

Eine Untersuchung über Cytochrom-c aus Hefe

Von

H. Tuppy und **K. Dus**

Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 29. April 1958)

Aus Bäckerhefe wurden mit Hilfe einer neuen, einfachen Extraktionsmethode und durch Chromatographie der Extrakte an Ionenaustauschersäulen zwei Hämoprotein-Fractionen mit Cytochrom-c-Aktivität gewonnen. Die mengenmäßig überwiegende, deren Eisengehalt 0,37% betrug, zeigte eine etwas höhere katalytische Aktivität im Bernsteinsäureoxydase-System als das aus Herzmuskel von Pferden isolierte Cytochrom-c. Diese Fraktion wurde für die Bestimmung der Anordnung der Aminosäuren in der Nachbarschaft der prosthetischen Gruppe verwendet. Die ermittelte Aminosäuresequenz, Phe-Lys-Thr-Arg-CyS-Glu-Leu-CyS-His-Thr-[Val, Glu], stimmt mit früher aufklärten homologen Sequenzen in Vertebraten- und Insekten-Cytochromen bezüglich des Abstandes der beiden Halbcystinreste voneinander und der diesen benachbarten Lage eines Histidin- und eines anderen basischen Restes überein, unterscheidet sich von ihnen jedoch in mancher anderer Hinsicht.

Aus verschiedenen Tierarten isoliertes Cytochrom-c besitzt weitgehend übereinstimmende Eigenschaften. Auch die Sequenz der Aminosäurereste in der Nachbarschaft der prosthetischen Gruppe hat sich in allen geprüften Fällen, wenn nicht als gleich, so doch als sehr ähnlich erwiesen^{1, 2, 3}. Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob sich die Ähnlichkeit im Muster der Aminosäurereste auch auf das Cytochrom-c eines Mikroorganismus wie der Hefe erstreckt.

¹ H. Tuppy und G. Bodo, Mh. Chem. **85**, 1182 (1954).

² H. Tuppy und S. Paléus, Acta Chem. Scand. **9**, 353 (1955).

³ H. Tuppy, Z. Naturforsch. **12 b**, 784 (1957).

Voraussetzung für einen solchen Struktur-Vergleich war die Gewinnung von Cytochrom-c aus Hefe in genügender Ausbeute und Reinheit. Das von *Keilin*⁴ ausgearbeitete Isolierungsverfahren eignet sich anscheinend nur für bestimmte Heferassen; seine Nachahmung führte bei uns (so wie auch an anderer Stelle⁵) nicht zu befriedigendem Erfolg. In der vorliegenden Arbeit werden die von uns verwendeten, einfachen Methoden zur Gewinnung und Reinigung von Cytochrom-c aus Hefe und die an dem isolierten Material angestellten Strukturuntersuchungen beschrieben.

Methoden und Versuche

Extraktion des Cytochroms-c aus Bäckerhefe

10 kg frische Preßhefe werden mit 2,5 l Essigester, 420 ml Glycerin und einer Lösung von 200 g Natriumdithionit in 5 l Wasser so lange gerührt, bis ein homogener Brei entstanden ist. Dieser bleibt 12 Stdn. bei Zimmertemp. stehen. Die durch Zentrifugieren erhaltene goldgelbe überstehende Lösung wird, wenn sie trübe ist, durch Einrühren von Hyflo Supercel (4 g je l) und Abnutschen geklärt (dabei bleibt ein kleiner Teil des Cytochroms-c an der Kieselgur adsorbiert; er kann aus dieser mit 2 m Ammonacetat eluiert werden). Das Filtrat enthält, nach seiner Extinktion bei 550 m μ , dem Maximum der Absorption des reduzierten Cytochroms-c im sichtbaren Wellenlängenbereich, zu schließen, 650 bis 700 mg Cytochrom. Sein pH beträgt etwa 6. Es wird zur Verminderung der Ionenstärke vor der nachfolgenden Adsorption des Hämoproteins an Amberlite XE 64 mit Wasser auf das dreifache Volum verdünnt.

