

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 367–377

COLLOQUIUM DES ZENTRUMS FÜR BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT GIESSEN

21.–22. November 1974

Organisatoren: *K. Krisch* †, Kiel¹⁾
L. Lumper, Gießen

Das Colloquium wurde von seinen Schülern und dem Zentrum für Biochemie zu *Ehren von Herrn Prof. Dr. Hj. Staudinger aus Anlaß seines 60. Geburtstages* veranstaltet.²⁾ Die wissenschaftlichen Beiträge zum Colloquium geben einen Überblick über den Stand der Arbeitsgebiete, auf denen Herr Prof. Dr. Hj. Staudinger als Forscher tätig war.

Hansjürgen Staudinger zum 60. Geburtstag

Am 18. November 1974 feierte Prof. Dr. rer. nat. *Hansjürgen Staudinger* in Gießen seinen 60. Geburtstag. Aus diesem Anlaß hatte das Biochemische Zentrum der Justus-Liebig-Universität zu einem wissenschaftlichen Colloquium eingeladen, zu dem sich zahlreiche Freunde, Kollegen und ehemalige Mitarbeiter in Gießen eingefunden hatten.

Hansjürgen Staudinger wurde in Zürich geboren und wuchs in Freiburg als Sohn des o. Professors für Chemie und späteren Nobelpreisträgers *Hermann Staudinger* auf. Man kann feststellen – und es beginnt sich ja heute allmählich wieder herumzusprechen, daß Begabung und Intelligenz entscheidend genetisch determiniert sind – daß er vom Vater ein reiches Erbe mitbekommen und gut verwaltet hat. Er ist jedoch schon bald aus dem Schatten des großen Vaters herausgetreten und seinen eigenen wissenschaftlichen Weg gegangen. Neben dem Hauptstudienfach Chemie galt sein Interesse schon früh auch biologischen und medizinischen Fragen, für die er in einem vorklinischen Medizinstudium ein solides Fundament legte.

Er drängte früh nach Selbständigkeit und übernahm nach der Habilitation in Freiburg 1946 schon 1948 die Leitung des traditionsreichen Zentrallaboratoriums der Städtischen Krankenanstalten Mannheim. Die über 10 Mannheimer Jahre können zu den fruchtbarsten seines Lebens gerechnet werden. Durch ihn wurde das Mannheimer Zentrallaboratorium weit über Deutschland hinaus wieder zu einem der ersten Plätze der „Klinischen Chemie“. Er hat in dieser Zeit zum Ansehen und zur Selbständigkeit dieses Faches in Deutschland entscheidend beigetragen. Zahlreiche Wissenschaftler wurden durch seine Persönlichkeit angezogen und geprägt. Viele haben als Gäste in Mannheim gearbeitet, Anregungen empfangen und Methoden, wie beispielsweise Steroidbestimmungen im Harn, gelernt. Wie er neben der Organisation eines gut funktionierenden Laborbetriebes für ein 1200-Betten-Krankenhaus es noch fertig gebracht hat, intensive biochemische Grundlagenforschung zu treiben, sollte den klinischen Chemikern immer als Vorbild dienen. Daneben hielt er in Heidelberg, wohin er sich 1948 umhabilitierte, noch Vorlesungen.

1959 wurde *Hansjürgen Staudinger* auf den Lehrstuhl für Physiologische Chemie in Gießen berufen. Dieser Universität ist er – nach Ablehnung von Rufen nach Bochum und Köln – bis heute treu geblieben. Seine wissenschaftlichen Interessen und Arbeiten können hier nur in wenigen Stichworten angedeutet werden: Analytik, Biosynthese und Stoffwechsel der Steroidhormone, Wirkungsmechanismus der Ascorbinsäure, Mechanismus von Hydroxylierungsreaktionen, Biochemie des endoplasmatischen Retikulums, mikrosomaler Elektronentransport, oxidativer Arzneimittelstoffwechsel, Silikoseprobleme, – das sind einige der Themen, die ihn am meisten beschäftigt haben. – Darüber hinaus hat er sich auch mit Engagement öffentlichen und wissenschaftspolitischen Fragen gewidmet. An der Gründung der „Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie“ hat er entscheidenden Anteil. Über sechs Jahre lang

¹⁾ Prof. Dr. Klaus Krisch verstarb am 7. 2. 1975

²⁾ Die Veranstalter danken der Merck'schen Stiftung für Kunst- und Wissenschaft (Darmstadt) für die finanzielle Unterstützung.

war er Vizepräsident der Deutschen Forschungsgemeinschaft und zweimal Dekan, zunächst der Medizinischen Fakultät und zuletzt, in schwierigen Zeiten, des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität.

Hansjürgen Staudinger wird aus gesundheitlichen Gründen vom aktiven Hochschulleben vorzeitig Abschied nehmen. Vielleicht haben die Verhältnisse an den Hessischen Universitäten diesen Entschluß erleichtert. Wer ihn kennt, weiß, daß dies nicht den Abschluß einer glanzvollen wissenschaftlichen Laufbahn bedeuten wird, sondern gleichzeitig einen Neubeginn. Das Besondere an *Hansjürgen Staudinger* ist, daß er nicht nur ein Mann seiner Fachwissenschaft war, sondern stets auch ein ungemein lebendiges Interesse an vielen Zweigen der Wissenschaft hatte, die außerhalb seines eigenen Arbeitsgebietes lagen. Dabei war und ist ihm die Problematik des Menschen im Verhältnis zu Erkenntnissen der Wissenschaften und deren Folgen von wesentlicher Bedeutung.

Wir, seine Freunde, Schüler und Kollegen verbinden mit unserem Dank und unserer Gratulation die Hoffnung, daß nun für ihn eine Zeit beginnt, wo der „Homo ludens“ zu seinem Recht kommen wird und wünschen ihm für diesen Aufbruch zu neuen Ufern alle Gute.

