

Cytochrom c.

II. Über ein durch tryptischen Abbau des Cytochroms c erhaltenes Ferriporphyrin c-Peptid.

Von
H. Tuppy und G. Bodo.

Mit 11 Abbildungen.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 26. April 1954.)

Aus dem tryptischen Hydrolysat des Cytochroms c wurde ein Abbauprodukt isoliert, welches unversehrt die prosthetische Gruppe des Enzyms, jedoch nur mehr ein aus neun Aminosäureresten bestehendes Bruchstück des Apoproteins enthält. In diesem Ferriporphyrin c-Peptid (abgekürzt: „tr-FePc-Peptid“) ist, ebenso wie in Cytochrom c selbst, das Porphyrin mit der Peptidkomponente durch zwei in diese eingebaute Halbcystinreste, die zum Farbstoff Thioätherbrücken schlagen, stabil verbunden. Durch Aufklärung der Aminosäure-Sequenz in der Peptidkomponente des tr-FePc-Peptids, CyS-Ala-Glu-CyS-His-Thr-Val-Glu-Lys, konnte gezeigt werden, daß die beiden Ferriporphyrin-gebundenen Halbcystinreste Glieder einer und derselben Peptidkette und von einander in dieser nur durch zwei Aminosäurereste getrennt sind.

Das tr-FePc-Peptid ist im Gegensatz zu Cytochrom c autoxydabel und besitzt im Bernsteinsäureoxydase- und Cytochromoxydase-System keine Wirksamkeit. Es steigert hingegen kräftig und ohne Mitwirkung irgendwelcher Fermente die Autoxydation der Ascorbinsäure. Auf diese katalytische Aktivität des tr-FePc-Peptids übt α -Benzoyl-L-histidin einen hemmenden Einfluß aus, verbunden mit einer Annäherung des Absorptionsspektrums des tr-FePc-Peptids an das des Cytochroms c, nicht jedoch mit einer Aktivierung im Bernsteinsäureoxydase-System.

In Cytochrom c kommt dadurch eine stabile Verknüpfung von Apoferment und Wirkgruppe zustande, daß zwei Halbcystinreste (CyS)

einerseits peptidisch in die Proteinkomponente des Ferments eingebaut sind, andererseits mit ihren Schwefelatomen Thioätherbrücken zu Seitenketten des Ferriporphyrinskeletts der prosthetischen Gruppe schlagen. Wie aus unserer I. Mitteilung über Cytochrom c hervorgeht¹, sind diese zwei Halbcystinreste Glieder der Aminosäure-Sequenzen ... Lys-CyS-Ala-Glu ... und ... Glu-CyS-His ...

In der Absicht, die bisher mit Hilfe eines partiellen Abbaues des Cytochroms c mit Schwefelsäure gewonnenen Ergebnisse zu ergänzen und die Anordnung einer größeren Zahl von Aminosäureresten in der Nähe der prosthetischen Gruppe festzustellen, wurde Cytochrom c nun der Hydrolyse mit proteolytischen Enzymen unterworfen. Als besonders aussichtsreich erwies sich ein Abbau mit Trypsin. Aus der Mischung der hierbei entstehenden Verdauungsprodukte konnte durch Fällungen mit Ammonsulfat, durch Adsorption an Talk und schließlich durch Verteilungschromatographie auf einer Kieselgur-Säule in guter Ausbeute ein einheitliches, rotgefärbtes, die prosthetische Gruppe des Cytochroms c tragendes Peptid erhalten werden. Mit der Aufklärung der Struktur und der Untersuchung einiger Eigenschaften dieses durch tryptischen Abbau gebildeten *Ferri-Porphyrin-c-Peptids* — abgekürzt: tr-FePc-Peptids — befaßt sich die vorliegende Mitteilung.

Bereits vor einigen Jahren hat Tsou^{2,3,4} Cytochrom c mit mehreren proteolytischen Enzymen, mit Pepsin, Papain, Trypsin und Chymotrypsin, abgebaut und die katalytische Wirksamkeit der so modifizierten Cytochrome untersucht. Abgesehen von Angaben über den Eisengehalt der verschiedenen Abbauprodukte enthalten die Arbeiten Tsous eine nähere chemische Charakterisierung nur im Falle der „Pepsin-modifizierten Cytochroms c“ in Form einer qualitativen Aminosäureanalyse und von Bestimmungen des Gesamt- und des Amino-Stickstoffgehalts. In keinem Fall wurden genauere Einzelheiten der chemischen Struktur mitgeteilt.

Material.

Die Darstellung des *Cytochroms c* aus Pferdeherzen und seine Reinigung erfolgte auf die in der I. Mitteilung¹ angegebene Weise. Für die meisten Versuche wurden Präparate mit einem Eisengehalt von 0,42 bis 0,44% verwendet. Abbauprodukte, bei denen ein nur bis zur „0,34%-Fe-Stufe“ gereinigtes Cytochrom c⁵ eingesetzt wurde, führten jedoch gleichfalls und in nicht minder befriedigender Weise zur Gewinnung hochgereinigten tr-FePc-Peptids.

¹ H. Tuppy und G. Bodo, Mh. Chem. 85, 807 (1954).

² C. L. Tsou, Nature 164, 1134 (1949).

³ C. L. Tsou, Biochemic. J. 49, 362 (1951).

⁴ C. L. Tsou, Biochemic. J. 49, 367 (1951).

⁵ D. Keilin und E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B 122, 298 (1937).

Das krist. Trypsin war ein käufliches Produkt der Worthington Biochemicals Co.

Die kristallisierte *Bacillus subtilis-Proteinase* („Subtilisin“)^{6,7} war eine Gabe der Herren Prof. K. Linderstrom-Lang und M. Ottesen, Kopenhagen.

α -Benzoyl-L-histidin wurde nach den Angaben von Gerngroß⁸ dargestellt; α -Benzoyl-L-arginin nach Bergmann, Fruton und Pollok⁹; α -Benzoyl-L-lysin aus ϵ -Carbobenzoxy-L-lysin¹⁰ durch Benzylierung und nachfolgende Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppe mittels katalytischer Hydrierung¹¹.

Kieselgur: Für die verteilungschromatographischen Versuche verwendeten wir das Handelsprodukt „Hyflo-Supercel“; dieses wurde vor Gebrauch im allgemeinen mit dem Verteilungsmittel, der leichteren Phase eines n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5)-Gemisches, sorgfältig gewaschen. Das für die Darstellung besonders reinen, für die Analysen und spektrophotometrischen Versuche bestimmten tr-FePc-Peptids verwendete „Hyflo-Supercel“ mußte hingegen einer längeren Reinigungsoperation unterzogen werden: Es wurde der Reihe nach 1. mit 50%igem Alkohol, der 3% NH₃ enthielt, 2. mit Wasser, 3. mit einer Mischung von Eisessig und Alkohol (1 : 4), 4. wieder mit Wasser, 5. mit verd. HCl (1 : 5), 6. noch einmal mit Wasser, bis zur völligen Entfernung der Chlor-Ionen, und 7. schließlich mit Alkohol gewaschen.

Methoden.

Spaltung des Cytochroms c mit Trypsin. 300 mg Cytochrom c (0,43% Fe) und 15 mg krist. Trypsin wurden in 30 ccm 0,1 m Veronalpuffer (pH 8,0) gelöst. Der Puffer war vorher durch kurzes Aufkochen von gelöstem Luft-sauerstoff befreit worden. Die Verdauungsmischung wurde in einem evakuierten Einschlußrohr 20 bis 22 Stdn. lang bei 37° inkubiert. Hierbei entsteht in der Lösung eine sehr geringe Menge eines flockigen Niederschlags. In den meisten Versuchen wurde nach beendeter Inkubation zur Inaktivierung des Trypsins 4 Min. lang in einem kochenden Wasserbad erhitzt, der dabei ausfallende rote Niederschlag, der aus denaturiertem Eiweiß und adsorbiertem farbstoffhaltigem Material bestand, durch Zentrifugieren abgeschieden und verworfen. Wie spätere Versuche zeigten, kann die Ausschaltung des Trypsins durch Erhitzen jedoch auch unterbleiben, ohne daß nachteilige Folgen auftreten.

Fällung des tr-FePc-Peptids mit Ammonsulfat. Zu der klaren Lösung, die ein Zusatz von 12,9 ccm 0,1 n HCl auf ein pH von etwa 5 brachte, wurden je ccm nach und nach 0,5 g festes Ammonsulfat gefügt. Der entstandene Niederschlag, in dem sich nahezu die gesamte Menge gefärbten Materials befand, wurde abzentrifugiert, mit 20 ccm Ammonsulfatlösung (0,5 g/ccm) gewaschen, dann in 20 ccm Wasser suspendiert und durch Zugabe von 6 bis 7 ccm 0,2 n NaOH in Lösung gebracht. Das pH betrug nun zirka 7,5.

