

## OXYDATIVE PHOSPHORYLIERUNG UND VITAMIN K MANGEL

VON

CARL MARTIUS UND DAGOBERT NITZ-LITZOW

*Physiologisch-chemisches Institut der Universität Würzburg (Deutschland)*

In einer vor kurzem erschienenen Mitteilung<sup>1</sup> haben wir auf Grund von Versuchen, in denen eine "entkoppelnde" Wirkung von Dikumarol und verwandten Verbindungen aufgezeigt wurde, die Hypothese aufgestellt, dass das Vitamin-K<sub>1</sub> an der oxydativen Phosphorylierung beteiligt sei. Wir berichten im Folgenden kurz über Versuche mit K-frei ernährten Küken, die unsere Hypothese bestätigen.

Bei der Aufzucht der K-Mangel Küken und der Bestimmung der Blutgerinnungszeiten folgten wir den von H. DAM und Mitarbeitern gegebenen Vorschriften<sup>2</sup>. Als Kontrolltiere dienten gleichfalls vitaminfrei ernährte Küken, gleichen Alters und Gewichtes, denen 24 Stunden vor Versuchsbeginn 100–200  $\gamma$  2-Methyl-1,4-Naphthochinon *per os* gegeben worden war.

Wie die Versuche 1–6 der Tabelle I zeigen weisen die aus den Lebern der K-Mangeltiere isolierten Mitochondrien durchweg (es wurde kein Versuch ausgelassen!) geringere Phosphorylierung bei meist höherer Atmung auf als die Kontrollen (Mittel: 30 %). Da bei diesen Versuchen jeweils Mitochondrienpräparate von zwei verschiedenen Tieren miteinander verglichen werden, ergeben sich naturgemäß stärkere Schwankungen in den Differenzen (15–61 %); die Verschiedenheit der Absolutwerte der P/O-Quotienten der einzelnen Versuchsgruppen erklärt sich durch die unvermeidliche Verschiedenheit der Versuchsbedingungen, die aber bei den jeweils verglichenen Ansätzen gleich waren.

TABELLE I

Nr		Alter	BGZ	$\mu A O$	$\mu A P$	P/O	Differenz
1	Kontr.	52d	20"	2.75	6.03	2.2	—
	K-Mangel-Tier	52d	380"	2.38	4.27	1.8	—18 %
2	Kontr.	55d	20"	2.46	3.16	1.29	—
	K-Mangel-Tier	55d	570"	2.76	3.05	1.10	—15 %
3	Kontr.	72d	40"	3.29	5.71	1.74	—
	K-Mangel-Tier	72d	720"	4.02	4.19	1.04	—40 %
4	Kontr.	53d	25"	2.15	5.62	2.62	—
	K-Mangel-Tier	53d	310"	3.5	7.26	2.07	—21 %
5	Kontr.	60d	20"	2.57	2.65	1.03	—
	K-Mangel-Tier	60d	275"	3.24	1.31	0.40	—61 %
6	Kontr.	61d	40"	2.34	4.55	1.94	—
	K-Mangel-Tier	61d	430"	3.64	4.07	1.12	—42 %

Substrat: 0.01 M  $\beta$ -Oxybutyrat.

Von besonderem Interesse sind die Versuche 4a–6a, bei denen Succinat als Wasserstoffdonator diente. In diesem Falle ist die Atmung der Kontroll- und Mangeltiere fast gleich und die Differenzen der P/O-Quotienten sind nur etwas halb so gross wie bei Verwendung von  $\beta$ -Oxybutyrat. Nun wird aber die bei der Dehydrierung der Bernsteinsäure gebildete Fumarsäure weiter in Äpfelsäure umgewandelt und ev. noch weitere Metaboliten, bei deren Abbau wie bei  $\beta$ -Oxybutyrat reduzierte Pyridinnukleotide auftreten. So sind die Daten der Versuche mit Succinat in Wirklichkeit Mittelwerte sozusagen idealer Versuche, in denen nur die Reaktion Succinat — 2H = Fumarat abläuft und solchen, in denen die gesamte Atmungskette von den Codehydrasen an durchlaufen wird. Es sieht demnach so aus als wenn im Idealfalle, d.h. wenn Fumarat nicht weiter umgesetzt würde, überhaupt keine Unterschiede in den P/O Quotienten der K-Mangeltiere und der Kontrollen mehr auftreten würden. Das würde aber bedeuten, dass der Ort der Wirkung des Vitamin K zwischen den Pyridinnukleotiden und der Potentialstufe des Cytochrom c liegen muss.

