

Es wurde hier ein ziemlich heterogenes Material über antimikrobiell wirksame Substanzen zusammengetragen, die während der letzten Jahre in Kulturpflanzen gefunden wurden und die für die Pflanzen wahrscheinlich eine große Bedeutung bei der Verhütung von Pilz-Infektionen und möglicherweise auch von Insektenbefall haben. Die Forschung befindet sich auf diesem Gebiet erst im Beginn. Die Isolierung und chemische Charakterisierung antimikrobiell wirksamer Substanzen ist daher im Augenblick besonders wichtig, weil die Kenntnis der Stoffe die Voraussetzung für ihre quantitative Bestimmung und für das Verstehen ihrer Funktionen ist. Eine Zusammenarbeit von Chemikern und Genetikern ist notwendig, um festzustellen, ob sich mit Hilfe solcher Stoffe die verschiedenartige Resistenz der

Pflanzen erklären lässt. Eine weitere wichtige Frage betrifft den möglichen Einfluß solcher Substanzen auf die Ernährung von Mensch und Haustieren. Der auf die Erfahrung von Jahrtausenden gegründeten Vorstellung von der vorteilhaften Wirkung einiger Nähr- und Gewürzpflanzen steht die Entdeckung von Stoffen gegenüber, die schädliche Wirkungen haben können. Auch hier besteht die nächste Aufgabe in der Isolierung und Charakterisierung der aktiven Prinzipien. Je besser wir die chemische Zusammensetzung der Pflanzen kennen lernen und dadurch mit reinen Stoffen ihren Einfluß auf den menschlichen und tierischen Organismus studieren können, umso größer werden die Möglichkeiten, den Wert der Pflanzen als Bestandteile unserer Nahrung zu beurteilen. Eingegangen am 4. August 1958 [A 896]

Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation

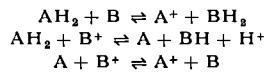
Von Prof. Dr. TH. BÜCHER und Dr. M. KLINGENBERG

Institut für Physiologische Chemie der Universität Marburg/L.*)

(Otto Warburg zum 75. Geburtstag gewidmet)

Die Wechselbeziehungen innerhalb des Netzwerks von Redox-Reaktionen, das sich über einen großen Teil der metabolisch wesentlichen Funktionen lebender Zellen erstreckt, werden erörtert. Anschließend an die Darlegung grundsätzlicher Gegebenheiten bei der Zerlegung der Brennstoffe werden einige Gruppen von Redox-Systemen in verschiedenen Räumen der Zellen und Gewebe in ihren Beziehungen zur Biosynthese, zur Bioenergetik und zur Zellatmung behandelt. Neuere Ergebnisse aus dem Arbeitskreis der Verfasser stehen dabei im Vordergrund. Die Beispiele zeigen, wie weitgehend die Entwicklung der Problematik der dynamischen Biochemie an den Fortschritt der Cytologie gebunden ist.

Wenn der Biochemiker von „Wasserstoff“ spricht, meint er das reduzierende Agens, d. h. Wasserstoff-Ionen oder Elektronen, $(H) \rightleftharpoons H^+ + e^-$
das in lebenden Zellen und Geweben in einer Mannigfaltigkeit von Redox-Systemen den Partner wechselt:



Es geht als eines der wesentlichen Basis-Substrate der lebendigen Organisation in verschiedenartige biosynthetische Reaktionen ein und treibt vor allem die Bioenergetik an, indem es in einem Netzwerk von Redox-Systemen der Vereinigung mit Sauerstoff entgegenstrebt.

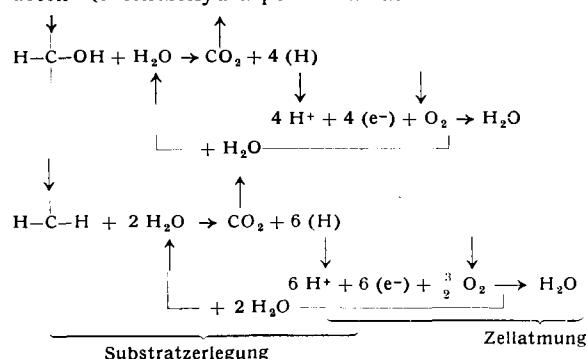
So klar sich diese grundsätzlichen Gegebenheiten heute vor dem geistigen Auge des Zellphysiologen abzeichnen, so problematisch sind für ihn noch die verwickelten Bahnen, die der Wasserstoff in den Redox-Reaktionen durchläuft.

Die Zellphysiologie steht gewissermaßen vor Aufgaben, wie sie sich der allgemeinen Physiologie mit der Entdeckung des Kreislaufs eröffneten. Wir wollen einige der Fragen dieses Aspekts darlegen und zunächst die bekannten Gegebenheiten der Bilanz und der Reaktionsmechanismen betrachten**).

„Wassercyclus“

Wenn wir das Bild des Blutkreislaufs herangezogen haben, dann meinen wir weniger das Kreisgeschehen an sich als die Dynamik gerichteter Versorgung und gelenkten Abtransports. Tatsächlich aber ist mit der Zellatmung ein zwar nicht vollendet so doch wesentlicher Kreislauf des Wasserstoffs verbunden.

Mindestens die Hälfte des für den Stoffwechsel mobilierten Wasserstoffs, bei reiner Fettverbrennung sogar fast zwei Drittel, entstammt dem Zell-Wasser, dessen Sauerstoff — von hier aus übersieht man die Bilanz — im gebildeten Kohlendioxyd deponiert wird:



Erst im letzten Glied der Atmungskette, dem sauerstoffübertragenden Ferment von Otto Warburg, vereinigt der Wasserstoff sich mit Sauerstoff. Bis zu 25% des verfügbaren Zellwassers kann in aktiv atmenden Geweben, wie zum

*) Ausgearbeitet auf der Grundlage des Konzepts zu einem Vortrag im Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, Januar 1957. — Mit Unterstützung der Rockefeller Foundation, des Schwerpunktprogramms „experimentelle Zellforschung“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft, des Fonds der Chemie sowie großzügiger ungebundener Zuwendungen der Firmen C. H. Boehringer & Sohn, Ingelheim am Rhein, C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof und der deutschen Laevasan-Gesellschaft, Mannheim-Waldhof.

**) Neuere Zusammenfassungen über die hier berührten Gebiete der Biochemie und Cytologie findet man unter Fußnoten 1-8):

1) a) H. A. Krebs u. H. L. Kornberg, *Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol.* 49, 212 [1957]. — b) K. Burton, ebenda 49, 275 [1957].

2) F. Lynen u. K. Decker, ebenda 49, 327 [1957].

3) B. L. Horecker in: *Neuere Ergebnisse aus Chemie u. Stoffwechsel der Kohlenhydrate*, 8. Kolloquium d. Gesellschaft für Physiol. Chemie, Mosbach/Ba. 1957, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958.

4) F. Leuthard, ebenda.

5) O. Wieland, ebenda.

6) B. Chance u. G. R. Williams, *Advances in Enzymol.* 17, 65 [1956].

7) a) G. E. Pallas in: *Enzymes — Units of Biological Structures and Function*, Verlag Academic Press Inc., New York 1956. — b) A. L. Lehninger, ebenda.

8) G. H. Hogeboom, E. L. Kuff u. W. C. Schneider, *Int. Rev. Cytology* 6, 425 [1957].

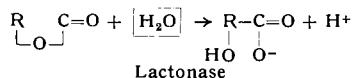
9) Th. Bücher, *Advances in Enzymol.* 14, 1 [1953].

10) Th. Bücher in: *Biologie und Wirkung der Fermente*, 4. Kolloquium d. Gesellschaft für Physiol. Chemie, Mosbach/Ba. 1953, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953.

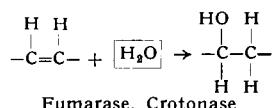
Beispiel den Flugmuskeln von Insekten, ständig in diesem Wasserkreislauf der Substratzerlegung umgesetzt werden.

Den Prinzipien des Intermediärstoffwechsels, dem Urbild rationalisierter Kettenprozesse der Arbeitsteilung entsprechend, sind die Reaktionsschritte, in denen Wasser in das Reaktionsgetriebe eingeführt wird, von denjenigen der Wasserstoffmobilisierung organisatorisch getrennt. Vier Reaktionstypen kommen in erster Linie in Betracht:

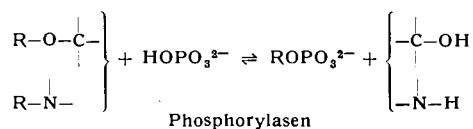
1. Hydrolyse von Lactonen:



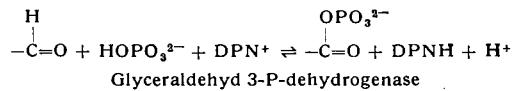
2. Hydratisierung von Doppelbindungen:



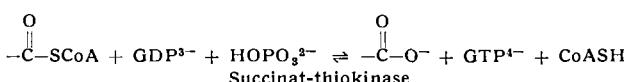
3. Im Zusammenhang mit der Phosphorylyse:



und der phosphorylytischen Dehydrierung:



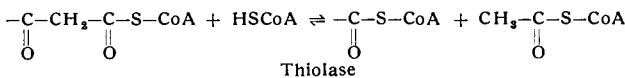
sowie der sog. Substratphosphorylierung:



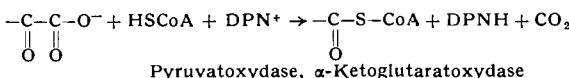
die hydrolytische Spaltung der Nucleosid-triphosphate, insbesondere des Adenosin-triphosphats:



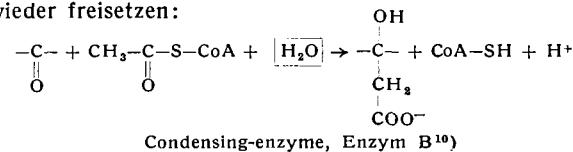
4. In Partnerschaft zu den Reaktionen der Thiolyse¹⁰⁾:



und thiolytischen Dehydrierung von Ketocarbonsäuren (sog. oxydative Decarboxylierung):



die „kondensierenden“ Reaktionen, welche Coenzym A wieder freisetzen:



In Tab. 1 haben wir den Weg der Zerlegung der Glucose-Molekel durch das Zusammenwirken der Embden-Meyerhof-Kette, des Citrat-Cyclus und der Atmungskette unter diesen Aspekten aufgegliedert.

¹⁰⁾ F. Lynen, V. Henning, C. Bublitz, B. Sörbo u. L. Kröplin-Rueff, Biochem. Z. 330, 269 [1958].

	C	H	O	PO ₄ ³⁻	H ₂ O	H ⁺	HPO ₄ ²⁻	ADP ³⁻	ATP ⁴⁻	H _{DPNH}	e _{DPNH}	e _{Atmungskette}	CO ₂	O ₂
$\frac{1}{2}$ Glucose	3	6	3	0		+		+	-					
Triose-P ²⁻	3	5	3	1		+	-	-	+	+	+	+		
Glycerat 3-P ³⁻	3	4	4	1										
Enolpyruvat-P ³⁻	3	2	3	1										
→ Pyruvat ¹⁻	3	3	3	0										
CoASH Acetyl-CoA	2	3	1	0										
Citrat ³⁻	4	2	5	0		+								
6	5	7	0											
5	4	5	0											
Succinat ²⁻	4	4	4	0										
Fumarat ²⁻	4	2	4	0										
Malat ²⁻	4	4	5	0										
Oxalacetat ²⁻	4	2	5	0										
	-3	-6	-3	0	-1	+5	-2	-2	+2	+5	+5	+2	+3	
Oxydative Phosphorylierung (Atmungskette)					+17	-12	-17	-17	+17	-5	-5	+10		
Sauerstoff-Reduktion (Atmungsferment)					+6	-12						-12		-6
Cytoenergetik (ATP-Hydrolyse)					-19	+19	+19	+19	-19					
	-3	-6	-3		+3									+3

Tabelle 1. Bilanz der Hauptkette der Kohlehydrat-Zerlegung¹⁰⁾

¹⁰⁾ Für die Säuren wurden jene Dissoziationsstufen eingesetzt, die bei pH 7 überwiegen. Die durch Hydratisierung von CO₂ freigesetzten Wasserstoff-Ionen blieben unberücksichtigt.

Koordination durch spezifische Strukturen

Wir müssen nunmehr die vier wesentlichen „Konstruktionselemente“ aufzählen, welche sich im Sinne einer Bildung von „Kooperativen“ innerhalb des Netzwerks der Redox-Systeme auswirken:

Räume

1. Spezifische Membranen umgrenzen distinkte Räume (*compartments*). Für die hier behandelten Probleme dürfen wir in erster Näherung voraussetzen, diese Membranen seien impermeabel für Enzymproteine und trennen spezifische Enzymverteilungsmuster. Auch die Verteilung der Metabolite wird durch Membranen wesentlich beeinflusst, passiv durch Semipermeabilität und aktiv durch Transport. Alle diese Funktionen sind an einen Ordnungszustand gebunden, dessen Aufrechterhaltung einen ständigen Zustrom freier Energie erfordert.

