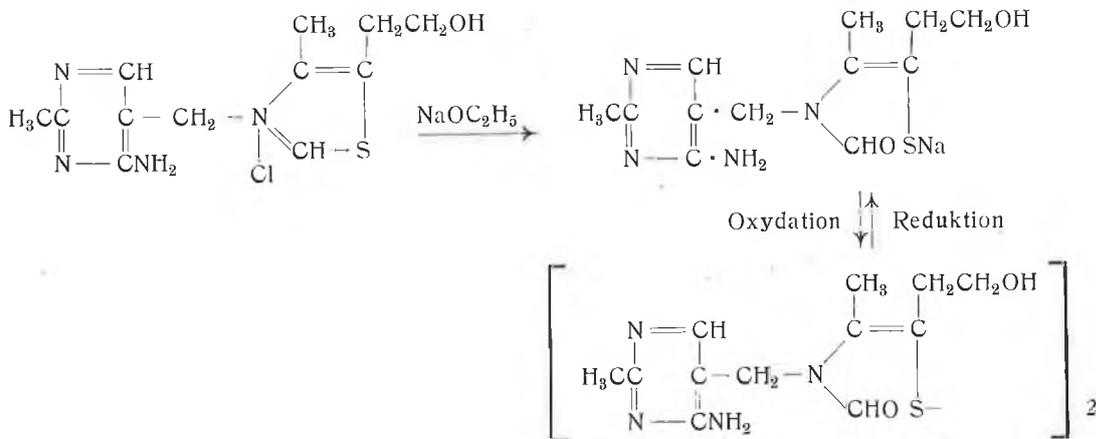
In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß es ein natürliches Antivitamin des Vitamins B₁ gibt¹⁸,



Bei Tieren (Füchsen), die viele rohe Fische als Futter erhielten, wurden infolgedessen schwere Vitamin B₁-Avitaminosen beobachtet.

LIAMS²⁰, daß Aneurin durch Alkoholat in das Salz der Thiolform übergeführt wird, die sich leicht zum Disulfid oxydieren und aus diesem durch Reduktion zurückführen läßt:

Eine andere Theorie der Aneurinwirkung beruhte auf der Beobachtung von O. ZIMA und R. R. WIL-



¹⁶ F. LIPMANN, Nature 138, 1097 (1937).

¹⁷ P. KARRER, W. GRAF, J. SCHUKRI, Helv. 28, 1523 (1945).

¹⁸ BELOFF, R. G. STERN, J. biol. Chem. 158, 19 (1945) — R. R. SEALOCK, G. H. LIVERMORE u. C. A. EVANS, Am. Soc. 65, 935 (1943) — L. O. KRAMPITZ u. D. W. WOOLEY, J. biol. Chem. 152, 9 (1944).

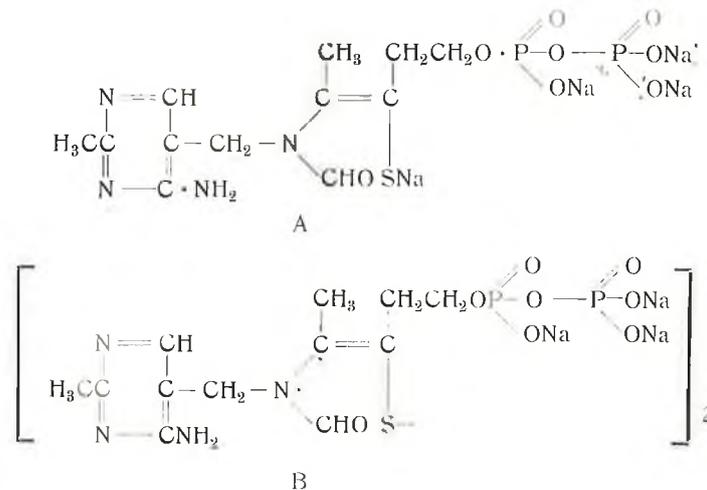
¹⁹ R. R. SEALOCK, G. H. LIVERMORE, J. biol. Chem. 156, 379 (1944).

²⁰ O. ZIMA, R. R. WILLIAMS, B. 73, 941 (1940) — O. ZIMA, K. RIISERT, T. MOLL, Z. physiol. Ch. 267, 210 (1941).

Sowohl das Natriumsalz der Thiolform wie das Disulfid besitzen im Tierversuch ungefähr die gleiche Vitamin B₁-Aktivität. ZIMA, WILLIAMS und Mitarbeiter nahmen daher an, die Wirkung des Vitamins B₁ beruhe darauf, daß es mit den beiden Formen ein Redoxsystem bilde und als solches in Oxydationsprozesse eingreife. Aber auch diese Anschauung trifft,

zum mindesten soweit Aneurin als Cocarboxylase seine Funktionen ausübt, nicht zu. Dies ließ sich auf folgendem Weg beweisen.

