Über den Atmungskatalysator Cytochrom.

Von Karl Zeile.

Vorgetragen in der Physikalisch-medizinischen Sozietät Erlangen am 7. Mai 1934.

Schon vor etwa 50 Jahren beschrieb Mac Munn unter der Bezeichnung Myo- bezw. Histohämatin in tierischen Zellen aufgefundene Häminverbindungen, die sich durch ein charakteristisches Absorptionsspektrum auszeichnen. Die ablehnende Kritik Hoppe-Seylers, der die Farbstoffe als Zersetzungsprodukte des normalen Blutfarbstoffes betrachtete, ließ indes die Befunde Mac Munns bald wieder in Vergessenheit geraten. Im Jahre 1923 diskutierte H. Fischer unter Hinweis auf diese Pigmente ihren Zusammenhang mit dem in Hefe aufgefundenen Koproporphyrin und erst 1925 machte Keilin Mitteilung über die Bestätigung und Erweiterung der Mac Munnschen Befunde. Auch in Einzelligen und in pflanzlichem Material wurde Cytochrom gefunden. Die höchste Cytochromkonzentration besitzen im allgemeinen Zellen mit hohem Sauerstoffverbrauch wie Bäckerhefe und einige aerobe Bakterien, der Brustmuskel fliegender Insekten und Vögel, der Herzmuskel von Wirbeltieren und Wirbellosen. Die stärker atmenden Gewebe der höheren Tiere, wie Hoden, Niere, Leber, Gehirn, Hypophyse, Netzhaut führen im allgemeinen mehr Cytochrom als die schwächer atmenden, z. B. Thymus und Bindegewebe, Oberhefe mehr als Unterhefe. In den höheren Pflanzen wurde Cytochrom in verhältnismäßig geringer Konzentration in den chlorophyllfreien Teilen nachgewiesen. Anaerobe Zellen führen kein Cytochrom; auffallenderweise enthalten indes auch die stark atmenden Aspergillusarten kein Cytochrom.

Sättigt man die cytochromhaltigen Zellen mit Sauerstoff, so verschwindet das charakteristische 4-bandige Absorptions-

spektrum, dessen Typus in Abb. 1 wiedergegeben ist, und macht einem viel weniger deutlichen mit schwachen Absorptionen bei etwa 570—550 und 540—520 $m\mu$ Platz. Ist der Sauerstoff ver-

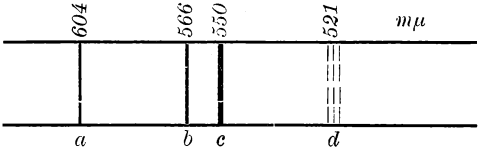
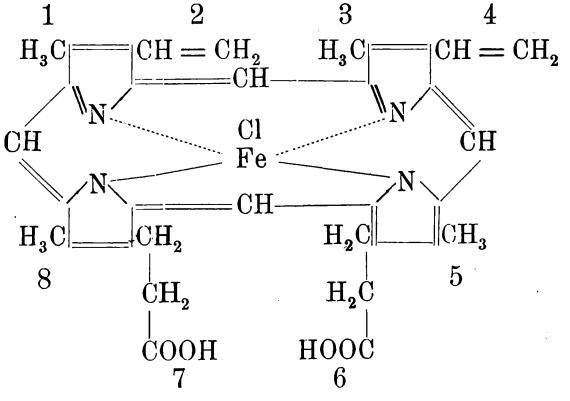


Abb. 1. Cytochromspektrum im Brustmuskel der Biene.

atmet, so kehrt das ursprüngliche Spektrum der reduzierten Phase wieder zurück; dieser Wechsel, der besonders gut an Hefesuspensionen durch Schütteln mit Luft, bezw. durch Stehenlassen unter Luftausschluß oder Zufügen eines Reduktionsmittels demonstriert werden kann, ist beliebig oft wiederholbar; er spricht zusammen mit der allgemeinen Verbreitung des Cytochroms in atmenden Zellen für eine universelle Bedeutung des Pigmentes bei den oxydativen Stoffwechselvorgängen.