Anreicherung durch Ionenaustausch

Amberlite XE 64 in der Ammoniumform (10 g lufttrockener Austauscher je 1 kg Hefe) wird zur Quellung in Wasser suspendiert und die Suspension durch tropfenweisen Zusatz von 2 n HCl auf pH 6,5 gebracht. Dann rührt man den Austauscher in die dreifach verdünnte Extraktionsflüssigkeit ein, wobei er sich durch Aufnahme des Cytochroms-c rosa färbt. Nach 1 bis 2stdg. Rühren ist die Adsorption vollständig; in der nunmehr gelbgrünen Lösung ist spektrophotometrisch kein Cytochrom-c mehr nachweisbar. Der mit Cytochrom-c beladene Austauscher wird in ein Chromatographierrohr gespült, in diesem mit Wasser gründlich gewaschen und durch Perkolieren mit 2 m Ammonacetatlösung eluiert. Das aus dem dunkelroten Eluat nach Dialyse durch Gefrier-trocknung erhaltene Cytochrom-c-Präparat hatte einen Eisengehalt von 0,10%; das Verhältnis der bei 550 m μ und bei 280 m μ gemessenen Lichtabsorptionswerte (E_{550}/E_{280}) betrug 0,33.

Reinigung und Fraktionierung durch Chromatographie

500 g XE 64 (NH_4^+) wurden in der oben angegebenen Weise auf pH 6 bis 7 gebracht und in ein Chromatographierrohr mit 7,5 cm Durchmesser gefüllt. Die 20 cm hohe Austauschersäule wurde so lange mit 0,2 m Phosphatpuffer von pH 7,67 durchspült, bis die ausfließende Flüssigkeit genau den gleichen pH-Wert zeigte wie der oben aufgebraachte Puffer. Dann wurden 700 mg Cytochrom-c-Präparat (0,10% Fe), in einem möglichst kleinen Volumen des

⁴ *D. Keilin*, Proc. Roy. Soc. London **B 106**, 418 (1930).

⁵ *K. Zeile* und *F. Reuter*, Z. physiol. Chem. **221**, 101 (1933).

Puffers gelöst, vorsichtig mit Hilfe einer Kapillare auf die (vollkommen ebene) obere Fläche der Austauschersäule aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte mit dem gleichen Puffer (pH 7,67), die Durchflußgeschwindigkeit wurde auf 10 ml/Stde. gedrosselt. Die aus der Säule austretende Flüssigkeit wurde unter Verwendung eines Fraktionsschneiders in 10-ml-Portionen gesammelt.

Bei der Chromatographie trennte sich das Cytochrom-c-Präparat in 4 Banden auf (Abb. 1). Schnell voran wanderte eine gelbbraune, cytochromfreie Zone (A), die viel Protein enthielt. Ihr folgten zwei rote Banden mit Cytochrom-c-Aktivität: Das in der schnelleren und der Menge nach geringeren (B) enthaltene Hämoprotein-Material hatte einen Eisengehalt von 0,29%; in der langsameren (C) befand sich die Hauptmenge (etwa 60%) des bei 550 m μ absorbierenden Materials, mit 0,37% Fe. Die am langsamsten wandernde Zone (D) blieb während der Chromatographie immer weiter zurück und ließ sich schließlich mit dem verwendeten Phosphatpuffer überhaupt nicht mehr vom Amberlite XE 64 ablösen, so daß zu ihrer Elution 2 m Ammonacetat verwendet wurde; obgleich diese Fraktion ein für Cytochrom charakteristisches Absorptionsspektrum besaß, war sie katalytisch nicht wirksam; ihr Eisengehalt war 0,31%. Die Chromatographie nahm 10 bis 14 Tage in Anspruch.

Die 2 Produkte mit Cytochrom-c Aktivität (0,29% Fe und 0,37% Fe) verließen die Säule in stark verdünnter Lösung. Zur Gewinnung fester Cytochrom-c-Präparate wurden die pufferhaltigen (0,2 m) Eluate mit Wasser auf das zehnfache verdünnt und rasch durch kleinere Amberlite XE 64-Säulen (pH 6,5; d = 4 cm; h = 5 cm) filtriert; das in der obersten Schichte der

Austauschersäulen adsorbierte Cytochrom-c wurde mit Wasser gut gewaschen, mittels 2 m Ammonacetat eluiert und aus dem konzentrierten Eluat nach Dialyse durch Gefrierdrying in Form eines dunkelroten Pulvers erhalten.

