

Diss ETH 6067

UNTERSUCHUNGEN UEBER DIE ROLLE VON VITAMIN K
IN HODEN UND SPERMATOZOEN

A B H A N D L U N G

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

E I D G E N O E S S I S C H E N T E C H N I S C H E N
H O C H S C H U L E Z U E R I C H

vorgelegt von

H A N S K O N R A D G E N T S C H

dipl. Naturwissenschaftler ETH
geboren am 5. März 1949
von Oberneunforn (TG)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. C. Martius, Referent
Prof. Dr. E. Carafoli, Korreferent

1977

ZUSAMMENFASSUNG

In einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine früher beobachtete Interaktion zwischen hochmolekularer Deoxyribonukleinsäure und Vitamin K näher untersucht. Dabei wiesen vor allem eine DNS - Schmelzpunktserhöhung und eine Mikrosomen - abhängige "Bindung" von Vitamin K₁ an Nukleinsäure auf eine Wechselwirkung hin. Gelelektrophorese und Cäsiumchlorid - Gradienten - Zentrifugation trennten jedoch die beiden Komponenten eines DNS/Vitamin K₁ - Gemisches auf. Aus den vorliegenden Resultaten muss geschlossen werden, dass wohl eine schwache Interaktion zwischen Phyllochinon und DNS besteht, doch lässt sich diese mit der Wechselwirkung einer lipophilen Substanz mit hydrophoben Bezirken, wie sie in wässrigen Lösungen von Makromolekülen vorhanden sind, vergleichen.

Wieweit Vitamin K auch in vivo an Nukleinsäure gebunden wird, sollte bei der intracellulären Lokalisation des Vitamin K₂(20) in Samenzellen von Hühnern und Ratten abgeklärt werden.

Nach einer einmaligen, oralen Gabe von ³H-Provitamin K kann an den folgenden Tagen ³H-markiertes Vitamin K₂(20) in den Spermatozoen bestimmt werden, dies obwohl diese Zellen selbst nicht befähigt sind in vitro Vitamin K₂(20) zu synthetisieren.

Bei Hühnern zeigte der zeitliche Verlauf der Vitamin K₂(20) - Aktivität pro Spermium am 4. und 9. Tage nach der Synkavitgabe ein Maximum. Aus dem Ablauf der Spermatogenese muss geschlossen werden, dass Vitamin K₂(20) sowohl in lange Spermatiden (Maximum am 4.Tag) als auch nach der Metaphase I&II in runde Spermatiden (Maximum am 9.Tag) eingebaut worden waren. Die nach einer Gabe von ³H-Acetat in den Spermien gefundene CHCl₃/MeOH - lösliche Radioaktivität zeigte ebenso am 4. und 9. Tag maximale Mengen pro Spermium.

Um die Lokalisation von Vitamin K₂(20) in Membranen, wie sie nach der Inkorporation während der Spermatogenese postuliert wurde, zu bestätigen, fraktionierte man Spermienzellen, wobei die Menachinon-Aktivität bei allen Trennmethode parallel zu den Phospholipiden zwischen den einzelnen Fraktionen aufgeteilt wurde, d.h. in Membranreichen Fraktionen gefunden wurde. An Spermienzellen von Ratten konnte gezeigt werden, dass in der Kopfregion bezogen auf Phospholipide 4x mehr Vitamin K₂(20) als in der Schwanzregion nachgewiesen werden konnte, doch auch hier konnte das Menachinon durch Detergentien aus den Zellen herausgelöst werden. Wie schon bei Hühnersper-

mien konnte in den von Membranen befreiten Kopffragmenten (DNS-haltig) kein Vitamin K₂(20) bestimmt werden.

In einem Essigsäure - Extrakt aus Hühnerspermien wurde die acrosomale Serinprotease Acrosin charakterisiert. Für dieses Enzym wurde neben verschiedenen kinetischen Grössen auch ein Molekulargewicht von 30'000 - 35'000 bestimmt. Die zu Beginn vorhandene inaktive Enzymvorstufe (Proacrosin), aus der in einem autokatalytischen Prozess die aktivierte Protease entsteht, weist ein Molekulargewicht von rund 100'000 auf.

Die Acrosin - Aktivität wird unter dem Einfluss des Antivitamin K, Marcoumar, vermindert und zwar in dem Ausmass, wie es früher für andere Serinproteasen beobachtet worden war. Durch die Gabe von Vitamin K₁ kann die Enzymaktivität wieder auf den Normalwert angehoben werden.

Im alkalischen Hydrolysat eines dialysierten Essigsäure - Extrakts aus Hühnerspermien konnten Gamma-Carboxyglutaminsäure - Reste nachgewiesen werden.

ABSTRACT

- There seems to be a weak interaction between vitamin K₁ and DNA, comparable with interactions between lipophilic substances and hydrophobic regions of macromolecules in aqueous solutions.
- After a single administration of ³H-synkavit, ³H-vitamin K₂(20) could be detected in spermatozoa of cocks and rats, although these cells were not able to synthesize it in an in vitro system. The time-course of appearance of vit.K₂(20) in sperm cells was investigated. 4 days (stage of long spermatids) and 9 days (stage of round spermatids) after the administration of synkavit the amount of vit.K₂(20) per sperm cell was maximal. Fractionations of these sperm cells revealed that the distribution of vit.K₂(20) among the fractions was parallel to the distribution of phospholipids.
- As a consequence of a vitamin K-deficiency in cocks the acrosomal enzyme acrosin, a serine-protease as thrombin, trypsin and elastase, that are all known to be vitamin K-dependent, is shown to be reduced in its activity. A zymogen (proacrosin) is converted to the active acrosin by an autocatalytic process.
- In a dialysed acetic acid - extract of cock sperms there could be detected gamma-carboxyglutamic-acid-residues that are known to exist in several zymogens of vitamin K-dependent serine-proteases.