Um unsere Überlegungen nicht zu komplizieren, gehen wir mit der Vereinfachung an die Grenze des Erlaubten und teilen die Gewebe in vier Räume ein, welche durch hochdifferenzierte Doppelmembranen, denen höchstwahrscheinlich eine eigene Enzymgarnitur zuzuordnen ist, getrennt werden (vgl. Abb. 1):

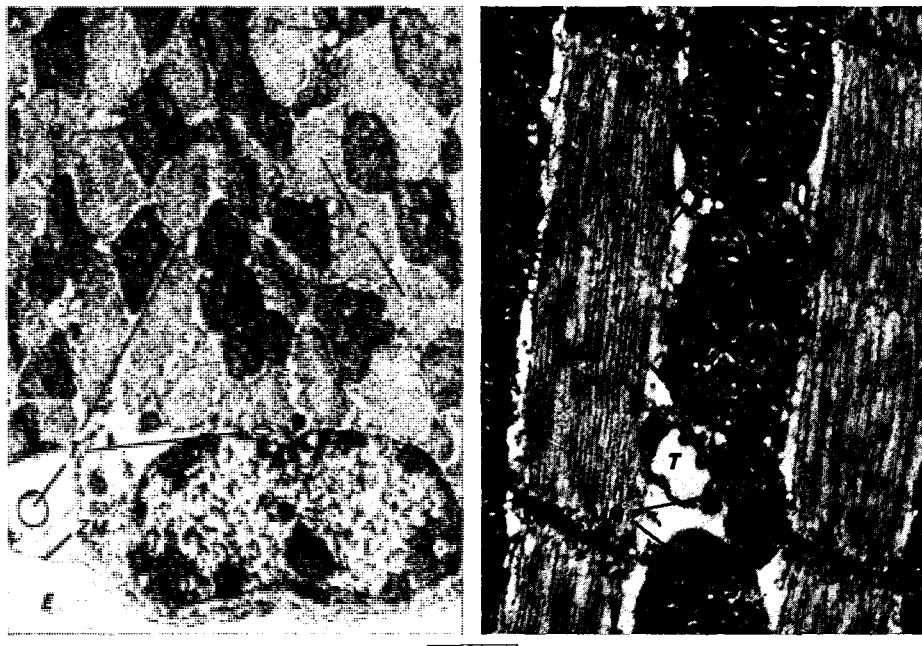


Abb. 1. Indirekter Flugmuskel der afrikanischen Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*): Schnitte im Elektronenmikroskop¹¹⁾. Links: Querschnitt am Zellrand (14500:1), rechts: Längsschnitt (29000:1). C: cytoplasmatischer Raum (im wesentlichen von den hier unerörtert bleibenden Myofilamenten ausgefüllt). E: extrazellulärer Raum, K: Zellkern, M: Mitochondrien, MM: Außenmembran der Mitochondrien, T: in den Zellbereich eindringende Tracheen, ZM: Zellmembran (Sarkolemm)

a) Den extrazellulären Raum, den wir im folgenden E-Raum nennen. Er weist keine praktisch ins Gewicht fallenden Aktivitäten wasserstoff-übertragender Enzyme auf. Der Metabolit-Austausch mit den intrazellulären Räumen ist in erster Ordnung auf ungeladene Substrate und einbasige Carbonsäuren beschränkt, während die Mannigfaltigkeit phosphorylierter Metabolite, zumindest die hier interessierenden, sich jeweils nur innerhalb des Raums der Einzelzelle bewegen können.

b) Den Zellkern (K in Abb. 1), den wir unerörtert lassen.

¹¹⁾ Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Universität Marburg/L. (vgl. W. Vogell, Biochem. Z., im Druck). Wir danken auch an dieser Stelle den Herren K. Niessing und W. Vogell für vielfältige Anregung und praktische Hilfe.

c) Den mitochondrialen Raum (M in Abb. 1), dessen elektronenmikroskopisch erkennbare Doppelmembran eine vermutlich größere Anzahl von Unterabteilungen umschließt⁷⁾. Wir bezeichnen ihn im folgenden als M-Raum.

d) Den cytoplasmatischen Raum (C in Abb. 1), der in besonders ausgeprägter Abhängigkeit von den spezifischen Funktionen der Zellen eine Fülle von Partikeln und Strukturen enthält. Ein großer Teil der Enzyme dieses Raumes, besonders der wasserstoff-übertragenden Enzyme, befindet sich in lediglich lockerer Strukturierung oder in Lösung. Beim Zentrifugieren von Gewebshomogenaten finden sie sich auch bei hohen Beschleunigungen in der Überstands-Fraktion (Supernatant-Fraktion, weiteres unten im Abschnitt „Malatdehydrogenasen“).

Wenn wir im folgenden vom C-Raum reden, dann meinen wir eigentlich diese Abteilung. Wir müssen es uns versagen, auf die differenzierte Problematik des endoplasmatischen Reticulums^{2a)} („Mikrosomen“) einzugehen, obwohl dort in manchen Geweben, beispielsweise in der Leber, ein bedeuternder metabolischer Apparat und Redox-Systeme in hoher Aktivität lokalisiert sind.

Grenzflächen

2. Die Koordination ausgedehnter Netzwerke von Redox-Systemen in zweidimensionalen Lipid/Wasser-Grenzflächen durch die Fixierung von Enzymproteinen in Lipidstrukturen⁶⁾. Weitgehend hypothetische Ansätze für die Erklärung der funktionellen Verknüpfung der Redox-Systeme in solchen „Teppichmuster - Systemen“ bewegen sich in dreierlei Richtung: a) Kollision der Enzymwirkungsgruppen durch eine Art Pendelmechanismus auf Grund der Wärmebewegung⁹), b) Transport durch grenzflächenaktive Redox-Substanzen, wie wir sie in der Gruppe der Lipid-Vitamine kennen und schließlich c) Elektronenhalbleiter-Mechanismen.

Spezifische Enzyme

3. Die Spezifität (und Unspezifität) der wasserstoff- und elektronenübertragenden Enzyme, welche auch ohne die richtenden Wirkungen übergeordneter Strukturen die Koexistenz distinkter Redox-Kooperative im Gleichgewicht und Ungleichheit innerhalb ein und derselben Raumes ermöglicht.

Transportmetabolite

4. Schließlich die Koppelung durch mehr oder minder unbefindliche Diffusion wasserstoff-überführender Metabolite (Transportmetabolite^{9a)}).

Pyridinnucleotide im C-Raum

Wasserstoffübertragende Reaktionen

Der cytoplasmatische Raum der Zelle ist an der Zersetzung der Kohlenhydrat-Molekeln mit sieben wasserstoff-übertragenden Reaktionen beteiligt. Wir haben sie in Tab. 2 gemeinsam mit den Massenwirkungskonstanten der

Enzym				$K_{7^{++}}$)		E'_o mV
				25 °C	37 °C	(Substrate, 37 °C)
Lactat-dehydrogenase (LDH)	L-(+)-Lactat ⁻	$DPN^+ \rightleftharpoons DPNH + H^+$	Pyruvat ⁻	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$5,3 \cdot 10^{-5}$	-204 ^{a)}
Malat-dehydrogenase (MDH)	Malat ²⁻	$E'_o = -320 \text{ mV} (25 \text{ }^\circ\text{C})^c)$	Oxalacetat ²⁻	$0,72 \cdot 10^{-5}$	$0,98 \cdot 10^{-5}$	-177 ^{b)}
Glycerophosphat-dehydrogenase (GDH)	L- α -Glycerin-P ²⁻	$\frac{\Delta E'_o}{\Delta T} = 0,01 \text{ mV/Grad } ^\circ\text{e}$	Dihydroxyaceton-P ²⁻	$5,7 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^{-5}$	-207 ^{a)}
[Triose-phosphat-isomerase (TIM) Glyceraldehyd-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) Phosphoglyceratkinese(PGK)]	[Dihydroxy-aceton-P ²⁻ + HPO ₄ ²⁻ + ADP ³⁻]		[Glycerat3-P ²⁻ + ATP ⁴⁻]		$1,6 \cdot 10^{-2b)}$	
Isocitrico-dehydrogenase (IDH)	Isocitrat ³⁻		α -Ketoglutarat ²⁻ + CO ₂	$4 \cdot 10^{2c})$		-404
Glucose 6-P-dehydrogenase (G 6-PDH)	Glucose 6-P ²⁻	$TPN^+ \rightleftharpoons TPNH + H^+$	6 P-Gluconat ³⁻ + 2 H ⁺	$\approx 10^{5d})$		-440
6 P-Gluconat-dehydrogenase (6 PDGH)	6 P-Gluconat ³⁻	$E'_o = -324 \text{ mV } ^c)$ (25 °C)	Ribulose 5-P ²⁻ + CO ₂	mindestens 10 ²		

⁸⁾ Neue Bestimmungen des Gleichgewichts¹²⁾.

b) Neu berechnet nach den Versuchsprotokollen¹³⁾.

c) K. Burton^{1b}).

d) Geschätzt aus den freien Energien der unphosphorylierten Substrate^{14, 19}).
e) Nach E. I. Padgett¹⁵)

e) Nach F. L. Roakey¹⁰).

$$++ \text{)} [\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ M}, [\text{HPO}_4^{2-}] = 10^{-3} \text{ M}, \frac{[\text{ADP}^{\circ}]}{[\text{ATP}^4^-]} = 10^{-1}, \text{ pCO}_2 = \frac{1}{20} \text{ ATM.}$$

Tabelle 2

beteiligten Reaktionen und den Normalpotentialen der neun beteiligten Redox-Systeme zusammengestellt.

Einen Überblick über die in den Geweben lokalisierten Aktivitäten der Enzymproteine, welche die Wasserstoff-Übertragungen katalysieren, geben die in den Abbildungen 3, 4, 12 und 13 dargestellten Verteilungsmuster. Dort sind „in vitro“ unter optimalen Substratbedingungen getestete Reaktionsgeschwindigkeiten eingetragen. Das vollständige Muster findet man für Lebergewebe und den Flugmuskel der Wanderheuschrecke, in den übrigen fehlen die Teste für die Isocitrico-dehydrogenase und vereinzelt auch für die anderen TPN-spezifischen Dehydrogenasen.

Die Spezifität dieser Enzyme ist sehr weitgehend. Sie erstreckt sich nicht nur auf die Substrate, sondern auch auf die beiden wesentlichsten wasserstoff-überführenden Transportmetaboliten des C-Raums, die beiden Pyridinnucleotide *Otto Warburgs*. Wir stellen diesen Aspekt in Abb. 2 an Hand des Beispiels der Lactat-dehydrogenase dar, welches *Ernster* und Kollegen¹⁶⁾ im Verlauf ihrer bemerkenswerten Untersuchungen kürzlich gegeben haben.

DPN- und TPN-Gruppe

Durch die Eigenart dieser Verhältnisse werden zwei Kooperative von Redox-Systemen, wenn auch nicht vollständig (beachte die Abhängigkeit vom p_H in Abb. 2), so doch weitgehend voneinander getrennt. Sie sollen im folgenden als die DPN-Gruppe und die TPN-Gruppe bezeichnet werden. In jeder dieser Gruppen werden Reaktionen auf gänzlich verschiedenen Abschnitten des Kohlenhydratmetabolismus miteinander gekoppelt. Offensichtlich richtet sich die lebendige Organisation dabei nach anderen Gegebenheiten als den Stoffwechselschemata der Biochemiker.

Betrachtet man die in Tab. 2 eingetragenen Massenwirkungskonstanten der einzelnen Reaktionen, dann zeigt

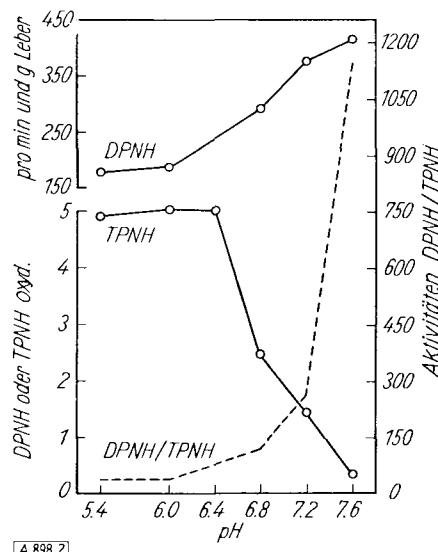


Abb. 2. Spezifität der Leber-Lactat-dehydrogenase gegenüber DPNH und TPNH, absolute und relative Aktivität als Funktion des pH. (F. Navazio, B. B. Ernster und L. Ernster 1957¹⁴), Testsystem: $1,5 \cdot 10^{-4}$ [M] DPNH oder TPNH, „Leberenzym“ aus 5 mg Leber, 0,0033 [M] Kaliumpyruvat und 0,04 [M] Kaliumumphosphat (pH wie angegeben) bei 25 °C

sich, daß durch das DPN-System diejenigen Substratreaktionen miteinander gekoppelt sind, deren Normalpotential positiver als dasjenige der Pyridinnucleotide ist. Für die TPN-Gruppe gilt das Gegenteil.

DPN-Gruppe: $K_7 \ll 1$

TPN-Gruppe: $K_7 \gg 1$

(C-Raum, Kohlenhydrat-Zerlegung)

„Ist-Potential“

Wir haben bei früherer Gelegenheit diese beiden Gruppen als die „Vene“ und „Arterie“ des Wasserstoff-Stroms im C-Raum bezeichnet³⁻⁵) und meinen damit, daß das „Ist-Potential“ BT [RED]

$$E' = E'_o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{RED}]}{[\text{OX}]}$$

E'_o Normalpotential } E' „Ist-Potential“ } $p_H = 7$

der beiden Pyridinnucleotid-Systeme innerhalb des fließenden Systems von nahezu statischen Gleichgewichten und von Ungleichgewichten in entgegengesetzter Richtung vom Normalpotential abweicht: für das TPN-System in negativer Richtung, also im Sinne eines weitgehend reduzierten Zustands (Donator-System), für das DPN-System in positiver Richtung (Acceptor-System). Das Normalpotential der beiden Pyridinnucleotide (vgl. Tab. 2), eine rechnerische Größe von nur mittelbarer Bedeutung, unterscheidet sich bekanntlich nur unwesentlich.

