

118. Über den Mechanismus der Reaktivierung der Bernstein-säure-Cytochrom-c-Reduktase durch die Vitamine E und K

von F. Weber, U. Gloor und O. Wiss.

(28. IV. 58.)

Von den Vitaminen E und K wird vermutet, dass sie an der Atmungskette mit ihrem Oxydoreduktionssystem beteiligt sind¹⁾. Wesentliche Stützen dieser Annahme sind Untersuchungen mit schonend extrahierten Enzympräparaten, die sich durch Zusatz dieser Vitamine oder des extrahierten Materials reaktivieren lassen^{2) 3) 4)}.

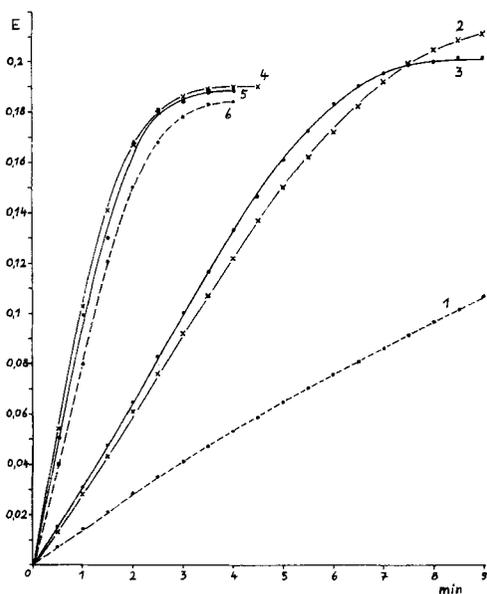


Fig. 1.

Aktivierung des Enzyms durch d-α- und dl-α-Tocopherol.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,08 $\mu\text{Mol/ml}$ d- α -Tocopherol
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,16 $\mu\text{Mol/ml}$ dl- α -Tocopherol
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ d- α -Tocopherol
- 5) Extrahiertes Enzym + 0,64 $\mu\text{Mol/ml}$ dl- α -Tocopherol
- 6) Nicht extrahiertes Enzym.

¹⁾ C. Martius, Biochem. Z. **326**, 24, 26 (1954).

²⁾ D. Deul, E. C. Slater & L. Veldstra, Biochim. biophys. Acta **27**, 133 (1958).

³⁾ A. Nason & I. R. Lehman, J. biol. Chemistry **222**, 511 (1956).

⁴⁾ G. V. Marinetti, J. Kochen, J. Eybland & E. Stotz, J. biol. Chemistry **229**, 1027 (1957).

Mit den folgenden Untersuchungen wird versucht festzustellen, worauf diese reaktivierende Wirkung beruht, ob das Redoxsystem oder andere funktionelle Anteile dafür verantwortlich sind. Es wird die Reaktivierung am Beispiel der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase geprüft, die aus Schweineherzen nach Green und Mitarb.⁵⁾ hergestellt ist, wobei von der letzten Reinigungsstufe abgesehen wird.

Von den verschiedenen geprüften α -Tocopherolen erweisen sich alle als wirksam. Wie aus Fig. 1–3 hervorgeht, bestehen jedoch erhebliche Aktivitätsunterschiede. *d*- α -Tocopherol ist doppelt so aktiv wie *dl*- α -Tocopherol.

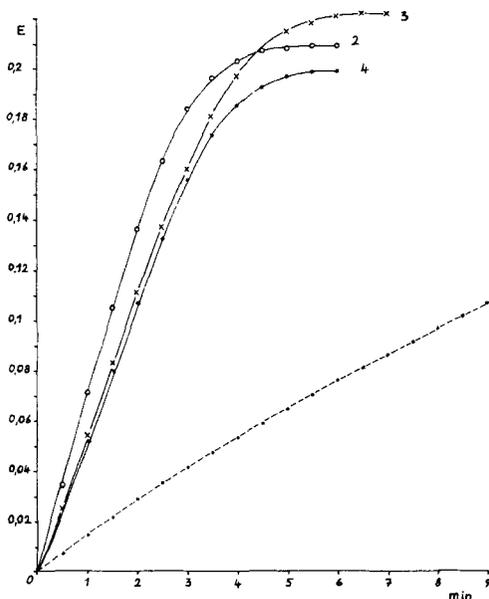


Fig. 2.

