

Mikrosomale Redoxasen

Hj. Staudinger, Gießen

Biochemisches Colloquium Gießen, am 6. Juli 1962

Mikrosomen sind Trümmer des endoplasmatischen Retikulums. Neben vielen anderen Enzymen findet man in dieser Zellfraktion auch Enzyme des Wasserstoff- bzw. des Elektronen-Transportes. Die Enzyme, die Elektronen von den reduzierten Pyridinnucleotiden bis zum Sauerstoff transportieren, lassen sich – zumindest formal – ihrem Normalpotential entsprechend zu einer Art Elektronentransportkette ordnen. Glieder dieses „mikrosomalen Elektronentransportes“ sind: eine kohlenoxyd-empfindliche terminale Oxydase von Cytochrom-Charakter, Cytochrom b_5 (bzw. damit verwandte Cytochrome), mehrere verschiedene „Cytochrom-Reductasen“. Ein ascorbinsäure-abhängiges Enzym, das den Wasserstoff vom reduzierten DPNH auf die radikalische Monodehydroascorbinsäure überträgt, gehört hierher. Es konnte neuerlich aus Mikrosomen gelöst und angereichert werden. Die zellphysiologische Bedeutung der verschiedenen mikrosomalen Elektronentransportmechanismen ist unbekannt. Am Gesamt-Sauerstoff-Umsatz der Zelle haben sie nur einen sehr kleinen Anteil. Die Affinität der Mikrosomen zum Sauerstoff ist 100-mal geringer als die Affinität der Mitochondrien (bzw. Cytochrom a_3). Der Umsatz der Mikrosomen pro Gramm Protein ist bei Sättigung mit O_2 etwa 3-mal kleiner als der von Mitochondrien. Bei dem niedrigen intrazellulären O_2 -Partialdruck macht der Anteil des mikrosomalen O_2 -Umsatzes nur etwa 1 % von der Gesamtatmung einer Zelle aus. Der mikrosomale Elektronentransport hat Bedeutung für die verschiedenartigen auch in Mikrosomen lokalisierten Hydroxylierungsreaktionen (Aromaten, Steroide usw.). Ein vorläufiger Mechanismus für die Hydroxylierungs-Reaktion wurde diskutiert. Neben dem mikrosomalen „Elektronen-Transport“ findet man in Mikrosomen auch wasserstoff-übertragende Enzyme, z. B. Enzyme, die die Δ^4 -3-Ketogruppe von Steroidhormonen reduzieren und damit die Steroidhormone inaktivieren. Die „Lehrmeinung“, daß nur TPNH Wasserstoffdonator für diese Reaktion sei, ist irrig. Auch DPNH ist ein H-Donator; Voraussetzung ist allerdings die Gegenwart von Orthophosphat. Die Reaktionsgeschwindigkeit des mikrosomalen Enzyms ist von der Konzentration an Orthophosphat abhängig und strebt einem Sättigungswert zu, der bei etwa $2 \cdot 10^{-1}$ m Phosphat erreicht wird. Orthophosphat kann durch Arsenat ersetzt werden.

Andere Anionen sind unwirksam. Eine Transhydrierung auf endogenes TPN^o oder eine Transphosphorylierung, wodurch DPNH in TPNH umgewandelt würde, konnte durch verschiedene Kontrolluntersuchungen mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Das Phosphat ändert V_{max} , nicht aber K_M für das Enzym: $DPNH + \text{Testosteron}$. [VB 613]

Über das toxische, entzündliche und cocarcinogene Prinzip des Crotonöls

Erich Hecker, München

Kolloquium des Max-Planck-Instituts für Medizinische Forschung, Heidelberg, am 18. Juni 1962

Crotonöl ist ein offizinelles, laxierend wirkendes Öl, das aus den Samen der in tropischen Zonen verbreiteten Euphorbiacee *Croton tiglium* L. gewonnen wird. Die laxative sowie die toxische und entzündliche bis blasenziehende Wirkung des Öls ist seit langem bekannt und hat vielfach zur chemischen Bearbeitung des Öls angeregt. Darüber hinaus wurde gefunden [1], daß Crotonöl die Eigenschaft besitzt, aus potentiellen Tumorzellen massive Geschwülste zu entwickeln. Diese co-carcinogene Wirkung des Öls hat in der experimen-

[1] I. Berenblum, Cancer Res. 1, 44, 807 (1941).

tellen Krebsforschung große Bedeutung erlangt, da man von ihr tiefere Einblicke in den komplizierten Mechanismus der Carcinogenese erhoffte. Die aus entsprechenden Versuchen abgeleitete sog. 2-Stufen-Hypothese der Carcinogenese ist aber bis heute umstritten, weil es trotz zahlreicher Bemühungen nicht gelang, das cocarcinogene Prinzip des Öls rein darzustellen.