K. Krisch †, Kiel

J. Seelig

Abteilung für Biophysikalische Chemie, Biozentrum
der Universität Basel

Struktur und Dynamik von Lipidmembranen

In vielen biologischen Membranen spielen Lipiddoppelschichten eine wichtige Rolle. Die Frage nach Konformation und Dynamik der Lipidmoleküle mußte lange Zeit unbeantwortet bleiben, da geeignete Meßmethoden fehlten. Durch Anwendung magnetischer Resonanzverfahren auf Membranprobleme konnten nun in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt werden. Eine der erfolgversprechendsten Methoden ist dabei die deuteriummagnetische Resonanz. Durch geeignete chemische Synthese werden die Lipidmoleküle zunächst spezifisch deuteriert. Aus den selektiv deuterierten Lipiden erhält man durch Mischung mit Wasser flüssig-kristalline Phasen, in denen die Lipide in Doppelschichten angeordnet sind. Mißt man das deuteriummagnetische Resonanzspektrum einer solchen Phase, so beobachtet man aufgrund des Deuteriumquadrupolmoments und der Anisotropie der Molekülbewegungen ein Dublett. Der Abstand der beiden Linien ist direkt proportional zur Anisotropie der Bewegung und somit auch ein Maß für die Ordnung in den Lipiddoppelschichten (1). Wir haben diese Methode auf zwei verschiedene Typen von Doppelschichten angewendet, nämlich

1. ein einfaches flüssig-kristallines System bestehend aus Natriumdekanoat, Dekanol und Wasser (2, 3), und
2. Mischungen aus Dipalmitoyl-3-*sn*-phosphatidylcholin und Wasser (4, 5).

Die Ergebnisse der deuteriummagnetischen Resonanzmessungen können wie folgt beschrieben werden:

1. Beide Systeme zeigen einen konstanten Ordnungsparameter für den größten Teil der Kohlenwasserstoff-

- kette. Nur im Zentralteil der Doppelschicht beobachtet man eine Abnahme des Ordnungsgrades. Die beiden Fettsäureketten des Dipalmitoyl-3-*sn*-phosphatidylcholins sind physikalisch nicht äquivalent.
2. Die beobachtete Kettenflexibilität läßt sich durch trans-gauche Rotationen um die C-C Bindungen der Kohlenwasserstoffkette erklären. In der Lipidregion mit konstantem Ordnungsparameter können gauche-Konformationen nur paarweise auftreten, so daß die Kohlenwasserstoffketten im wesentlichen parallel zueinander bleiben (Kink, Jog). Die quantitative Analyse der Deuterium-Ergebnisse steht im Einklang mit Röntgenstrukturmessungen und kalorimetrischen Untersuchungen.
3. Die Deuteriummethode wurde auch zur Untersuchung der Cholingruppe des Dipalmitoyl-3-*sn*-phosphatidylcholins verwendet (in Vorbereitung). Bei 41 °C beobachtet man für die N-CD₃-, die α-CD₂- und die β-CD₂-Gruppe eine drastische Änderung der Quadrupolaufspaltung. Oberhalb dieser Umwandlungstemperatur zeigt die α-CD₂-Gruppe praktisch keine Temperaturabhängigkeit, während die Quadrupolaufspaltungen der β-CD₂- und N-CD₃-Gruppe mit zunehmender Temperatur kleiner werden. Dieser Effekt kann nur durch eine Rotation um die C_α-C_β-Bindung gedeutet werden.

Literatur

1. Seelig, J. & Niederberger, W. (1974), *J. Amer. Chem. Soc.* 96, 2069.
2. Seelig, J. & Niederberger, W. (1974), *Biochemistry* 13, 1585.
3. Niederberger, W. & Seelig, J. (1974), *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 78, 947.
4. Seelig, J. & Seelig, A. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 57, 406.
5. Seelig, A. & Seelig, J. (1974), *Biochemistry* 13, 4839.

Prof. Dr. J. Seelig
Biozentrum der Universität
Klingelbergstr. 70
CH-4056 Basel

J. P. Segrest,

Departments of Pathology and Biochemistry,
University of Alabama in Birmingham

Lipid-Protein Interactions in Biological Membranes

The membranous structures of a living cell provide the special and temporal framework upon which higher orders of life are based. Unfortunately biological membranes are poorly understood at present because of their dominant property of insolubility.

Because of the ubiquitous role played by membranes in maintaining the complex integrity of living organisms, the processes of disease must often act upon or through the membranes of an organism's individual cells. An important example of this premise is the P-450 detoxification system which is bound to and spacially organized on, the endoplasmic reticulum membranes of the hepatic parenchymal cell. It seems reasonably certain that understanding and control of defects of liver detoxification (e.g. production of carcinogenic metabolites, hepatotoxicity, etc.) will hinge to a disproportionately large degree upon an elucidation of basic principles of membrane structure.

The membrane is a unique physical system, i.e. a thin sheet of aqueous discontinuity whose properties are dominated by the hydrophobic effect. Knowledge of fundamental principles of lipid-protein interactions in membranes, as they relate to the geometrical and physical restrictions unique to membranes, will permit new insights leading to new experimental approaches to the functional anatomy of biological membranes.

There are two distinct types of interactions – electrostatic and hydrophobic – between the proteins and lipids of membranes. Two specific molecular model systems have been proposed which illustrate these basic types of interactions. These systems are one, a 35 residue peptide derived from the membrane-penetrating segment of a surface glycoprotein that displays hydrophobic interactions with phospholipids and two, an "amphipathic helix" proposed for the lipid binding sites of plasma lipoproteins that displays an interfacial (electrostatic plus hydrophobic) type of interaction with phospholipids.

These two *in vitro* membrane systems, to the best of the authors' knowledge, are the first ones of biological origin to be proposed that deal with lipid-protein interactions at the level of topomolecular anatomy.

The properties of the *hydrophobic polypeptide model* are:

a) it forms a bilayer-penetrating helix parallel to the hydrocarbon chains of a phospholipid bilayer;

b) at a critical concentration the peptide associates with itself within the hydrocarbon interior of the phospholipid bilayer, and
c) it reacts essentially irreversibly with phospholipid.

The properties of the *amphipathic polypeptide model* are:

a) it forms a helix perpendicular to the hydrocarbon chains of a phospholipid bilayer and sits at the interfacial surface of the bilayer;
b) it associates preferentially with phospholipid molecules at all concentrations up to saturation and not with itself; and
c) it reacts reversibly with phospholipid under appropriate conditions.

J. P. Segrest, M. D., Ph. D.
Dept. of Biochem. and Pathol. University
of Alabama
The Medical Center
Birmingham, Alabama 35294 U.S.A.