Aktivierung des Enzyms durch α -Tocopherylchinon.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml α -Tocopherylchinon
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml *d*- α -Tocopherol
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,32 μ Mol/ml *dl*- α -Tocopherol.

Noch wirksamer als *d*- α -Tocopherol ist das α -Tocopherylchinon. *dl*- α -Tocopherol zeigt in äquimolaren Mengen genau die gleiche Wirksamkeit wie *dl*- α -Tocopherylacetat. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das Redoxsystem nicht an der Wirkung beteiligt ist. Eine Spaltung der Esterbindung zum freien Tocopherol kommt unter den gewählten Versuchsbedingungen kaum in Betracht.

Versuche mit Vertretern der Vitamin-K-Reihe führen zu analogen Ergebnissen (Fig. 4). Vitamin K₁ und das entsprechende Diacetat der Naphtohydrochinonstufe sind gleich aktiv. Von besonderem Interesse ist jedoch die Beob-

⁵⁾ D. E. Green, S. Mii & P. M. Kohout, J. biol. Chemistry **217**, 551 (1955).

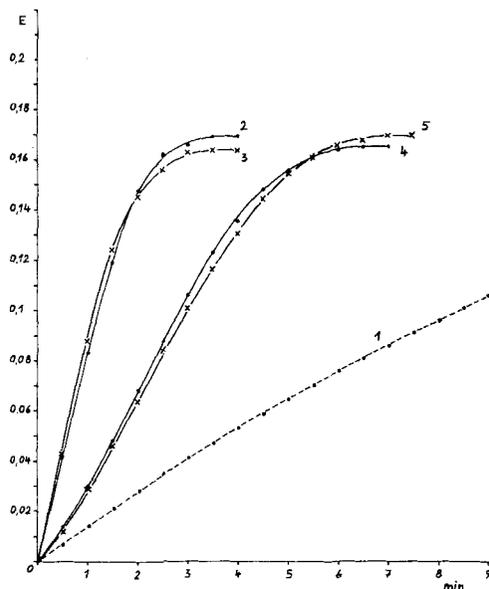
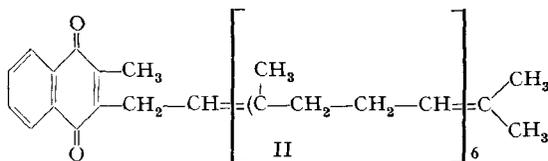


Fig. 4.

Aktivierung des Enzyms durch Vitamin K_1 und Di-O-acetyl-dihydro-vitamin K_1 .

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,32 μ Mol/ml Vitamin K_1
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,32 μ Mol/ml Diacetyl-dihydro-vitamin K_1
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml Vitamin K_1
- 5) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml Diacetyl-dihydro-vitamin K_1 .

Es drängt sich der Vergleich mit anderen, ähnlich gebauten Substanzen auf. Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Vitamin A und Cholesterin erweisen sich als unwirksam oder haben zum Teil eine hemmende Wirkung. Somit zeigt sich, dass für die Aktivierung einerseits eine isoprenartige Struktur notwendig ist, dass aber andererseits ein konjugiert ungesättigtes System (Vitamin A) nicht aktiviert (Fig. 8).

Experimenteller Teil.