Durch Kombination von kontinuierlichen und diskontinuierlichen, multiplikativen Verteilungen [2] mit chromatographischen Verfahren sowie eigens entwickelten Entzündungs- und Cocarcinogen-Testen haben Votr. u. Mitarb. kürzlich [3] zwei farblose, glasartig amorphe Substanzen a und b aus Crotonöl isoliert, die für die gesamte toxische, entzündliche und cocarcinogene Wirkung des Öls verantwortlich sind. Beide Verbindungen erscheinen chromatographisch einheitlich, zeigen R_F -Werte von 0,6 bzw. 0,7, $[\alpha]_D^{47^\circ}$ bzw. 46° und enthalten nach UV- und IR-Spektrum freie Hydroxylgruppen, Esterfunktionen und Doppelbindungen [4]. Substanz a läßt sich mit 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid [5] in einen intensiv roten, kristallisierenden Ester (Fp $86-87^\circ C$, ν_{OH} 2,95; ν_{CH} 3,43, 3,51; ν_{CO} 5,8–5,85; $\nu_{C=C}$ 6,1–6,15 μ (KBr); λ_{max} (230), 330,5, (345), (460) m μ ; ϵ_{max} (15000), 30880, (26800), (634) (in Äthanol) überführen. Analyse und Molekulargewicht stimmt am besten mit der Bruttozusammensetzung $C_{51}H_{64-66}O_{12}N_3$ überein [6].

Die LD_{50} der beiden Substanzen liegt bei 10 γ /50 g Frosch, ihre Entzündungseinheit (E.E.) bei 10^{-2} γ /Mäuseohr. Im Papillomtest werden bei einmaliger dorsaler Applikation von 300 γ 9.10-Dimethyl-1.2-benzanthracen (DMBA)/Maus und nachfolgender 2mal wöchentlicher Behandlung mit jeweils 0,5 γ Substanz a bzw. b nach 12 Wochen bei 100% der Mäuse gutartige Tumoren und zwar durchschnittlich 10 bzw. 11/Maus erhalten. Nach weiteren 16 Wochen ohne jede weitere Behandlung hat sich ein Teil der Tumoren in bösartige wuchernde Plattenepithelcarcinome umgewandelt. Daneben werden auch Sarkome und Leukämien beobachtet. Orale Verabfolgung von DMBA und dorsale Applikation von Substanz a bzw. b führt in ähnlicher Weise zu Plattenepithelcarcinomen und Sarkomen. Weder bei alleiniger Anwendung von 300 γ DMBA noch bei ausschließlicher Applikation von Substanz a bzw. b treten bösartige Tumoren auf.

Die Isolierung der Cocarcinogene a und b eröffnet erstmals die Möglichkeit, die Struktur dieser hochwirksamen Verbindungen zu klären, sowie die 2-Stufen-Hypothese der Carcinogenese zu überprüfen und einer biochemischen Analyse zuzuführen. [VB 608]

Neuere Beiträge zur Chemie und Biochemie der Aminosäuren

B. Witkop, Bethesda-Washington (USA)

GDCh-Ortsverband Gießen, am 19. Juli 1962

Eine neue natürliche Oxy-Aminosäure ist das 3-Oxyprolin, ein Isomeres des 4-Oxyprolins. Beide Aminosäuren sind charakteristische Bausteine des Stütz- und Binde-Gewebes, in dessen Eiweiß, Collagen, 3-Oxyprolin nur zu einem Bruchteil des 4-Oxyprolins vorkommt, ein Umstand der gemeinsam mit der schweren Trennbarkeit auf dem nach dem Prinzip von Stein und Moore arbeitenden automatischen Aminosäure-

[2] E. Hecker: Verteilungsverfahren im Laboratorium, Weinheim, Bergstraße, 1955; Z. analyt. Chem. 181, 284 (1961); Chem. Ztg. 86, 272 (1962).

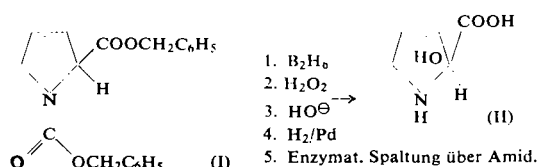
[3] Erstmals vorgetragen auf einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft vom 2.–5. 1. 1962 in Homburg/Saar veranstalteten Krebs-Symposium.

[4] Dissertation J. G. Meyer, München 1962.

[5] E. Hecker, Chem. Ber. 88, 1666 (1955).