TABELLE II

Nr.		Alter	BGZ	$\mu A O$	$\mu A P$	P/O	Differenz
3a	Kontr.	wie bei		3.84	7.0	1.82	—
	K-Mangel-Tier	Nr. 3		3.82	5.77	1.51	—17 %
4a	Kontr.	wie bei Nr. 4		1.12	3.26	2.92	—
	K-Mangel-Tier	wie bei Nr. 4		1.04	2.8	2.7	—7.5 %
5a	Kontr.	wie bei Nr. 5		2.76	4.13	1.5	—
	K-Mangel-Tier	wie bei Nr. 5		2.79	3.32	1.19	—21 %
6a	Kontr.	wie bei Nr. 6		2.3	4.9	2.13	—
	K-Mangel-Tier	wie bei Nr. 6		2.42	4.11	1.73	—19 %

Substrat: 0.01 M Succinat.

Die zu den Versuchen verwendeten Mitochondrien wurden bei Vers. 1 und 2 mittels 0.25 M Rohrzuckerlösung, bei den übrigen mittels einer Lösung präpariert, die 0.2 M an Rohrzucker und 0.02 M an Versene war. Die Mitochondriensuspensionen zweier miteinander verglichener Ansätze enthielten, wie durch N-Bestimmungen kontrolliert wurde, gleiche Mengen Enzymmaterial. Die Atmung wurde mittels Warburgtrögen von 5 ml Inhalt gemessen, die Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit usw. war die gleiche wie bei <sup>1</sup> angegeben.

## LITERATUR

<sup>1</sup> C. MARTIUS UND D. NITZ-LITZOW, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 134.

<sup>2</sup> H. DAM, I. KRUSE UND E. SÖNDERGAARD, *Acta Physiol. Scand.*, 22 (1951) 238.

Eingegangen den 20. November 1953

## ON THE SIZE OF THE MONOMER OF INSULIN

by

D. W. KUPKE\* AND K. LINDERSTRØM-LANG

*Carlsberg Laboratorium, Copenhagen (Denmark)*

The question of the minimum molecular weight of insulin has recently been investigated by several authors. There seems to be general agreement about the value 12,000 for acid aqueous solutions<sup>1-4</sup> while the value 6000 has been suggested by HARFENIST AND CRAIG<sup>5</sup> for solutions of insulin in the system water-secondary butanol-dichloroacetic acid, and by FREDERICO<sup>6</sup> for alkaline aqueous solutions (pH 10) and dioxan-water mixtures. It is naturally of great importance to establish as firmly as possible the size of the smallest molecular unit into which insulin may dissociate without irreversible loss of its activity. We have therefore attempted to estimate the molecular weight of the isoelectric hormone in concentrated solutions of guanidinium chloride (GuCl) in which it is soluble at pH 5. GuCl is known to cause dissociation of associated protein molecules and it does not denature insulin irreversibly (see below).

The molecular weight was measured in the micro-osmometer designed by KORSGAARD CHRISTENSEN<sup>7,8</sup>, compare<sup>9</sup>. The stainless steel parts were replaced by ones of nickel since the former metal was heavily corroded by solutions of guanidinium chloride. Circular pieces cut out from Visking sausage casing (thickness 0.025 mm) were used as membranes after careful washing with GuCl. Since their permeability was low, equilibrium was but slowly reached *i.e.* in the course of 3-4 days. For the same reason the dynamic method<sup>8,9</sup> for measuring the pressure was rather cumbersome, and the static principle was used after establishing the approximate osmotic pressure by the dynamic method. Only experiments where the pressure was constant for several days are reported here. Bacterial growth can fortunately be excluded.