Gehalt und Spiegel

Für das TPN-System geben wir in Tab. 3 eine Auswahl von Gehaltsbestimmungen in verschiedenen Geweben, die man *Glock* und *McLean* verdankt²⁰⁾. Um diese und die anderen im folgenden mitgeteilten Gewebsanalysen korrekt auswerten zu können, müssen wir auf Fragen der Nomenklatur eingehen. Wir haben nämlich die Begriffe des Gewebsgehalts und des Spiegels einer bestimmten Substanz zu unterscheiden. Der Gewebsgehalt ist das Ergebnis einer „Über-Alles“-Bestimmung. Unter dem Begriff des Spiegels oder der stationären Zwischenstoffkon-

	TPN+	TPNH
Leber	8	276
Niere	4	73
Herz	5	44
Nebenniere	23	156
Zwerchfell	3	18
Gehirn	3	11
Mamma (laktierend) ...	3	38

Tabelle 3
TPN- und TPNH-Gehalt in verschiedenen Organen der Ratte²⁰⁾
(nMol/g_{fr}; abgerundet)

zentration wollen wir dagegen die freie Konzentration oder noch exakter die Aktivität der Metabolite verstanden wissen, also jene Größe, welche die Verhältnisse in Ketten von Fließgleichgewichten charakterisiert. Bei der Auswertung von Gehaltsbestimmungen wie den angeführten ist zu bedenken, daß sie a) den Mittelwert über verschiedene Räume des Gewebes mit möglicherweise gänzlich unterschiedlichem Metabolitengehalt und Redoxstatus geben und b) mitunter erhebliche Anteile der Metabolite durch unspezifische Bindungen und durch die Fixierung an spezifischen Orten der Lösung und damit der unmittelbaren Wechselwirkung in den Reaktionsketten entzogen sein können. Das Problem des lösenden Anteils des Zellwassers brauchen wir hier, wo es sich in erster Linie um Quotienten handelt, nicht zu berühren.

Wahrscheinlich betreffen diese Gegebenheiten im Falle des Quotienten TPN/TPNH nicht die Größenordnung: a) Bestimmungen an isolierten Mitochondrien aus dem Arbeitskreis von *Kaplan*²¹⁾ und die in dieser Arbeit am anderen Ort mitgeteilten Ergebnisse weisen darauf hin, daß der TPN/TPNH-Quotient im M-Raum nicht wesentlich von den in Tab. 3 mitgeteilten Gesamtbestimmungen abweicht. b) Die Konzentration der TPN-spezifischen Dehydrogenasen (vgl. Abb. 3, 4 und 12) — spezifischer Bindungsstelle für das Nucleotid mit möglicherweise bedeutend höherer Affinität für die reduzierte Form — können ebenfalls

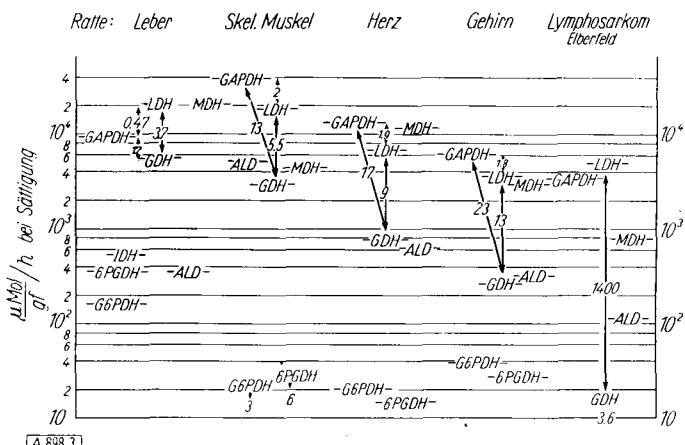


Abb. 3. Enzymverteilungsmuster des C-Raums^{17, 18)} (Überstand des Sucrosehomogenates bei 10⁵ g, 10 min, vgl. Abb. 14) einiger Gewebe der Ratte. Optische Tests bei p_H 7,4 im Substratoptimum bezogen auf das Frischgewicht (gf).

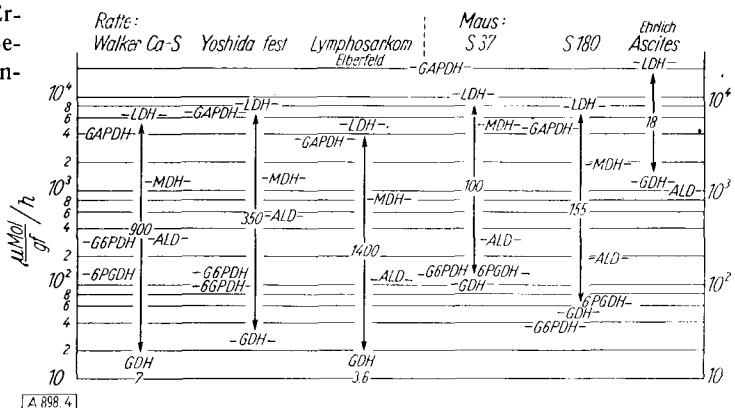


Abb. 4. Enzymverteilungsmuster (C-Raum) einiger experimenteller Tumoren der Ratte und Maus¹⁹⁾. Optischer Test bei p_H 7,4 im Substratoptimum bezogen auf das Frischgewicht (gf). Mit Ausnahme des Ehrlich-Ascites-Tumors im Vergleich zur hohen Aktivität der LDH niedrige Aktivität der GDH.

in erster Näherung vernachlässigt werden. Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse können wir schließen, daß das „Ist-Potential“ des TPN-Systems im C-Raum 30–70 mV negativer als das Normalpotential ist.

TPN-TPNH: E' ≈ -400 mV
„Ist-Potential“, C-Raum.

Verschiedene Autoren^{20, 21, 23–26)} haben sich in den letzten Jahren um vergleichende Bestimmungen des Gehaltes von DPN und DPNH in Geweben bemüht. Die bislang zuverlässigste Methode wurde von *Weinhouse* und seinen Mitarbeitern entwickelt. Wir geben in Tab. 4 einen Auszug ihrer Werte. Sie zeigen — darin stimmen die Ergebnisse der

	DPN+	DPNH
Leber	622	538
Leber 6 Tage fasten ...	512	600
Niere	642	536
Herz	646	105
Skelettmuskel	495	20
Gehirn	161	137

Tabelle 4
DPN- und DPNH-Gehalt in verschiedenen Organen der Ratte^{25, 26)}
nMol/g_{fr}

- ²²⁾ H. J. Hohorst u. F. H. Kreutz, Vortrag auf d. gemeinsamen Tagung d. deutschen u. schweizerischen Physiol. Chemiker, Basel, Sept. 1957.
- ²³⁾ A. Delbrück, H. Schimassek, K. Bartsch u. Th. Bücher, Biochem. Z., im Druck.
- ²⁴⁾ E. Zebe, A. Delbrück u. Th. Bücher, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Physiol. Chemie, Hamburg, Sept. 1956; Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol. 189, 115 [1957]; diese Ztschr. 69, 65 [1957].
- ²⁵⁾ G. E. Glock u. P. McLean, Biochem. J. 61, 388 [1955].
- ²⁶⁾ B. Jacobson u. N. O. Kaplan, J. biol. Chemistry 226, 603 [1957].
- ²⁷⁾ H. J. Hohorst u. F. H. Kreutz, Vortrag auf d. gemeinsamen Tagung d. deutschen u. schweizerischen Physiol. Chemiker, Basel, Sept. 1957.
- ²⁸⁾ H. Holzer, S. Goldschmidt, W. Lamprecht u. E. Helmreich, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 297, 271 [1954].
- ²⁹⁾ H. Holzer, Ergebn. med. Grundlagenforsch. 1, 189 [1956].
- ³⁰⁾ L. Jedeikin u. S. Weinhouse, J. biol. Chemistry 213, 271 [1955].
- ³¹⁾ L. Jedeikin, A. J. Thomas u. S. Weinhouse, Cancer Res. 16, 867 [1956].

verschiedenen Autoren trotz einiger Polemik über die Abhängigkeit vom Zustand der Gewebe im Wesentlichen überein —, daß der Quotient DPN/DPNH des Gewebsgehalts in der Größenordnung 1 bis 0,1 liegt. Auch die spektrophotometrischen Messungen des Arbeitskreises von *Chance*^{26a)} an ganzen Zellen weisen in die gleiche Richtung.

Setzte man Gewebsgehalt gleich Spiegel, dann ergäbe sich für das „Ist-Potential“ des DPN-Systems in den meisten Geweben etwa der Wert des Normalpotentials, d. h. etwa -320 mV. Hier, so glauben wir, ist jedoch dieses Ver-

fahren nicht berechtigt. Betrachtet man nämlich die in den Abbildungen 5—7 eingetragenen Gehalte der Metabolite der DPN-Gruppe und errechnet die „Ist-Potentiale“ dieser Redox-Systeme (zweitunterste Zeile der Abbildungen), dann würden sich Ungleichgewichte in den wasserstoffübertragenden Reaktionen bis zu +100 mV, entsprechend einer Diskrepanz des DPN/DPNH-Quotienten der Größenordnung 10³ ergeben. Dies erscheint unwahrscheinlich; es müssen also die Gehaltsbestimmung entweder der Metabolite oder des DPN-Systems um Größenordnungen täuschen.

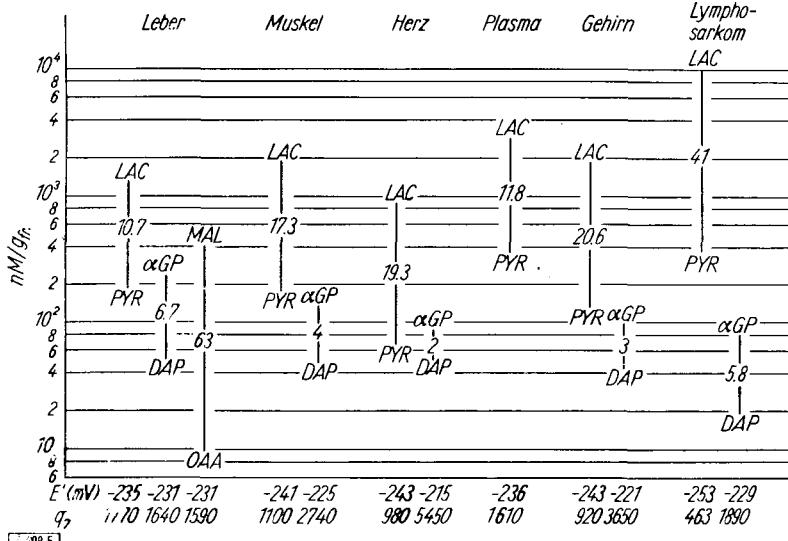


Abb. 5. Metabolitgehalt (DPN-Gruppe) verschiedener Gewebe der Ratte^{12, 22}). Mittelwerte von 15 (Leber) bis 2 (Gehirn) Versuchen: In der Leber Übereinstimmung von E' bzw. q₇ für die DPN-Gruppe, in Plasma und Geweben (mit Ausnahme des Tumors) angenäherte Übereinstimmung der Lactat/Pyruvat-Quotienten (Kopplung über den E-Raum). Erniedrigter q₇ für Glycerin-1-Phosphat/Dihydroxyacetophosphat in Muskeln, Gehirn und Tumor

$$E' = E'_0 - 30,7 \lg \frac{\text{Gehalt}_{\text{red}}}{\text{Gehalt}_{\text{ox}}} \text{ mV}$$

$$q_7 = \frac{\text{Gehalt}_{\text{ox}}}{\text{Gehalt}_{\text{red}}} \cdot \frac{1}{K_7} \quad \left| \begin{array}{l} E'_0 \text{ und } K_7, \text{ vgl. Tabelle 2.} \\ \text{Gehalt}_{\text{ox}} \quad 1 \\ \text{Gehalt}_{\text{red}} \quad K_7 \end{array} \right.$$

Versuchstechnik: Entnahme der Proben nach Auflegen tiefgekühlter (flüssige Luft) Metallblöcke unter Äthernarkose. Metabolitbestimmungen enzymatisch (Beispiel in Abb. 8). Bestimmung des Oxalacetats: enzymatisch im Doppelstrahlphotometer (wegen des leichten Zerfalls nur in der Größenordnung zuverlässig)

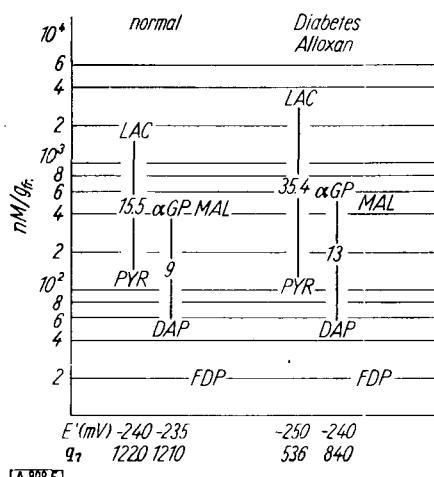


Abb. 6. Metabolitgehalt (DPN-Gruppe) der Leber von Ratten: Senkung von q₇ bei Alloxandiabetes^{12, 22}). Mittelwerte von 6 Kontrolltieren und 6 Tieren mit Alloxandiabetes (8 Wochen nach Alloxan i.p., Blutglucose 240—700 mg %, Wasserverbrauch weit über der Norm). Versuchstechnik: unmittelbares Überführen des Gewebsproben in Perchlorsäure von 37 °C nach Freilegen des Organs unter Äthernarkose, sonst wie in Abb. 5 (vgl. auch Abb. 8)

^{26a)} B. Chance in: The Mechanism of Enzyme Action, The Johns Hopkins Press, Baltimore 1954.