H.-U. Schulze

Zentrum für Biochemie der Universität Gießen

Einfluß von Phospholipoiden und Membranstruktur auf die enzymatische Aktivität der NADH: Semidehydroascorbat-Oxidoreduktase

Die NADH:Semidehydroascorbat-Oxidoreduktase (EC 1.6.5.4) wird inaktiv, wenn die mikrosomalen Phospholipide entweder mit Phospholipase C hydrolysiert oder mit organischen Lösungsmitteln aus den Membranen extrahiert werden. Diese Inaktivierungen des strukturegebundenen Enzyms sind mit der Lipidabnahme korreliert und vollständig reversibel. Die partiell inaktivierte NADH:Semidehydroascorbat-Oxidoreduktase in extrahierten Mikrosomen kann mit Asolectin, nicht aber mit isoliertem und gereinigtem Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin + Phosphatidylinosit und Lysophosphatidylcholin selbst, reaktiviert werden. Die reinen Diacylglycerinphosphatide sind jedoch dann wirksam, wenn die Lipidmicellen Lysophosphatidylcholin enthalten. Außerdem haben mehrere nichtionische Detergenzien (Triton-Gruppe) einen starken reaktivierenden Effekt.

Mikrosomen werden durch das nichtionische Detergenz Triton X114 solubilisiert. Dabei entstehen zunächst größere, enzymatisch noch voll aktive Lipoproteidkomplexe. Bei höheren Tensidkonzentrationen wird mit zunehmender Trennung von Phospholipoiden und Proteinen auch die NADH:Semidehydroascorbat-Oxidoreduktase zunehmend inaktiv. Rekonstitution micellarer Strukturen, die nach Entfernung des Tensids

aus den Solubilisaten durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln oder durch Zusatz von enzymatisch inaktiven Membranstrukturen zu den Solubilisaten gelingt, führt zur Reaktivierung der NADH:Semidehydroascorbat-Oxidoreduktase.

Prof. Dr. Hans-Ulrich Schulze
D-6300 Gießen,
Friedrichstr. 24

L. Lumper und H. Ehrig³⁾

Zentrum für Biochemie der Universität Gießen

Untersuchungen über die Struktur von Proteinen der mikrosomalen Elektronentransportkette

Aus den CD-Spektren werden andere Daten für die Sekundärstruktur des tryptischen Cytochrom b_5 ermittelt als aus der Röntgenstrukturanalyse. Mögliche Ursachen für die Divergenz sind der Einfluß des Hämchromophoren und der aromatischen Aminosäurereste. Die Verfälschung des CD-Spektrums im Bereich der Peptidabsorption durch den Hämchromophoren scheint ohne Bedeutung zu sein, da die Überführung von Fe^{3+} -Cytochrom b_5 in Fe^{2+} -Cytochrom b_5 ohne Einfluß auf das CD-Spektrum des tryptischen Cytochrom b_5 zwischen 200 und 250 nm ist. Die Reduktion des Häm-Eisens ist auch nach den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse nicht von einer Änderung der Kettenkonformation im Cytochrom b_5 begleitet (1). CD-spektroskopisch werden zwei Konformationen des Apocytochroms b_5 beobachtet: unterhalb von $pH = 3,5$ als „denaturiertes“ Protein, innerhalb der Existenzzone von Cytochrom b_5 als „häm-bindendes“ Apocytochrom. Die unterschiedliche Kinetik des $^3H/H$ -Austausches bei $pH = 7,5$ ist jedoch ein deutliches Indiz dafür, daß die Sekundärstruktur im „häm-bindenden“ Apocytochrom und im (tryptischen) Cytochrom b_5 verschieden ist. Damit wird die Interpretation der CD-Spektren bestätigt (2), nach welcher die Bindung von Hämin eine Änderung der Kettenkonformation des Apocytochroms zur Folge hat. Zur Untersuchung des Einflusses der optischen Aktivität von aromatischen Aminosäureresten auf das CD-Spektrum von Fe^{3+} Cytochrom b_5 unterhalb 250 nm wurde der einzige Tryptophan-Rest spezifisch modifiziert. Dies gelingt durch Oxidation mit N-Bromsuccinimid, jedoch erst nach Auffaltung von Cytochrom b_5 bzw. Apoprotein bei $pH = 2,0$.

N-Bromsuccinimid-oxidiertes Apocytochrom bindet Hämin stöchiometrisch. Das Absorptionsspektrum ist

³⁾ Ergebnisse sind Teile der Dissertation von H. Ehrig.

identisch mit demjenigen von (nativem) Cytochrom b_5 . Das CD-Spektrum ist jedoch im UV-Bereich verändert. Formylierung mit Ameisensäure/HCl scheint nicht nur den Tryptophan-Rest anzugreifen, da die Entformylierung bei $pH = 9,0$ nur teilweise gelingt. Das CD-Spektrum des Membranproteins Detergens-Cytochrom b_5 besitzt „helicalen“ Charakter. Detergentien (10 mmol/l Na-Desoxycholat, 1 mmol/l Lysolecithin) und Phosphatidylcholin (200facher molarer Überschuß) veränderten den Circular dichroismus oberhalb 200 nm nicht. Das (detergensfreie) Membransegment des Detergens-Cytochrom b_5 erleidet in Gegenwart der gleichen Konzentrationen dieser amphiphilen Substanzen eine tiefgreifende Konformationsumwandlung von einer „remander-structure“ zu einer vorwiegend helicalen Struktur. Die Tryptophanreste im hydrophoben Segment lassen sich schon bei $pH = 6,5-7,5$ modifizieren. Beim isolierten Protein wurde die Reaktion durch Titration mit N-Bromsuccinimid spektroskopisch verfolgt. In endoplasmatische Membranen inseriertes Cytochrom b_5 wurde mit *Koshland*-Reagenz umgesetzt und isoliert. Der Grad der Modifizierung nach Isolierung des Proteins beträgt 1,5 Tryptophan-Reste/Mol Cytochrom b_5 . Das hydrophobe Segment im Membranprotein Cytochrom b_5 scheint nach diesen Ergebnissen

1. durch die Core „tryptisches Cytochrom b_5 “ in der helicalen Konformation fixiert zu werden und
2. nicht vollständig in die Lipid-Phase der Membranen einzutauchen.