⁶ A. V. Güntelberg, C. r. trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **29**, 27 (1954).

⁷ A. V. Güntelberg und M. Ottesen, Nature **170**, 802 (1952); C. r. trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **29**, 36 (1954).

⁸ O. Gerngroß, Z. physiol. Chem. **108**, 50 (1919/20).

⁹ M. Bergmann, J. S. Fruton und H. Pollok, J. Biol. Chem. **127**, 643 (1939).

¹⁰ K. Schlögl und H. Fabitschowitz, Mh. Chem. **84**, 937 (1953).

¹¹ W. F. Ross und L. S. Green, J. Biol. Chem. **137**, 105 (1941).

Hatte man zuvor das zur Denaturierung des Trypsins dienende Erhitzen auf 100° unterlassen, so blieb nun ein lichtrot gefärbtes Produkt ungelöst, welches abzentrifugiert und verworfen wurde. Nach Zusatz einer der zugesetzten Lauge äquivalenten Menge (6 bis 7 ccm) 0,2 n HCl wurde die Fällung mit Ammonsulfat (0,5 g je ccm) wiederholt. Der Niederschlag wurde abermals in verd. Lauge gelöst. Bisweilen war es wieder notwendig, eine geringe Menge ungelöster Substanz durch Zentrifugieren zu entfernen. Die (bei pH 7,5) dunkelrote Lösung des tr-FePc-Peptids wurde durch Säurezusatz wieder auf pH 5 gebracht. Dabei schlägt die Farbe in bräunlichrot um. Aus der schwach sauren Lösung fällt das tr-FePc-Peptid beim Stehen zum Teil in bräunlichroten Flocken aus.

Adsorption an Talk. Die Lösung des tr-FePc-Peptids (pH 5) wurde nun durch eine aus 20 g Talk bereitete Säule filtriert. Der mit dem farbstofftragenden Peptid beladene Talk wurde in der Chromatographiersäule der Reihe nach mit 50 ccm 0,5%iger Essigsäure, 50 ccm Wasser und 60 ccm sehr verd. Ammoniaklösung (1 Teil konz. NH₃ auf 8000 Teile Wasser) gewaschen. Die Waschoption mußte manchmal vorzeitig abgebrochen werden, wenn die Zone des adsorbierten Materials auf der Säule sich rasch verbreiterte und eluiert zu werden drohte. Die Elution des tr-FePc-Peptids vom Talk erfolgte mit wäbr.-alkohol. NH₃ (2 ccm konz. NH₃ in 100 ccm 50%igem Äthanol). Das Eluat wurde im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure eingetrocknet. Der trockene Rückstand war leicht wasserlöslich.

Verteilungschromatographie auf Kieselgur. 20 g gewaschenes, trockenes „Hyflo-Supercel“ wurden mit 6,6 g der unteren Phase des Verteilungsmittels n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) angerieben und hierauf, mit ungefähr 90 ccm der oberen Phase zu einem Brei verrührt, in ein Chromatographierrohr (3 cm Durchmesser) gespült. Das „Hyflo-Supercel“ bildete, sobald es sich abgesetzt hatte, im Rohr eine 9,5 cm hohe Säule. Auf diese wurde das vom Talk eluierte tr-FePc-Peptid, gelöst in 2 bis 3 ccm der oberen Phase des Butanol-Essigsäure-Gemisches, gebracht. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte mit größeren Mengen der oberen Phase. Es bildeten sich zwei gefärbte Zonen aus: Eine, in welcher das tr-FePc-Peptid enthalten war, besaß eine dunkel-braunrote Farbe und lief mit einem R-Wert von 0,80 bis 0,95; die andere, nur schwach bräunlich gefärbt, lief mit R ~ 1,2 voraus. Das Chromatogramm wurde entwickelt, bis die langsamere Zone aus der Säule ausgewaschen war. Durch Eindampfen im Vak. wurden die aus den zwei Zonen stammenden Produkte in fester Form erhalten.

Von beiden Produkten unterwarfen wir je eine Probe einer vollständigen Hydrolyse mit HCl; in den Hydrolysaten wurden nach Abzentrifugieren des abgeschiedenen Farbstoffs folgende Aminosäuren papierchromatographisch nachgewiesen:

	R	(CyS) ₂	Asp	Glu	Ser	Gly	Thr	Ala
tr-FePc-Peptid	0,80 bis 0,95	× × ×	—	× × × × ×	—	—	× × × ×	× × × ×
Rascher wandern- de Zone	~ 1,2	—	×	×	×	× × ×	× × ×	× ×

	R	Val	Phe	Leu + Ileu	Pro	His	Lys	Arg
tr-FePc-Peptid	0,80 bis 0,95	× × × ×	—	×	—	× × ×	× × × ×	—
Rascher wandern- de Zone	~ 1,2	× ×	× × ×	× × × ×	× × ×	×	?	×

Die im Hydrolysat des tr-FePc-Peptids gefundene geringe Menge Leucin und/oder Isoleucin rührt von einer Verunreinigung her. Diese wurde stets dann in größerer Menge angetroffen, wenn bei der Chromatographie die Kieselgur-Säule durch Auftragen von zu viel Substanz überladen worden war. In diesem Falle verhalf eine Wiederholung der Chromatographie zu einem reinen Produkt.

Analytische Bestimmungen. Das durch zweimaliges Chromatographieren in einer Kieselgur-Säule gereinigte tr-FePc-Peptid wurde in 10%iger Essigsäure gelöst. Von dieser Lösung kamen für die einzelnen Analysen sowie auch für die später besprochenen spektrophotometrischen Untersuchungen aliquote Teile zur Verwendung. Zur Bestimmung des *Trockengewichts* wurde ein gemessenes Volumen der essigsäuren Lösung zur Trockene gebracht und der Rückstand im Vak. 5 Stdn. auf 100° erhitzt. Eine auf die gleiche Weise getrocknete Probe diente auch zur Feststellung des salzartig an das tr-FePc-Peptid gebundenen *Acetats* mit Hilfe einer Acetylbestimmung nach *Wiesenberger*¹². Der *Eisengehalt* des tr-FePc-Peptids wurde kolorimetrisch mit o-Phenanthrolin nach der Methode von *Drabkin*¹³ ermittelt, *Schwefel* durch Aufschluß mit metallischem Kalium nach *Zimmermann*¹⁴. Eine Bestimmung des *Aminostickstoffs* erfolgte nach der Methode von *Kainz*¹⁵; um hierbei die Bildung eines unlöslichen Niederschlags zu vermeiden, wurde die Umsetzung des tr-FePc-Peptids in dioxanhaltiger Lösung vorgenommen. Zur Ermittlung des *Aschegehalts* wurde nach vorsichtiger Verbrennung 4 Stdn. lang auf 550° erhitzt.

Spaltung des tr-FePc-Peptids mit Silbersalz und Isolierung eines porphyrin-freien Enneapeptids. Vom tr-FePc-Peptid ließ sich auf die in der I. Mitteilung¹ für Peptide des Porphyrins c beschriebene Weise die Farbstoffkomponente mit Hilfe von Silbersulfat in essigsaurer Lösung abspalten. Das in Freiheit gesetzte cysteinhaltige Peptid wurde nach dem dort angegebenen „modifizierten Verfahren“ vor der Ausfällung des Silbers als Sulfid mit Perameisensäure oxydiert. Nach der H₂S-Fällung wurde die Lösung des oxydierten Peptids durch Ausschütteln mit Tri-n-octylamin von Schwefelsäure befreit und im Vak. zur Trockene verdampft.

Wenn wir verteilungschromatographisch gereinigtes tr-FePc-Peptid mit Silbersulfat spalteten, war es nicht erforderlich, das erhaltene farbstofffreie, cysteinsäurehaltige Produkt (welches hinfort, die Aufklärung seiner Struktur vorwegnehmend, einfach als „Enneapeptid“ bezeichnet werden wird) einer weiteren Reinigung zu unterziehen. War hingegen das tryptische Abbau-

¹² E. Wiesenberger, Mikrochem. 33, 51 (1947).

¹³ D. L. Drabkin, J. Biol. Chem. 140, 387 (1941).

¹⁴ W. Zimmermann, Mikrochem. 35, 80 (1950).