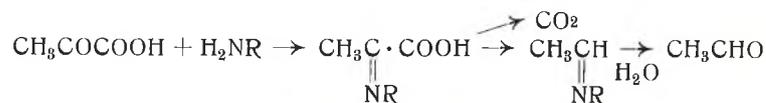
Wir haben die Thiolform der Cocarboxylase (A) (Aneurinpyrophosphat) und aus ihr die Disulfidform (B) hergestellt und beide auf Cocarboxylasewirkung *in vitro* geprüft²¹.



A erwies sich bei gleichem p_H (6,2) ebenso wirksam wie die Cocarboxylase selbst, d. h. setzte mit derselben Schnelligkeit CO₂ aus Brenztraubensäure frei; B war dagegen völlig inaktiv. Es gelang aber, aus dieser inaktiven Disulfidform B durch Reduktion (mit Cystein) wieder fermentativ aktive Cocarboxylase (A) zurückzugewinnen (Ausbeute etwa 30%). Durch diese Versuche wird bewiesen, daß bei der Decarboxylierungsreaktion der Brenztraubensäure

nicht ein aus Thiolform und Disulfidform aufgebautes Redoxsystem eine Rolle spielen kann.

Schließlich wurde noch die Hypothese vertreten²², daß die Decarboxylasewirkung darauf beruhe, daß sich die Cocarboxylase mit ihrer freien Aminogruppe mit der Brenztraubensäure zu einem Ketimid umsetze, welches hierauf CO₂ abspaltet (LANGENBECK-Zyklus):



Eine experimentelle Basis existiert für diese Hypothese zur Zeit aber nicht, so daß wir über den chemischen Mechanismus der Carboxylasewirkung heute nichts Bestimmtes aussagen können.

Pyridoxin (Adermin) Vitamin B₆

Das wasserlösliche Vitamin B₆ oder Pyridoxin ist 1938 gleichzeitig von fünf verschiedenen Gruppen von Forschern isoliert worden²³. Es findet sich sehr verbreitet im Tier- und Pflanzenreich. Ein Mangel an Pyridoxin führt bei manchen Tieren, z. B. Ratten,

zu einer Form von Dermatitis (*Acrochynie*); ob und in welchen Mengen der Mensch dieses Vitamins bedarf, ist nicht näher bekannt. Man glaubt aber, daß pellagraähnliche Symptome und Dermatosen die Folge eines B₆-Mangels beim Menschen sein können.

Später hat sich gezeigt, daß Pyridoxin nur eine Form des B₆-Faktors ist und neben ihm zwei nahe Verwandte, Pyridoxal und Pyridoxamin, in der Natur vorkommen²⁴. Alle drei Verbindungen sind synthetisch zugänglich, Pyridoxal am besten durch Oxydation des Pyridoxins²⁵.

²¹ P. KARRER, M. VISCONTINI, *Helv.* **29**, 711 (1946).

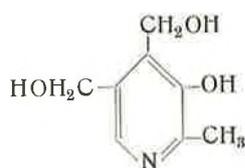
²² *Ergebnisse Enzymforschung* **2**, 314 (1933).

²³ S. LEPKOVSKY, *Science* **87**, 169 (1938) — J. C. KERESZTESY u. I. R. STEVENS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **38**, 64 (1938) — P. GYÖRGY, *Am. Soc.* **60**, 983 (1938) — R. KUHN u. G. WENDT, *B.* **71**, 780, 1118 (1938) — A. ITIBA u.

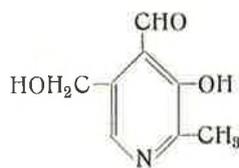
K. MITI, *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Research (Tokyo)* **34**, 623 (1938).

²⁴ E. E. SNELL, *J. biol. Ch.* **154**, 313 (1944) — *Am. Soc.* **66**, 2082 (1944) — *J. biol. Ch.* **157**, 491 (1945).

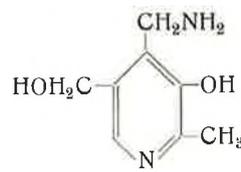
²⁵ HARRIS, HEYL, FOLKERS, *Am. Soc.* **66**, 2088 (1944).



Pyridoxin



Pyridoxal



Pyridoxamin

Die drei Substanzen besitzen für viele Mikroorganismen sowie für höhere Tiere, z. B. für Ratten, Vitamin B₆-Wirkung. Manche Mikroorganismen verwerten Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin gleich gut, für einige ist ersteres etwas wirksamer, für viele andere erweist sich aber die Wirkung des Pyridoxals und Pyridoxamins mehrere bis mehrere tausend Male größer als diejenige des Pyridoxins²⁶.