1. *Präparation der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase.* Als Ausgangsmaterial für die Präparation des Enzyms, die im wesentlichen nach einer Vorschrift von Green und Mitarb.⁵⁾ erfolgte, wurden frische auf 0° abgekühlte Schweineherzen (2 kg) verwendet. Nach Entfernung des Fettes und Bindegewebes von den Muskeln wurden diese in kleine Stücke zerteilt. Je 200 g davon wurden in 300 ml einer eiskalten Lösung von 85 g Rohrzucker und 5 g K_2HPO_4 pro Liter im *Servall* Omnimixer zweimal 1 Min. lang bei 15'000 Umdrehungen homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Zugabe von 6-n. KOH auf pH 7,0 eingestellt und dann in der Kühlzentrifuge bei 2'500 g 5 Min. lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde durch Gaze filtriert und dann mit 7,5 Liter kalter 0,9-proz. KCl-Lösung vermischt. Diese Suspension wurde portionsweise in der Kühlzentrifuge bei 2° bei 40'000 g während 6 Min. zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in 400 ml 0,9-proz. KCl-Lösung suspendiert, über Nacht im Kältelabor bei 2° stehengelassen und dann bei -15° eingefroren.

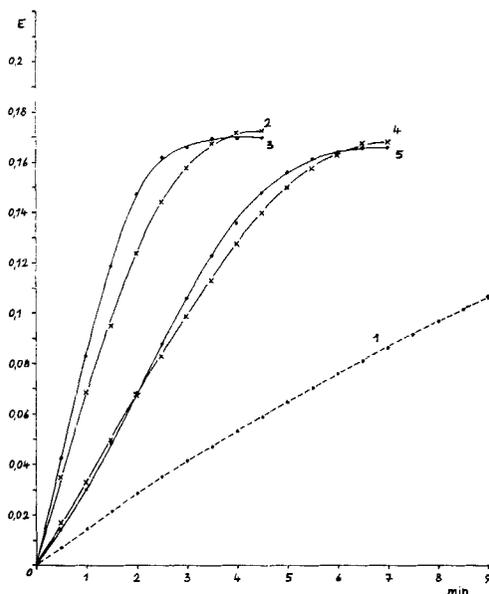


Fig. 5.

Aktivierung des Enzyms durch Phytol.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ Phytol
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ Vitamin K_1
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,16 $\mu\text{Mol/ml}$ Phytol
- 5) Extrahiertes Enzym + 0,16 $\mu\text{Mol/ml}$ Vitamin K_1 .

Für die zweite Präparationsstufe wurde die in kaltem Wasser aufgetaute Suspension 1 Std. lang bei 3'000 g in der Kühlzentrifuge bei 2° zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde in 250 ml einer eiskalten Lösung von 48 g Rohrzucker, 3,3 g KCl und 0,8 g bernsteinsaurem Natrium pro Liter suspendiert, im *Potter-Elvehjem*-Apparat homogenisiert und dann bei -15° eingefroren.

Dritte Stufe: Nach dem Auftauen und nochmaligem Homogenisieren der Suspension im *Potter*-Gefäß wurde diese mit kaltem tertiärem Amylalkohol in einem Verhältnis von 10 ml Amylalkohol zu 100 ml Suspension vermischt und 10 Min. stehengelassen. Dann wurde 0,5-m. Phosphatpuffer vom pH 7,6 im Verhältnis von 5 ml Puffer zu 100 ml Amylalkohol-haltiger Suspension zugegeben. Die Suspension wurde im *Potter*-Gerät homogenisiert und anschliessend in der Kühlzentrifuge 6 Min. bei 40'000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit einem weniger scharf abzentrifugierten Sediment von dem fest niedergeschlagenen Sediment abgossen und mit der vierfachen Menge 8,5-proz. Rohrzuckerlösung verdünnt. Es wurde dann im *Potter*-Apparat homogenisiert und 30 Min. in der Kühlzentrifuge bei 40'000 g und 2° zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100 ml 8,5-proz. Rohrzuckerlösung suspendiert, im *Potter*-Gefäß homogenisiert und bei -15° eingefroren und aufbewahrt.