¹⁵ G. Kainz, Mikrochim. Acta [Wien] 1953, 349.

produkt des Cytochroms c nur mit Hilfe von Ammonsulfat-Fällungen und durch Adsorption an Talk isoliert worden, so erwies sich das nach seiner Spaltung mit Silbersalz gewonnene Produkt als eine Mischung von Peptiden, aus welcher das „Enneapeptid“ erst papierchromatographisch herauspräpariert werden mußte (Abb. 1 und Tabelle 1; das „Enneapeptid“ bildet den Fleck Nr. 1). Für die papierchromatographische Isolierung des „Enneapeptids“ kamen Peptidmengen in Frage, die durch tryptischen Abbau von 25 bis 40 mg Cytochrom c erhalten worden waren. Bei größeren Ansätzen versagte die papierchromatographische Trennungsmethode.

Der *N*-terminale Rest des „Enneapeptids“. Für die Endgruppenbestimmung fand ein papierchromatographisch isoliertes Produkt Verwendung. Das aus dem Papier eluierte „Enneapeptid“ wurde in der üblichen Weise¹ dinitrophenyliert und anschließend hydrolysiert. Im Hydrolysat ließen sich folgende Aminosäuren, teils substituiert, teils in freier Form, nachweisen: DNP-CySO₃H (××), ε-DNP-Lys (××), im-DNP-His (××); CySO₃H (××), Glu (×××), Thr (××), Ala (××), Val (××).

Partielle Hydrolyse des „Enneapeptids“ mit Salzsäure.

Eine Menge des Enneapeptids, die durch Abbau von etwa 0,2 g Cytochrom c erhalten worden war, wurde 4½ Tage lang, in 2 bis 3 cm konz. HCl gelöst, bei 37° inkubiert. Dann wurde die Salzsäure durch Abdampfen im Vak. und wiederholtes Eintrocknen des Rückstandes mit Wasser vertrieben. Die zurückbleibende Peptidmischung wurde in 15 cm Wasser gelöst, mit NH₃ auf den Umschlagspunkt von Methylrot gebracht und auf die beschriebene Art und Weise¹ ionophoretisch in 3 Fraktionen, eine saure A, eine neutrale M und eine basische K, aufgetrennt. In der basischen Fraktion konnten wir nur die freien Aminosäuren His und Lys nachweisen. Die Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchung der Fraktionen A und M sind in den Abb. 2 und 3 und den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt.

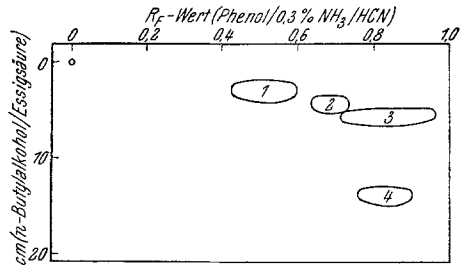


Abb. 1. Papierchromatographische Isolierung des „Enneapeptids“. Vgl. Tabelle 1.

Tabelle 1. Isolierung des „Enneapeptids“ (vgl. Abb. 1).

Fleck Nr. (Abb. 1)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren
1	gelb → viol.	CySO ₃ H (××××), Glu (×××××), Thr (×××), Ala (×××), Val (×××), Lys (×××), His (×××)
2	violett	Glu (××), Lys (××)
3	schwach violett	Asp (××), Glu (×××), Ser (××), Gly (××), Thr (××), Ala (××), Val (××), Leu u./od. Ileu (×××), Pro (×), Lys (×)
4	violett	Gly (××), Leu u./od. Ileu (××)

Spaltung des „Enneapeptids“ mit Subtilisin. „Enneapeptid“ (aus zirka 30 mg Cytochrom c) wurde in einem Tropfen Wasser gelöst, mit wenig 1 n NH_3 auf pH 8 gebracht und mit einer auf pH 8 eingestellten Lösung von 80 μg B. subtilis-Proteinase in 40 μl Wasser versetzt. Die Mischung wurde 24 Stdn. lang, in eine Glaskapillare eingeschmolzen, auf 37° erwärmt. Anschließend erfolgte Inaktivierung des Enzyms durch 3 Min. Erhitzen der Kapillare im siedenden Wasserbad. Der Inhalt der Kapillare wurde auf eine Polythen-Folie gebracht, auf ihr im Exsikkator zur Trockene eingedampft und zweidimensional auf einem halben Bogen Whatman Nr. 4 Filtrierpapier chromatographiert.

Spektrophotometrie. Alle Messungen wurden im Beckman-Spektrophotometer Modell DU vorgenommen. Zur Bestimmung des Spektrums des

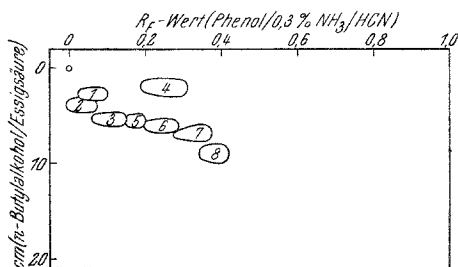


Abb. 2. Partielle Hydrolyse des „Enneapeptids“. Papierchromatographie der sauren Fraktion A. Vgl. Tabelle 2.

tr-FePc-Peptids wurden 0,080 ccm einer Lösung des für die Analysen verwendeten Materials in 10%iger Essigsäure mit 3,34 ccm 0,2 m Na_2HPO_4 auf ein pH ~ 7 gebracht und mit Wasser auf ein Volumen von 10 ccm aufgefüllt. Die molare Konzentration des tr-FePc-Peptids (berechnet unter Zugrundelegung der Eisenbestimmungen) betrug in dieser Lösung $4,06 \cdot 10^{-5}$. Für Messungen der sehr hohen Absorptionsmaxima des reduzierten und oxydierten tr-FePc-Peptids bei 413 bzw. 396 μ wurde die Lösung auf das 5fache verdünnt. Die Reduktion des tr-FePc-Peptids erfolgte mit Hilfe von Natriumdithionit. Die Messung der Maxima des reduzierten tr-FePc-Peptids muß unmittelbar nach Zusatz des Dithionits erfolgen, da in dessen Gegenwart die Extinktion rasch abnimmt.

Die Messung der Maxima des oxydierten tr-FePc-Peptids muß unmittelbar nach Zusatz des Dithionits erfolgen, da in dessen Gegenwart die Extinktion rasch abnimmt.

Manometrie. Die Prüfung des tr-FePc-Peptids auf katalytische Wirksamkeit erfolgte im Warburg-Apparat bei 38° mit Luft als Gasphase. Wenn nicht eigens anders angegeben, betrug das Gesamt-Flüssigkeitsvolumen je Gefäß 1,5 ccm. In den in der Mitte der Gefäße angebrachten Nöpfchen befand sich stets mit 20%iger KOH getränktes Filtrierpapier zur Absorption des allenfalls gebildeten Kohlendioxyds.

Bei der Bestimmung der katalytischen Aktivität unserer Präparate im Bernsteinsäureoxydase-System folgten wir den Angaben von Potter¹⁶, ersetzten jedoch das 5%ige Rattenleber-Homogenat durch ein 5- bis 8%iges wäbr. Rinderleber-Homogenat. Dieses zeigt mit Succinat als Substrat eine nur sehr geringe O_2 -Aufnahme, die durch Zusatz katalytischer Mengen Cytochrom c kräftig gesteigert wird (Abb. 6). Das Rindsleber-Homogenat erweist sich somit als relativ arm an endogenem Cytochrom c und als äußerst geeignet zur Testung des tr-FePc-Peptids auf Cytochrom c-Wirksamkeit.

¹⁶ V. R. Potter, in W. W. Umbreit, R. H. Burris und J. F. Stauffer, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, S. 139. Burgess Publishing Co.; Minneapolis, 1951.

Tabelle 2. Partielle Hydrolyse des „Enneapeptids“. Papierchromatographie der sauren Fraktion 4 (vgl. Abb. 2).

Fleck Nr. (Abb. 2)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
A 1	violett	CySO ₃ H (× × × ×)			CySO ₃ H
A 2	violett	CySO ₃ H (× × ×) Glu (× × ×)	DNP-Glu (× × ×)	CySO ₃ H (× × ×)	Glu-CySO ₃ H
A 3	gelb → violett	CySO ₃ H (×) Glu (×) Ala (×)	DNP-CySO ₃ H (×)	Glu (×) Ala (×)	CySO ₃ H-[Ala, Glu]
A 4	violett	CySO ₃ H (?) Glu (?) His (?)	DNP-Glu (×) im-DNP-His (?)	CySO ₃ H (?)	Glu-[CySO ₃ H, His]
A 5	violett	Asp (?)			(Asp)
A 6	gelb → violett	CySO ₃ H (× × × ×) Ala (× × × ×)	DNP-CySO ₃ H (× × × ×)	Ala (× × × ×)	CySO ₃ H-Ala
A 7	violett	Glu (× × × ×)			Glu
A 8	violett	Glu (?) Ala (?)	DNP-Ala (?)	Glu (?)	Ala-Glu

Ergebnisse.