Einfacheres Verfahren zur Gewinnung von Hefe-Cytochrom-c mit 0,31% Fe

Auf folgende Weise läßt sich die Adsorption des Cytochroms-c aus der Hefe-Extraktionslösung mit einer Reinigung durch Chromatographie zeitsparend kombinieren: In ein Chromatographierohr (d = 3 bis 4 cm) füllt man zunächst Amberlite XE 64 (pH 6,5) in breiiger wäßriger Suspension zu einer gleichmäßig gepackten 10 cm hohen Säule ein und überschichtet sodann den weißen Austauscher — wiederum gleichmäßig — mit rosafarbenem, mit Cytochrom-c beladenem Austauscher, wie er durch Einrühren von XE 64 in die Hefe-Extraktionslösung erhalten worden ist, bis zu einer Gesamthöhe von 20 cm. Behandelt man nun die Säule mit 1 m Ammonacetat (15 ml/Std.), so spielt sich in einer und derselben Operation sowohl Elution des Cytochroms

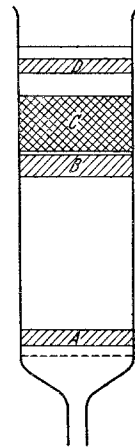


Abb. 1. Chromatographie eines rohen Cytochrom-c-Präparats aus Hefe an einer Säule von Amberlite XE 64. 0,2 m Phosphatpuffer, pH 7,67. (A) Cytochromfreie Verunreinigungen. (B) Hämoprotein-Fraktion mit 0,29% Fe und Cytochrom-c-Aktivität. (C) Hämoprotein-Fraktion mit 0,37% Fe und Cytochrom-c-Aktivität. (D) Denaturiertes Hämoprotein-Material

aus dem beladenen XE 64 im oberen Teil der Säule als auch eine gewisse chromatographische Reinigung im darunterbefindlichen unbeladenen Austauscher ab. Dabei erhält man in 2 bis 3 Stdn., nach Abtrennung einer vorauseilenden Zone von Verunreinigungen, ein rotes Eluat, aus dem sich ein Cytochrom-c-Präparat mit 0,26% Fe gewinnen läßt (Ausbeute 75%). Setzt man dem Eluat festes Ammonsulfat bis zu einer Sättigung von 80% zu, so fällt eine beträchtliche Menge eines farblosen Proteinniederschlags aus und das aus der überstehenden Lösung durch Dialysieren und Gefriertrocknung erhaltliche Cytochrom-c hat einen Eisengehalt von 0,31%.

Eigenschaften des Hefe-Cytochroms-c

Die Maxima der Lichtabsorption liegen bei reduziertem Cytochrom-c aus Hefe (ebenso wie bei dem aus Säugetiermuskulatur gewonnenen Cytochrom) bei 280, 415, 521 und 550 m μ ⁶.

Zur Bestimmung der in Lösungen vorhandenen Menge Cytochrom-c wurde stets — nach Reduktion des Hämoproteins mit Natriumdithionit — die Lichtabsorption bei 550 m μ gemessen; den Berechnungen legten wir aus Gründen der Analogie zu den Verhältnissen bei Säugetier-Cytochrom-c einen angenommenen molaren Extinktionskoeffizienten von $\beta = 6,2 \times 10^7$ und ein angenommenes Molekulargewicht von 12.000 zugrunde.

Der Erfolg der der Reinigung der Cytochrompräparate dienenden Operationen läßt sich an der Veränderung des Verhältnisses der Extinktionswerte bei 550 m μ und 280 m μ messend verfolgen. Dieses Verhältnis (E₅₅₀/E₂₈₀) und der auf das Trockengewicht bezogene Eisengehalt der Präparate nehmen, wie wir uns überzeugen konnten, während der Reinigung parallel zu:

E ₅₅₀ /E ₂₈₀	0,33	0,85	1,00	1,21
% Fe	0,10	0,26	0,31	0,37

Die Ermittlung des Eisengehaltes erfolgte nach der von *Paul*⁷ modifizierten Methode von *Lorber*⁸.

Die katalytische Aktivität des Cytochroms-c im Bernsteinsäureoxydase-System wurde manometrisch nach *Potter*⁹ bestimmt, wobei jedoch an Stelle von Rattenleber ein 6proz. Rinderleber-Homogenat Verwendung fand¹⁰. Die Hefe-Cytochrom-c-Fraktion mit 0,37% Fe war in diesem System um etwa 15% aktiver, die Fraktion mit 0,29% Fe hingegen um etwa 5% weniger aktiv als Cytochrom-c-Präparate aus Pferdeherzmuskulatur, bezogen auf gleiche Extinktionswerte bei 550 m μ .

Abbau des Cytochroms-c mit Pepsin

420 mg Hefe-Cytochrom-c (0,37% Fe) lieferten, auf früher beschriebene Weise² mit Pepsin verdaut, 37 mg „Hämopeptid“. Bei der Verteilungschromatographie auf einer Hyflo-Supercel-Säule¹⁰ mit frischbereitetem n-Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (4:1:5) hatte es den Anschein, als spalte sich das Produkt in 2 Zonen auf, die sich jedoch nicht klar voneinander trennten. Die

⁶ *H. Theorell*, *Biochem. Z.* **285**, 207 (1936).