Literatur

1. Mathews, F. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 74.
2. Schnellbacher, E. & Lumper, L. (1971), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 615-628.

Prof. Dr. L. Lumper
Zentrum für Biochemie
Friedrichstr. 24
D-6300 Gießen

W. Weis

Zentrum für Biochemie der Universität Gießen

Über Ascorbat: Ferricytochrom- b_5 -Oxidoreduktase (EC 1.10.2.1)

Die reversible Redoxreaktion Ferricytochrom $b_5 + L (+)$ -Ascorbat \rightleftharpoons Ferrocycytochrom $b_5 +$ Monodehydro-L(+)-ascorbat + H^+ wird in der Mikrosomenfraktion der Säugetierleber durch die Ascorbat:Ferricytochrom b_5 -Oxidoreduktase katalysiert. Sowohl das membran-

gebundene Enzym in Mikrosomen als auch das in mit nichtionischen Detergentien behandelten Mikrosomen vorliegende Enzym wurden durch ihre kinetischen Daten (scheinbare K_m und V_{max}) charakterisiert. Durch Ionenaustauschchromatographie kann das Enzym in einem submikrosomalen Partikel, frei von Cytochrom b_5 , erhalten werden. Dieses vom endogenen Substrat befreite Enzym wurde ebenfalls kinetisch charakterisiert. Es gelingt, das Enzym durch verschiedene Verfahren bis zu 60-fach gegenüber Mikrosomen anzureichern. Das Enzym ist wahrscheinlich an der von $L(+)$ -Ascorbat abhängigen Fettsäuredesaturierung und ähnlichen Prozessen beteiligt.

Prof. Dr. W. Weis
Zentrum für Biochemie
Friedrichstr. 24
D-6300 Gießen

K. Krisch

Institut für Physiologische Chemie und Physikochemie
der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Mikrosomale Hydrolasen und Arzneimittelstoffwechsel

Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) in Lebermikrosomen katalysieren die Hydrolyse einer großen Zahl körperfremder Verbindungen, u. a. auch einer Reihe von Pharmaka mit Ester- und Amidbindungen. Es wird über die Isolierung einer solchen Esterase aus menschlicher Leber berichtet. Das Enzym konnte bei einer Ausbeute von 20% 180-fach angereichert werden und verhielt sich diskelektrophoretisch einheitlich. Auf Grund von Bestimmungen des Molekular-, Untereinheiten- und Äquivalentgewichtes ergab sich, daß es sich um ein Trimer mit je einem aktiven Zentrum pro Untereinheit handelt. Die Abhängigkeit von V_{max} und K_m von der Kettenlänge des Acylrestes wurde studiert. Das Enzym spaltete kurzkettige Triglyceride und Monooleat, nicht jedoch Di- und Triolein. Ferner wurden das Kurzzeit-Narkotikum Propanidid, *p*-Nitrophenylacetat, Östronacetat, Acetanilid, Monoäthylglycin-2,6-xylylid und Butanilicain, nicht jedoch Procain, Succinylbischolin, Atropin, Pethidin und Chloramphenicol hydrolysiert. Einige Struktur-Wirkungsbeziehungen werden diskutiert.

Ferner wird über Versuche zur Isolierung und Charakterisierung der genetisch determinierten Atropinesterase aus Kaninchenlebermikrosomen berichtet. Die Aktivitäten von Lebermikrosomen „positiver“ und „negativer“ Kaninchen wurden miteinander verglichen. Dabei wurden keine Unterschiede in der unspezifischen Carboxylesterase-Aktivität gefunden, während die Butyrylcholin-Esterase bei den „negativen“ Tieren 10mal niedri-

ger war. Durch Gelfiltration konnte der größte Teil der unspezifischen Esteraseaktivität (Substrat Buttersäuremethylester) von der Atropin- und Butyrylcholinesteraseaktivität abgetrennt werden. Diese verhielten sich im Verlauf der Isolierung parallel. Durch isoelektrische Fokussierung konnten mindestens zwei Atropinesterase-Formen getrennt werden. Der Hauptgipfel (Ef VII) fehlte bei analogen Präparationen aus den Lebern „negativer“ Kaninchen vollständig. Seine Substratspezifität wurde geprüft. Das Enzym ist, wie seinerzeit schon von *Werner* mit Serum und Leberhomogenaten gezeigt wurde, stereospezifisch. Es spaltet, neben Buttersäuremethylester, *p*-Nitrophenylacetat und Butanilicain, *L*-Hyoscyamin, *L*-Scopolamin, *D*, *L*-Homatropin, nicht jedoch *D*-Hyoscyamin, *D*-Scopolamin, Pseudoatropin und quartäre Ammoniumderivate. Die Atropinesterase sollte nicht den unspezifischen Carboxylesterasen zugeordnet werden, sondern wieder mit einer eigenen Ordnungsnummer in der Liste der Enzymkommission geführt werden.

Literatur

Moog, P. & Krisch, K. (1974), Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 355, 529.

Prof. Dr. K. Krisch †
Institut für Physiologische Chemie
und Physikochemie
D-2300 Kiel

W. Kersten und A. Ogilvie

Physiologisch-Chemisches Institut, Erlangen

Auslösung von Regulationsprozessen durch Chinon-Antibiotika

Etliche Antibiotika, wie Mithomycine, Anthracycline, Nalidixinsäure, Granaticin u. a., als auch synthetische Carcinostatika enthalten Chinon-Ringsysteme. Ausgehend von der Beobachtung, daß auch Mithomycin-Derivate, denen der alkylierende Aziridin-Ring fehlt, noch bakteriostatisch wirken, untersuchten wir die Grundlage der bakteriostatischen Wirkung von Mithomycin-Derivaten, des synthetischen 5,8-Dioxo-6-amino-7-chlorochinolins (Bayer), einiger verwandter Verbindungen wie auch des von *H. Zähler* isolierten Granaticins. Die aufgeführten Verbindungen haben so ähnliche Wirkung, daß hier exemplarisch nur von den Resultaten der Wirkung des Granaticins berichtet wird.