Struktur des tr-FePc-Peptids.

Durch Verdauung von Cytochrom c mit Trypsin und anschließende Ausföhrung der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Reinigungsoperationen wurde das tr-FePc-Peptid in einer Ausbeute von 50% d. Th. gewonnen. Es enthält unverseht die prosthetische Gruppe, jedoch nur mehr ein Bruchstück der Proteinkomponente des Cytochroms. Eine papierchromatographische Untersuchung der nach vollständiger Hydrolyse mit Säure erhaltenen Spaltprodukte erwies, daß das tr-FePc-Peptid von den zahlreichen Aminosäureresten des Enzyms nur mehr einige wenige besitzt, die von den sieben Aminosäuren Cystin [(CyS)₂], Glutaminsäure (Glu), Threonin (Thr), Alanin (Ala), Valin (Val), Histidin (His) und Lysin (Lys) gebildet werden. Da Trypsin gewiß nicht imstande ist, Thioaetherbindungen zu spalten, muß im tr-FePc-Peptid, ebenso wie in Cytochrom c selbst, die Farbstoffkomponente, Ferriporphyrin, gebunden an die Seitenketten 2 und 4 je einen Halbcystinrest (CyS) tragen. Diese beiden Halbcystinreste sind in Cytochrom c, wie wir in der I. Mitteilung¹ zeigen konnten, sowohl mit ihren Amino- als auch ihren Carboxylgruppen peptidisch in die Proteinkomponente eingebaut. Wir erwarteten daher, aus dem tr-FePc-Peptid nach Spaltung der Thioaetherbindungen, welche die Farbstoffkomponente mit dem aus Aminosäuren aufgebauten Rest der Proteinkomponente verknüpfen, zwei Peptide zu erhalten: eines von der Seitenkette 2 und eines von der Seitenkette 4 des Porphyrins. Entgegen dieser Erwartung ging jedoch aus reinem tr-FePc-Peptid bei der mit Hilfe von Silbersulfat nach *Paul*¹⁷ vorgenommenen Abscheidung des Farbstoffs vom Peptidteil und nachfolgender Oxydation des letzteren mit Perameisensäure nur ein einziges Peptid hervor; dieses enthält — infolge der Perameisensäure-Oxydation — Cysteinsäure (CySO₃H) an Stelle von CyS, im übrigen jedoch unverändert und ohne Abstrich alle zuvor im tr-FePc-Peptid nachgewiesenen Aminosäuren. Wurde nur unvollständig gereinigtes tr-FePc-Peptid mit Silbersalz gespalten und das porphyrinfreie Produkt oxydiert, so konnten im Reaktionsprodukt wohl mehrere Peptide papierchromatographisch nachgewiesen werden, von denen jedoch nur ein einziges Cysteinsäure enthält (Fleck Nr. I in Abb. 1 und Tabelle 1); in diesem Peptid befanden sich neben CySO₃H wiederum die 6 Aminosäuren Glu, Thr, Ala, Val, Lys und His. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, daß die beiden in Cytochrom c durch Thioaetherbindungen mit der Farbstoffkomponente verbundenen Halbcystinreste Glieder einer und derselben Peptidkette sind und in dieser miteinander durch nur wenige andere Aminosäurereste und durch trypsinresistente Peptidbindungen verknüpft sind.

¹⁷ *K. G. Paul*, Acta Chem. Scand. **3**, 1178 (1949); **4**, 239 (1950).

Das aus dem tr-FePc-Peptid gewonnene porphyrinfreie und cysteinsäurehaltige Produkt erweist sich, abgesehen von seinem papierchromatographischen Verhalten, auch dadurch als einheitlich und als ein einziges Peptid, daß es nur einen aminoendständigen Aminosäurerest besitzt, und zwar, wie mit *Sangers* DNP-Methode¹⁸ festgestellt werden konnte, Cysteinsäure. Bei der Dinitrophenylierung mit Dinitrofluorbenzol wird nicht die gesamte im Peptid vorkommende Cysteinsäure substituiert, vielmehr findet man nach Hydrolyse des DNP-Peptids außer DNP-CySO₃H auch noch freie CySO₃H in großer Menge. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Erwartung, daß sich im untersuchten Peptid zwei Cysteinsäurereste befinden, von denen füglich nur einer aminoendständig sein kann.

Weiterer Einblick in die Struktur dieses Peptids wurde durch partielle Hydrolyse mit Säure und papierchromatographische Untersuchung der ionophoretisch in eine saure und eine neutrale Fraktion geteilten Mischung der Spaltprodukte gewonnen (Tabellen 2 und 3, Abb. 2 und 3). Aus der Natur der Spaltprodukte läßt sich unzweideutig die Struktur des die zwei Cysteinsäurereste enthaltenden Peptids erschließen. In diesem muß sich eine Pentapeptidsequenz CySO₃H-Ala-Glu-CySO₃H-His und eine Tetrapeptidsequenz Thr-Val-Glu-Lys befinden; erstere ergibt sich mit Notwendigkeit aus den Peptiden CySO₃H-Ala (*A* 6), Ala-Glu (*A* 8, *M* 8), CySO₃H-[Ala, Glu] (*A* 3), Glu-CySO₃H (*A* 2), CySO₃H-His (*M* 1) und Glu-[CySO₃H, His] (*A* 4), letztere aus den Peptiden Thr-[Val, Glu] (*M* 9), [Val, Glu] (*M* 10), Thr-[Val, Glu, Lys] (*M* 7) und Glu-Lys (*M* 6). Die so erschlossenen zwei Aminosäure-Sequenzen liegen im ursprünglichen Peptid zu einer einzigen Kette verknüpft vor. Der zuvor erwähnte Befund, daß in dieser Kette CySO₃H an N-terminaler Stelle steht, erweist, daß die Penta- und nicht die Tetrapeptidsequenz den aminoendständigen Rest beisteuert, und erlaubt die Aufstellung der Formel CySO₃H-Ala-Glu-CySO₃H-His-Thr-Val-Glu-Lys. Das Peptid, welches sich somit aus insgesamt neun Aminosäureresten zusammensetzt, wird in dieser Mitteilung der Kürze halber einfach als „Enneapeptid“ bezeichnet.

In dieser Formel des „Enneapeptids“ könnte vielleicht die Nachbarschaft von His und Thr noch in Zweifel gezogen werden mit der Begründung, daß sich unter den zahlreichen Abbaupeptiden kein einziges befunden hat, welches die Peptidbindung His-Thr intakt enthalten hätte. Es ist jedoch bekannt, daß Bindungen, an denen Serin- oder Threonin-Reste mit ihrer Aminogruppe beteiligt sind, gegenüber saurer Hydrolyse besonders empfindlich sind, und darum auch nicht verwunderlich, daß nur solche threoninhaltige Peptide gefunden worden sind (*M* 7 und *M* 9), die das Threonin als N-terminalen Rest tragen. Wenn in der Peptidkette zwischen Histidin und Threonin noch ein anderer Aminosäurerest eingeschoben wäre, z. B. ein Glu- oder Ala-Rest, so bliebe es unerklärlich, warum unter den gefundenen

¹⁸ *F. Sanger*, *Biochemic. J.* **39**, 507 (1945).

Peptiden des Histidins kein einziges war, welches diese Aminosäure mit peptidisch verknüpfter Carboxylgruppe enthielt, also z. B. ein Dipeptid His-Glu oder His-Ala.

Die Struktur des „Enneapeptids“ bestätigt und erweitert die in unserer I. Mitteilung¹ beschriebenen Ergebnisse, denen zufolge die mit dem Ferriporphyrin verknüpften Halbcystinreste im Verbands der Proteinkomponente des Cytochroms c eingefügt in die Aminosäure-Sequenzen ...Lys-Cys-Ala-Glu... und ...Glu-Cys-His... vorliegen. Es wird nun deutlich, daß der carboxylendständige Glu-Rest der Sequenz Lys-Cys-Ala-Glu mit dem aminoendständigen Glu-Rest der Sequenz Glu-Cys-His identisch ist; es sind demnach die beiden Halbcystinreste

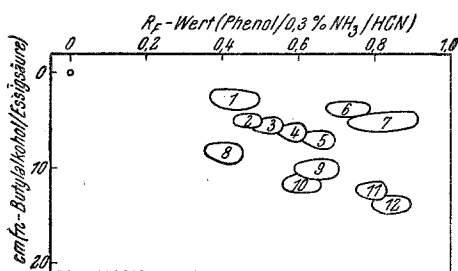


Abb. 3. Partielle Hydrolyse des „Enneapeptids“. Papierchromatographie der neutralen Fraktion M. Vgl. Tabelle 3.

voneinander nur durch zwei Aminosäurereste, Ala und Glu, getrennt. Alles in allem kennen wir nun also die Reihenfolge von 10 Aminosäureresten in der mit der prosthetischen Gruppe durch Schwefelbrücken verbundenen Peptidkette: Lys-Cys-Ala-Glu-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys.