⁷ *K. G. Paul*, *Acta Chem. Scand.* **2**, 430 (1948).

⁸ *L. Lorber*, *Biochem. Z.* **181**, 391 (1927).

⁹ *V. R. Potter*, in *W. W. Umbreit* u. a., *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis 1951, Seite 139.

¹⁰ *H. Tuppy* und *G. Bodo*, *Mh. Chem.* **85**, 1024 (1954).

unvollständig separierten Fraktionen lieferten bei der Totalhydrolyse (mit 5,7 n HCl, 15 Stdn., 105°) die gleichen freien Aminosäuren (Glutaminsäure, Threonin, Histidin, Lysin, Arginin, Valin, Leucin, Phenylalanin, dazu wenig Alanin) und ergaben bei Endgruppenbestimmungen nach der DNP-Methode¹¹ den gleichen N-terminalen Aminosäurerest (Phenylalanin). Sie wurden auf Grund dieser Übereinstimmung und unseres Unvermögens, eine klare präparative Scheidung zu erzielen, bei den folgenden Versuchen zur Aufklärung der Aminosäuresequenz unterschiedslos eingesetzt.

Durch Behandlung mit Silbersulfat in essigsaurer Lösung¹² wurde das „Hämopeptid“-Material in prosthetische Gruppe und Polypeptid-Komponente gespalten¹⁰, letztere zur Umwandlung von Cystein- in Cysteinsäurereste mit Perameisensäure oxydiert¹⁰. Die hämatinfreie, oxydierte Polypeptid-Komponente wird im folgenden als „Dodekapeptid“ bezeichnet, da sie, wie spätere Untersuchungen zeigten, aus 12 Aminosäureresten zusammengesetzt ist.

Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des „Dodekapeptids“

Eine papierchromatographische Bestimmung der in einem Hydrolysat des „Dodekapeptids“ vorhandenen Aminosäuren ergab die in Tab. 1 angeführten Werte. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte durch 1-dimensionale absteigende Chromatographie auf 4 cm breiten und 50 cm langen Papierstreifen (Whatman Nr. 4). Ein aliquoter Teil des Hydrolysats wurde in

Tabelle 1. Zahl der Aminosäurereste im „Hämopeptid“

	Im Hydrolysat durch papierchromatographische Bestimmung ermittelt *	Auf Grund der Aminosäuresequenz erwartete Werte
Halbcystin**	1,9	2
Lysin	} 2,9	1
Histidin		1
Arginin		1
Glutaminsäure	} 4,2	2
Threonin		2
Alanin	0,3	—
Valin	1,0	1
Phenylalanin	1,6	1

* Werte auf Val = 1,0 bezogen.

** Als Cysteinsäure bestimmt.

4 μ l wässriger Lösung mit Hilfe einer Mikropipette in Form eines 3 cm langen Striches auf die Startlinie eines solchen Papierstreifens aufgetragen; für Vergleichszwecke wurden Lösungen der einzelnen im Hydrolysat vorkommenden Aminosäuren in verschiedenen bekannten Konzentrationen (0,5 bis 2×10^{-2} m) auf die Startlinie anderer Papierstreifen in gleicher Weise aufgebracht. Nach 15stdg. Entwicklung mit n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) wurden die Streifen bei Raumtemp. getrocknet und sodann nochmals¹³ 15 Stdn. lang mit

¹¹ F. Sanger, Biochemic. J. **39**, 507 (1945).

¹² K. G. Paul, Acta Chem. Scand. **4**, 239 (1950).

¹³ B. Keil, Coll. Czech. Chem. Comm. **19**, 1006 (1954).

dem gleichen Lösungsmittelgemisch entwickelt. Nach neuerlichem Trocknen folgte die Anfärbung der Aminosäuren mit Ninhydrin durch kurzes Eintauchen der Papierstreifen in die von *Barrollier*¹⁴ angegebene Reagenslösung und 24stdg. Trocknen bei Zimmertemp. in einem dunklen Raum. Die Aminosäuren Cysteinsäure, Alanin, Valin, Phenylalanin und Leucin erwiesen sich als scharf voneinander getrennt, Glutaminsäure und Threonin jedoch sowie die 3 basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin waren einander noch zu eng benachbart, als daß sie hätten sauber voneinander geschieden werden können, und wurden darum gemeinsam bestimmt. Aus den Streifen wurden die den einzelnen Farbflecken entsprechenden Papierstückchen ausgeschnitten und in Eprovetten 4 Stdn. mit je 5 ml Methanol eluiert¹⁵. Die violetten methanol. Lösungen wurden bei 500 m μ photometriert; von den Extinktionswerten kamen Blindwerte in Abzug, die durch Ausmessung von Eluaten aus gleich behandelten und gleich großen, aber aminosäurefreien Stückchen Papiers ermittelt wurden (diese Korrekturwerte waren gering, reproduzierbar und der Papierfläche streng proportional). Für jede einzelne Aminosäure wurde die Abhängigkeit der Extinktionsmeßwerte von der chromatographierten Aminosäuremenge gesondert bestimmt und im gewählten Mengenbereich für linear befunden (Aminosäuremengen zwischen 0,02 und 0,08 μ Molen).