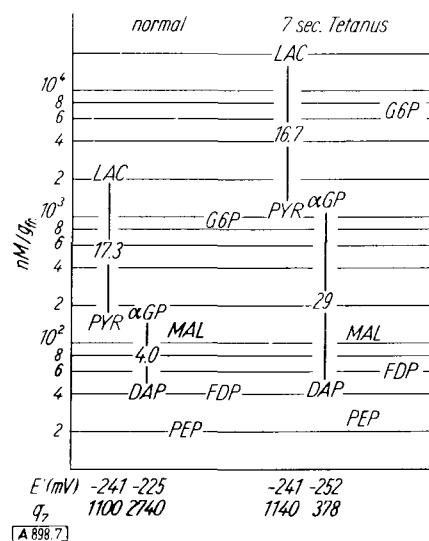


Abb. 7. Metabolitgehalt (DPN-Gruppe) des Bauchdeckenmuskels der Ratte in Ruhe (Mittelwert aus 9 Bestimmungen) und nach tetanischer Reizung (Einzelversuch²⁷)). Anstieg des Pyruvatgehalts infolge Glycerin-1-P-Pyruvat-Dismutation. Konstanz des q₇ (Lactat/Pyruvat) trotz Anstieg des Lactats um eine Größenordnung. Zur Versuchstechnik und Auswertung vgl. die Legende zu Abb. 5 und die Abb. 8

„Ist-Potential“ der DPN-Gruppe

Wir haben in Bezug auf diese Diskrepanz sowohl die Gehaltsbestimmungen als auch den Status des Ungleichgewichts zu erörtern. Am übersichtlichsten ist die Betrachtung des Systems Lactat/Pyruvat, welches durch die Zellmembran in den E-Raum permeieren kann. a) Vergleicht man die Werte im Blutplasma, in dem keine spezifischen Bindungsorte vorhanden sind und in dem die unspezifische Bindung — zumindest was den Quotienten der Metabolitspiegel betrifft — in erster Näherung vernachlässigt werden darf, mit denen der Gewebe, dann wird offensichtlich, daß der Quotient der Gewebsgehalte nicht größenordnungsmäßig von dem der Spiegel abweicht. b) Die Frage nach dem Ausmaß des Ungleichgewichts ist nach den Gesetzen der Ketten von Fließgleichgewichten auf die Möglichkeiten für den Zu- und den Abfluß gerichtet. Sind erstere groß und letztere klein, dann haben wir, dem Stau in fließenden Gewässern vergleichbar, nahezu statische Verhältnisse. c) Bezüglich des Zuflusses weisen die bereits erwähnten Enzymverteilungsmuster die Lactat-dehydrogenase — getestet in vitro — als eines der „großen“ Enzyme aus. Einen Anhalt für die in vivo möglichen Umsätze durch dieses Enzym können wir aus dem in Abb. 7 dargestellten Experiment gewinnen. Aus dem dort bei tetanischer Reizung aufgetretenen Lactat-Stoß errechnet man eine Fließgeschwindigkeit von 4000 Mikromol/gfr./Stunde, also einen Wert, der die durchschnittliche Gewebsatmung um eine Größenordnung übersteigt. d) Die besondere Lage der Lactat/Pyruvat-Reaktion im System der Stoffwechselketten bedingt, daß der Abfluß des Lactats in erster Näherung nur unter Vermittlung der Lactat-dehydrogenase der gleichen Zelle oder — ge-

²⁷⁾ F. H. Kreutz u. H. J. Hohorst, Biochem. Z., im Druck.

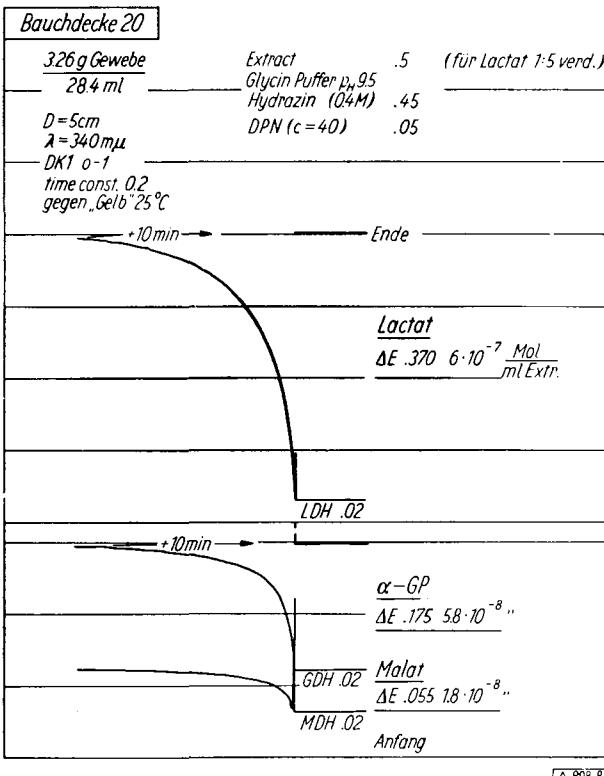


Abb. 8. Hintereinandergeschaltete enzymatische Bestimmung von Malat, Glycerin1-P und Lactat²⁸⁾ mit MDH, GDH und LDH. Die Bestimmung kann zugleich als ein Beleg für die hohe Substratspezifität der Enzyme der DPN-Gruppe gewertet werden. (Ordinate: Abstand zwischen zwei Linien entspricht $\Delta E = 0.2$.)

koppelt über den E-Raum — durch die Lactat-dehydrogenasen anderer Zellen erfolgen kann.

Aus diesen Überlegungen können wir folgern, daß die Beziehungen zwischen dem Lactat-System und dem DPN-System des C-Raums dem statischen Gleichgewichtszustand weitgehend angenähert sind.

Ein weiterer Test für die gleiche Folgerung ergibt sich für Lebergewebe aus der Betrachtung des Gehaltes der anderen Metabolitsysteme der DPN-Gruppe (Abb. 5). Trotz der teilweise erheblichen Verschiedenheit der involvierten Enzymkonzentrationen sowie der kinetischen Eigenheiten der Enzyme in ihrer Wechselwirkung mit den Metabolitspiegeln stimmen nämlich die aus den Gehalten errechneten „Ist-Potentiale“ innerhalb der Fehlergrenzen überein.

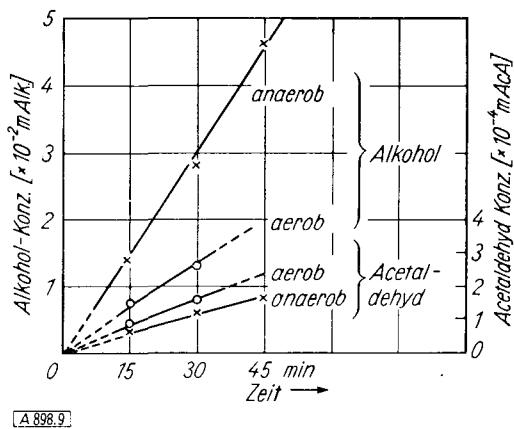


Abb. 9. Kinetik der Bildung von Alkohol und Acetaldehyd durch Bäckerhefe bei Glucose-Umsatz (Holzer, Schultz und Lynen 1956²⁹⁾)

²⁸⁾ H. J. Hohorst, ebenda, im Druck.

²⁹⁾ H. Holzer, G. Schultz u. F. Lynen, ebenda 328, 252 [1956].

	aerob	anaerob
Alkohol	76	200
Acetaldehyd	1100	400

Für andere Gewebe trifft letztere Gelegenheit nicht zu (Abb. 5 und 7). Dort weichen die „Ist-Potentiale“ des Lactat-Systems und Glycerin1-P-Systems voneinander ab. Wir vermögen beim derzeitigen Stand unserer Untersuchungen nicht völlig sicher zu sagen, ob diese Diskrepanzen auf einer mangelnden Übereinstimmung zwischen Gehalt und Spiegel des C-Raums oder auf einen höheren Status des Ungleichgewichts im Glycerin 1-P-System beruhen. Wahrscheinlich ist letzteres der Fall. Was wir für das Lactat-System im Lebergewebe gezeigt haben, dürfen wir jedoch auch auf andere Gewebe übertragen, sofern die Stellung der Lactat-dehydrogenase im Verteilungsmuster der Enzyme mit dem Lebergewebe in etwa übereinstimmt oder auf einen noch höheren Gehalt an diesem Enzym hinweist.²⁸⁾ Ein Beispiel, in dem das nicht der Fall ist, wird mit den in den Abbildungen 10 und 11 dargestellten Metabolitveränderungen im Flugmuskel der Wanderheuschrecke unter Anaerobiose im Vergleich zum Enzymverteilungsmuster der Abb. 12 gegeben. Ein Beispiel in dem sich das Glycerin1-P-System infolge unzureichender Aktivität der

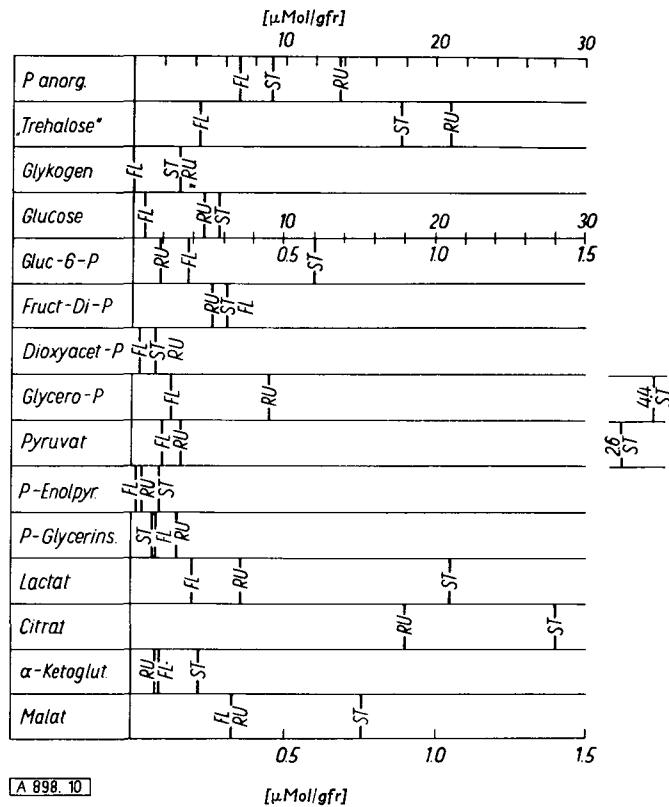


Abb. 10. Metabolitgehalt im Flugmuskel der afrikanischen Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*)^{10, 48)}. RU: in Ruhe, FL: nach zweistündigem Flug am Karussel, ST: nach 1,5 Min. unter sauerstoff-freiem Stickstoff

Glycerin1-P Dihydroxyaceton-P	E' (mV) q ₇	Flug	Ruhe	Stickstoff
		-232 1600	-230 1780	-261 177
Lactat Pyruvat	E' (mV) q ₇	-212 9500	-213 8600	-192 44000

Versuchstechnik: Tötung durch Übergießen mit flüssiger Luft, Präparation der Organe in tiefgefrorenem Zustand. Mit Ausnahme der Kohlenhydrate des Panorg. und Citrats enzymatische Bestimmungen. DPN = Konst. $\approx 0.7 \mu\text{M}/\text{gfr}$, DPNH $< 0.01 \mu\text{M}/\text{gfr}$. Alle Analysen in einem Kollektiv von jeweils 10 Tieren für jeden Zustand.

Glycerophosphat-dehydrogenase (vgl. Abb. 4) einwandfrei in Zustand des Ungleichgewichtes befindet, zeigt die Metabolitverteilung des Lymphosarkoms in Abb. 5.