In welcher Weise ist nun das Cytochrom unter die Häminderivate einzureihen? Hämine sind bekanntlich ganz allgemein gesprochen die Eisenkomplexsalze der Porphyrine, sie werden aus diesen leicht durch Einführung der Chlor-ferri-Gruppe erhalten und gehen umgekehrt z. B. bei der Behandlung mit Bromwasserstoff-Eisessig in Porphyrin über. Das gewöhnliche, aus Blut zu gewinnende Hämin, schlechtweg Hämin genannt, ist das Eisenkomplexsalz des Protoporphyrins; ihm kommt, wie von H. Fischer durch Synthese bewiesen, Formel I zu. In diesem Zusammenhang interessiert noch die Konstitution des Hämatopor-

I.



phyrins, das man sich durch Wasseranlagerung an die beiden ungesättigten Seitenketten (2 und 4) des Protoporphyrins entstanden denken kann, und die des Mesoporphyrins, das durch Reduktion der ungesättigten Seitenketten zu Aethylresten aus Protoporphyrin entsteht. Wird in einem Hämin das Chlor in alkalischem Medium durch OH ersetzt, so resultiert ein Hämatin. Hämin und Hämatin enthalten 3-wertiges Eisen, bei Reduktion desselben bildet sich ein Häm, das nur das zweiwertige Eisen an die beiden Porphyrinstickstoffatome gebunden enthält. Sowohl das dreiwertige als auch das zweiwertige porphyringebundene Eisen bilden mit stickstoffhaltigen Körpern verschiedenster Art, z. B. NH_3, Aminen, Hydrazin, Pyridin und anderen N-Heterozyklen, Aminosäuren, Eiweiß dissoziable Komplexverbindungen. Enthalten diese Komplexe Häm, also 2-wertiges Eisen, so bezeichnet man sie als Hämochromogene, enthalten sie Hämatin, so spricht man von Parahämatin. Hämochromogen geht leicht durch Autoxydation reversibel in Parahämatin über, ferner ist der Hämochromogentypus durch ein auffallendes zweibandiges Absorptionsspektrum charakterisiert. Durch diese Spektraleigenschaft wird der Zusammenhang zwischen Hämochromogen und Cytochrom hergestellt, denn wie Keilin erörtert, läßt sich das Cytochromspektrum in drei Hämochromogenspektren auflösen, von denen b und c ihre Trabanten im Bandenkomplex d haben (vgl. Abb. 1), während der von a, im Organmaterial vielleicht zu schwer sichtbar, zwischen c und d liegen müßte. Der komplexe Charakter des Spektrums geht daraus hervor, daß die relative Intensität der Banden a, b und c in verschiedenen Objekten verschieden sein kann und daß unter bestimmten Bedingungen die Oxydation so geleitet werden kann, daß die Banden unabhängig voneinander verschwinden.

Bisher ist es nur gelungen vom ganzen Cytochromsystem die Komponente c unverändert aus der Zelle abzuscheiden. Hier hat infolgedessen zunächst die Konstitutionsaufklärung eingesetzt und auch Ergebnisse gezeitigt, während man über die Natur der Komponente a heute noch kaum Aussagen machen kann und von b nur vermuten muß, daß sie ein Hämochromogen des gewöhnlichen Hämins in einem besonderen Verteilungszustand darstellt, wodurch die rotwärts verschobene Lage der Absorptionsbande bei 566 $m\mu$ gegenüber der normalen Absorption