2. *Extraktion der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase mit Iso-octan.* Enzymsuspension der Stufe 3 wurde mit eiskaltem Iso-octan im Verhältnis 1:1 vermischt, 2 Min. lang in geschlossenen Zentrifugengläsern geschüttelt und anschliessend 2 Min. bei 600 g in der Kälte zentrifugiert. Nach Absaugen der überstehenden Iso-octanschicht wurde die Enzymsuspension mit der gleichen Menge frischen Iso-octans wie beschrieben geschüttelt und

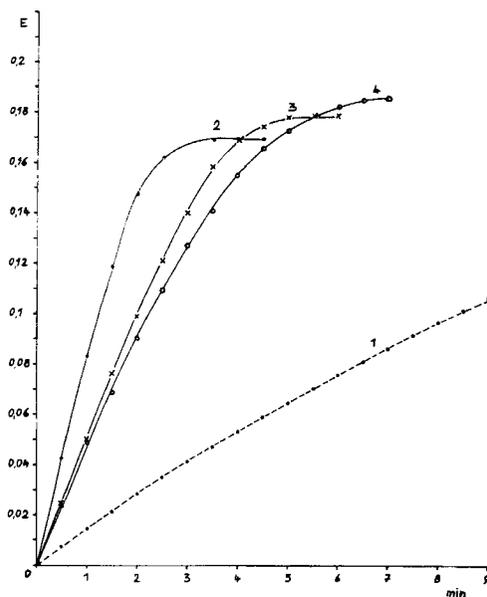


Fig. 6.

Aktivierung des Enzyms durch Isophytol und Phytansäure.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ Vitamin K₁
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ Isophytol
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ Phytansäure.

zentrifugiert. Diese Extraktionsprozedur wurde im ganzen fünfmal durchgeführt. Nach Beendigung der Extraktion wurde die Enzymsuspension im *Potter*-Gerät homogenisiert und bei -15° eingefroren und aufbewahrt.

3. *Aktivitätsbestimmung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase.* Es wurde spektrophotometrisch die Reduktion von Cytochrom c im *Eppendorf*-Photometer bei 546 $m\mu$ gemessen. Die Küvetten (Schichtdicke 1 cm) befanden sich immer im heizbaren Küvettenhalter bei 25° . Die Testlösung hatte folgende Zusammensetzung (in der Reihenfolge des Zusatzes der Komponenten): 2,45 ml 0,1-m. Phosphatpuffer vom pH 7,4; 0,1 ml 2-proz. wässrige Lösung von Cytochrom c; 0,3 ml Suspension der auf Aktivierung zu prüfenden Substanzen (siehe unten); 0,05 ml Enzym (320 γ Protein); 0,03 ml 0,01-m. KCN-Lösung. Nach dem Mischen dieser Testlösung wurde am Photometer die Extinktion auf 0,1 eingestellt. Durch Zugabe von 0,2 ml einer 0,1-m. Lösung von Natriumsuccinat wurde die Enzymreaktion ausgelöst; dann wurde alle 30 Sek. die Extinktion am Photometer abgelesen, bis die Reaktion beendet war. Die erste Messung bei 30 Sek. nach Zugabe des Substrates wurde als 0-Wert von den folgenden Messungen abgezogen. Die so erhaltenen Messwerte für die Cytochrom-c-Reduktion wurden graphisch dargestellt.

Suspension von Vitamin E und K, sowie der anderen geprüften Substanzen (in Anlehnung an *Deul et al.*²⁾: 7,5 μMol von jeder untersuchten Substanz wurden in 0,2 ml absolutem Alkohol bei gelindem Erwärmen auf 40° gelöst und mit 0,8 ml einer 0,25-proz.

Lösung von Rinderserumalbumin (Aufarbeitung nach der Alkoholfraktioniermethode 6 von *Cohn*) in 0,1-m. Phosphatpuffer vom pH 7,4 vermischt. Von diesen Suspensionen wurden je nach der gewünschten Konzentration 0,05–0,3 ml eingesetzt. Wurde weniger als 0,3 ml verwendet, so wurde das Volumen durch Zusatz der entsprechenden Menge Alkohol-Rinderserumalbumin-Lösung (im gleichen Verhältnis 0,2:0,8 ml gemischt) ergänzt.