Holzer, Schultz und Lynen²⁹⁾ haben in Versuchen mit Hefe vor einiger Zeit gezeigt, daß der Quotient Äthanol/Acetaldehyd sich bei Glucose-Umsatz unter anaeroben und aeroben Bedingungen nach einer äußerst kurzen Anlaufzeit auf einen Wert einstellt, der nahezu unabhängig von der Höhe der im Laufe des Versuches anwachsenden Metabolitspiegel ist (Abb. 9). Nur durch gezwungene und umständliche Zusatzhypothesen könnte man die gefundene

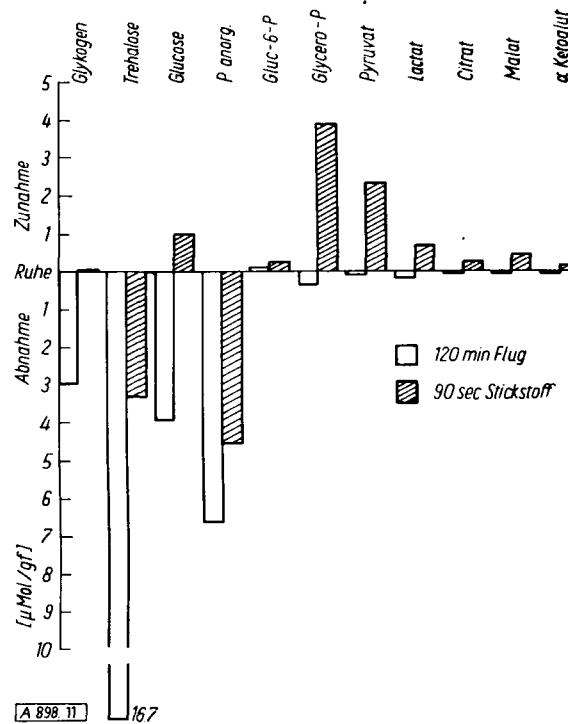


Abb. 11. *Locusta*: Metabolitveränderungen im Flug (helle Blöcke) und unter Sauerstoffmangel (schraff. Blöcke)^{19, 48)} (vgl. Abb. 10). Weitgehende Erschöpfung der Reservekohlehydrate und Absinken des Panorg. im Flug, Konstanze der übrigen Metabolite. Unter Sauerstoffentzug wird eine kurzdauernde tetanische Phase durchlaufen. Die Bilanz entspricht mit Ausnahme des Pyruvatgehalts der Reaktion Hexose + Panorg. → Glycerin-1-P + Pyruvat.

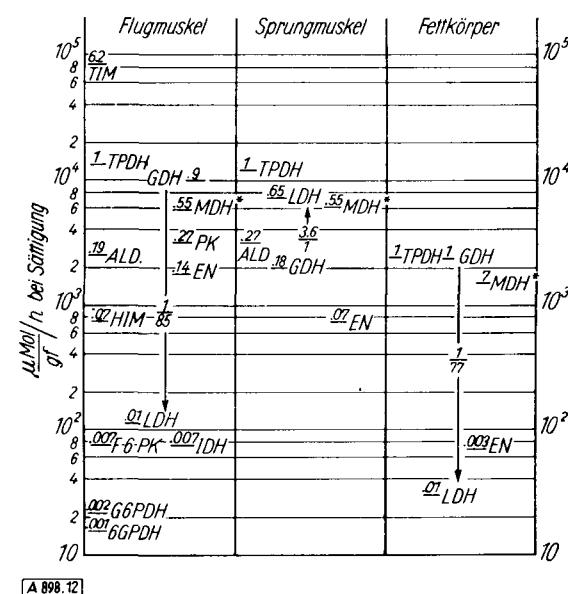


Abb. 12. Enzymverteilungsmuster (C-Raum) im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper der afrikanischen Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*)^{19, 49)}. Optische Teste bei $p_{\text{H}_2} = 7,4$ im Substratoptimum; vergleichsweise sehr niedrige Aktivität der LDH im Flugmuskel und Fettkörper bezogen auf das Frischgewicht (gf.). (vgl. auch Abb. 13)

Konstanz des Redox-Potentials des im Fluß befindlichen Systems anders als durch eine weitgehende Annäherung des Fließgleichgewichts an den statischen Gleichgewichtszustand erklären. Ein Auszug der von den Autoren errechneten Quotienten für das freie DPN-DPNH-System ist in der Legende zu Abb. 9 enthalten. Ein analoges Beispiel hat R. Czok³⁰⁾ auf der Basis des weit komplexeren Versuchsobjekts der arterio-venösen Differenzen im Zusammenhang mit Hirndurchblutungsmessungen gegeben und im gleichen Sinne diskutiert. In diesen unabhängig und etwa gleichzeitig veröffentlichten Arbeiten ist der hier in extenso dargestellte Aspekt erstmals mitgeteilt worden.

Setzen wir den vorstehend erörterten Gesichtspunkten entsprechend das „Ist-Potential“ des Lactat-Systems im Blutplasma demjenigen des DPN-Systems des C-Raums gleich, dann erhalten wir

$$\text{DPN}-\text{DPNH}: E' \approx -236 \text{ mV}$$

„Ist-Potential“, C-Raum

und als Differenz der „Ist-Potentiale“ der beiden Pyridin-nucleotid-Systeme

$$E'_{\text{TPN}} - E'_{\text{DPN}} \approx -160 \text{ mV}$$

$$\Delta G' \approx -7,4 \text{ [KAL/MOL]}$$

Erstaunlicherweise liegt der Unterschied der freien Energie beider Systeme in der Größenordnung der fundamentalen energetischen Quantität der lebendigen Organisation, der freie Energie der Hydrolyse „energiereicher“ Phosphat-Bindungen.

q₇

Zur Berechnung des Spiegel-Quotienten des DPN-Systems aus den Metabolitgehalten haben wir zufolge der in Tab. 2 eingetragenen Reaktionsgleichungen eine Annahme über die Wasserstoffionen-Konzentration im C-Raum zu machen. Bekanntlich herrscht hier beträchtliche Unsicherheit. Wir setzen daher ohne Berücksichtigung des wirklichen Zell-p_H in unseren Überlegungen das p_H = 7. Den auf diese Weise sich ergebenden Quotienten nennen wir q₇:

$$q_7 = \frac{\text{Gew. Gehalt}_{\text{OX}}}{\text{Gew. Gehalt}_{\text{RED}}} \cdot K_7 \approx \frac{\text{DPN}_{\text{frei}}}{\text{DPNH}_{\text{frei}}}$$

$p_{\text{H}} = 7$, statisches Gleichgewicht

Von den zwei Unsicherheiten dieses indirekten Verfahrens — der über die Wasserstoffionen-Aktivität und der über das Ausmaß des Ungleichgewichtes — wird im Regelfall erstere überwiegen. Im übrigen hat es alle Vorteile des thermodynamischen Rückschlusses, der von Systemen ausgeht, in denen die Verhältnisse der Konzentrationen und auch der Aktivitäten experimentell und rechnerisch zugänglich sind.

Erstaunlich ist die Diskrepanz zwischen dem Quotienten aus den in Tab. 4 enthaltenen Gehaltsbestimmungen und dem von uns indirekt erschlossenen Quotienten der Spiegel. Sie liegt in der Größenordnung von 10^3 . Höchstwahrscheinlich sind alle oben genannten Faktoren beteiligt. Einen wesentlichen Anteil haben die spezifischen Bindungsorte der Dehydrogenasen, ein Umstand, der rechnerisch durch die folgende Gleichung berücksichtigt werden kann:

$$E' = E'_0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\text{Gehalt}_{\text{RED}}}{\text{Gehalt}_{\text{OX}}}$$

$$E'_0 = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{1 + \sum C_E \cdot K_{\text{RED}}}{1 + \sum C_E \cdot K_{\text{OX}}}$$

³⁰⁾ R. Czok, Dissert., Marburg 1956.

worin K_{RED} und K_{OX} Assoziationskonstanten, C_E Konzentrationen spezifischer Bindungsorte und E_o^* das durch Bindungen der Nucleotide veränderte Normalpotential bedeuten. Die Konzentrationen der Dehydrogenasen im C-Raum liegen in der Größenordnung des Mikromolaren.

Den Einfluß der Verteilung der Nucleotide auf verschiedene Räume erkennt man qualitativ durch den Vergleich der Werte (Tab. 4) für Leber, Niere und Herz — mitochondrienreiche Gewebe — mit denen des Muskels, der relativ arm an Mitochondrien und reich an Dehydrogenasen ist. Auf eine weitergehende Diskussion an dieser Stelle müssen wir verzichten.

Zellphysiologischer Aspekt

Die dargelegten Verhältnisse sind fraglos von fundamentaler Bedeutung für die Funktionen der metabolischen Systeme des C-Raums. Eine ausführliche Diskussion würde den Rahmen dieses Artikels sprengen. Wir beschränken uns daher auf Hinweise qualitativen Charakters.

Für das TPN-System ist in den letzten Jahren von mehreren Arbeitskreisen wahrscheinlich gemacht worden, daß es in einer Reihe von Synthese-Ketten als Wasserstoff-Donator fungiert^{31, 33-37}. Die größenordnungsmäßige Erhöhung der Aktivität der TPN-spezifischen Dehydrogenasen des „oxydativen“ Kohlenhydrat-Abbaus in den Brustdrüsen während der Lactogenese verdeutlicht diesen Aspekt^{31, 32}. Popják und Mitarbeiter^{33, 34}, Brady und Mitarbeiter³⁵ sowie insbesondere Langdon³⁶ haben gezeigt, daß die Fettsäuresynthese in verschiedenen Organen unter der Beteiligung des TPN-Systems des C-Raums vorstatten geht (im Gegensatz zum Fettsäure-Abbau, der dem M-Raum zugehört). Hinsichtlich der Beziehungen zur Aminosäure-Synthese muß die weitere Klärung der Lokalisation der involvierten Enzyme abgewartet werden. In der gleichen Richtung liegt die Problematik der Beziehungen zwis-

schen den TPN-Systemen des C-Raums und des M-Raums. Schließlich ist zu erwähnen, daß das TPN-System funktionelle Beziehung zur Erhaltung des Redox-Status von Systemen mit allgemein physiologischen Bedeutungen besitzt (z. B. Glutathion-reduktase, Haemoglobin-reduktion).

In bezug auf das DPN-System stehen zwei Problemkreise im Vordergrund.

1. Die Beziehungen zum M-Raum, die sowohl unter energetischen als auch unter kinetischen Aspekten neu durchdacht werden müssen, denn das „Ist-Potential“ des DPN-Systems im C-Raum erweist sich nunmehr als wesentlich höher als das Normalpotential, welches allgemein in die Stufenleiter der Atmungskette eingesetzt wird, und die Konzentration des freien DPNH liegt, ganz abgesehen von den Permeabilitätsfragen, innerhalb der Größenordnung der „Michaelis-Konstanten“ der spezifischen Bindungsorte, auch des M-Raums.

2. Seit Otto Meyerhofs bahnbrechenden Arbeiten über die „Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei der anaeroben Kohlenhydrat-Spaltung“³⁸) wissen wir, daß das Redox-Potential des DPN-Systems im Zusammenhang mit der Energetik des ATP-Systems im C-Raum steht.

Der besseren Übersicht halber haben wir in Tab. 2 die Energetik des „Meyerhof-Systems“ zusammengefaßt, das heißt der Reaktionen, die durch Triose-isomerase, Glyceraldehyd 3-P-dehydrogenase (das oxydierende Gärungsferment von Warburg und Christian³⁹) und durch Glycerat 3-P-kinase (das phosphat-übertragende Enzym von Bücher¹³) katalysiert werden. Zugleich haben wir für den Status des ATP-Systems angenommen:

$$\frac{[HPO_4^{2-}][ADP^{3-}]}{[H^+][ATP^{4-}]} = 10^3$$

Eine Aufgliederung der energetischen Verhältnisse geben wir in Tab. 5. Man erkennt, wie wichtig ein positives „Ist-Potential“ im DPN-System für die energieliefernden Funk-

³¹) G. E. Glock u. P. McLean, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 12, 590 [1953].

³²) G. E. Glock u. P. McLean, Biochem. J. 56, 171 [1954].

³³) G. Popják u. A. Tietze, ebenda 60, 147 [1955].

³⁴) P. Hele u. G. Popják, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 18, 295 [1955].

³⁵) R. O. Brady, A. Mamoon u. E. R. Stadtman, J. biol. Chemistry 222, 795 [1956].

³⁶) R. J. Langdon, ebenda 226, 615 [1957]; J. Amer. chem. Soc. 77, 5190 [1955].

³⁷) Th. Bücher: Diskussionsbemerkung zu ³), ⁴) und ⁵).

³⁸) O. Meyerhof, P. Ohlmeyer u. W. Möhle, Biochem. Z. 297, 90, 113 [1938].

³⁹) O. Warburg u. W. Christian, ebenda 303, 40 [1939].

⁴⁰) T. H. Benzinger u. R. Hems, Proc. nat. Acad. Sci. USA 42, 896 [1956].

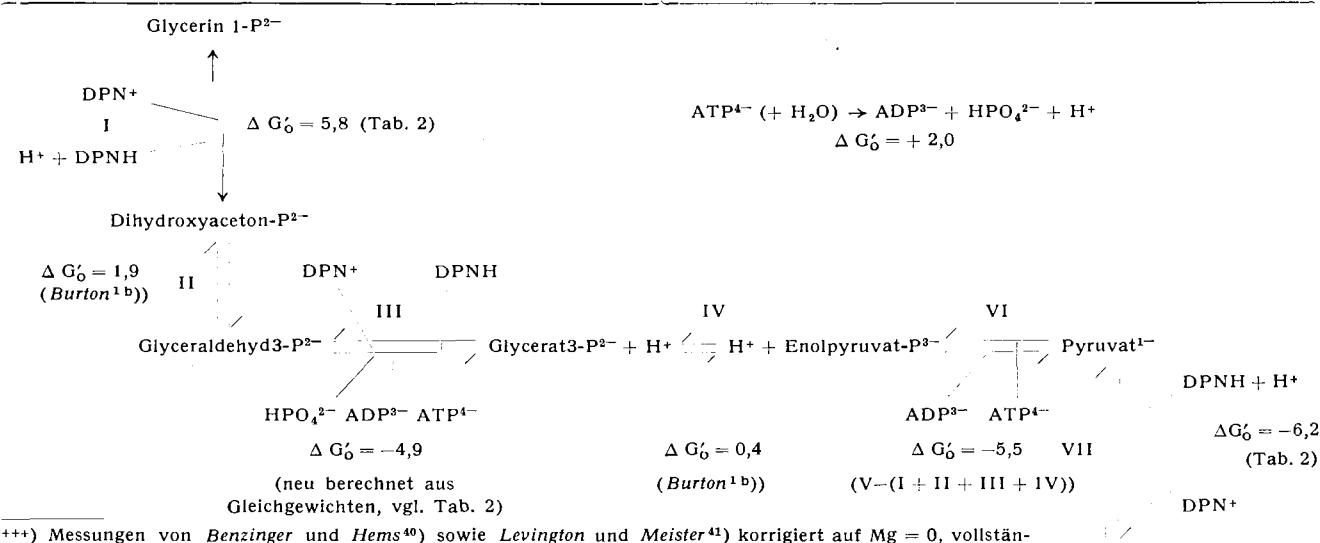
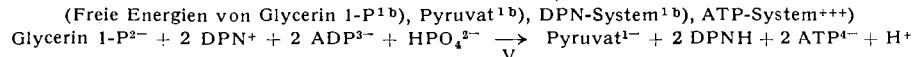
⁴¹) L. Levington u. A. Meister, J. biol. Chemistry 209, 265 [1954].