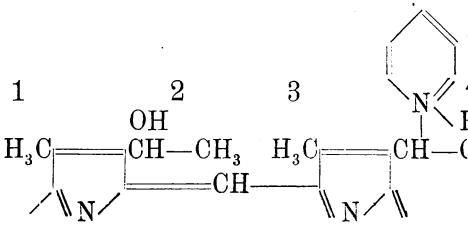
des Protohämochromogens bei 557 $m\mu$ zu erklären ist. Die Abtrennung der Komponente c aus Hefezellen, dem bisher geeignetsten Ausgangsmaterial, gelingt im wesentlichen dadurch, daß ein Hefeplasmolysat kurze Zeit auf 90° erwärmt wird und die Zellreste, die noch die Komponente c enthalten nach dem Abfiltrieren mit einer Na-sulfit-hydrosulfit-Lösung ausgezogen werden. Aus diesem Extrakt lassen sich bei einem $p_h$ca 3,8, solange das Cytochrom c in reduziertem Zustand gehalten wird, mit Kaolin Begleitstoffe herausadsorbieren, endlich nach seiner Oxydation das Cytochrom selbst. Bei alkalischer Reaktion ist Elution möglich; in solchen Eluaten ist in der Regel schon ein Hämingehalt der Präparate von ca. 3,3% erreicht, der sich auch durch die chromatographische Methode bisher nicht weiter steigern ließ. Das so gereinigte Cytochrom c zeigt ein typisches Hämochromogenspektrum, in oxydiertem Zustand das eines typischen Parahämatins. Von einem gewöhnlichen Hämochromogen unterscheidet sich aber die Komponente c dadurch deutlich, daß sie im physiologischen p_h-Bereich nicht autoxydabel ist und sich nicht mit CO verbindet; erst jenseits von p_h 4 und 13 ist Autoxydation möglich. Auffallend ist ferner die Resistenz des Hämochromogen- und Parahämatinspektralbildes der Komponente c gegen Dissoziationseinflüsse bei weitgehender Verdünnung, endlich nimmt das Hämochromogenspektrum der Komponente c mit der Lage seiner Hauptabsorption bei 550 $m\mu$ unter den Hämochromogenspektren der bekannten Blutfarbstoffderivate, deren Hauptabsorption durchwegs um 547 $m\mu$ liegen, eine Sonderstellung ein.

Trotz dieser Besonderheiten im Verhalten der Komponente c ließ sich der Bau des ihr zugrundeliegenden Porphyringerüstes als identisch mit dem des gewöhnlichen Bluthämins erkennen. Beim tiefgreifenden Abbau mit Bromwasserstoff-Eisessig wurde kristallisiertes Hämatoporphyrinchlorhydrat erhalten; der durch Jodwasserstoffreduktion daraus gewonnene Mesoporphyrinester erwies sich identisch mit dem aus Bluthämin dargestellten.

Dagegen führte die schonende Enteisenung der Komponente c mit verdünnter Salzsäure zu einem Porphyrin, dem sog. Porphyrin c, das offenbar der intakten Komponente c am nächsten steht, und das wiederum in seinen Eigenschaften von den sich vom Blutfarbstoff ableitenden Porphyrinen typisch abweicht.

Seine Absorptionsbanden liegen zwischen denen des Proto- und Hämatoporphyrins, es zeigt ferner die auffallende Eigenschaft, daß es im Gegensatz zu den bisher bekannten Porphyrinen beim Abstumpfen seiner mineralsauren Lösung nicht in überschichteten Äther übergeht, sondern in der wässerigen Phase stabil gelöst bleibt. Von der Ansicht Mac Munns ausgehend, daß die Histohämatine gefärbte Proteide seien, ist das Porphyrin c als ein Porphyrin zu betrachten, in dem die Verbindung zum kolloiden Eiweißträger oder Bruchstücken desselben noch nicht gelöst ist, eine Auffassung, die die abweichenden Löslichkeitseigenschaften des Porphyrins c vollkommen erklärt, und die mit den neueren Befunden über die Eisweißnatur des gereinigten Cytochroms c in Einklang steht. Es wurde also zunächst versucht, durch feste chemische Verbindung von Porphyrin mit Eiweißbausteinen, d. h. ganz allgemein Stickstoffbasen, Modellkörper des Porphyrins c zu synthetisieren, die mit ihm in bezug auf die auffallenden Löslichkeitseigenschaften, die spektroskopischen Daten und die Möglichkeit zur Abspaltung von Hämatoporphyrin mit Bromwasserstoff-Eisessig übereinstimmen. Das gelang in der Tat durch Anlagerung von tertiären N-Ringbasen, am besten Pyridin, an die ungesättigten Seitenketten des Protoporphyrins. Die Konstitution des Pyridinadduktes, das in schön kristallisiertem Zustand zu gewinnen ist, wird durch Formel II wiedergegeben; offen zu lassen ist noch die relative Stellung des Pyridinringes in der Seitenkette 2 oder 4. Verwendet man N-Basen mit primärem, sekundärem oder nicht ringgebundenem tertiären N-Atom zur Anlagerung, so erhält man zwar ebenfalls hydrophile Porphyrine mit den Spektraleigenschaften des Porphyrins c, die aber im Gegensatz zu diesem nicht mehr mit Bromwasserstoff-Eisessig die Stickstoftbase abspalten lassen. Durch eine Verknüpfung des Porphyrins mit Stickstoffbasen über die Karboxylgruppe nach Art einer Peptidbindung, die unter Gewinnung zahlreicher Derivate realisiert wurde, läßt sich kein mit dem des Porphyrins c übereinstimmendes Absorptionsspektrum erzeugen, außerdem erweist sich ebenfalls die Abspaltung der N-Base mit HBr-Eisessig als nicht möglich. Auch andere Versuche zur Modifizierung der reaktionsfähigen Seitenketten 2 und 4 des Proto- bezw. Hämatoporphyrins, z. B. Acylierung des letzteren, führten zu keiner Spektralverschiebung in Richtung des Por-