Bei der Säurehydrolyse des „Enneapeptids“ wurde ebenso wie bei den Versuchen der I. Mitteilung $\text{CySO}_3\text{H-Ala}$ in großer

Menge gefunden (*A* 6 in Abb. 2 und Tabelle 2), das Isomere $\text{Ala-CySO}_3\text{H}$ nun jedoch nicht einmal in Spuren. Dies bekräftigt die dort geäußerte Ansicht, daß $\text{Ala-CySO}_3\text{H}$ ein Artefakt war, welches sich in der damals zur Hydrolyse des Cytochroms c verwendeten heißen verd. Schwefelsäure durch Peptidumlagerung gebildet hatte. Eine solche Peptidumlagerung tritt bei Verwendung von 5,7 n HCl bei 37° nicht ein.

An Stelle von Salzsäure verwendeten wir in einem orientierenden Versuch zur partiellen Hydrolyse des „Enneapeptids“ auch das bakterielle Enzym Subtilisin. Bei der Einwirkung dieser Proteinase bildeten sich aus dem „Enneapeptid“ vorwiegend drei Peptide. Zwei von ihnen erwiesen sich als identisch mit $\text{CySO}_3\text{H-His}$ (*M* 1) und Thr-[Val, Glu, Lys] (*M* 7); das dritte hingegen bestand zwar ebenso wie $\text{CySO}_3\text{H-[Ala, Glu]}$ (*A* 3) aus den drei Aminosäuren CySO_3H , Ala und Glu, trug ebenfalls CySO_3H an N-terminaler Stelle, unterschied sich von diesem jedoch durch sein papierchromatographisches Verhalten; so zeigte es in Phenol/0,3% NH_3/HCN einen R_F -Wert von etwa 0,46, während *A* 3 (Abb. 2) bedeutend langsamer lief. Das bei der enzymatischen Hydrolyse des „Enneapeptids“ erhaltene Tripeptid ist demnach etwas weniger hydrophil als *A* 3; wir vermuten, daß es sich von *A* 3 dadurch unterscheidet,

Tabelle 3. Partielle Hydrolyse des „Enneapeptids“; Papierchromatographie der neutralen Fraktion *M* (vgl. Abb. 3).

Fleck Nr. (Abb. 3)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
M 1	gelb → violett	CySO ₃ H (××××) His (×××××)	DNP-CySO ₃ H (××××) im-DNP-His (××××)		CySO ₃ H-His
M 2	violett	Ser (×)			(Ser)
M 3	grauviolett	Gly (××)			Gly
M 4	violett	Thr (××××)			Thr
M 5	violett	Ala (×××××)			Ala
M 6	violett	Glu (××) Lys (××)	DNP-Glu (××) ε-DNP-Lys (××)		Glu-Lys
M 7	gelb → violett	Glu (×××××) Thr (××××) Val (×××××) Lys (×××××)	DNP-Thr (××××) ε-DNP-Lys (××××)	Glu (××××) Thr (×) Val (××××)	Thr-[Val, Glu, Lys]
M 8	violett	Glu (××) Ala (××)	DNP-Ala (××)	Glu (××)	Ala-Glu
M 9	gelb → violett	Glu (×××××) Thr (×××××) Val (×××××)	DNP-Thr (××××)	Glu (×××××) Val (××××)	Thr-[Glu, Val]
M 10	violett	Glu (×) Val (×)			[Val, Glu]
M 11	violett	Val (×)			Val
M 12	violett	(I) Leu (××)			(I) Leu

daß es einen Glutamin-Rest statt eines Glutaminsäure-Restes enthält und somit die Struktur $\text{CySO}_3\text{H-Ala-Glu}(\text{NH}_2)$ besitzt.

Die beim Abbau des Cytochroms c mit Trypsin und des „Enneapeptids“ mit Subtilisin zutage tretende Spezifität dieser beiden Proteinasen entspricht in befriedigender Weise den Ergebnissen früherer Untersuchungen. Wie *Bergmann* und seine Mitarbeiter^{9,19} bei Verwendung synthetischer Substrate festgestellt haben, spaltet Trypsin ausschließlich jene Peptidbindungen, an denen Arginin- und Lysinreste mit ihren Carboxylgruppen beteiligt sind. Diese Spezifität des Trypsins, die neuerdings auch bei der Untersuchung eines höhermolekularen, natürlichen Substrats bestätigt worden ist²⁰, läßt erwarten, daß ein aus einem Protein herausgebrochenes tryptisches Abbauprodukt an seinem Carboxylende entweder Arg oder Lys und in N-terminaler Position einen solchen Aminosäurerest tragen muß, dessen nun freie Amino-Gruppe vor der Spaltung mit Arg oder Lys verknüpft war. Diese Erwartung trifft in unserem Falle vollends zu. Die Aminosäure-Sequenz im tr-FePc-Peptid, $\text{CyS-Ala-Glu-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys}$, endet mit einem Lysinrest und beginnt mit einem Halbcystinrest, dessen Aminogruppe, wie aus der vorigen Mitteilung bekannt ist, in Cytochrom c mit Lysin verbunden ist (... Lys-CyS-Ala-Glu ...). Für die Spaltung der Peptidbindungen $\text{Glu-CySO}_3\text{H}$ bzw. $\text{Glu}(\text{NH}_2)\text{-CySO}_3\text{H}$ und His-Thr im „Enneapeptid“ durch Subtilisin findet man gewisse Analogien in der früher beobachteten Spaltung der Bindung $\text{Glu}(\text{NH}_2)\text{-Asp}(\text{NH}_2)$ in oxydiertem Oxytocin²¹ und der Bindungen $\text{Glu}(\text{NH}_2)\text{-His}$, Glu-Ala und His-Leu in der Fraktion B des oxydierten Insulins²².

Tabelle 4. Eisen-, Schwefel- und Aminostickstoff-Gehalt des tr-FePc-Peptids.

	Gefundene Werte		Berechnet für $\text{C}_{74}\text{H}_{99}\text{O}_{18}\text{N}_{17}\text{S}_2\text{Fe}^+$
	bezogen auf das Trockengewicht	unter Berücksichtigung des Essigsäure- und Aschegehaltes	
Fe	% 2,71	% 3,20	% 3,42
S	3,21	3,79	3,92
$\text{NH}_2\text{-N}$	2,19	2,58	2,57*

* Berechnet für 3 NH_2 -Stickstoffatome je Molekül.

Wenn auch durch die (in der I. Mitteilung über Cytochrom c¹ zitierten) Arbeiten von *Theorell* und von *Zeile* und deren Mitarbeitern die Struktur des Porphyrins c aufgeklärt und durch unsere Untersuchungen die Aminosäure-Sequenz im tr-FePc-Peptid festgestellt ist, so läßt sich doch dessen Struktur noch nicht eindeutig formulieren, da es derzeit unmöglich ist anzugeben, welcher der beiden Halbcystinreste der Peptidkomponente mit dem Pyrrolring I und welche mit dem Pyrrolring II des Porphyrins verbunden ist. Es bleiben zwei Formeln zur Wahl:

¹⁹ *K. Hofmann* und *M. Bergmann*, *J. Biol. Chem.* **130**, 81 (1939).

²⁰ *F. Sanger* und *H. Tuppy*, *Biochemic. J.* **49**, 481 (1951).

²¹ *H. Tuppy* und *H. Michl*, *Mh. Chem.* **84**, 1011 (1953).

²² *H. Tuppy*, *Mh. Chem.* **84**, 996 (1953).