⁴²) A. E. Martell u. G. Schwarzenbach, Helv. chim. Acta 39, 453 [1956].

Tabelle 5. Energetik im Zusammenhang mit der Oxydationsreaktion der Gärung.

($p_H = 7$, $[Mg] = 0$, 25° , alle Metabolite molar)

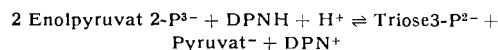
$$\Delta G'_0 = -2,3$$



+++) Messungen von Benzinger und Hems⁴⁰) sowie Levington und Meister⁴¹) korrigiert auf $Mg = 0$, vollständige Dissoziation (mit Hilfe der Konstanten von Martell und Schwarzenbach⁴²)) und $25^\circ C$; $p_H = 0$.

Lactat¹⁻

tionen dieses Apparates ist. Eine Betrachtung des Verhältnisses von Pyruvat zu Enolpyruvat2-P in Abb. 7 veranschaulicht diese Gegebenheiten. Soll nämlich durch Wasserstoff-Entzug „energiereiches“ Phosphat gebildet und nicht umgekehrt durch das frei reversible System^{39, 40} unter Verbrauch von energiereichem Phosphat Kohlenhydrat aus C₃-Säuren gebildet werden,

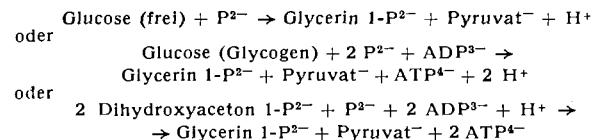


dann sind hohe DPN/DPNH-Quotienten eine essentielle Voraussetzung. Zwar vermögen wir nicht genau zu sagen, inwieweit der Enolpyruvat-P-Gehalt in unseren Bestimmungen dem Spiegel entspricht; für den Muskel wären jedoch in erster Näherung lediglich unspezifische und spezifische Bindungen zu diskutieren, da der mitochondriale Raum in der Skelettmuskulatur, wie bereits gesagt, nur einen geringen Anteil hat.

C-Raum: Glycerin1-P-Pyruvat-Dismutation

Abb. 7 zeigt einen von Sacks⁴³ und Mitarbeitern entdeckten Effekt am Beispiel eines *in situ* unter leichter Äthernarkose tetanisch gereizten Bauchdeckenmuskels: Trotz Anstiegs des Lactat-Gehalts um eine Größenordnung über den Ruhe-Gehalt zeigt der Quotient Lactat/Pyruvat eher fallende als steigende Tendenz.

Die Erklärung für den Mechanismus dieses Effektes, die den Entdeckern entgangen ist, läßt sich aus unserem Experiment ablesen. Sie liegt in der Wirkung der Glycerophosphat-Pyruvat-Dismutation:



Die Stöchiometrie dieser Substratbeziehungen ist bereits zu einem frühen Stadium der Bemühungen um das Reaktionsschema der Glykolyse von den Arbeitskreisen Embdens^{44, 45} und Meyerhofs^{46, 47} klargelegt worden. Der Zuwachs des Pyruvats unter tetanischer Anstrengung entspricht in Abb. 7 mit verblüffender Genauigkeit dem Zuwachs des Glycerin 1-P.

Die zellphysiologische Funktion dieses Konstruktionsprinzips liegt darin, daß durch ein Anheben des Pyruvat-Spiegels das System Lactat/Pyruvat ins Ungleichgewicht gesetzt wird, so daß der – energieliefernden – Oxydationsreaktion der Glykolyse bedeutende Mengen Wasserstoffs (10 Mikromol/gf, in 7 sec.) entzogen werden. Kinetische und energetische Aspekte wirken hier zusammen: die Lactat-dehydrogenase wird durch das Ungleichgewicht beflogelt, und zugleich ein wesentlich höherer Konzentrationsgradient des Lactats über die Zellmembran ausgebildet als bei einem gleichen Anstieg des „Ist-Potential“ im DPN/DPNH-System ohne die Wirkung der Glycerin 1-P-Pyruvat-Dismutation erreichbar wäre. Auf diese Weise wird das energetische Potential der Oxydationsreaktion der Glykolyse gehalten. Möglicherweise werden diese Funktionen noch dadurch vervollkommen, daß sich das Glycerin 1-P-Dihydroxy-acetonphosphat-System im Zustand der Ruhe im Ungleichgewicht befindet. Bei der Auswertung der in der Abbildung verzeichneten q₇-Quotienten

⁴³ J. Sacks u. J. H. Morton, Amer. J. Physiol. 186, 221 [1956].
⁴⁴ G. Embden u. J. Deuticke, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 230, 29, 50 [1934].
⁴⁵ G. Embden u. Th. Ickes, ebenda 230, 63 [1934].
⁴⁶ O. Meyerhof u. D. McEachern, Biochem. Z. 260, 417 [1933].
⁴⁷ O. Meyerhof u. W. Kiessling, ebenda 264, 40 [1933].
⁴⁸ Th. E. Friedemann u. C. J. Baborka, J. Biol. Chemistry 141, 993 [1941].

für das DPN/DPNH-System ist zu berücksichtigen, daß mit dem Anstieg des Lactats eine Anreicherung der Wasserstoff-Ionen verbunden ist. Die Diskussion der komplizierteren Verhältnisse bei „steady state“-Reizung geben wir an anderem Ort²⁷.

Eine weitere, möglicherweise bedeutungsvolle Eigenheit der Glycerin1-P-Pyruvat-Dismutation besteht darin, daß sie, den oben stehenden Reaktionsgleichungen zufolge, in den Pool des Zellphosphats in gleicher Richtung wie die Zellatmung eingreift. Diesen Aspekt zeigen wir am Metabolitmuster der Flugmuskeln der Wanderheuschrecken (Abb. 10 und 11). Eine Besonderheit des Enzymverteilungsmusters dieses als Modell für das Studium der Umsetzung chemischer Energie in mechanische Arbeit besonders geeigneten Gewebes besteht darin, daß im Insektenflugmuskel mangels zureichender Aktivität der Lactat-dehydrogenase (Abb. 12) (im Gegensatz zu den Sprungmuskeln (Abb. 13)) das System Lactat/Pyruvat praktisch bedeutungslos ist. Die in Abb. 10 mit ST eingetragenen Metabolitgehalte betreffen den Zustand nach Beatmung mit Stickstoff für 90 sec. Abb. 11 zeigt die Bilanz. Weitere Einzelheiten sind in den Legenden enthalten.

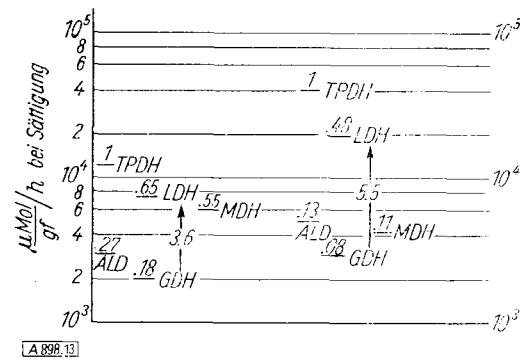


Abb. 13. Hinterbeinmuskel der Ratte und Sprungmuskel der Wanderheuschrecke^{19, 49}: Qualitative Übereinstimmung der Enzymverteilungsmuster (gf = Frischgewicht)

Bei näherer Betrachtung dieser Bilanz fällt auf, daß der Anstieg des Pyruvat-Spiegels hinter demjenigen des Glycerophosphats zurückbleibt. Dieses Phänomen ist inzwischen auch von Kubišta⁵⁰ an Flugmuskeln der Schabe beobachtet worden. Es kommt wahrscheinlich dadurch zu stande, daß das Glycerophosphat/Dihydroxy-acetonphosphat-System Wasserstoff nicht nur aus der Oxydationsreaktion der Glykolyse, sondern auch aus anderen Redoxsystemen der Zelle, möglicherweise sogar aus dem M-Raum aufnimmt. Kubišta konnte einen Anstieg des Acetat-Spiegels beobachten. In unseren Versuchen zeigt sich ein Anstieg des Citrats, Malats und α-Ketoglutarats.

Glykolyse

Von unserem Standpunkt aus gesehen liegt die unmittelbare Ursache für die Erscheinung der Glykolyse im Auftreten eines Konzentrationsgradienten für Lactat über die Zellmembran. Bringt man Gewebe, die im C-Raum über ausreichende Aktivität der Lactat-dehydrogenase verfügen, in ein Lactat-freies Medium, dann werden sie infolge der Permeabilitätverhältnisse so lange Lactat in den Außenraum verlieren, bis die Spiegel des freien Lactats in beiden Räumen ausgeglichen sind. Aus der Verteilung des Lactats und Pyruvats zwischen dem Plasma und den Zellen (vgl. zum Beispiel 5), die in erster Näherung nicht den Gesetzmäßigkeiten der Donnan-Verteilung folgt, darf man schließen, daß diese Säuren undissoziert permeieren. Da die

⁴⁹ A. Delbrück, E. Zebe u. Th. Bücher, ebenda, im Druck.
⁵⁰ V. Kubišta, Biochem. Z. 330, 315 [1958].

Dissoziationskonstanten der beiden Säuren sich um eine Größenordnung unterscheiden, der Anteil der undissoziierten Form am gesamten Lactat also größer ist, darf angenommen werden, daß Lactat dem Pyruvat vorausseilt.

Diese Gegebenheiten treffen nicht nur für jene „Glykolyse“ zu, welche prinzipiell und unabhängig vom Status der Sauerstoff-Versorgung beim Überführen von Geweben in unphysiologische Verhältnisse möglich ist, sondern man beobachtet das Vorauseilen des Lactats auch *in vivo*, z. B. im Blutplasma in den ersten Minuten nach der Beendigung kurz dauernder aber erheblicher Muskelanstrengungen⁴⁸⁾.

Vergleicht man den Zustand des Systems Lactat/Pyruvat im tetanisch gereizten Muskel (Abb. 7) und im Lymphosarkom (Abb. 5), dann zeigt sich, daß es *in vivo* zwei verschiedene Grenztypen von Glykolyse gibt, diejenige, welche (von den oben erörterten kurzzeitigen Schwankungen abgesehen) den Quotienten Lactat/Pyruvat des Plasmas nicht ändert, und diejenige des Tumors, die das Lactat im extrazellulären Raum einseitig anreichert.

Die Ursachen für letztere Gegebenheit sind fraglos komplex. Ein wesentlicher Faktor liegt jedoch in der Diskrepanz zwischen den Aktivitäten der Lactat-dehydrogenase und Glycerophosphat-dehydrogenase, die wir mit Ausnahme der Ascitustumoren in allen bislang untersuchten experimentellen Tumoren feststellen konnten***). Wir wollen es jedoch vermeiden, im Hinblick auf diese Befunde das Problem der Malignität anzuschneiden.

C-Malat-dehydrogenase und M-Malat-dehydrogenase:

Extrahiert man ein und dieselbe Gewebsprobe wiederholt unter steigend aggressiven osmotischen und mechanischen Bedingungen der Desintegration und verfolgt den Gang der spezifischen Aktivitäten von Extrakt zu Extrakt, wie in Abb. 14 dargestellt, dann lassen sich weitgehend sichere Aussagen über die Verteilung der Enzymaktivitäten auf die beiden für uns wesentlichen Zellräume gewinnen⁴⁹⁾. Es ergibt sich auf diese Weise in Bestätigung einer Unter-

*** Dr. Dr. Chr. Hackmann, Institut für experimentelle Pathologie der Farbenfabriken Bayer AG., und Dr. H. Schmidt-Ruppin, Chemotherapeutisches Laboratorium der Farbwerke Hoechst A.G., danken wir auch an dieser Stelle für die Überlassung eines reichen Materials experimenteller Tumortiere. Unseren Kollegen J. Linzbach und E. Henschel, Pathologisches Institut der Universität Marburg, danken wir für die histologische Beurteilung unseres Tumormaterials.

suchung von Christie und Judah^{50a}), daß zur Grundausstattung lebender Zellen zwei Malat-dehydrogenasen gehören, deren eine sich in dem gleichen Raum wie die Enzyme der Glykolyse, deren andere sich in den Mitochondrien befindet. Das Enzym der Mitochondrien ist nach gründlicher mechanischer Zerstörung ohne weiteres mit Wasser extrahierbar.