phyrins c. Die mit II wiedergegebene Formulierung stellt also diejenige Verknüpfungsart dar, die, soweit man sehen kann, als einzige die Eigenschaften der natürlichen Cytochromkomponente c erklärt; es ist in hohem Maße wahrscheinlich, daß dasselbe Bauprinzip auch im Naturprodukt vorliegt.

II. 

(Nur das halbe Molekül ist eingezeichnet.)

Außer der mit dem Porphyrin auf die eben erörterte Weise chemisch fest verknüpften N-Substanz muß dem Cytochrom-c-System noch ein weiterer N-Komplex angehören, der mit dem Eisen im Dissoziationsgleichgewicht steht und der nach dem eingangs über das Wesen von Hämochromogen-Parahämatin-Systemen Gesagten für das Zustandekommen des typischen Hämochromogenspektrums des Cytochroms c verantwortlich zu machen ist. Eine Differenzierung dieser N-Komplexe innerhalb des Cytochrom-c-Systems ist noch nicht möglich, wohl aber eine Abgrenzung des Cytochrom-c-Systems als Ganzes. Die Möglichkeit dazu bot sich in dem mit dem Oxydationszustand wechselnden Adsorptionsverhalten des Cytochroms c: Unter geeigneten Bedingungen ist das Cytochrom c in reduziertem Zustand z. B. an Kaolin nicht oder nur so wenig adsorbierbar, dagegen sehr leicht, und zwar ohne Änderung des Reaktionsmilieus, einfach nach kurzem Schütteln mit Luft, in oxydiertem Zustand. So ist es möglich in einer Cytochromlösung, in der das Pigment noch zusammen mit Begleitstoffen vorliegt, einmal die Menge adsorbierbarer Begleitstoffe festzustellen, dadurch, daß eine Adsorption in der reduzierten Lösung ausgeführt wird, während in einer Parallelprobe, in der das Cytochrom durch Luftoxydation in adsorbierbare Form gebracht worden ist, die Gesamtmenge von Cytochrom + Begleitstoff ermittelt wird. Die Cytochrommenge ergibt sich als Differenz aus beiden Versuchen, die in ihr enthaltene Häminmenge ist leicht spektrophotometrisch festzustellen; aus dem Hämingehalt der zu 3,5 % gefunden wurde, läßt sich auf einfache Weise das kleinste Molgewicht des Cyto-

chroms c zu 18700 errechnen. Damit ist festgestellt, daß Cytochrom c ein hochmolekulares Gebilde darstellt, also in der Tat der Mac Munnschen Vorstellung entspricht; außerdem ist mit einem Hämingehalt von 3,5% die Grenze für die Reinigung mit physikalischen Methoden ermittelt, die mit 3,3% tatsächlich auch fast erreicht worden ist.