Unbeschadet dieser noch ungeklärten Einzelheit der Struktur können wir dem tr-FePc-Peptid eine Bruttoformel $C_{74}H_{99}O_{18}N_{17}S_2Fe^+$ und ein Molekulargewicht von 1634,6 zuschreiben. Es ist nun interessant, die aus der Formel zu errechnenden analytischen Daten (Tabelle 4, Spalte 4) mit den von uns an dem sorgfältig chromatographisch gereinigten tr-FePc-Peptid festgestellten zu vergleichen. Dabei muß zweierlei in

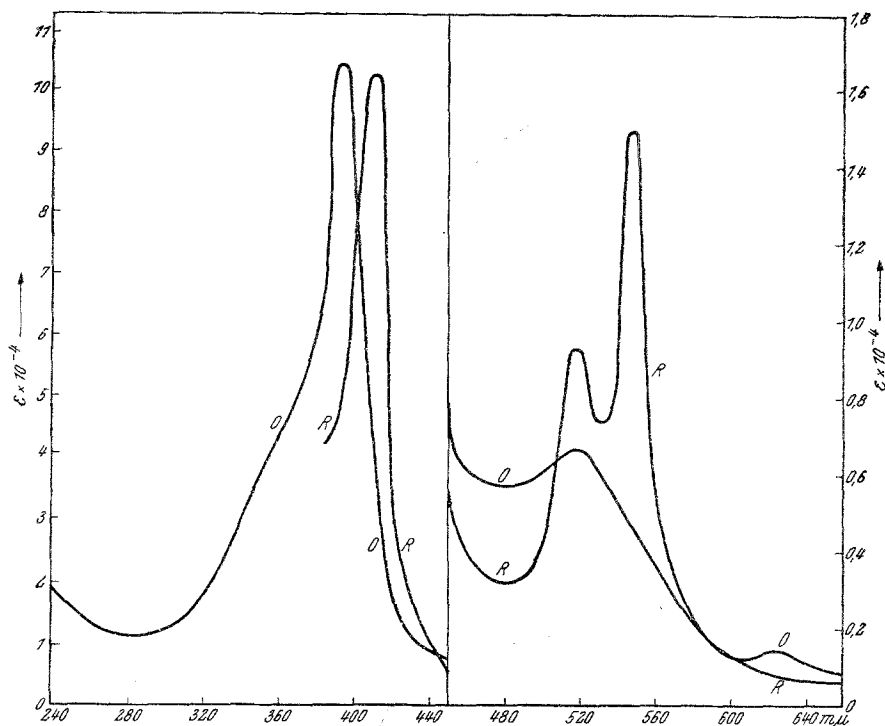


Abb. 4. Absorptionsspektrum des tr-FePc-Peptids. O: oxydiert; R: reduziert.

Betracht gezogen werden: Erstens zeigte das von uns aus essigsaurer Lösung isolierte Produkt auch nach scharfem Trocknen einen beträchtlichen Gehalt an (vermutlich salzartig gebundener) Essigsäure (10,9%, entsprechend 3,75 Molen Essigsäure je Atom Eisen); zweitens blieb nach vorsichtigem Veraschen unseres tr-FePc-Peptids ein Glührückstand von 8,22%, der nur zu einem Teil dem Eisenoxyd zuzuschreiben ist, welches aus dem Eisen der prosthetischen Gruppe beim Verglühen entstehen muß (3,88%, errechnet aus dem experimentell gefundenen Fe-Gehalt), zum anderen Teil jedoch (4,34%) anorganischen Verunreinigungen. In Spalte 3 der Tabelle 4 sind die unter Berücksichtigung des Essigsäure- und Restaschegehalts korrigierten, in Spalte 2 die effektiv erhaltenen

analytischen Werte angeführt. Ein Vergleich der Spalten 3 und 4 zeigt eine befriedigende Übereinstimmung. Das molare Verhältnis der bestimmten Eisen-, Schwefel- und Aminostickstoffwerte beträgt für das tr-FePc-Peptid 0,97 : 2,00 : 3,12 und kommt somit dem ganzzahligen Verhältnis 1 : 2 : 3 nahe.

Einige Beachtung verdient das Ergebnis der nach der Methode von *Kainz*¹⁵ vorgenommenen Aminostickstoff-Bestimmung, welche im Gegensatz zur üblichen *Van Slyke*-Methode nicht nur α -Aminogruppen, sondern auch ε -Aminogruppen von Lysinresten und Säureamidgruppen erfaßt; die gefundene Zahl von etwas über 3 Aminogruppen je 2 Atome Schwefel zeigt, daß außer dem N-terminalen Halbcystinrest und dem Lysinrest im tr-FePc-Peptid noch eine dritte reagierende Gruppe vorhanden sein muß; es erscheint vernünftig anzunehmen, daß einer der beiden Glutaminsäurereste des tr-FePc-Peptids, vermutlich der zwischen den beiden Halbcystinresten stehende, in Säureamidform, als Glutaminrest, vorliegt.

Der von *Tsou*⁸ 1951 für ein von ihm dargestelltes tryptisches Abbauprodukt des Cytochroms c angegebene Eisengehalt von 0,87% steht in schroffem Gegensatz zu unserem Wert von 2,71%. Es ist ungewiß, ob der äußerst niedrige Eisengehalt dieses „trypsin-modifizierten Cytochroms c“ auf einen nur teilweisen Abbau des Enzyms mit Trypsin oder auf Unreinheit zurückzuführen ist. Es wäre möglich, daß *Tsou* den Eisengehalt seines Präparats spektrophotometrisch bestimmte, unter der Voraussetzung, daß dessen Absorptionsspektrum mit dem des Cytochroms c quantitativ übereinstimme; diese Voraussetzung ist, wie aus dem folgenden Abschnitt hervorgeht, nicht zutreffend.

Spektrophotometrie des tr-FePc-Peptids.

Abb. 4 zeigt die Absorptionsspektren des reduzierten und des oxydierten tr-FePc-Peptids. Diese sind im sichtbaren Wellenbereich denen des reduzierten und oxydierten Cytochroms c qualitativ sehr ähnlich; die Höhe der Absorptionsmaxima ist jedoch, verglichen mit jenen des unveränderten Enzyms, bei dem tryptischen Abbauprodukt beträchtlich geringer.

Die Messung der Extinktionsmaxima bereitete im Falle des reduzierten tr-FePc-Peptids unerwartete Schwierigkeiten und war nicht genau durchführbar, da sie in den mit Natriumdithionit als Reduktionsmittel versetzten Lösungen rasch absanken; es ist möglich, daß das tr-FePc-Peptid durch Spuren von H_2O_2 , wie sie sich aus Dithionit und Luftsauerstoff bilden können, zerstört wird. Ein ähnliches Absinken der Extinktionswerte tritt bei Cytochrom c in Gegenwart von Natriumdithionit erst nach längerem Stehen ein.

Eine Messung des Absorptionsspektrums des oxydierten tr-FePc-Peptids im ultravioletten Bereich erwies das Fehlen einer Bande bei

280 $m\mu$; dieser Befund entspricht der Tatsache, daß das tryptische Abbauprodukt des Cytochroms c im Gegensatz zu diesem selbst unter seinen Aminosäureresten keine aromatischen (Phe, Tyr, Try) mehr enthält.

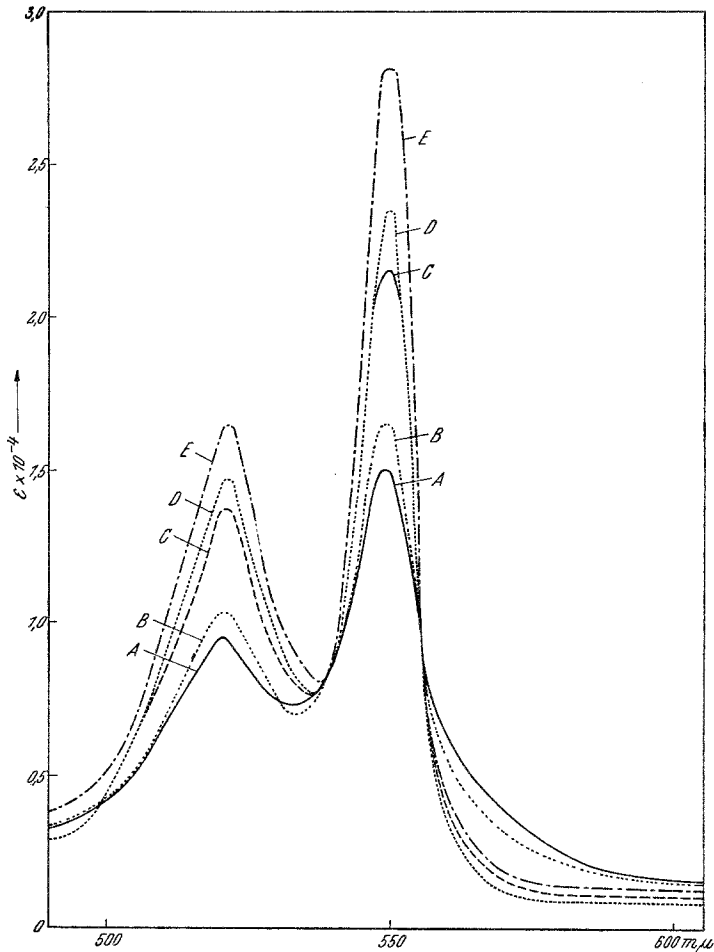


Abb. 5. Einfluß von α -Benzoyl-L-histidin auf das Absorptionsspektrum des tr-FePc-Peptids. A: tr-FePc-Peptid (red.), B: tr-FePc-Peptid (red.) + 10fache molare Menge α -Benzoyl-L-histidin, C: tr-FePc-Peptid (red.) + 100fache molare Menge α -Benzoyl-L-histidin, D: tr-FePc-Peptid (red.) + 1000fache molare Menge α -Benzoyl-L-histidin, E: Cytochrom c (red.).