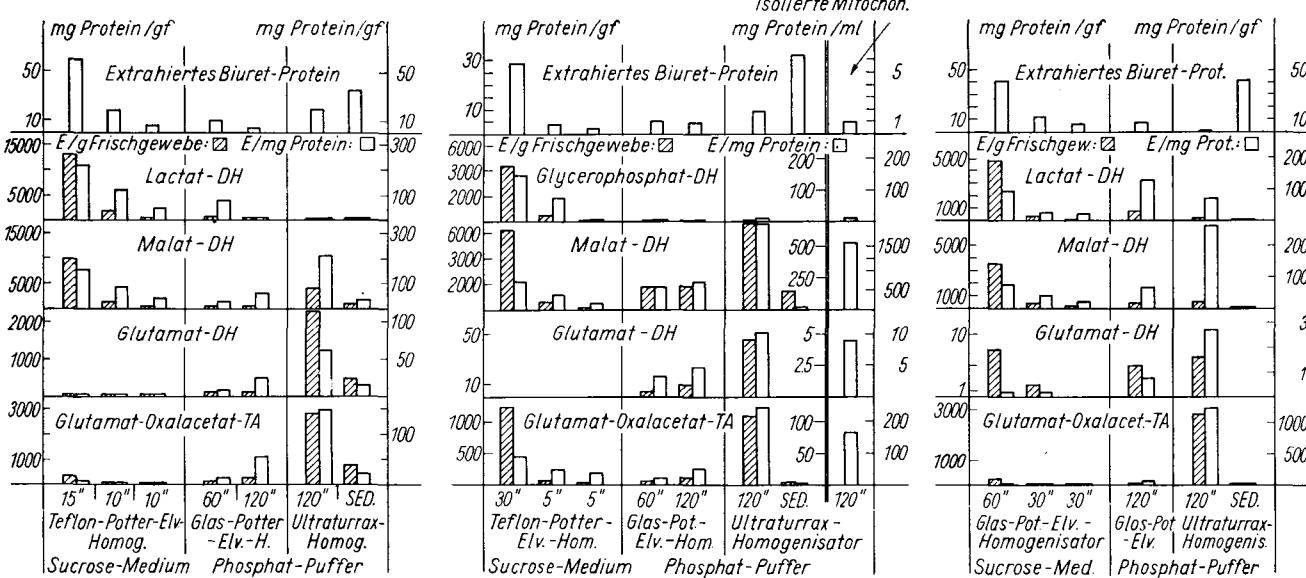
Diese beiden Enzyme katalysieren zwar die gleiche Reaktion mit in erster Näherung gleicher Spezifität, sie unterscheiden sich jedoch in allen von uns bislang untersuchten Eigenschaften, die das Verhältnis zwischen Enzymprotein und Substrat betreffen⁴⁹⁾ (pH-Optimum, DPN-Sulfat-Hemmung, Substrataffinität). Nur das Enzym der Mitochondrien zeigt die in der Literatur⁵¹⁾ beschriebene Hemmung durch Oxalacetat, also sein eigenes Substrat, die sich bereits bei sehr geringen Konzentrationen bemerkbar macht (Abb. 15). Wir finden in den drei von uns bislang untersuchten Geweben (Flugmuskel, Leber und Epitheliom (Geschwulst)) die gleichen qualitativen Unterschiede, ein Umstand der nicht nur die oben geführte Argumentation stützt, sondern auch in zellphysiologischer Hinsicht besonderes Interesse beansprucht.

Die Aktivitäten der beiden Malat-dehydrogenasen, die wir als C-MDH und M-MDH bezeichnen wollen, entsprechen sich gegenseitig in der Größenordnung. Die Enzyme sind jedoch so weitgehend voneinander getrennt, daß man im Rohrzuckerhomogenat fast ausschließlich die Aktivität des C-Enzyms testet.

Der Versuch einer umfassenden Diskussion der Funktionen der C-Malat-dehydrogenase wäre verfrüht. Einen möglicherweise nützlichen Hinweis vermag man jedoch zu gewinnen, wenn man das Redox-Potential des Malat/Oxalacetat-Systems mit denjenigen der anderen Metabolitsysteme der DPN-Gruppe vergleicht (Tab. 2). Es zeigt sich dann, daß bei der hohen Aktivität der Dehydrogenase Oxalacetat in merklichen Konzentrationen nur dann „existieren“ kann, wenn der Quotient DPN/DPNH sehr hohe Werte erreicht. Die Messung am Lebergewebe in Abb. 5 gibt ein Beispiel für diesen Aspekt. Oxalacetat war dort mit den empfindlichsten photometrischen Methoden gerade noch erfassbar.

^{50a} G. S. Christie u. J. D. Judah, Proc. Roy. Soc. [London] 141, 420 [1953].

⁵¹ D. D. Davies u. E. Kun, Biochem. J. 66, 307 [1957].



A 8991 Abb. 14. Gesamtaktivität (schraff. Blöcke, linke Skala) und spezifische Aktivität (helle Blöcke, rechte Skala) in Extrakten bei wiederholter Homogenisation der gleichen Gewebsprobe (Überstand nach 10 Min. bei 10^3 g)¹⁸). Absinken der spezifischen Aktivität bei Enzymen des C-Raums, Anstieg bei Enzymen des M-Raums. Links: Rattenleber; Mitte: Insekten-Flugmuskel (*Locusta*); Rechts: Epitheliom Impftumor (Ratte).

In diesem Zusammenhang erscheint uns die Frage nicht unvernünftig, ob solche Bedingungen im M-Raum unter allen Funktionszuständen gegeben sind. Man findet nämlich in isolierten Mitochondrien bei Mangel an Phosphat-Acceptor (Atmungskontrolle) und im anaeroben

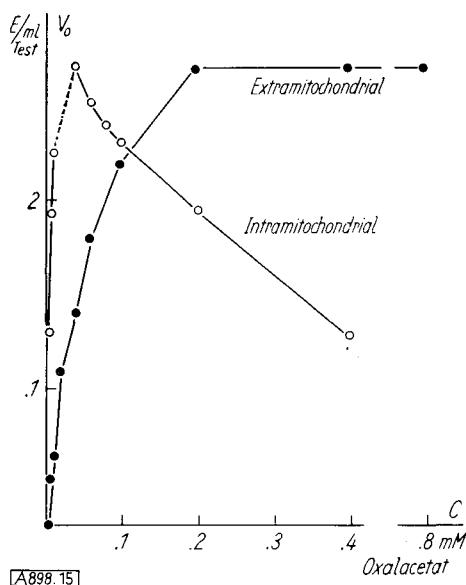


Abb. 15. MDH-*Locusta*-Flugmuskel. C-Malatdehydrogenase (erster Sucroseextrakt in Abb. 14) und M-Malatdehydrogenase (vorletzter Extrakt in Abb. 14)¹⁸). Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Oxalacetatkonzentration.

Zustand praktisch vollständige Reduktion des intramitochondrialen DPN. Mit dem Verschwinden des Oxalacetats, seines Schlüsselsubstrats, würde damit der Citrat-Cyclus zusammenbrechen und müßte bei einem Angebot von Phosphat-Acceptor bei steigender Zelleistung oder bei erneut eintretender Sauerstoff-Versorgung wieder neu aufgebaut werden. Das „Ist-Potential“ des DPN-Systems im C-Raum ist andererseits infolge der gegenseitigen Hilfestellung der Metabolitsysteme der DPN-Gruppe und der Koppelung aller Gewebe und Gewebsteile durch das Lactat/Pyruvat-System im Bereich eines positiven „Ist-Potential“ stabilisiert. Der C-Raum könnte also durch die Aufrechterhaltung eines zwar niedrigen, jedoch konstanten Spiegels von Oxalacetat eine wesentliche Hilfestellung für den Citrat-Cyclus leisten. Die Hemmbarkeit der M-Malatdehydrogenase durch Oxalacetat könnte sich ebenfalls im Sinne einer Stabilisierung dieses fundamentalen Apparats auswirken.

In diesem Zusammenhang erscheint die in Abb. 6 dargestellte merkliche Erniedrigung des „Ist-Potential“ in der DPN-Gruppe des C-Raums in der Leber allokan-diabetischer Ratten bemerkenswert²²), da sich bekanntlich viele der Symptome des Diabetes durch einen Mangel an Oxalacetat erklären lassen.

M-Raum: Glycerophosphat

Wir kennen heute dreierlei verschiedene Stoffwechselbeziehungen der Substanz L-Glycerin 1-P:

1. Die oben erörterte Zugehörigkeit des Redox-Systems Glycerin 1-P-Dihydroxyaceton-P zur DPN-Gruppe des C-Raums.

2. Die zentrale Stellung dieser Substanz im Lipid-metabolismus als Ausgangsprodukt für die Synthese von Glycerin-Phosphatiden und Neutralfetten⁵²⁻⁵⁴) sowie — un-

²²) A. Kornberg u. W. E. Pricer, J. biol. Chemistry 204, 345 [1953].

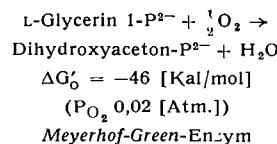
⁵³) S. B. Weiss u. E. P. Kennedy, J. Amer. chem. Soc. 78, 3550 [1956].

⁵⁴) S. B. Weiss, S. Wagner Smith u. E. P. Kennedy, Nature [London] 178, 594 [1956].

mittelbar⁵⁵) oder mittelbar nach Phosphorylierung von Glycerin⁵) — als Abbauprodukt.

3. Die 1918 von O. Meyerhof in extrahierten Muskeln entdeckte „Atmungserregung durch Glycerin-phosphorsäure“⁵⁶), mit der wir uns im folgenden zu befassen haben.

Die Untersuchungen Meyerhofs wurden von Green und seinem Arbeitskreis aufgegriffen⁵⁷⁻⁵⁹), der das strukturgebundene Enzym der Glycerin 1-P-Oxydation in einer größeren Anzahl von Geweben nachgewiesen und das Prinzip der von ihm katalysierten Reaktion dargelegt hat:



Diese Reaktionsgleichung ist in der Folge zunächst von Lardy⁶⁰), in letzter Zeit in mehreren Laboratorien^{19, 61}), in allen Einzelheiten, auch den sterischen belegt worden. Auch in der Isolierung des Enzyms sind Fortschritte erzielt worden^{60, 64}) und möglicherweise ähnelt seine Wirkungsgruppe derjenigen der Succinodehydrogenase.

1956 entdeckte E. Zebe⁶²), daß Glycerin 1-P durch das Homogenat von Insektenflugmuskeln wesentlich intensiver veratmet wird als alle anderen Substrate, die anzubieten nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnisse des Intermediärstoffwechsels sinnvoll erscheint — eine Beobachtung, die um so überraschender war, als bereits bekannte Untersuchungen beispielsweise von Sacktor an Fliegenmuskeln⁶¹) keinerlei Besonderheiten für diese Substanz erwarten ließen.

Die nähere Untersuchung des Effekts^{19, 49}) ergab, daß die Atmung der Homogenate im Bereich physiologisch sinnvoller Substratkonzentrationen der struktur-gebundenen Oxydase zuzuschreiben waren, obwohl der C-Raum der Muskeln über eine auffällig hohe Aktivität der DPN-spezifischen Dehydrogenase verfügt^{19, 63}) (vgl. Abb. 12).

Diese Untersuchungen, welche zur Formulierung des sog. Glycerin 1-P-Cyclus führten (vgl. 568 und Abb. 16), geben in mehreren Arbeitskreisen Anlaß, die zellphysiologischen Funktionen der Glycerin 1-P-Enzyme unter den Aspekten des energieliefernden Stoffwechsels auf breiter Basis zu untersuchen^{50, 61, 61a, 73}).

Verständlicherweise nehmen die in dieser Hinsicht in unserem Arbeitskreis erzielten Ergebnisse in den folgenden Erörterungen des Netzwerks der Redox-Systeme im M-Raum in manchen Abschnitten eine Vorrangstellung ein. Dies ist umso eher zu vertreten, als einerseits viele grundsätzliche Gegebenheiten der Atmungskette unabhängig von der Natur des veratmeten Substrats sind und andererseits die über das Glycerin 1-P mitgeteilten Ergebnisse

⁵⁵) R. M. C. Dawson, Biochem. J. 62, 689 [1956], 64, 192 [1956].
⁵⁶) O. Meyerhof, Arch. Physiol. 175, 20 [1919].

⁵⁷) D. E. Green, Biochem. J. 30, 629 [1936].

⁵⁸) D. E. Green, J. G. Dewan, ebenda 37, 1069 [1937].

⁵⁹) J. G. Dewan u. D. E. Green, ebenda 37, 1074 [1937].

⁶⁰) T. C. Tung, L. A. Anderson u. H. A. Lardy, Arch. Biochem. Biophysics 40, 194 [1952].

⁶¹) B. Sacktor u. D. G. Cochran, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 26, 200 [1957].

^{61a}) B. Sacktor u. R. Estabrook, Fed. Proc. 17, 301 [1958].

⁶²) E. Zebe, Experientia [Basel] 12, 68 [1956].

⁶³) E. Zebe u. W. H. McShan, J. gen. Physiol. 40, 779 [1957].