Versuche zur Ermittlung der Aminosäuresequenz

Endgruppenbestimmungen mit der DNP-Methode wurden außer an dem durch Pepsinabbau aus Cytochrom-c erhaltenen „Hämopeptid“ auch am „Dodekapeptid“ durchgeführt und erwiesen übereinstimmend Phenylalanin als einzigen aminoendständigen Rest.

Die Einwirkung von Trypsin auf das „Hämopeptid“ lieferte 3 Spaltprodukte: zwei Dipeptide (Phe-Lys und Thr-Arg) und ein um die 4 Aminosäurereste der Dipeptide ärmeres Hämopeptid. Dieses wurde durch Adsorption an Talk und durch Verteilungschromatographie auf einer Kieselgur-Säule (mit n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 als Lösungsmittel) gereinigt. Silbersalzsplattung und Oxydation mit Perameisensäure ließen daraus ein hämatinfreies „Octapeptid“ gewinnen, das Cysteinsäure als N-terminalen Rest trug und außer Cysteinsäure noch Glutaminsäure, Threonin, Valin, Leucin und Histidin enthielt. Durch partielle Hydrolyse (konz. HCl, 8 Tage, 37°) wurde das „Octapeptid“ zu einem komplexen Gemisch von Aminosäuren und Peptiden abgebaut; unter den Peptiden wurden CySO₃H-Glu, [Glu, Leu], [Glu, Leu, CySO₃H], Leu-CySO₃H, CySO₃H-His und Thr-[Val, Glu] identifiziert.

In dem durch eine enzymatische Verdauung des „Dodekapeptids“ mit Subtilisin entstandenen Gemisch von Spaltprodukten konnten die folgenden Peptide nachgewiesen werden: Thr-Arg, CySO₃H-Glu, [Leu, CySO₃H, His] und Thr-[Val, Glu].

Die bei der Isolierung und Charakterisierung der untersuchten Peptide angewandten Methoden sind in früheren Arbeiten ausführlicher beschrieben worden^{2, 10}. Dort findet sich auch eine Erklärung der verwendeten Symbole; hier sei nur daran erinnert, daß damit, daß 2 oder 3 Aminosäurereste in eine eckige Klammer gesetzt sind, angedeutet ist, daß ihre Reihenfolge nicht oder nicht eindeutig ermittelt worden ist.

¹⁴ J. Barrollier, Naturwiss. **42**, 416 (1955).

¹⁵ F. G. Fischer und H. Dörffel, Biochem. Z. **324**, 544 (1954).

Besprechung der Ergebnisse

Die im Versuchsteil angegebene Methode der Extraktion von Cytochrom-c aus Hefe mit einer Mischung von Essigester, Glycerin und wäßriger Dithionitlösung ist das Resultat zahlreicher Experimente. In deren Verlauf erwies es sich, daß in Abwesenheit von Dithionit (dessen Verwendung schon auf *Keilin*⁴ zurückgeht) Cytochrom nur in Spuren freigesetzt wird. Ist Dithionit anwesend, so gehen beträchtliche Mengen Cytochrom in die Extraktionsflüssigkeit unter der Voraussetzung, daß deren Ionenstärke eine hohe ist. Es konnten beispielsweise mit 15proz. Kochsalzlösung in Gegenwart von Essigester und Dithionit 45 mg Cytochrom-c je kg frischer Preßhefe herausgelöst werden. Es ist jedoch von großem Nachteil, daß Cytochrom-c in konzentrierteren Kochsalzlösungen relativ schnell Zersetzung erleidet und sich aus Lösungen höherer Ionenstärke an Kationenaustauschern nicht adsorbieren läßt. Aus diesem Grund war der überraschende Befund willkommen, daß die Anwesenheit größerer Salzmengen im Extraktionsmedium entbehrlich wird, wenn man diesem Glycerin zusetzt.