Zusatz von Histidin oder dessen α -Benzoylderivat in großem Überschuß zu einer bei pH 7,3 gepufferten Lösung des tr-FePc-Peptids bewirkte eine schon mit freiem Auge deutlich sichtbare Farbvertiefung. In Abb. 5 ist dargestellt, wie steigende Konzentrationen von α -Benzoyl-

L-histidin eine zunehmende Annäherung des Spektrums des reduzierten tr-FePc-Peptids an das des reduzierten Cytochroms c herbeiführen.

Katalytische Wirksamkeit des tr-FePc-Peptids.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, ist das tr-FePc-Peptid im Bernsteinsäureoxydase-System inaktiv; es erhöht die in Gegenwart von Rindsleberhomogenat sehr geringe, auf die Gegenwart von endogenem Cytochrom c

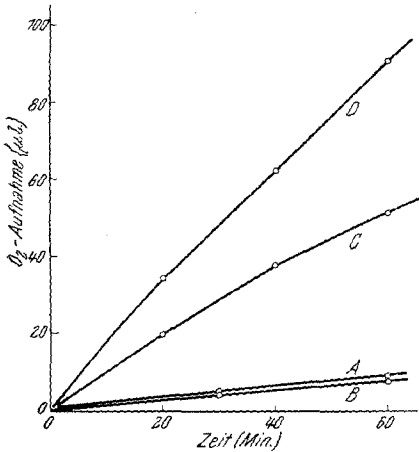


Abb. 6. Bestimmung der Cytochrom c-Aktivität im Bernsteinsäureoxydase-System. A und B zeigen die Sauerstoffaufnahme in Abwesenheit bzw. in Gegenwart ($4 \cdot 10^{-5}$ m) des tr-FePc-Peptids, C und D in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-5}$ m bzw. $4 \cdot 10^{-5}$ m Cytochrom c. (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,3; $4 \cdot 10^{-4}$ m CaCl_2 , $4 \cdot 10^{-4}$ m AlCl_3 ; $6 \cdot 10^{-2}$ m Natriumsuccinat; 0,15 cem 5%iges Leberhomogenat in einem Endvolumen von 2,50 cem.)

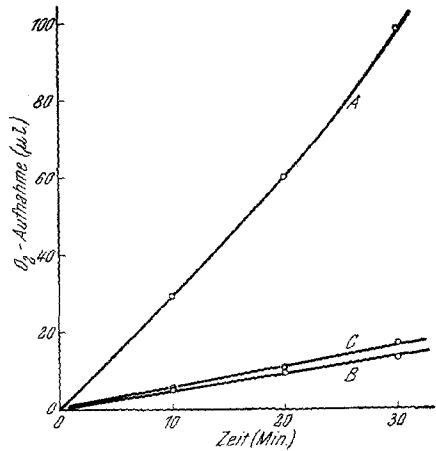


Abb. 7. Hemmung der Ascorbinsäure-Autoxydation durch Komplexon und durch Ovalbumin. A: Ascorbinsäure-Autoxydation; B: in Gegenwart von $6,7 \cdot 10^{-8}$ m Komplexon; C: in Gegenwart von 0,17 Gew.-% Ovalbumin. (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,3; $8 \cdot 10^{-2}$ m Ascorbinsäure.)

zurückzuführende Sauerstoffaufnahme nicht, während zugesetztes Cytochrom c eine starke Wirksamkeit entfaltet.

Für eine Prüfung des tr-FePc-Peptids auf eine eventuelle katalytische Aktivität im Cytochromoxydase-System mit Ascorbinsäure als Substrat erwies es sich als notwendig, die in Lösung bei pH 7,3 bereits sehr starke, wohl durch Spuren von Schwermetallionen katalysierte Autoxydation der Ascorbinsäure zu unterdrücken. Abb. 7 zeigt, wie diese Autoxydation sowohl durch Komplexon III (Äthylendiamintetraessigsäures Na) als auch durch Zusatz von Proteinen, z. B. durch eine frisch bereitete Ovalbuminlösung, weitgehend unterbunden werden kann.

Die in Gegenwart von Ovalbumin sehr geringe Oxydation der Ascorbinsäure durch Luftsauerstoff wird in Anwesenheit von Leberhomogenat kräftig durch Cytochrom c, aber auch (in sogar noch höherem Maße)

durch das tr-FePc-Peptid katalysiert (Abb. 8). Diese katalytische Wirkung des tr-FePc-Peptids bedarf jedoch nicht der Mitwirkung des Cytochromoxydase-Systems (Abb. 9) und ist in Abwesenheit von Leberhomogenat noch ausgeprägter als in dessen Gegenwart. Im Gegensatz hierzu besitzt Cytochrom c ohne Zusatz des Cytochromoxydase-Systems keine oder (wie in Abb. 9) eine nur sehr geringfügige Aktivität, welche wohl einer Verunreinigung des Enzyms durch eine kleine Menge autoxydablen Cytochroms c zuzuschreiben ist. Die Fähigkeit, die Autoxydation der

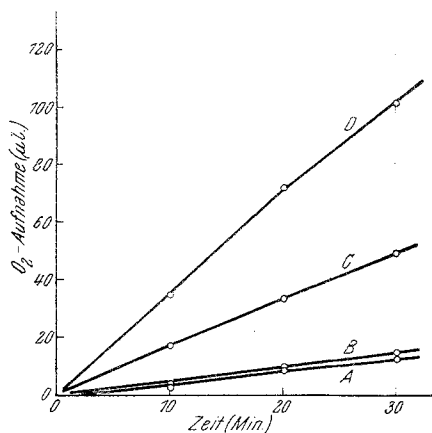


Abb. 8. Katalyse der Ascorbinsäure-Oxydation in Gegenwart von Leberhomogenat. A: Ascorbinsäure-Autoxydation; B: in Gegenwart von $4 \cdot 10^{-5}$ m FeSO_4 ; C: in Gegenwart von $4 \cdot 10^{-5}$ m Cytochrom c; D: in Gegenwart von $4 \cdot 10^{-5}$ m tr-FePc-Peptid. (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,3; $8 \cdot 10^{-3}$ m Ascorbinsäure; 0,10 cem wäbr. 5%iges Leberhomogenat und 0,20 cem 2,5%ige Ovalbuminlösung in einem Endvolumen von 1,50 cem.)

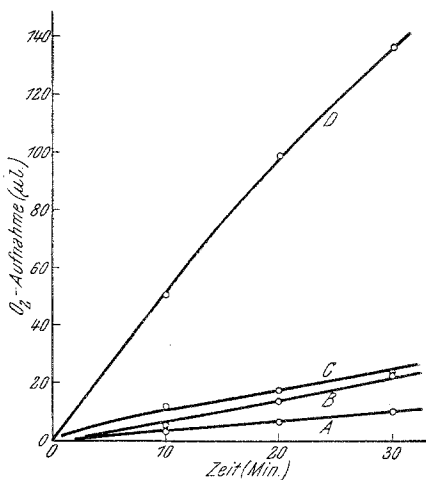


Abb. 9. Katalyse der Ascorbinsäureoxydation in Abwesenheit von Leberhomogenat. A: Ascorbinsäure-Autoxydation; B: in Gegenwart von $4 \cdot 10^{-5}$ m FeSO_4 ; C: in Gegenwart von $4 \cdot 10^{-5}$ m Cytochrom c; D: in Gegenwart von $4 \cdot 10^{-5}$ m tr-FePc-Peptid. (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,3; $8 \cdot 10^{-3}$ m Ascorbinsäure; 0,33 Gew.-% Ovalbumin.)

Ascorbinsäure kräftig zu steigern, liegt im tr-FePc-Peptid selbst und nicht etwa in Eisenionen, die aus ihm frei werden könnten; denn selbst eine dem tr-FePc-Peptid äquimolekulare Menge Fe^{++} ist zu einer solchen katalytischen Wirkung nicht befähigt (Kurven B in den Abb. 8 und 9). Die Katalyse beruht vielmehr darauf, daß das reduzierte tr-FePc-Peptid, ungleich der reduzierten Form des nativen Cytochroms c, autoxydabel ist und daß das oxydierte tr-FePc-Peptid, gleich der oxydierten Form des Cytochroms c, durch Ascorbinsäure bei 38° leicht reduziert wird.

