

# Über den Abbau des Nicotins durch Bakterienenzyme

Von

Karl Decker, Horst Eberwein, F. Arnold Gries\* und Margarete Brühmüller

Aus dem Chemischen Universitätslaboratorium München, Institut für Biochemie, und dem Max-Planck-Institut für Zellechemie, München

(Der Schriftleitung zugegangen am 14. Mai 1960)

Beim Studium des Nicotinabbaus durch verschiedene Organismen wurden bislang nur einzelne, ausgeschiedene Reaktionsprodukte charakterisiert. Untersuchungen über die enzymatischen Vorgänge sind erst in jüngster Zeit in Angriff genommen worden<sup>1,2</sup>.

Unsere Versuche wurden an dem aeroben Bodenbakterium *Arthrobacter oxydans* durchgeführt, das auf L-Nicotin als einziger C- und N-Quelle wächst und dabei etwa 30% des Substrats in ein Gemisch tiefblauer und violetter Pigmente umwandelt. Die intakten Bakterien nehmen pro Mol L-Nicotin 5,6 Mol O<sub>2</sub> auf und entwickeln dabei 2,4 Mol CO<sub>2</sub>. Ein partieller Abbau des Nicotins unter Bildung von Farbstoff sowie der im folgenden beschriebenen Produkte findet in Gegenwart eines Elektronenacceptors auch in zellfreien Extrakten statt. In einem solchen System beträgt die Sauerstoffaufnahme 1,5 Mol O<sub>2</sub> pro Mol L-Nicotin; CO<sub>2</sub> wird nicht gebildet. Die Verwendung von Dichlorphenol-indophenol als Oxydans ermöglicht es, die oxydativen Abbauschritte optisch zu verfolgen. Mit dieser analytischen Methode ließ sich das Enzymsystem fraktionieren, das die ersten Abbauschritte katalysiert.

Verfolgt man den Abbau des Nicotins durch UV-Spektroskopie, so lassen sich durch das Erscheinen charakteristischer Maxima mehrere Zwischenprodukte nachweisen. Eine Auftrennung dieser Substanzen gelingt durch Papierchromatographie; besonders bei Verwendung von Nicotin, dessen Methylgruppe mit <sup>14</sup>C markiert ist, war die Reihenfolge des Auftretens der einzelnen Substanzen deutlich zu erkennen (*R<sub>F</sub>*-Werte in n-Butanol/Eisessig/Wasser 10 : 1 : 3 auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b, mit Salzsäure gewaschen und mit 0,2 *m* Natriumacetat besprüht: I 0,34; III 0,23; V 0,47).

Der erste Abbauschritt erfolgt unter Aufnahme von 0,5 Mol O<sub>2</sub>/Mol Nicotin; das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, die Nicotinoxidase, wurde 20fach angereichert (Aufschluß der Zellen durch hochtouriges Schütteln mit Reflexperlen, Fraktionierung des 22000 × *g*-Überstands mit Protaminsulfat, Calciumphosphatgel und Ammoniumsulfat). Das Reaktionsprodukt I konnte aus L-Nicotin mit zellfreiem Extrakt oder angereichertem Enzym in Gegenwart eines Elektronenacceptors in größerer Menge dargestellt und isoliert werden. Die enzymatische Herstellung von I wird dadurch erleichtert, daß sein weiterer Abbau in Gegenwart überschüssigen Nicotins nur sehr langsam erfolgt. Das Produkt ist von synthetischem DL-6-Hydroxy-nicotin<sup>3</sup> hinsichtlich des UV- ( $\epsilon_{297} = 6300$ ;  $\epsilon_{231} = 13600$  bei *p<sub>H</sub>* 6,8) und IR-Spektrums und der Elementaranalyse nicht zu unterscheiden; während aber das *racem.* 6-Hydroxy-nicotin einen Schmp. von 105° hat, schmilzt I

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

<sup>1</sup> L. I. Hochstein u. S. C. Rittenberg, *J. biol. Chemistry* **234**, 151, 156 [1959].

<sup>2</sup> H. Eberwein, Diplomarbeit u. Dissertation, Universität München 1960.

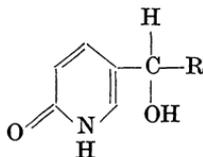
<sup>3</sup> A. E. Tschitschibabin u. A. W. Krissanow, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **57**, 1163 [1924].

bei 123° und besitzt einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{23}$ : -69°. Behandelt man I 4 Stdn. mit 1 *n* NaOH bei 175°, wird es optisch inaktiv und schmilzt bei 104° (Misch-Schmp. mit DL-6-Hydroxy-nicotin 103-104°). Es handelt sich also bei der enzymatisch gewonnenen Substanz I um L-6-Hydroxy-nicotin. Dieses Ergebnis wird auch durch die Untersuchungen von Hochstein und Rittenberg bestätigt<sup>1</sup>.