Granaticin (0,5 mg/l) hemmt in *B. subtilis* die Synthese aller Makromoleküle, insbesondere aber von RNA. Alle Versuche, diese bevorzugte Hemmung der RNA-Synthese durch Granaticin darauf zurückzuführen, daß Granaticin die RNA-Polymerase oder einen ihrer Faktoren beeinflusst oder daß Granaticin direkt oder indirekt mit der

DNA in vitro oder in vivo reagiert, zeigten, daß Granaticin nicht direkt in die Mechanismen der RNA-Synthese eingreift.

Es zeigte sich dann, daß die Hemmwirkung des Granaticins aufgehoben werden kann durch Zugabe von Leucin zum Nährmedium. Daraus mußte gefolgert werden, daß Granaticin in den Zellen das Phänomen eines Leucin-Mangels erzeugt. Der Gehalt an Leucin in den behandelten Zellen war jedoch nicht erniedrigt. Dagegen war die Beladung der Leucin-tRNA spezifisch und sehr stark vermindert. Im Rohextrakt hemmt Granaticin die Leucyl-tRNA-Synthetase.

Die Hemmung der RNA-Synthese ist ein Regulationsphänomen als Folge der Hemmung der Proteinsynthese. Die Hemmung der RNA-Synthese tritt nur auf in Keimen mit strenger Kontrolle (rel^+), nicht aber in solchen Keimen mit aufgehobener Kontrolle zwischen Protein- und RNA-Synthese (rel^-). In rel^+ Keimen ist die Hemmwirkung des Chinons verbunden mit einem starken Abstieg des Nucleosidtetraphosphates ppGpp, nicht dagegen in rel^- Keimen. Der Effekt des Granaticins auf die RNA-Synthese kann aufgehoben werden durch gleichzeitige Zugabe von Chloramphenicol zum Nährmedium. Bei den meisten Hemmstoffen der Proteinbiosynthese, insbesondere bei solchen, die am Ribosom angreifen, kommt es zur Entkopplung und verstärkten Synthese von RNA. Der genau umgekehrte Effekt wird beobachtet nach Einwirkung von Granaticin. Hier führt die Hemmung der Proteinsynthese zur Hemmung der RNA-Synthese durch eine Auslösung der strengen Kontrolle.

Ein Einfluß des Granaticins auf die oxidative Phosphorylierung kann ausgeschlossen werden, da sofort nach Zugabe von Granaticin zu den Keimen es zum Anstieg des ATP-Spiegels kommt. Da mehrere andere Chinon-haltige Substanzen das gleiche Phänomen auslösen, führen wir die Wirkung des Granaticins im wesentlichen auf sein Chinon-Ringsystem zurück. Granaticin ist somit – nach Borrelidin – das zweite Antibiotikum, das die Proteinsynthese hemmt durch Angriff an einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase.

Prof. Dr. W. Kersten
Physiol.-Chem. Institut
Wasserturmstr. 5
D-8520 Erlangen

G. Gundlach

Biochemisches Zentrum der Justus Liebig Universität,
Gießen

Zur Regulation der Proteasenexkretion

Für die Spaltung von Kohlenhydraten, Nucleinsäuren und Lipiden in ihre oligomeren Bestandteile stellt der Säugetierorganismus im Rahmen des Nahrungsabbaus nur

wenige Enzyme zur Verfügung. Die Hydrolyse der Proteine dagegen erfordert eine große Zahl von Proteasen unterschiedlicher Spezifität. Über die Selektivität der Proteasenexkretion nach Fütterung mit Proteinen verschiedener Aminosäurezusammensetzung herrscht seit Pavlow und Babkin bis in die jüngste Zeit Verwirrung. Während Pavlow an eine Sekretion entsprechend der Zusammensetzung der Mahlzeit glaubte, vertrat sein Schüler Babkin die Auffassung, daß die Enzymsekretion ein Zufallsprozeß ist, abhängig von der Synthese in der Bauchspeicheldrüse ohne Selektivität reagierend auf unspezifischen Reiz.

Langfristige Adaptation der Enzymsekretion in Bezug auf Kohlenhydrate, Eiweiße und Lipide ist bekannt. Während für die Adaptation der meisten Enzyme erhebliche Zeiten benötigt werden, reagiert der Säugerorganismus auf „high-protein“ or „low-protein“ Diät relativ rasch. Unsere Versuche zeigen, daß innerhalb von einer Stunde deutlich meßbare Verschiebungen der Sekretionsleistung des Pankreas erfolgen. Gaben von Gelatine oder Protaminsulfat führen zu höheren Enzymkonzentrationen im entsprechenden Darmabschnitt als physiologische NaCl-Lösung. Auch das Verhältnis Chymotrypsin- zu Trypsinexkretion wird geändert. Das setzt die Auslösung eines spezifischen Reizes voraus. Folgende Möglichkeiten ergeben sich:

1. Der Speiserest setzt ein Hormon frei
2. freies Enzym setzt Hormon frei
3. freies Enzym wird absorbiert und reguliert direkt die Exkretion.

Als Trigger werden außer Sekretin, Pankreozymin das kürzlich angereicherte Polypeptid Chymodinin und das Aktivierungspeptid des Trypsins diskutiert.

Prof. Dr. G. Gundlach
Zentrum für Biochemie
Friedrichstr. 24
D-6300 Gießen

Eva Degkwitz

Zentrum für Biochemie Gießen

Vitamin C und Cytochrome

Bei Mangel an Vitamin C nehmen die Gehalte der mikrosomalen Cytochrome P-450 und b_5 in der Leber, den Nieren, den Nebennieren und in der Milz von Meerschweinchen ab. Es werden auch die mitochondrialen Cytochrome a und b in der Leber vermindert. Da die Halbwertszeiten der verschiedenen Cytochrome unterschiedlich sind und außerdem die Halbwertszeiten des Vitamins C in den Organen variieren, treten die genannten Abnahmen bei dem Modell des zunehmenden Mangels durch ascorbinsäurefreie Fütterung und bei

dem Modell eines konstanten partiellen Mangels an Vitamin C zu verschiedenen Zeitpunkten ein. Weitere Vergleiche dieser beiden Modellsysteme und Untersuchungen zum Einfluß von Phenobarbital, von δ -Aminolävulinsäure und von 5-Oxo-D-gluconat zeigen, daß die Abnahmen der Cytochromgehalte nicht unbedingt mit bereits bekannten Symptomen des Ascorbinsäuremangels, wie Gewebsblutungen, Verschiebungen im Gehalt an Depoteisen in Leber, Milz und Muskulatur sowie der Abnahme des Serumeisens korreliert sind. Sie könnten daher auf verschiedenen Wirkungsmechanismen des Vitamins beruhen. Die Vergleiche zeigen weiter, daß die beiden Modellsysteme unterschiedlich durch sekundäre Folgeerscheinungen des Vitamin C-Mangels belastet sind.