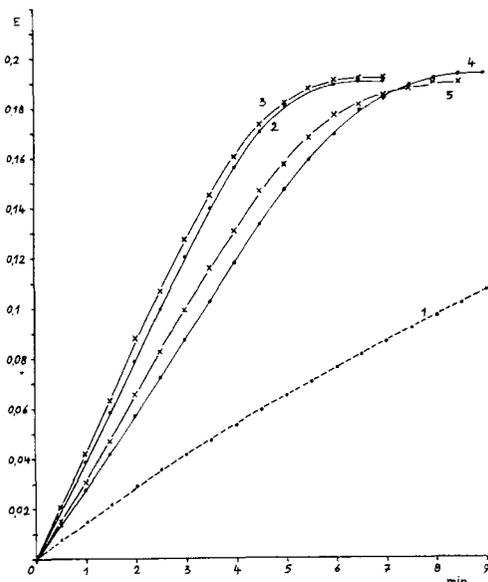


Fig. 7.

Aktivierung des Enzyms durch Vitamin K_2 und Squalen.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,32 μ Mol/ml Vitamin K_2
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,32 μ Mol/ml Squalen
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml Vitamin K_2
- 5) Extrahiertes Enzym + 0,16 μ Mol/ml Squalen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Enzympräparates erfolgte durch Bestimmung des Trockengewichtes nach Extraktion des Fettes mit Alkohol, entsprechend den Angaben von *Slater*⁸⁾.

Diskussion

Am Beispiel der Cytochrom-c-Reduktase wurde in früheren Untersuchungen^{2) 3) 4)} gezeigt, dass milde Extraktion mit organischen Lösungsmitteln eine Inaktivierung zur Folge hat und dass durch Zusatz von extrahiertem Material oder von Vitamin E und K eine vollständige oder teilweise Reaktivierung möglich ist.

Die hier mitgeteilten Versuche zeigen, dass zur Reaktivierung eine isoprenartige Struktur notwendig ist und es wird somit wahrscheinlich gemacht, dass solche Strukturen als Baustein für funktionelle Anteile der Mitochondrien von Bedeutung sind.

⁸⁾ *E. C. Slater*, *Biochem. J.* **45**, 1 (1949).

Die Tatsache, dass die Vitamine E, K₁ und K₂ gleich wirksam sind wie die entsprechenden Seitenketten, zeigt, dass ihr Redoxsystem in dieser Versuchsanordnung nicht für die Aktivierung verantwortlich ist. Es scheint somit, dass hier eine Teilfunktion dieser Vitamine zum Ausdruck kommt, die darin besteht, dass die Seitenkette die Verankerung am Fettanteil der Mitochondrien ermöglicht.

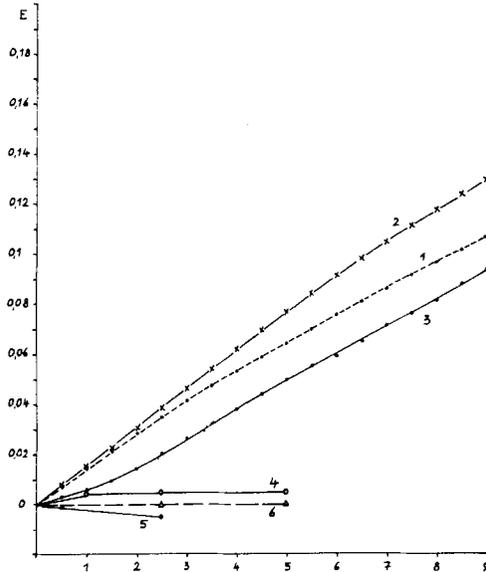


Fig. 8.

Aktivierungsversuch mit Cholesterin, C₁₈-Fettsäuren und Vitamin A.

- 1) Extrahiertes Enzym
- 2) Extrahiertes Enzym + 0,64 μ Mol/ml Cholesterin
- 3) Extrahiertes Enzym + 0,64 μ Mol/ml Stearinsäure
- 4) Extrahiertes Enzym + 0,64 μ Mol/ml Ölsäure
- 5) Extrahiertes Enzym + 0,64 μ Mol/ml Linolsäure
- 6) Extrahiertes Enzym + 0,64 μ Mol/ml Vitamin A.