Die relative Größe des kolloiden Trägers läßt die Vorstellung begründet erscheinen, daß er, einerseits chemisch mit dem Hämin an dessen Seitenketten verbunden, gleichzeitig auch die Rolle der hämochromogenbildenden Base übernimmt; von dieser Anschauung ausgehend, die zunächst als praktische Arbeitshypothese gelten soll, läßt sich das Unvermögen des Cytochroms c zur Autoxydation und zur CO-Bindung, ferner seine Stabilität gegen Dissoziationseinflüsse anschaulich auf einen Mangel der gegenseitigen Beweglichkeit von Häminkomponente und hämochromogenbildender Base zurückführen. Tatsächlich ist es bis jetzt auch nicht gelungen aus dem Cytochrom-c-System eine hämochromogenbildende Base abzutrennen, was für den Fall, daß sie als selbständige Komponente vorhanden wäre, nach der Enteisenung des Cytochroms c zweifellos möglich sein müßte.

Die Teilchengröße, d. h. das Molekulargewicht im physikalischen Sinne, das sich aus der Diffusionsgeschwindigkeit ergibt, ist aber, soweit bis jetzt ersichtlich, ein Mehrfaches der kleinsten Einheit; die Verhältnisse liegen ganz ähnlich wie beim Hämoglobin, bei dem aus dem Hämingehalt eine kleinste Einheit von etwa 17000 zu errechnen ist, während das wirkliche Molekulargewicht den 4-fachen Wert ausmacht. Auch sonst ergeben sich Ähnlichkeiten mit dem Hämoglobin, insofern als die Diazoreaktion auch im Cytochrom c auf eine wesentliche Beteiligung des Histidins als Baustein schließen läßt, ferner liegt der isoelektrische Punkt des Cytochroms c bei p_H 8,3, also in der Nähe des für denaturiertes Globin ermittelten. Es braucht nicht besonders betont zu werden, daß sich eine Verwandtschaft zwischen Cytochrom c und Hämoglobin keineswegs auch auf die Verknüpfungsart zwischen Farbstoffanteil und kolloidem Träger erstrecken kann, denn in ersterem liegt ja eine feste chemische Valenzbindung an den Porphyrinseitenketten vor, die noch gegen starke Säuren resistent ist, während man sich die Bindung von Häm und Globin im Hämoglobin

als eine viel lockerere und am Eisenatom eingreifend vorstellen muß, die sich beispielsweise schon in schwach angesäuerter Ätheremulsion löst. Außerdem besitzt das Hämoglobin ein reversibles Bindungsvermögen für molekularen Sauerstoff unter Konstanthaltung der zweiwertigen Valenzstufe seines Eisens, es wirkt als Sauerstofftransporteur; das Cytochrom c dagegen ist als typisches Oxydations-Reduktions-System aufzufassen, in dem das Eisen zwischen der zwei- und dreiwertigen Stufe hin und her pendelt, es hat seine Funktion als Katalysator bei der intrazellulären Verbrennung.

Über den engeren Wirkungsbereich des Cytochroms in der Zelle geben Versuche von Keilin Anhaltspunkte, nach denen das Cytochrom in folgendes System einzugliedern ist:

Molekularer Sauerstoff → Warburgs Atmungsferment → Cytochrom → Dehydraseaktiviertes Substrat

Die Kette mag durch Einschaltung weiterer Systeme, wie z. B. der Ascorbinsäure (Vitamin c), die zwischen Atmungsferment und Cytochrom zu stehen käme, noch erweitert sein; jedenfalls aber stellt sich in Übereinstimmung mit den von Michaelis entwickelten Vorstellungen der Mechanismus als eine Hintereinanderschaltung von reversiblen Redoxsystemen dar, von denen jeweils dasjenige mit dem höheren Potential das mit dem niedrigeren zu oxydieren vermag. Im Modellversuch verwendete Keilin als „aktiviertes Substrat" Cystein, Cytochrom wurde in Form eines vorgereinigten aus Hefe gewonnenen Cytochrom-c-Präparates angewandt und als „Atmungsferment" diente ein Oxydasepräparat aus Schafherzmuskel. Nur wenn Cytochrom zugegen ist tritt eine katalytische Dehydrierung des Cysteins ein; verständlicherweise ist auch die Anwesenheit der Oxydase nötig, denn da Cytochrom c nicht autoxydabel ist, würde nach erfolgter Reduktion durch Cystein der Prozeß der Sauerstoffaufnahme zum Stillstand kommen, wenn nicht das dreiwertige Eisen der Oxydase die Rückoxydation des Cytochroms übernehmen würde. Das dabei in den zweiwertigen Zustand übergehende Oxydaseeisen ist selbst autoxydierbar, es ist ferner durch Kohlenoxyd in derselben Weise blockierbar wie es für die Atmung an der intakten Zelle von Warburg eingehend studiert wurde. So ist die katalytische Cysteindehy-

drierung durch Kohlenoxyd hemmbar, obwohl Cytochrom c selbst sich nicht mit CO verbindet.