Prof. Dr. Eva Degkwitz
Zentrum für Biochemie
Friedrichstr. 24
D-6300 Gießen

W. Estabrook, J. Werringloer, P. J. O'Brien and
J. A. Peterson

Department of Biochemistry. The University of Texas
Health Science Center at Dallas

The Effects of Adducts and the Nature of Activated Oxygen for Cytochrome P-450 Catalyzed Hydroxylation Reactions

The mechanism of oxygen activation for the hydroxylation of many organic chemicals has been of special interest to *Professor Hansjürgen Staudinger* and his colleagues for a number of years. They proposed a role for an "oxene" as "active oxygen", i.e. "The enzymic active oxygen must be an electrophilic and energy-rich species with six electrons" (1). Many hydroxylation reactions are catalyzed by the hemoprotein, cytochrome P-450, which functions in a cyclic manner (2) in concert with other electron transfer proteins, generally associated with the membranous fraction (microsomes) of many tissues. Recent studies (3) have demonstrated the redox transitions associated with the interaction of cytochrome P-450 and the substrate to be hydroxylated, as well as oxygen. These results suggest (4) the role of higher valence states for the heme iron prior to oxygen into the substrate molecule. A general scheme has been developed and the sequence of reaction steps proposed are as follows:

- a) The low spin form of the ferric hemoprotein combines reversibly with a substrate molecule to be hydroxylated resulting in a transition to the high spin form of ferric cytochrome P-450 complexed with the substrate molecule;

- b) The complex of substrate and ferric cytochrome P-450 undergoes a one electron reduction to form the ferrous hemoprotein-substrate complex;
- c) Molecular oxygen reacts with the ferrous hemoprotein-substrate complex resulting in a ternary complex of substrate, oxygen, and ferrous cytochrome P-450;
- d) This ternary complex undergoes a one electron reduction forming a proposed complex containing substrate, a peroxide anion and the perferryl form of cytochrome P-450;
- e) It is proposed that the substrate molecule may undergo hydrogen abstraction resulting in the formation of a carbanion together with protonation of the peroxide anion. Water is expelled from the complex leaving an oxene associated with the heme iron. Electron rearrangement results in the introduction of the oxene into the substrate molecule. The details of the mechanism of oxygen insertion into the substrate molecule and the nature of the electron rearrangement reactions are not known.
- f) The resulting hydroxylated substrate molecule (product) dissociates from the ferric hemoprotein regenerating the low spin form of ferric cytochrome P-450 described in (a) above;

The overall reaction of cytochrome P-450 as it functions in substrate hydroxylation represents, therefore, a combination of oxygen activation followed by substrate activation.

A number of studies have shown (5) that some substrates, such as secondary amines, which undergo oxidative demethylation reactions catalyzed by cytochrome P-450 reactions, form tight complexes with the ferrous form of cytochrome P-450. These adduct interactions are characterized by the formation of absorbance bands with maxima between 450 and 480 nm. *Ulrich et al.* (6) have suggested that these complexes represent the interaction of a carbanion, formed during substrate activation (*e* above), with cytochrome P-450. Present studies have shown that a unique species of cytochrome P-450 can participate in this type of interaction. Using chemical probes, such as metyrapone and the formation of product adduct complexes of cytochrome P-450, at least four types of cytochrome P-450 have been identified (7) in the microsomal fraction of rat liver. Pretreatment of animals with various inducing agents, e.g. phenobarbital, pregnenolone-16 α -carbonitrile and 3-methylcholanthrene, results in an alteration in the percent distribution of the four types of cytochrome P-450 in liver microsomes.

The mechanism of oxygen activation and substrate activation during cytochrome P-450 catalyzed reactions requires further elucidation. Further, the presence of various forms of cytochrome P-450 extends the complexity of interpretation of these results. The many contributions of *Professor Staudinger* and his collaborators

in providing the essential fundamentals for our understanding of the mechanism of hydroxylation reactions serves as a firm foundation for advancing our knowledge of this important and challenging area of biochemistry.

Supported in part by Research Grants from The National Institutes of Health (GM 16488 and GM 19036, Julian A. Peterson is a Research Career Development Awardee of the USPHS KO4-GM 30962).

References

1. Ullrich, V. & Staudinger, H. (1969), in *Microsomes and Drug Oxidations* (edited by J. R. Gillette, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R. W. Estabrook, J. R. Fouts and G. J. Mannering), Academic Press, New York, p. 199–217.
2. Estabrook, R. W., Hildebrandt, A., Remmer, H., Schenkman, J. B., Rosenthal, O. & Cooper, D. Y. (1968), in 19th Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie (edited by B. Hess and H. Staudinger). Springer-Verlag, Berlin, p. 142–177.
3. Peterson, J. A., Ishimura, Y., Baron, J. & Estabrook, R. W. (1973), in *Oxidases and Related Redox Systems* (edited by T. E. King, H. S. Mason, and M. Morrison), University Park Press, Baltimore, Maryland, p. 565–581.
4. Rahimtula, A. D., O'Brien, P. J., Hrycaj, E. G., Peterson, J. A. & Estabrook, R. W. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 695–702.
5. Werringloer, J. & Estabrook, R. W. (1973), *Life Sciences*, **13**, 1319–1330.
6. Ullrich, V. & Schnabel, K. H. (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 240–248.
7. Werringloer, J. & Estabrook, R. W. (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 270–286.

Prof. Dr. R. W. Estabrook
Department of Biochemistry
The University of Texas
Health Science Center at Dallas
75235-Dallas, Texas U.S.A.

A. G. Hildebrandt, M. Tjoe and I. Roots

Department of Clinical Pharmacology, Free University Berlin.