Von den beiden Antipoden des 6-Hydroxy-nicotins wird — im Gegensatz zu der Umwandlung von DL-Nicotin zu DL-6-Hydroxy-nicotin — nur der linksdrehende weiter abgebaut, während der rechtsdrehende unverändert bleibt; so konnte durch selektiven Abbau des L-6-Hydroxy-nicotins aus dem Racemat D-6-Hydroxy-nicotin rein dargestellt werden (Schmp. 121°,  $[\alpha]_D^{23}$ : +67°).

Läßt man auf L-6-Hydroxy-nicotin Enzymextrakt mit oder ohne Zusatz von Elektronenacceptoren einwirken, so findet man ein Zwischenprodukt (III), das, bei Hemmungen weiterer Reaktionen mittels *p*-Chlormercuri-benzoat, quantitativ angehäuft wird. Diese Reaktion ist mit der Aufnahme von 0,5 Mol O<sub>2</sub> pro Mol L-6-Hydroxy-nicotin verbunden. Das Produkt III läßt sich isolieren, indem man den enzymatischen Ansatz nach Gefriertrocknung mit absolutem Alkohol auszieht und den Extrakt mit neutralem Aluminiumoxyd reinigt; es kann aus Alkohol-Äther fraktioniert kristallisiert werden (Schmp. 157°). Das UV-Spektrum von III zeigt eine charakteristische *p*<sub>H</sub>-Abhängigkeit (*p*<sub>H</sub>2:  $\epsilon_{288}$  = 16000; *p*<sub>H</sub> 10,5:  $\epsilon_{329}$  = 25600; *p*<sub>H</sub> 14:  $\epsilon_{310}$  = 19800). Ebenso verhält sich synthet. gewonnenes 6-Hydroxy-3-[ $\gamma$ -methylamino-butyl]-pyridin (A). A zeigt auch im Enzymansatz das gleiche Verhalten wie III hinsichtlich der Umsatzgeschwindigkeit und der Reaktionsprodukte. In der Papierelektrophorese und -chromatographie sind A und III nicht zu unterscheiden. Wir glauben demnach in Übereinstimmung mit Hochstein<sup>4</sup> der Substanz III die Struktur A zuordnen zu dürfen. III und A bilden kein Dinitrophenylhydrazon oder Semicarbazon; mit salzsaurem FeCl<sub>3</sub> zeigen beide keine Farbreaktion.

Behandelt man III mit KBH<sub>4</sub>, so entsteht ein Produkt mit dem Spektrum des 6-Hydroxy-nicotins. Auch Modellsubstanzen der Struktur



besonders das Reduktionsprodukt von A, zeigen gleiches spektrales Verhalten. Diese als II bezeichnete Substanz unterscheidet sich jedoch von 6-Hydroxy-nicotin deutlich im *R<sub>F</sub>*-Wert. Durch Bakterienenzyme werden 50% von II (ebenso auch von reduziertem A) mit gleicher Geschwindigkeit wie DL-6-Hydroxy-nicotin in das Keton (III) umgewandelt. Wir vermuten deshalb, daß der Verbindung II die Struktur des 6-Hydroxy-3-[ $\alpha$ -hydroxy- $\delta$ -methylamino-butyl]-pyridins zukommt und sie das beim Übergang von I nach III zu erwartende Zwischenprodukt ist. Seine Bildung aus 6-Hydroxy-nicotin stellt ein interessantes biologisches Analogon zur Menschutkinschen Variante des Hofmann-Abbaus<sup>5</sup> dar.

Inkubiert man III mit den Bakterienenzymen, so entstehen vorwiegend blaue Pigmente; in Gegenwart von Elektronenacceptoren — sehr viel langsamer auch ohne diese — beobachtet man unter Aufnahme von 0,5 Mol O<sub>2</sub> pro Mol III eine Abnahme der 287- $\mu$ -Absorption und das Auftreten eines starken Maximums bei 340  $\mu$ . Es läßt sich einem Produkt (IV) zuordnen, welches sich durch große Instabilität auszeichnet und bislang nicht rein dargestellt werden konnte. Schon beim Stehenlassen in wäßriger oder nichtwäßriger Lösung geht IV spontan in eine Verbindung V über, deren stärkstes Absorptionsmaximum in neutraler Lösung bei