[6] Diplomarbeit H. Bresch, München 1962.

Analysator erst in jüngster Zeit zur Entdeckung [1], Kristallisation [2] und Synthese [2] der neuen Aminosäure geführt hat.



Die Hydroborierung des N-Carbobenzyloxy-O-benzylester-Derivates (I) des jüngst beschriebenen 3,4-Dehydro-D,L-prolins [3] führt nach einer Reihe von chemischen Schritten und Abtrennung von Isomeren in 60-proz. Ausbeute zum 3-Oxy-D,L-prolin, dessen N-Tosyl-O-methyl-ester dasselbe Infrarot-Spektrum wie das analoge Derivat der aus natürlichem Eiweiß, in diesem Fall Gerüstsubstanz von Seegurken, gewonnenen L-Aminosäure, besaß. Für die Konfiguration der natürlichen Aminosäure als *trans*-3-Oxy-L-prolin (II) ist der streng chemische Beweis noch in Arbeit. D-Aminosäure-Oxydase greift II nicht an, wohl aber die D,L-Verbindung die quantitativ den für den D-Anteil errechneten Sauerstoff verbraucht und dabei in ein neues Produkt, vermutlich 1,2-Dehydro-3-oxyprolin übergeht. Das neue 3-Oxyprolin kommt auch in den Zellwänden von Anthrax-Bakterien und in gewissen Antibiotika (z. B. Telomycin) vor [4].

Vom Dehydroprolin ausgehend ließ sich Anhydro-3-Oxystachydrin darstellen [5], wie es von Cornforth [6] durch Essigsäureanhydrid-Behandlung von natürlichem *cis*- und *trans*-3-Oxystachydrin aus *Courbonia virgata* erhalten worden war. Die Dehydro- und Ketoprolin-Derivate erlauben die selektive Einführung von Tritium durch Verwendung von reduktiver Hydroborierung oder Natrium-Borhydrid. Die so gewonnenen Tritium-markierten Prolin- und Oxyprolin-Derivate dienten als Substrate für Leber-Microsomen, Hühner-Embryonen (Überführung in gebundenes Oxyprolin) und *Streptomyces antibioticus* (Einbau in den Peptid-Anteil der verschiedenen Actinomycine). Diese im Laboratorium von S. Udenfriend ausgeführten Arbeiten verschafften neue Einblicke in die Biogenese und das Schicksal im Stoffwechsel von Oxyprolin.

[VB 617]

Spaltung von Proteinen ohne Enzyme

B. Witkop, Bethesda-Washington (USA)

GDCh-Ortsverband Marburg/Lahn, am 20. Juli 1962

Man verfügt nun schon über eine Reihe von Methoden, die es erlauben, Peptide und Eiweiß-Stoffe ohne Hilfe von Enzymen selektiv zu spalten [7]. Solche Methoden erweisen ihren Wert, wenn es gilt, die immer länger werdenden und in rascherer Folge veröffentlichten Primär-Sequenzen von Eiweiß-Stoffen und Enzymen auf ihre Richtigkeit zu prüfen. Arbeiten aus jüngster Zeit haben sich hauptsächlich mit der Ribonuclease aus Rinder-Bauchspeicheldrüsen beschäftigt. Dieses Enzym besteht aus einer unverzweigten Kette von 124 Aminosäuren, deren sekundäre und tertiäre Struktur von 4 Disulfid-Brücken bestimmt wird. Bei der vorsichtig reduzierenden Öffnung dieser 4 S-S-Brücken in Harnstoff-Lösung verliert das Enzym die gesamte gerichtete Struktur, die sich aber bei langsamer Re-Oxydation und Herausdialysieren des Harnstoffs vollkommen und selektiv wiederherstellen läßt; man gelangt wieder zum aktiven Enzym, das sich von nativer