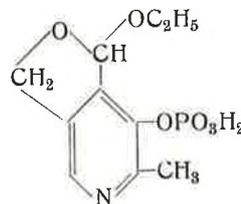
Pyridoxal wurde ebenfalls als Bestandteil eines Coferments erkannt. Es läßt sich auf biologischem Weg (mittels Adenosintri-phosphorsäure) oder mit chemischen Methoden in einen Phosphorsäureester überführen, welcher die Wirkungsgruppe verschiedener Decarboxylasen sein soll, welche natürliche l-Aminocarbonsäuren zu den betreffenden Aminen decarboxylieren²⁷. Solche Reaktionen spielen sich bei jeder Fäulnis von Eiweißstoffen ab. Dieser Pyridoxal-phosphorsäureester, die *Codecarboxylase*, konnte auch in natürlichen Quellen nachgewiesen werden.

Tyrosin²⁹, Arginin²⁸, Glutaminsäure²⁸, Ornithin²⁹ und Dioxyphenylalanin³⁰ bedürfen nach Angaben amerikanischer Forscher zur Decarboxylierung dieser Fermente, die alle denselben Pyridoxal-phosphorsäureester als Wirkungsgruppe, aber verschiedene Apofermente (Eiweißkomponente) enthalten sollen.

Wirksame Pyridoxal-phosphorsäureester-Präpa-

rate stellten zuerst GUNSALUS, UMBREIT, BELLAMY und FOUST durch Einwirkung von Phosphoroxchlorid auf Pyridoxal her³¹. Diese Produkte waren indessen amorph und sehr unrein und enthielten nur 32–36 % Pyridoxal (als Ester). Die Synthese erlaubte auch keine sichere Aussage über die Konstitution des Esters, wenn auch der Umstand, daß letzterer keine Phenolreaktion zeigte, auf eine Veresterung der phenolischen Hydroxylgruppe hindeutete.

In unserem Laboratorium ist es kürzlich gelungen, den Pyridoxal-acetal-phosphorsäureester in prachtvoll krystallisierter, chemisch reiner Form darzustellen³².



Er erwies sich als biologisch voll wirksam, d. h. er spaltet bei Gegenwart der zugehörigen Apofermente Tyrosin in Tyramin und CO₂.



Der Pyridoxal-acetal-phosphorsäureester ist das dritte Coferment, welches sich synthetisch herstellen ließ. Das erste, der Riboflavin-phosphorsäureester, ist indessen nur in unreinem und amorphem Zustand bekannt; das zweite, die Cocarboxylase (Aneurin-pyrophosphorsäureester), wurde zwar rein,

aber nur mikrokrystallin erhalten. Der Pyridoxal-acetal-phosphorsäureester, das Acetal der l-Aminosäure-Codecarboxylase, bildet dagegen große, zu Büscheln vereinigte Nadeln.

Es ist möglich, daß der Pyridoxal-phosphorsäureester auch als Coferment anderer Enzyme, sog.

²⁶ SNELL, RANNEFELD, J. biol. Ch. **157**, 475 (1945).

²⁷ GUNSALUS, BELLAMY, UMBREIT, J. biol. Ch. **155**, 685 (1944).

²⁸ UMBREIT, GUNSALUS, J. biol. Ch. **159**, 333 (1945).

²⁹ BADDILEY, GALE, Nature **155**, 727 (1945).

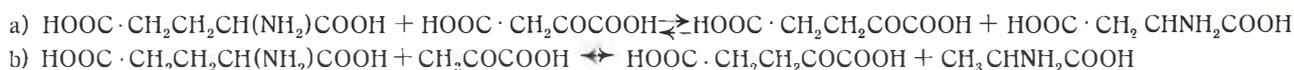
³⁰ LICHSTEIN, GUNSALUS, UMBREIT, J. biol. Ch. **161**, 311 (1945).

³¹ GUNSALUS, UMBREIT, BELLAMY, FOUST, J. biol. Ch. **161**, 743 (1945).

³² P. KARRER, M. VISCONTINI, Helv. **30** (im Druck).

Transaminasen, wirken kann. Hier handelt es sich um Fermente, welche die Aminogruppe der Glutaminsäure auf Oxalessigsäure oder auf Brenztrauben-

säure übertragen können, wobei beide Reaktionen reversibel sind:



In Transaminasen aus höheren Tieren (Rattenmuskel³³, Schweineherz³⁴) glaubt man die Wirkungsgruppen mit Pyridoxalphosphorsäureester identifiziert zu haben, während die Frage der Natur der Wirkungsgruppe der Transaminasen aus Mikroorganismen noch offensteht³⁵. Der krystallisierte Pyridoxal-acetal-phosphorsäureester war nicht befähigt, in einer in *Bac. coli* vorkommenden Transaminase, welche die Übertragung der Aminogruppe

aus Glutaminsäure auf Oxalessigsäure bewirkt, als Coferment zu dienen³⁶.

Über die Art und Weise, wie Pyridoxal-phosphat in die Decarboxylierungsvorgänge bei Aminosäuren und in die Transaminierung eingreift, können wir uns gegenwärtig noch keine Vorstellungen machen. Der Chemismus dieser Reaktionen ist noch nicht geklärt. Aufgabe der zukünftigen Forschung wird es sein, tiefer in diese Probleme einzudringen.