Chromatographie von Cytochrom-c an Kationenaustauschern ist die einfachste und wirksamste Methode zu seiner Reinigung. Während das Atmungspigment tierischen Ursprungs sich an der Ammoniumform eines Carboxylaustauschers wie Amberlite XE 64 adsorbieren und an Säulen dieses Harzes in alkalischem Medium chromatographieren läßt — dieser Tatsache bedienten sich erstmals *Paléus* und *Neilands*¹⁶ und später *Margoliash*¹⁷ — gelingt unserer Erfahrung nach eine Adsorption und Chromatographie von Hefe-Cytochrom-c an Amberlite XE 64 erst bei niedrigeren pH-Werten.

Für die Aufarbeitung des extrahierten Cytochroms-c sind im experimentellen Teil zwei Wege angegeben worden: ein mühsamerer, tagelange Chromatographie erfordernder, der 40 mg einer Cytochrom-c-Fraktion mit einem Eisengehalt von 0,37%, und ein rascher, müheloser, der 49 mg Cytochrom-c mit 0,31% Fe zu gewinnen erlaubte. Der letztere wird stets dann vorzuziehen sein, wenn eine weitgehende Reinigung und eine Aufspaltung des Hefe-Cytochroms in Fraktionen nicht angestrebt wird.

Von Interesse ist der Befund, daß sich bei langsamer Ionenaustauscher-Chromatographie eines unreinen Hefe-Cytochrom-c-Präparats zwei katalytisch aktive Fraktionen voneinander trennten, von denen die eine im Bernsteinsäureoxydase-System der Säugerleber sogar aktiver war als Säuger-Cytochrom-c. Es ist bisher noch kein Versuch unternommen worden zu ermitteln, inwieweit sich diese zwei Fraktionen strukturell unterscheiden.

¹⁶ *S. Paléus* und *J. B. Neilands*, Acta Chem. Scand. **4**, 1024 (1950).

¹⁷ *E. Margoliash*, Biochemic. J. **56**, 529, 535 (1954).

Für die Ermittlung der Anordnung der Aminosäurereste in der Nachbarschaft der prosthetischen Gruppe wurde nur die katalytisch stärker wirksame Cytochrom-c-Fraktion mit 0,37% Eisengehalt eingesetzt. Von ihr wurde die schwächer aktive abgesondert, da mit der Möglichkeit gerechnet werden mußte, daß die Anwesenheit von mehr als einem Hämoprotein im Untersuchungsmaterial bei einer Strukturermittlung zu Fehlresultaten führen kann. Verunreinigungen, die nicht Hämoprotein-Natur besitzen und bei proteolytischer Verdauung kein Hämopeptid-Material liefern, können hingegen bei einer auf unsere Weise durchgeführten Bestimmung der Sequenz häm-naher Aminosäuren nicht stören, sosehr sie auch den Eisengehalt und das E_{550}/E_{280} -Verhältnis des Ausgangsmaterials herabsetzen mögen.

In dem „Hämopeptid“, welches aus der Cytochrom-c-Fraktion mit 0,37% Fe durch Abbau mit Pepsin gewonnen worden ist, ist die prosthetische Gruppe des Cytochroms mit einer aus 12 Aminosäureresten zusammengesetzten Polypeptid-Komponente,



verknüpft. Für diese Anordnung der Reste zeugen folgende Befunde:

Der N-terminale Rest der Sequenz ist Phenylalanin. Dieser endständige Rest ist mit Lysin verknüpft, da bei der Einwirkung von Trypsin auf das „Hämopeptid“ ein Dipeptid Phe-Lys freigesetzt wird. Die Abspaltung dieses Dipeptids ist begreiflich, da Trypsin jene Peptidbindungen angreift, an denen Lysin- oder Argininreste mit ihren Carboxylgruppen beteiligt sind. Bei der Verdauung des „Hämopeptids“ mit Trypsin wird außer Phe-Lys auch noch ein zweites Dipeptid, Thr-Arg, von dem restlichen Hämopeptid, welches jetzt nur mehr eine Octapeptidsequenz enthält, abgetrennt; Thr-Arg muß in Anbetracht der proteolytischen Spezifität des Trypsins zwischen Phe-Lys und die restliche Oktapeptidsequenz eingefügt werden. Letztere beginnt gemäß Endgruppenbestimmung mit einem Halbcystinrest. Die in Partialhydrolysaten und nach Verdauung mit Subtilisin identifizierten Peptide $\text{CySO}_3\text{H-Glu}$, Glu-Leu , $[\text{Glu, Leu, CySO}_3\text{H}]$, $\text{Leu-CySO}_3\text{H}$, $[\text{Leu, CySO}_3\text{H, His}]$ und $\text{CySO}_3\text{H-His}$ zeigen, daß die Fortsetzung der Sequenz $-\text{CyS-Glu-Leu-CyS-His-}$ lauten muß. Dafür, daß das Tripeptid Thr-[Val, Glu] vom C-terminalen Ende der Sequenz stammt und sich an den Histidinrest anschließt, spricht wohl nicht in direkter Weise ein Histidin und Threonin enthaltendes Peptid, sondern nur die Unmöglichkeit, das Tripeptid an anderer Stelle einzuordnen. Es mag hier jedoch auch erwähnt werden, daß die peptischen Abbauprodukte von Cytochrom-c anderer Herkunft (Rind, Huhn, Lachs, Seidenspinner) ebenfalls die Aminosäurefolge Thr-Val-Glu im Anschluß an einen Histidinrest in C-terminaler Position enthalten (vgl. Tabelle 2).