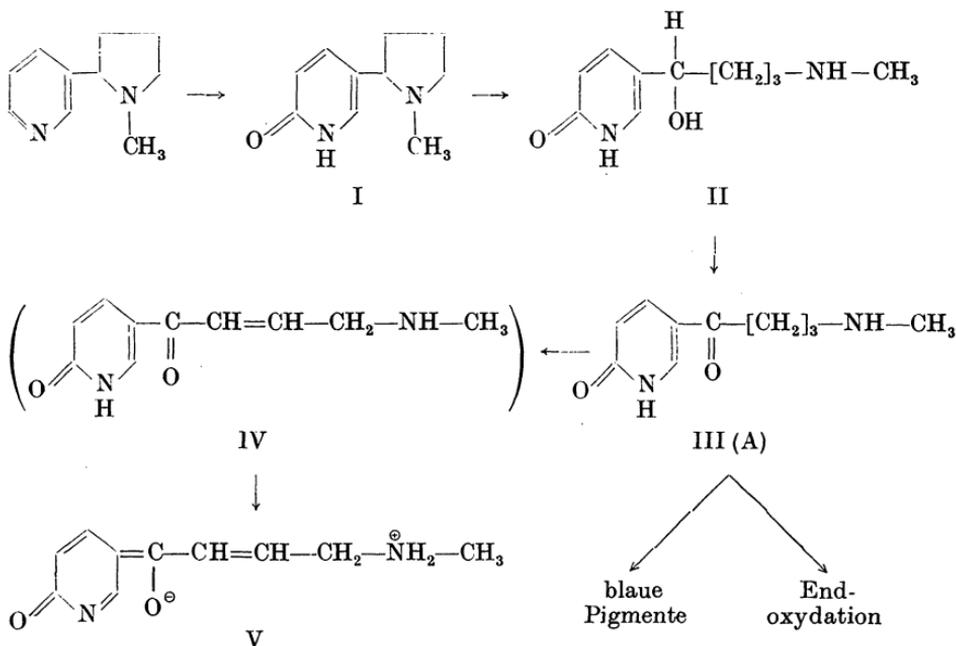
<sup>4</sup> L. I. Hochstein u. S. C. Rittenberg, J. biol. Chemistry **235**, 795 [1960].

<sup>5</sup> J. Read u. J. Walker, J. chem. Soc. [London] **1934**, 308.

358  $m\mu$  liegt ( $pH$  6,8:  $\epsilon_{358} = 29800$ ,  $\epsilon_{288} = 4380$ ,  $\epsilon_{216} = 10600$ ;  $pH$  14:  $\epsilon_{348} = 23400$ ,  $\epsilon_{275} = 4800$ ,  $\epsilon_{222} = 7300$ ).

Diese Substanz erhält man auch als Endprodukt der Oxydation von L-Nicotin durch Bakterienextrakt in Gegenwart von Dichlorphenol-indophenol. Nach Entfernung des Farbstoffes aus dem Reaktionsansatz gewinnt man V durch Gefrier-trocknung und Extraktion mit Essigester. V kristallisiert aus Alkohol in schönen, schwach gelben Nadeln vom Schmp. 256—257°. Die Mol.-Gew.-Bestimmung nach Rast, die Elementaranalyse sowie die Sauerstoffbilanz seiner Bildung weisen ihm die Formel  $C_{10}H_{12}N_2O_2$  zu. Es besitzt keine optische Aktivität. Obgleich es bei enzymatischen Reaktionen (in Gegenwart von Oxydantien) auftritt, wird es weder durch Extrakte noch durch Trockenzellen oder intakte Bakterien weiter verändert; dies wurde auch durch Versuche mit  $^{14}C$ -markiertem V gesichert. Versuche mit markiertem Nicotin an intakten Bakterien oder mit Trockenzellen ohne Oxydantien ergeben keinen Anhalt für ein Auftreten dieser Substanz im Stoffwechsel der lebenden Zelle. Es dürfte sich also bei der Bildung der Verbindung V um einen unphysiologischen Vorgang handeln.

Auf Grund dieser Untersuchungen und vergleichender Studien über den Abbau verwandter Alkaloide (Nornicotin, Myosmin, Methylmyosmin und Anabasin)<sup>2</sup> stellen wir diese Reaktionsfolge für den enzymatischen Abbau des Nicotins zur Diskussion:



Eine ausführliche Beschreibung der Versuche erfolgt in weiteren Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen sind wir für sein großes Interesse und zahlreiche Anregungen zu besonderem Dank verpflichtet.

### Zusammenfassung

Der Abbau des L-Nicotins in einem zellfreien System aus *Arthrobacter oxydans* erfolgt unter Einführung einer Hydroxylgruppe in 6-Stellung des Pyridinrings, Öffnung des Pyrrolidinrings und successive Dehydrierung der daraus entstandenen Seitenkette. Daten über den Nachweis der einzelnen Reaktionsschritte und über die Gewinnung und Charakterisierung der Zwischenprodukte werden angeführt und ein Reaktionsschema für die ersten Abbauschritte vorgeschlagen.

### Summary

The degradation of L-nicotine by a cell free system from *Arthrobacter oxydans* is accomplished by the introduction of a hydroxyl group in the 6-position of the pyridine ring, opening of the pyrrolidine ring, and successive dehydrogenation of the resultant side chain. Data are presented in evidence for the single reaction steps and for the isolation and characterization of the intermediate products. A scheme for the initial reaction steps is proposed.

*Dr. Karl Decker, Chemisches Universitätslaboratorium, Institut für Biochemie, München 2, Karlstraße 23.*

---