Wie läßt sich nun der Sinn und die Notwendigkeit der Hintereinanderschaltung mehrerer Redox-Systeme im Oxydationsmechanismus der Zelle deuten? Es ist auffallend, daß das Atmungsferment mit einem stärker positiven Oxydationspotential als es das Cytochrom besitzt die Cysteindehydrierung nicht allein katalysieren kann. Auch an anderen, durch reversible Farbstoffsysteme katalysierten Dehydrierungsreaktionen wurde von Barron und von Michaelis beobachtet, daß Farbstoffsysteme mit verhältnismäßig hohem Oxydationspotential nicht geeignet zur Sauerstoffübertragung sind. Nach Michaelis ist die Erklärung darin zu suchen, daß in den Fällen, wo das Oxydationspotential des Katalysators sehr weit über dem des Substrates liegt, praktisch der gesamte Katalysator in der reduzierten Stufe vorliegt, sodaß also von der allein wirksamen oxydierten Phase zu wenig vorhanden ist, als daß auf grund der Massenwirkungsgesetzes beträchtliche Umsätze zustande kommen könnten, während, wenn der Potentialunterschied nicht zu groß ist, eine günstigere Verteilung von oxydierter und reduzierter Phase vorliegt und dauernd genügend von der wirksamen oxydierten Katalysatorstufe verfügbar ist. Die günstigste Wirkung würde also demnach erreicht, wenn die miteinander in Reaktion tretenden Redox-Systeme sich mit ihren Potentialbereichen in geeigneter Weise überlagern, was für die Überwindung großer Potentialunterschiede, wie sie zwischen Sauerstoff und Zellsubstrat bestehen, die Einschaltung von Zwischenstufen nötig macht. Dabei werden die drei Komponenten des Cytochroms wieder für sich verschiedene Potentialstufen ausbilden. Schließlich mag auch die Unterteilung des Oxydationsgefälles für die Zelle insofern von Bedeutung sein, als sie die für ihren Stoffwechsel benötigte Energie aus den Oxydationsreaktionen in gekoppelten Reaktionen nutzbar machen muß, die geeignete Potentialabgriffe zur Voraussetzung haben können.

Wenn man so die Notwendigkeit der Zwischenschaltung des Cytochroms im Atmungsprozeß verstehen kann, so wird sein Unvermögen zur Autoxydation dann verständlich, wenn man dem vorgeschalteten Atmungsferment die Funktion einer Steuerung des Oxydationsablaufs zuschreibt. Die Existenz eines

oder mehrerer solcher Steuerungsorgane ist zweifellos für das Verständnis der Pasteur-Meyerhofschen sowie der Crabtree-schen Reaktion vorauszusetzen. Wäre das Cytochrom autoxydabel, so würde es unter Umgehung des Regulators direkt mit dem Luftsauerstoff in Reaktion treten, so aber wirkt es nur nach Maßgabe der Wirksamkeit des ihm übergeordneten Oxydations-systems.

Alle diese Fragen werden zu ihrer endgültigen Klärung noch umfangreicher Experimentalarbeit am Organismus und in Modellreaktionen bedürfen; das Studium der dabei beteiligten Katalysatoren in Substanz und die Aufklärung ihres Baues, für die gerade beim Cytochrom c die Verhältnisse infolge seiner Stabilität relativ günstig liegen, werden dazu aber immer die letzte sichere Grundlage bilden müssen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Sozietät zu Erlangen

Jahr/Year: 1933-1934

Band/Volume: 65-66

Autor(en)/Author(s): Zeile Karl

Artikel/Article: Uber den Atmungskatalysator Cytochrom. 179-188