Stimulation of Microsomal Ethanol Oxidation by H₂O₂ Formation During the Uncoupling of Hepatic Microsomal Mixed Function Oxidation Reactions

The mechanism of hepatic microsomal ethanol oxidation has been explained by two proposals: The first states that microsomal ethanol oxidation occurs by a reaction which appears to be characteristic for microsomal mixed function oxidation reactions (1, 2). The second proposition is that NADPH dependent H₂O₂ formation and catalase activity in microsomes could account for all ethanol oxidation independently from mixed function oxidation reactions (3, 4).

Evidence for an alternative is obtained from the observation that N-demethylation of aminopyrine in microsomes from pregnenolone-16- α -carbonitrile treated rats

yields an increased rate and extent of H₂O₂ formation which by far exceeds the initial rate of H₂O₂ formation observed in the absence of aminopyrine (5).

An even higher increase of rate and extent of H₂O₂ formation was observed during the N-demethylation of *ethylmorphine* as compared to *aminopyrine* in microsomes from livers of male guinea pigs treated similarly. However, the rates of mixed function oxidation dependent N-demethylation of these substrates behaved oppositely (*ethylmorphine*: 4.8 nmoles HCHO mg⁻¹ min⁻¹; 5.5 nmoles H₂O₂ mg⁻¹ min⁻¹; *aminopyrine*: 9.0 nmoles HCHO mg⁻¹ min⁻¹; 3.9 nmoles H₂O₂ mg⁻¹ min⁻¹).

Since examination of rates of O₂ uptake and NADPH oxidation with these two substrates are unchanged it is assumed that H₂O₂ appears as a by product of hydroxylation reactions which can be explained as the result of an uncoupling of the hydroxylation reaction yielding H₂O₂ as the product of uncoupling. The increased rate of acetaldehyde formation from ethanol oxidation observed during certain mixed function oxidation reactions (6) parallels the increase in rate of H₂O₂ formation observed. This observation appears to be an alternative to the proposals made above (1, 2, 3, 4).

References

1. Orme-Johnson, W. H. & Ziegler, D. M. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 78–82.
2. Lieber, Ch. S. & de Carli, L. M. (1970), *J. Biol. Chem.* **245**, 2505–2512.
3. Thurman, R. G., Ley, H. G. & Schalz, R. (1972), *Eur. J. Biochem.* **25**, 420–430.
4. Feytmans, E. & Leighton, F. (1973), *Biochem. Pharmacol.* **22**, 249–360.
5. Hildebrandt, A. G., Speck, M. & Roots, I. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 968–975.
6. Hildebrandt, A. G., Speck, M. & Roots, I. (1974), *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **281**, 371–382.

Prof. Dr. A. G. Hildebrandt
Department of Clinical Pharmacology
Free University Berlin
Klinikum Steglitz
D-1000 Berlin 45,
Hindenburgdamm 30, Germany.

V. Graef und S. W. Golf

Zentrum für Biochemie Gießen

Metabolismus des Testosterons in Lebermikrosomen

Die 5 α -Reduktion des Testosterons mit NADPH in Mikrosomen der weiblichen Rattenleber wird nicht durch ein Enzym sondern durch ein *Enzymsystem* katalysiert. Die Elektronen werden von NADPH auf das FAD der NADPH:Coenzym Q₁₀-Oxidoreduktase (einer Fraktion

der NADPH:Cytochrom c-Reduktase), von diesem auf Coenzym Q₁₀ und dann schließlich mit Beteiligung einer Testosteron-5 α -Reduktase auf Testosteron übertragen. Testosteron läßt sich in Gegenwart von Lebermikrosomen auch durch reduziertes Coenzym Q₁₀ anstelle von NADPH zu 5 α -Dihydrotestosteron reduzieren. Diese Reaktion ist reversibel. Das Enzymsystem zur Δ^4 -3-Oxosteroid-5 α -Reduktion des Testosterons wurde durch das nichtionische Detergenz Lubrol WX in Phosphatpuffer, pH 7,0, mit Glycerin, Natriumcitrat und KCl solubilisiert und durch DEAE-Cellulose-Chromatographie und anschließende Fällung mit Ammoniumsulfat etwa 17fach angereichert. Durch Affinitätschromatographie der solubilisierten Mikrosomen an Testosteron-hemisuccinat-Sepharose wurde NADPH:Coenzym Q₁₀-Oxidoreduktase/Coenzym Q₁₀ von der Testosteron-5 α -Reduktase getrennt. Jede dieser beiden Fraktionen war nicht in der Lage, Testosteron mit NADPH zu reduzieren; vereinigte man sie aber, wurden in Gegenwart von NADPH aus Testosteron 5 α -Dihydrotestosteron und 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol gebildet.

Literatur

- Graef, V. & Golf, S. W. (1975), diese Z. 13, 333–339.
 Priv.-Doz. Dr. V. Graef
 Zentrum für Biochemie
 Friedrichstr. 24
 D-6300 Gießen

P. Moldéus, R. Grundin, H. Vadi and S. Orrenius

Department of Forensic Medicine, Karolinska Institutet,
 Stockholm, Sweden

Isolated Liver Cells: A Valuable Tool for the Study of Drug Metabolism

Although considerable knowledge has been gathered on the functional aspects of microsomal monooxygenation, comparatively little has so far been known about the intracellular regulation of this process. For such studies, we have found the isolated rat liver cell system to be a very useful model, combining the convenience of an *in vitro* system with the access to the complex mechanisms of the intact *in vivo* system.

Isolated rat liver cells were prepared as described previously (1), by perfusion of the isolated liver with a collagenase containing medium. A high degree of cell viability and intactness of the cell membrane were established by the criteria given by Moldéus et al. (2). Cytochrome P-450 in the isolated liver cells was present in an oxidized state essentially free of substrates and

thus able to bind entering drug molecules. Prior to binding to cytochrome P-450 the drug is absorbed through the cell membrane by a passive diffusion process. This absorption and subsequent binding to cytochrome P-450 was very rapid and completed within a few seconds (3).

Addition of a drug, alprenolol, to a suspension of isolated liver cells gave rise to a typical type I spectral change indicating the binding to cytochrome P-450. This binding was also reflected by alterations of the electron paramagnetic resonance (EPR) characteristics of the cytochrome, with a decrease in the low spin signal and appearance of a high spin signal.