Zwischen den Ergebnissen einer papierchromatographischen Be-

stimmung der in der Polypeptidkomponente des „Hämopeptids“ enthaltenen Aminosäuren (Tabelle 1) und den Zahlen der Aminosäurereste, wie sie sich aus der oben formulierten Polypeptidsequenz ergeben, besteht eine befriedigende Übereinstimmung, mit Ausnahme des Wertes für Phenylalanin; die quantitative Bestimmung ergab einen zwischen 1 und 2 (1,6) liegenden Wert, während bei der Sequenzermittlung Phenylalanin nur in N-terminaler Stellung festgestellt werden konnte und für einen weiteren Phenylalaninrest innerhalb der Aminosäurefolge jeglicher Hinweis fehlt. Diese Diskrepanz bedarf noch einer Aufklärung.

Ein Vergleich der in Hefe-Cytochrom-c ermittelten Aminosäuresequenz mit homologen, in Cytochrom-c anderer Herkunft schon früher aufgeklärten Sequenzen (Tabelle 2) offenbart eine Reihe signifikanter Übereinstimmungen. Besonders bemerkenswert ist der in allen Fällen gleiche Ab-

Tabelle 2. Vergleich der Aminosäuresequenzen in den aus Cytochrom-c verschiedenen Ursprungs durch Abbau mit Pepsin gewonnenen „Hämopeptiden“

Rind ²	... Val—Glu(NH ₂)—Lys—CyS—Ala—Glu(NH ₂)—CyS—His—Thr—Val—Glu ...
Huhn ²	... Val—Glu(NH ₂)—Lys—CyS—Ser—Glu(NH ₂)—CyS—His—Thr—[Val, Glu] ...
Lachs ²	... Val—Glu(NH ₂)—Lys—CyS—Ala—Glu(NH ₂)—CyS—His—Thr—[Val, Glu] ...
Seiden- spinner ³	... Val—Glu(NH ₂)—Arg—CyS—Ala—Glu(NH ₂)—CyS—His—Thr—[Val, Glu] ...
Bäcker- hefe	... Phe—Lys—Thr—Arg—CyS—Glu—Leu—CyS—His—Thr—[Val, Glu] ...

stand zwischen den zwei Halbcystinresten, welche durch die Ausbildung von Thioätherbrücken im Hämoprotein die prosthetische Gruppe mit der Proteinkomponente verbinden, und die dem einen Halbcystinrest benachbarte Stellung eines Histidinrestes. Wie *Ehrenberg* und *Theorell*¹⁸ durch Bau eines Modells demonstriert haben, lassen sich zwei in eine Polypeptidkette eingebaute Cysteinreste unschwer mit ihren Thiolgruppen an die Vinylgruppen eines Protoporphyrinmoleküls addieren, sofern sie in der Aminosäuresequenz von einander durch zwei andere Aminosäurereste getrennt sind und die Polypeptidkette die Gestalt einer α -Helix annimmt. Eine solche sekundäre Struktur der Polypeptidkette bringt dann auch den Histidinrest in eine räumliche Position, die für eine Anlagerung eines Imidazol-Stickstoffatoms an das Eisenatom der prosthetischen Gruppe besonders günstig ist. Dieser Histidinrest ist aller Wahrscheinlichkeit nach ein integrierender Bestandteil des „aktiven Zentrums“ des Cytochroms-c¹ und liefert eine der zwei häm-gebundenen basischen Gruppen des Cytochrom-c-Apoproteins, welche nach *Theorell* und *Åkeson*¹⁹ für die

¹⁸ A. Ehrenberg und H. Theorell, Acta Chem. Scand. **9**, 1193 (1955).

¹⁹ H. Theorell und Å. Åkeson, J. Amer. Chem. Soc. **63**, 1804 (1941).