Ribonuclease nicht unterscheiden läßt [8]. In der Primärsequenz der Ribonuclease sind also richtungsweisende Gruppen enthalten, die das ungeordnete Enzym richtig steuern, so daß es sich „von selbst“ in die verwickelte Architektur des voll aktiven Enzyms „faltet“. Aus diesem historischen Versuch ergibt sich eine Bedeutung der Primär-Sequenz von Eiweißstoffen, wie man sie vorher nicht vermuten konnte. Die Interpretation der hierbei wirksamen, in die Primär-Sequenz eingebauten, richtungsweisenden Kräfte („Informationen“) ist nur dann sinnvoll, wenn die Stellung jeder Aminosäure genau bekannt ist. Hier machen sich die Grenzen der enzymatischen Methodik der Eiweiß-Strukturmittlung bemerkbar, die zu einer Art sehr routinierter und verwickelter „Buchhaltung“ geworden ist, bei der es darauf ankommt, überlappende Peptid-Sequenzen richtig zur Gesamt-Sequenz zusammenzufügen. Dagegen eignen sich die von Enzymen unabhängigen selektiven Spaltmethoden vorzüglich zur „Eiweiß-Buchprüfung“, da Peptid-Bindungen gelöst werden, die enzymatisch unangreifbar sind. So vermag Bromcyan bei Zimmertemperatur (im Gegensatz zu den nur bei höherer Temperatur verlaufenden alkylierenden Spaltungen [9]) und saurem pH, die den vier Methioninen in der Ribonuclease folgenden Peptid-Bindungen selektiv und fast quantitativ zu spalten [10]. Die nebenreaktionsfreie Spaltung führt zu drei Spaltstücken: Rumpf-Protein, einem „chemischen Schwanz-Peptid“, das die Aminosäuren 1 bis 13 enthält und freiem Homoserin. Spaltet man nun lediglich das auf neuem Wege vereinfacht hergestellte [11] S-Peptid, das die Aminosäure-Sequenz 1 bis 20 der Ribonuclease enthält, so lassen sich auf ⁹Sephadex-Säulen das gleiche „chemische Schwanzpeptid“ (1-13) und ein Heptapeptid (14-20) trennen und isolieren, deren genauere Untersuchung im Verein mit neuen Resultaten der enzymatischen Revision [12, 13] zu folgender Revision führte:

	NH ₂
alte Sequenz:	-SER-THR-SER-SER-ASP-HIS-MET-GLU-NH ₂
revidierte Sequenz:	-GLU-HIS-MET-ASP-SER-SER-THR-SER-
Fortlaufende Numerierung:	- 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 -

Das aus Ribonuclease-S-Peptid mit Bromcyan herausgeschälte Heptapeptid (14-20) ist möglicherweise eng mit dem Wirkungs-Zentrum und -Mechanismus des Enzyms verknüpft. Seine Synthese gelang jüngst K. Hofmann [14]. Sowohl natürliches wie synthetisches Heptapeptid scheinen nach den vorliegenden Beobachtungen eine unerwartete Stabilität und Tendenz zur Isomerisierung zu besitzen, die im Augenblick noch Gegenstand intensiver Untersuchungen sind. [VB 618]

Neue Monomere und Polymere Polymere mit Mercaptan-Seitenketten

C. G. Overberger, Brooklyn, N.Y./USA

GDCh-Ortsverband Marburg/Lahn, am 18. Mai 1962

Die relative Oxydationsgeschwindigkeit einer Serie von Thiolen wurde spektralphotometrisch bestimmt. In gepufferter wäßriger Lösung bei pH = 10 werden 2,2-Dimethyl-4-(p-mercaptophenyl)-valeriansäure und ein verseiftes Copolymeres aus Vinyl-thioacetat ungefähr gleich schnell oxydiert, während 2,2-Dimethyl-4-mercaptovaleriansäure etwa dop-

- [1] I. D. Ogle, M. A. Logan u. R. B. Arlinghaus, Arch. Biochim. Biophys. 94, 85 (1961). K. Piez u. J. Gross, Biochim. Biophys. Acta 34, 24 (1959).
- [2] P. Irreverre, K. Morita, A. Robertson u. B. Witkop, Biochem. Biophys. Res. Comm., im Druck.
- [3] A. V. Robertson u. B. Witkop, J. Amer. chem. Soc. 84, 1697 (1962).
- [4] P. Irreverre, unveröffentlicht.
- [5] A. V. Robertson, J. E. Francis u. B. Witkop, J. Amer. chem. Soc. 84, 1709 (1962).
- [6] I. W. Cornforth u. A. J. Henry, J. chem. Soc. 957 (1952).
- [7] Vgl. B. Witkop, Advances in Protein Chemistry 16, 221 (1962).

- [8] F. H. White, jr., J. biol. Chemistry 235, 383 (1960).
- [9] W. B. Lawson, E. Gross, C. M. Foltz u. B. Witkop, J. Amer. chem. Soc. 84, 1715 (1962).
- [10] E. Gross u. B. Witkop, J. biol. Chemistry 237, 1856 (1962).
- [11] E. Gross u. B. Witkop, unveröffentlichte Versuche.
- [12] D. G. Smyth, W. H. Stein u. S. Moore, J. biol. Chemistry 237, 1845 (1962).
- [13] J. T. Potts, A. Berger, J. Cooke u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 237, 1851 (1962).
- [14] Unveröffentlichte Versuche; persönliche Mitteilung.