Das von Tsou im Hinblick auf seine spektroskopischen und katalytischen Eigenschaften sehr gründlich untersuchte „pepsin-modifizierte Cytochrom c“⁴ verhielt sich unserem tr-FePc-Peptid insofern völlig

analog, als es ebenfalls die Autoxydation der Ascorbinsäure kräftig katalysierte, jedoch im natürlichen Succinoxidase- und Cytochromoxydase-System inaktiv war. In der Tat scheinen bisher noch alle Versuche einer Modifikation des Cytochroms c, durch welche dieses in einen autoxydablen Zustand gerät — sei es durch Einwirkung extremer pH-Bedingungen oder proteolytischer Enzyme —, zu einer gleichzeitigen Zerstörung seiner Aktivität im natürlichen Enzymsystem geführt zu haben.

Offenbar verändern alle versuchten Modifikationen einen für die katalytische Wirksamkeit des Cytochroms entscheidenden Bindungszustand des Eisenatoms der prosthetischen Gruppe, einen Bindungszustand, welcher allein imstande ist, das Eisen gegenüber der oxydierenden Wirkung molekularen Sauerstoffs abzuschirmen. Nach *Theorell* und *Åkeson*²³ ist das Porphyrin-Eisenatom in Cytochrom c mit zwei wahrscheinlich stickstoffhaltigen Gruppen der Proteinkomponente, wohl Imidazolgruppen zweier Histidinreste, verknüpft. Im Proteinteil des Enzyms befinden sich diese Histidinreste vermutlich an Stellen, die für ihre Funktion als „häm-gebundene Gruppen“ räumlich besonders günstig sind. Wir wissen nun, daß in Cytochrom c insgesamt drei Histidinreste vorkommen²³. Einer von ihnen ist unmittelbar benachbart einem der beiden Halbcystinreste, welche die prosthetische Gruppe des Enzyms mit der Proteinkomponente verknüpfen, und scheint somit für eine Funktion als „häm-gebundene Gruppe“ räumlich prädestiniert zu sein¹. Dieser eine Histidinrest ist auch noch im tr-FePc-Peptid vorhanden. Wir versuchten nun, für die fehlende zweite „häm-gebundene Gruppe“ Ersatz zu schaffen und dadurch das Eisenatom der prosthetischen Gruppe gegen Sauerstoff „abzuschirmen“, indem wir zur Lösung des tr-FePc-Peptids Histidin zusetzten. Die nachteilige Tatsache, daß es bei einem solchen Zusatz in Lösung unmöglich ist, die Imidazolgruppen in räumliche Nähe des Eisens zu zwingen und dort festzuhalten, trachteten wir dadurch wettzumachen, daß wir das Histidin in großem Überschuß zufügten. Unter diesen Umständen erfährt nicht nur, wie oben beschrieben, das Spektrum des tr-FePc-Peptids eine Annäherung an das des Cytochroms c, sondern es tritt auch eine Abschwächung des autoxydablen Charakters des tr-FePc-Peptids ein, wie sich aus einer teilweisen Hemmung der durch dieser katalysierten Ascorbinsäure-Autoxydation kundtut. Allerdings wird Histidin selbst in Gegenwart von tr-FePc-Peptid und Ascorbinsäure unter Sauerstoffaufnahme abgebaut. Wir ersetzten darum Histidin durch das unter diesen Bedingungen beständigere α -Benzoyl-L-histidin und konnten bei dessen Verwendung eine bemerkenswerte, mit steigender

²³ *H. Theorell* und *Å. Åkeson*, *J. Amer. Soc.* **63**, 1804, 1812, 1818, 1820 (1941).

Konzentration zunehmende Hemmung des katalytischen Einflusses des tr-FePc-Peptids auf die Autoxydation der Ascorbinsäure nachweisen (Abb. 10). Diese teilweise Unterdrückung des autoxydablen Charakters des tr-FePc-Peptids in Gegenwart von α -Benzoyl-L-histidin ist jedoch *nicht* mit einem auch nur geringen Auftreten einer Cytochrom c-Wirksamkeit im natürlichen Succinoxidase-System verbunden.

Die Beeinflussung der katalytischen Wirksamkeit des tr-FePc-Peptids durch α -Benzoyl-L-histidin scheint ein verhältnismäßig spezifischer

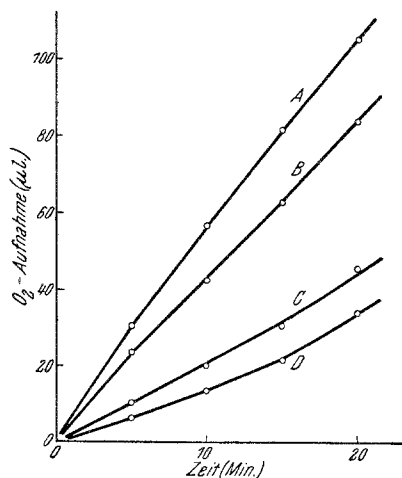


Abb. 10. Einfluß von α -Benzoyl-L-histidin auf die Katalyse der Ascorbinsäure-Autoxydation durch das tr-FePc-Peptid. A: Autoxydation der Ascorbinsäure, katalysiert durch das tr-FePc-Peptid; B, C und D: nach Zusatz von $4 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-3}$ und $4 \cdot 10^{-2}$ m α -Benzoyl-L-histidin. (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,3; $8 \cdot 10^{-3}$ m Ascorbinsäure; $1 \cdot 10^{-3}$ m Komplexon; $4 \cdot 10^{-5}$ m tr-FePc-Peptid.)

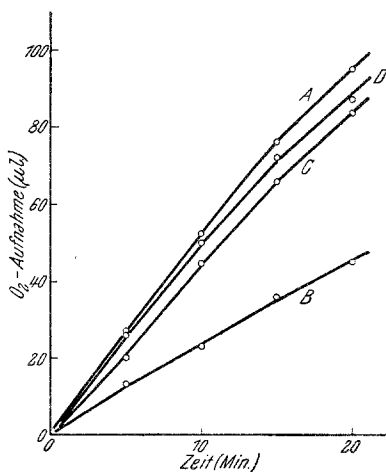


Abb. 11. Einfluß der α -Benzoyl-derivate von L-Histidin, L-Lysin und L-Arginin auf die Katalyse der Ascorbinsäure-Autoxydation durch das tr-FePc-Peptid. Autoxydation der Ascorbinsäure, katalysiert durch das tr-FePc-Peptid; ohne Zusatz (A) bzw. nach Zusatz einer 100fachen molaren Menge ($4 \cdot 10^{-3}$ m) von α -Benzoyl-L-histidin (B), α -Benzoyl-L-lysin (C), α -Benzoyl-L-arginin (D). (0,1 m Phosphatpuffer pH 7,3; $8 \cdot 10^{-3}$ m Ascorbinsäure; $1 \cdot 10^{-3}$ m Komplexon; $4 \cdot 10^{-5}$ m tr-FePc-Peptid.)

Effekt zu sein; wie Abb. 11 zeigt, ist die Wirkung der α -Benzoylderivate der beiden anderen natürlich vorkommenden basischen Aminosäuren, Lysin und Arginin, im Vergleich zu der des Benzoyl-histidins gering. Man kann in diesem Befund eine Bestätigung der Theorie sehen, daß in Cytochrom c die Imidazolgruppen von zwei Histidinresten der Eiweißkomponente als „häm-gebundene Gruppen“ fungieren.

Die Aminostickstoff-, Schwefel- und Acetyl-Bestimmungen wurden von Dr. G. Kainz im Mikroanalytischen Laboratorium des II. Chemischen Instituts ausgeführt.

Für sein stets förderndes Interesse an dieser Arbeit sind wir dem Vorstand unseres Instituts, Herrn Prof. Dr. *F. Wessely*, für das uns zur Verfügung gestellte Enzym Subtilisin den Herren Prof. *K. Linderström-Lang* und *M. Ottesen* zu großem Dank verpflichtet.

Ein Teil unserer Untersuchungen wurde mit Mitteln ausgeführt, welche die *Rockefeller Foundation* dem II. Chemischen Laboratorium zugewendet hat. Wir danken hierfür wie auch für die große Hilfe, die einer von uns (H. T.) von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften aus den Erträgnissen der *Seegen*-Stiftung erhalten hat.