Hämochromogen-Natur des Hämoproteins verantwortlich sind. — Alle bisher untersuchten Cytochrome stimmen ferner hinsichtlich der Lage eines stark basischen Aminosäurerestes (Arginin oder Lysin) und einer Tripeptidsequenz, Thr-Val-Glu, überein; ob diese Gleichheit einer funktionellen Bedeutung zuzuschreiben ist, ist nicht bekannt.

Die Unterschiede, die in der ermittelten Aminosäuresequenz zwischen Hefe-Cytochrom-c einerseits und Cytochromen tierischen Ursprungs andererseits bestehen, sind — wie aus genetischen Gründen nicht unpassend erscheint — zahlreicher als die bisher innerhalb der Gruppe tierischer Cytochrome beobachteten; sie betreffen die Natur der beiden zwischen den Halbcystinresten gelegenen Aminosäuren (Glu, Leu) und die Aminosäurefolge, die dem Argininrest vorangeht (Phe-Lys-Thr-).

Zu einem Zeitpunkt, als unsere Versuche zur Extraktion und Reinigung von Hefe-Cytochrom-c zum Zwecke einer Bestimmung der Aminosäuresequenz bereits beendet waren, wurde von *Okunuki* und Mitarbeitern²⁰ eine schöne und ergiebige Methode zur Gewinnung von Hefe-Cytochrom-c publiziert. Mit Hilfe dieses Verfahrens, welches allerdings im Vergleich zu unserem bedeutend langwieriger ist, wurde ein kristallisiertes Präparat erhalten, dessen E_{550}/E_{280} -Quotient 1,28 betrug. Eine noch weitergehende Reinigung scheint kürzlich chinesischen Autoren gelungen zu sein²¹; sie berichten, daß ihr Präparat sich elektrophoretisch in 2 gefärbte Fraktionen auftrennen ließ, von denen die mengenmäßig überwiegende einen Eisengehalt von 0,43% und eine größere katalytische Aktivität im Succinoxidase-System besaß als Cytochrom-c-Präparate aus Säugerherzen. Beide Fraktionen zeigten das gleiche charakteristische Absorptionsspektrum, das mit den Spektren von Cytochrom-c anderen Ursprungs identisch war. *Yčas* und *Drabkin*²² gewannen aus Hefe ein Cytochrom-c-Präparat mit 0,344% Fe, *Minakami* und Mitarbeiter²³ ein solches mit 0,36—0,37% Fe, in beiden Fällen durch chromatographische Reinigung an Kationenaustauschern.

Zusatz bei der Korrektur: *Nunnikhoven*²⁴ hat eben die Isolierung von zwei Cytochrom-c-Komponenten aus Bäckerhefe in elektrophoretisch einheitlichem Zustand (Eisengehalt 0,44% bzw. 0,47%; E_{550}/E_{280} 1,26 bzw. 1,18) und einen Vergleich ihrer Aminosäurezusammensetzung mit jener von Cytochrom-c aus Pferdeherz beschrieben.

Für die freundliche Überlassung von Preßhefe sind wir den Vereinigten *Mautner-Markhof'schen* Preßhefe Fabriken, Wien, zu großem Dank verpflichtet.

²⁰ *B. Hagihara, T. Horio, J. Yamashita, M. Nozaki und K. Okunuki*, Nature **178**, 629 (1956).

²¹ *W.-C. Li und C. L. Tsou*, Sci. Sinica (Peking) **5**, 663 (1957); Chem. Abstr. **51**, 16679 h (1957).

²² *M. Yčas und D. L. Drabkin*, J. Biol. Chem. **224**, 921 (1957).

²³ *S. Minakami*, J. Biochem. (Japan) **42**, 749 (1955); *S. Minakami, H. Ishikura und K. Satake*, ibid. **43**, 575 (1956).

²⁴ *E. Nunnikhoven*, Biochim. Biophys. Acta **28**, 108 (1958).

Aufrichtiger Dank wird dem *Van't Hoff Fonds* für die durch Verleihung eines Stipendiums gewährte Unterstützung der Arbeit ausgesprochen.

Den Untersuchungen kam auch die großzügige Hilfe zugute, die dem II. Chemischen Institut der Universität Wien durch Zuwendungen der *Rockefeller Foundation* erwiesen worden ist.

Es sei ferner dankbar erwähnt, daß Herr Dr. *R. K. Zahn*, Frankfurt/M. uns im Hinblick auf die Möglichkeiten der Extraktion von Cytochrom-c aus Hefe hilfreich beraten hat.