The metabolism of this drug in isolated liver cells, without addition of cofactors, proceeded at a considerably higher rate than that found in microsomes in the presence of a NADPH generating system. The apparent *Michaelis* constant was, however, in the same order of magnitude. The wellknown inhibitors of drug metabolism SKF 525-A and metyrapone markedly inhibited alprenolol metabolism in the isolated liver cells. The relative inhibitory effects were the same in isolated liver cells as in microsomes, indicating similar inhibitory mechanism in both systems.

The endogenous production of NADPH was sufficient to support maximal drug metabolism in cells both from fasted and fed animals. However, in liver cells from fasted phenobarbital treated animals, where the concentration of cytochrome P-450 and thereby drug metabolism had been increased, the generation of NADPH was limiting. Addition of lactate or glucose increased the NADPH generation sufficiently to ensure maximal drug metabolism in these cells.

Subsequent to oxidation many drugs undergo conjugation prior to excretion, glucuronidation being the predominant pathway. The rate of conjugation of *p*-nitrophenol was studied in the isolated liver cells. After incubation of the conjugation products with β -glucuronidase, 90% of the conjugated *p*-nitrophenol could be recovered. Interestingly the rate of glucuronidation in the isolated liver cells without addition of cofactors was 3–4 times faster than in microsomes in the presence of saturating amounts of UDPGlcUA.

References

1. Grundin, R., Moldéus, P., Vadi, H., Orrenius, S., von Bahr, C., Bäckström, D. & Ehrenberg, A. (1975), *Adv. Exp. Med. Biol.* in press.
2. Moldéus, P., Grundin, R., Vadi, H. & Orrenius, S. (1974), *Eur. J. Biochem.* 46, 351.
3. von Bahr, C., Vadi, H., Grundin, R., Moldéus, P. & Orrenius, S. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 334.
 Prof. Dr. S. Orrenius
 Department of Forensic Medicine
 Karolinska Institutet
 Stockholm, Sweden

H. Sies

Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München

Monooxygenase Activity and Nicotinamide Nucleotide Systems in Perfused Rat Liver

Application of organ spectrophotometry allows a direct insight into transitions between metabolic steady states in isolated, hemoglobin-free perfused rat liver. Thus, it was demonstrated that the degree of reduction of cytochrome P-450 shifts from 0.06 in the endogenous steady state to 0.29 during monooxygenation of a substrate, hexobarbital (1). This apparently negative increase in the redox potential of cytochrome P-450 is concomitant with a positive increase in the redox potential of the cytosolic free NADPH system, as shown by the indicator metabolite ratios of the malic enzyme reaction. Interestingly, there is no appreciable change in the cytosolic free NADH system during changes in monooxygenation activity, evidenced by the indicator metabolite couple of the lactate dehydrogenase reaction. Furthermore, the substantial oxidation in the NADPH system upon addition of hexobarbital to the perfusate of perfused liver results in a decrease of nicotinamide nucleotide specific surface fluorescence as well as in respective changes in the tissue levels of NADPH and NADP⁺ (1, 2).

The apparent discrepancy arising from the calculation of the redox potentials based on the published midpoint potentials, *i.e.* cytochrome P-450 apparently operating at a more negative potential than its reducing system NADPH, is resolved by assuming a positive shift of the midpoint potential of cytochrome P-450 upon substrate binding (2). In fact, such a shift has recently been demonstrated in an isolated system (3).

The question of possible rate-limiting steps has been of interest to investigators working at the level of the intact organ or cell. It may be stated (1, 4) that in liver from 'normal', unstarved rats the capacity of NADPH generation is sufficient for the supply of reducing equivalents to the monooxygenase system, thus excluding control by factors extrinsic to this system. However, extreme experimental conditions can be found in which the capacity for reoxidation of NADPH by the monooxygenase system exceeds that of NADPH generation (1, 4, 5), *e.g.* in glycogen-depleted liver from phenobarbital-pretreated rats, particularly when mitochondrial NADPH formation is also blocked by respiratory inhibitors.

A striking problem results from the interrelationships between the nicotinamide nucleotide systems of the mitochondria and of the extramitochondrial space. Currently, several groups are considering factors that

govern formation, intracellular localisation and transport of reducing equivalents which finally are utilized by the monooxygenase system of the endoplasmic reticulum. In our group, interest was focused recently on the direct assessment of different nicotinamide systems in the intact cell by measurement of their relative fluorescence enhancement (6).

References

1. Sies, H. & Brauser, B. (1970), *Eur. J. Biochem.* **15**, 531–540.
2. Sies, H. & Kandel, M. (1970), *FEBS Lett.* **9**, 205–208.
3. Waterman, M. R., Ullrich, V. & Estabrook, R. W. (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 355–360.
4. Moldéus, P., Grundin, R., Vadi, H. & Orrenius, S. (1974), *Eur. J. Biochem.* **46**, 351–360.
5. Thurman, R. G. & Scholz, R. (1969), *Eur. J. Biochem.* **10**, 459–467.
6. Sies, H., Häussinger, D. & Grosskopf, M. (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 305–320.

Prof. Dr. H. Sies
Institut für Physiologische Chemie
und Physikalische Biochemie
der Universität München
D-8000 München 2, Goethestr. 33

D. Mansuy and V. Ullrich

*Physiologisch-Chemisches Institut
Universität Homburg/Saar*

P-450 Carbene-Complexes

The purpose of this communication is to propose an explanation for the peculiar difference spectra obtained during interactions of some chemicals with reduced microsomal cytochrome P-450. We examined particularly the case of polyhalogenated compounds, halothane and carbon tetrachloride being well known to exhibit Soret peaks at 470 and 454 nm. Theoretically, one possible route for the system: A₂CX₂ (polyhalogenated compound) + microsomal rat liver cyt. P-450, in the presence of an excess of reducing agent, is the formation of a carbene-cyt. P-450 complex: [A₂C → Fe^{II} (cyt. P-450)], as a result of a two electrons reduction of the starting material. We were able to demonstrate that this is the case for halothane, CF₃CHClBr: the diazo CF₃CHN₂, a well known precursor of the carbene CF₃CH giving the same difference spectrum with reduced cyt. P-450 as halothane itself. Then, this allows us to give an explanation for the occasional hepatotoxicity of halothane. A lot of other polyhalogenated compounds were also showed to give such peculiar difference spectra, provided they are sufficiently reducible.

Prof. Dr. V. Ullrich
Physiologisch-Chemisches Institut
D-6650 Homburg/Saar