Untersuchungen über die Spezifität dieser Wirkung zeigen, dass sie auf der einen Seite sehr ausgeprägt ist. Nur isoprenartige Strukturen erweisen sich als wirksam. Auf der anderen Seite sind doch erhebliche Variationen in der Kettenlänge und im Sättigungsgrad möglich. Es scheint somit, dass die Verankerung an die Struktur nicht durch definierte chemische Bindungen zustandekommt, wie das bei wasserlöslichen Coenzymen der Fall ist, sondern dass spezifische physikalische Eigenschaften, wie z. B. Oberflächenaktivität, hier wirksam sind.

Zur Erklärung der Stoffwechselfunktion fettlöslicher Vitamine wird häufig von der Voraussetzung ausgegangen, dass zwecks Bindung an ein Apoferment hydrophile Gruppen eingeführt werden müssen. Diese Versuche sprechen dafür, dass gerade die fettlösliche Seitenkette für die Bindung von Bedeutung ist.

Die Tatsache, dass *dl*- α -Tocopherol nur halb so aktiv ist wie das *d*- α -Tocopherol, zeigt, dass sterische Einflüsse von Bedeutung sind. Diese Beob-

achtung ist jedoch nicht geeignet, etwas über die Vitaminwirkung des *d*- α -Tocopherol im Vergleich zum *dl*- α -Tocopherol auszusagen. Wenn von der Annahme ausgegangen wird, dass das Vitamin E auch durch sein Redoxsystem wirkt, muss es durch Ringspaltung in ein Benzochinonderivat vom Typ des Tocopherylchinons übergeführt werden. Tocopherylchinon, dargestellt aus *dl*- α -Tocopherol, ist jedoch in dieser Versuchsanordnung noch wirksamer als *d*- α -Tocopherol.

Im Gegensatz dazu haben *Nason & Lehman*³⁾ bei Verwendung von DPNH-Cytochrom-c-Reduktase nur für das *d*- α -Tocopherol, nicht aber für *dl*- α -Tocopherol und Tocopherylchinon eine aktivierende Wirkung feststellen können.

SUMMARY.

1. Cytochrome-c reductase, inactivated by extraction, can be reactivated not only by α -tocopherol but also by its acetate.

2. Likewise, not only vitamin K₁ but also di-O-acetyl-dihydro vitamin K₁ has been found to be active, as well as vitamin K₂.

3. Phytol and squalene are reactivating to the same extent as vitamin K₁ resp. K₂. Isophytol and phytanoic acid are also active.

4. Stearic acid, oleic acid, linoleic acid, vitamin A and cholesterol are inactive.

From these data we may conclude that under the conditions indicated it is not the redox system of vitamins E and K, but their isoprene side chain which is responsible for the reactivation of succinate-cytochrome-c reductase.

Biochemische Forschungsabteilung
der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.*, Basel.

119. Die Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch Vitamin K₁, 2-Methyl-1,4-naphtochinon und Ubichinon

von **F. Weber**, **U. Gloor** und **O. Wiss**.

(28. IV. 58.)

*Nason & Lehman*¹⁾ haben gezeigt, dass die Cytochrom-c-Reduktase nach schonender Extraktion mit Iso-octan durch Vitamin E reaktiviert werden kann. Wirksamer als Vitamin E erwies sich ein Bestandteil des extrahierten Materials. Auch *Marinetti et al.*²⁾ isolierten aus Schweineherzen-Mitochondrien verschiedene Lipidfraktionen, die sich in diesem Test als wirksam erwiesen. Über die Struktur dieser Stoffe ist Sicheres nichts bekannt.

¹⁾ *A. Nason & I. R. Lehman*, J. biol. Chemistry **222**, 511 (1956).

²⁾ *G. V. Marinetti, J. Kochen, J. Erbland & E. Stotz*, J. biol. Chemistry **229**, 1027 (1957).