⁶⁴) L. Ringer u. T. P. Singer, Fed. Proc. 17, 297 [1958].

noch nicht veröffentlicht wurden, während für das Verhalten anderer Substrate eine größere Anzahl ausgezeichneter Zusammenstellungen in der Literatur zu finden sind⁶).

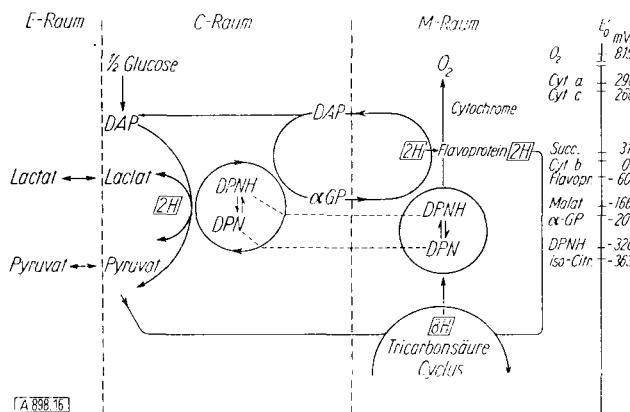


Abb. 16. „Glycerin-1-P-Cyclus“¹⁹⁾

Gleiches läßt sich über die Mitochondrien der Flugmuskeln, welche im folgenden neben diejenigen der Leber gestellt werden, sagen.

Steuerung des Wasserstoff-Umsatzes durch Atmungskontrolle

Es gibt eine Vielfalt von möglichen Steuerungsmechanismen der Atmung (vgl. 66)). Der wichtigste und hier ausschließlich mit Atmungskontrolle bezeichnete Mechanismus besteht in der Kopplung der Atmungsgeschwindigkeit mit der oxydativen Phosphorylierung. Hierbei wird der Elektronenfluß der Atmungskette durch die Überführung von Phosphat in energiereiche Bindung gesteuert. Ohne den Phosphat-Acceptor ADP ist die Atmungskette in Gegenwart von Substrat und Sauerstoff blockiert, so daß keine Verluste der an ihr entwickelten freien Energie entstehen. Sobald ADP aus einem energieverzehrenden Prozeß an die Atmungskette gelangt, wird es in ATP überführt und löst damit die Atmung aus.

Die Funktion der Atmungskontrolle an isolierten Rattenleber-Mitochondrien ist zuerst von Lardy und Wellmann⁶⁷) beschrieben worden. Chance und Williams^{6,68)} gelang es, einen wesentlichen Einblick in den Mechanismus der Atmungskontrolle und oxydativen Phosphorylierung zu gewinnen. Untersuchungen ähnlicher Art und die Funktion der Atmungskontrolle seien am Beispiel der Glycerin 1-P-Atmung von intakten *Locusta*-Flugmuskel-Mitochondrien besprochen⁶⁵). Die Spezialisierung des Flugmuskels auf den oxydativen Stoffwechsel, die daraus resultierende hohe Mitochondriendichte des Gewebes und die große Aktivität der Glycerin 1-P-Oxydation erweckten besonderes Interesse an den Eigenschaften der Flugmuskelmitochondrien. Es gelang uns, Mitochondrien aus *Locusta*-Flugmuskel unter geeigneten Bedingungen zu gewinnen, die mit Glycerin 1-P und den Tricarbonsäure-Cyclussubstraten Atmungskontrolle aufweisen.

Die Ausrüstung dieser Mitochondrien mit den Komponenten der Atmungskette wird durch ein Differenzspektrum in Abb. 17 gezeigt, in dem die Differenz der mit Glycerin 1-P und ADP anaerob reduzierten und in Gegenwart eines Überschusses von ADP völlig oxydierten Atmungskette registriert ist. Das untere Spektrum zeigt die von Rattenlebermitochondrien her bekannten Absorptions-

maxima⁶). Die Absorptionsbande der Pyridinnucleotide ist allerdings viel schwächer und verschmilzt mit einer von uns als Cytochrom c δ -Bande identifizierten Absorptionsbande zu einem Maximum bei 320 m μ . Rattenherz-Mitochondrien besitzen ein ähnliches Absorptionsmaximum,

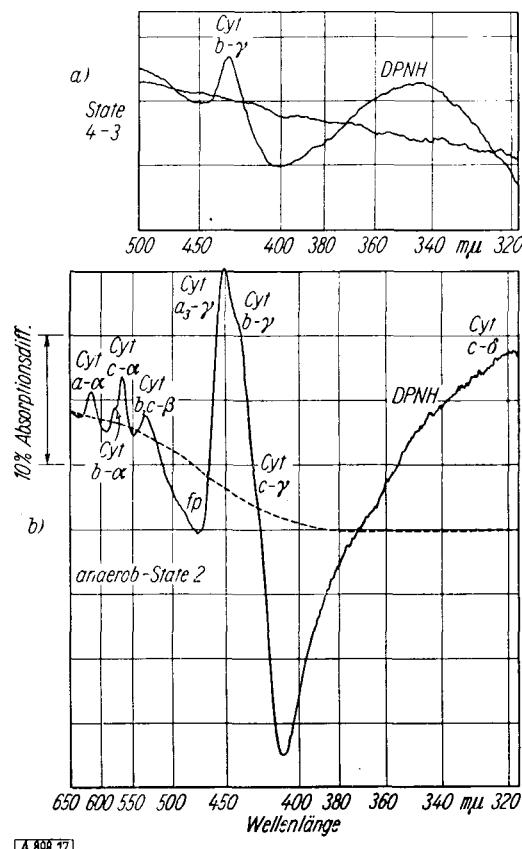


Abb. 17. Glycerin 1-P + $\frac{1}{2}$ O₂ → Dihydroxyaceton-P + H₂O
 in Flugmuskelmitochondrien: Differenzspektren verschiedener Zu-
 stände der Atmungskette^{65).}
 Unten: Anaerob mit Substrat gegen aerob ohne Substrat (alle Kom-
 ponenten der Atmungskette sind über 95 % reduziert); (Basislinie
 gestrichelt)

Meßküvette: mit α GP (2 mM) (anaerob)	sonst gleiche Zusammensetzung: 0,85 mg Prot./ml, ADP 1,5 mM, HPO ₄ ²⁻ 2 mM, Mg^{2+} 2 mM, EDTA 1 mM, TRAP 10 mM, pH 7,2, 25 °C
Vergleichsküvette: ohne α GP (aerob)	
Oben: Zustand mit Substrat unter Atmungskontrolle (Cytochrom b zu 65 % und DPNH fast vollständig reduziert).	
Meßküvette mit α GP, ohne ADP (state 4 nach Chance)	
Vergleichsküvette mit α GP, mit ADP (1,5 mM)	sonst gleiche Zusammensetzung, vgl. oben
Registrierung unmittelbar nach ADP-Zusatz. Basislinie nach Zugabe von ADP zur Meßküvette	

das von *Holton* und Mitarbeitern^{69, 70}) — nach unserer Ansicht auf Grund der vorstehend beschriebenen Experimente irrtümlicherweise — für gebundenes DPN gehalten wurde (vgl. auch⁶). Tatsächlich würde die Anwendung der von *Holton* benutzten Bedingungen auf unsere Präparationen das DPNH aus dem Differenz-Spektrum eliminieren, da das DPN im Aeroben ohne ADP (Status 4) und im Anaeroben fast völlig reduziert ist. Es gelang, das mitochondriale DPN der Flugmuskeln eindeutig in den Differenzspektren zwischen dem ruhenden (Status 4) und aktiv phosphorylierenden Status 3 zu identifizieren (Abb. 17 oben). Sein Absorptionsmaximum liegt genau bei 340 m μ , da das Cytochrom c infolge einer viel geringeren Absorptionsdifferenz zwischen den beiden Zuständen nicht mehr inter-

⁶⁵⁾ M. Klingenberg, E. Ritt u. Th. Bücher, Biochem. Z., im Druck.
⁶⁶⁾ H. A. Lardy, Vortrag auf dem 3. Internat. Kongreß für Biochemie Brüssel, August 1955

⁶⁷⁾ H. A. Lardy u. H. Wellmann, Brüssel, August 1955.

⁶⁷) H. A. Lardy u. H. Wellmann, J. biol. Chemistry 195, 25 [1952].
⁶⁸) B. Chance u. G. R. Williams, ebenda 217, 409 [1955].

⁷ B. Charles & G. R. Williams, *ebenda* 277, 405 [1955].

⁶⁹) E. A. Holton, Biochem. J. 64, 57 [1956].

⁶⁹) F. A. Holton, Biochem. J. 64, 57 [1956].
⁷⁰) F. A. Holton, W. C. Hülsmann, D. K. Myers u. E. C. Slater, ebenda 67, 591 [1958].

feriert. In gleicher Weise konnte von *Chance*⁷⁾ das DPNH in Herzmuskel-Mitochondrien nachgewiesen werden. Das DPNH des M-Raumes besitzt somit das gleiche Absorptionsmaximum wie freies DPNH.

Abb. 18 zeigt an einem Beispiel, wie die Redox-Zustände und die Kinetik der einzelnen Komponenten der Atmungskette unter dem Einfluß von Substrat und ADP in Beziehung stehen. Die gleichzeitige Bewegung von Wasser durch die Mitochondrienmembran wird durch die Regi-

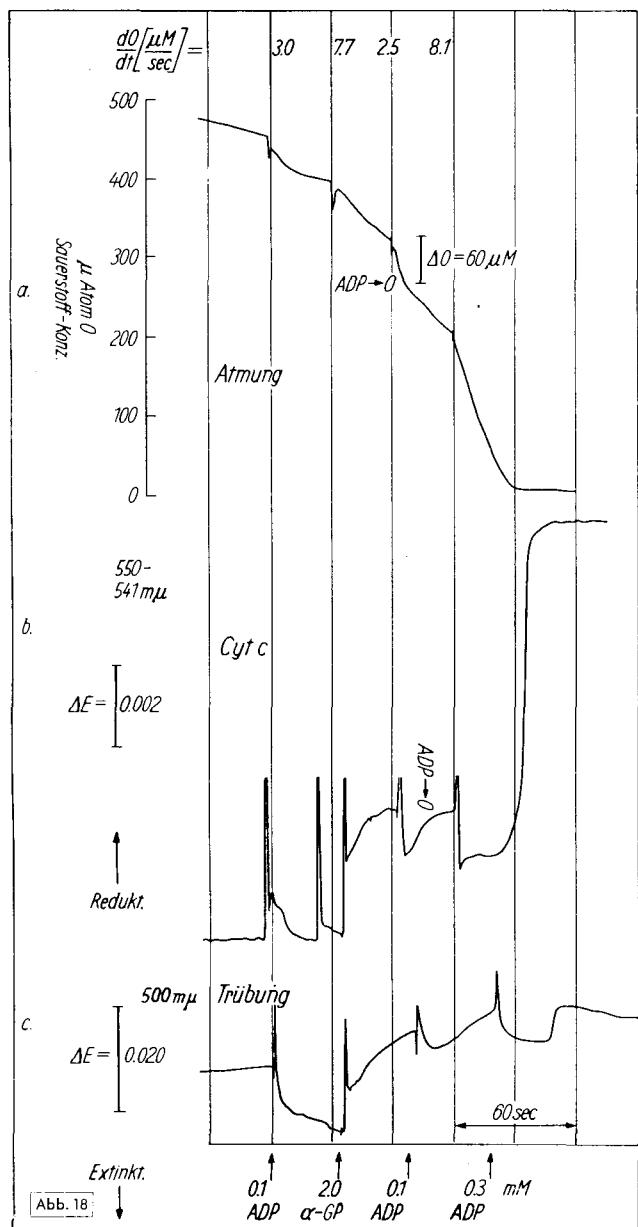


Abb. 18. Sauerstoff-Verbrauch (Atmungskontrolle), Cytochrom c-Kinetik und Schwellungsgrad von Flugmuskelmitochondrien mit Glycerin 1-P⁶⁵). Zusammensetzung der Suspension: 0,85 mg Prot./ml Mitochondrien in 0,3 M Saccharose, 0,01 TRA-Puffer, 2 mM PO₄, 2 mM MgCl₂, pH 7,2; 25°C

- a. Atmungsregistrierung mit der rotierenden Platinenelektrode. Die Atmungsgrößen sind den entspr. Kurvenabschnitten zugeordnet.
- b. Kinetik und Cytochrom c. Registrierung der Absorptionsdifferenz zwischen dem Cyt. c-α-Maximum bei 550 mμ und dem isosbestischen Punkt bei 541 mμ mit dem Doppelstrahlspektrophotometer. (Die Spitzen der Registrationskurve sind Röhreffeekte bei Zugeabe der Substrate).
- c. Schwellung der Mitochondrien. Registrierung bei einer von spezifischen Absorptionsänderungen relativ unabhängigen Wellenlänge mit dem Doppelstrahlspektrophotometer.
Abnehmender Extinktion entspricht eine Zunahme der Schwel lung. Die zugegebenen Volumina der Substratlösungen pro ml Suspension betragen 1 μL je 0,1 mM ADP, 2 μL für 2 mM α-GP. Der pro μL erzeugte Verdünnungseffekt von ΔE = -0,003 ist jeweils zu berücksichtigen. Die unterschiedliche Kinetik in B und C bei ADP-Zugabe läßt auf Wasserbewegungen schließen. Bei Anaerobiose (O₂ → O) Störung durch eine spezifische Absorptionsänderung.

striierung der Trübung demonstriert (vgl. auch^{7b, 72}). Die enge Kopplung des Redox-Zustandes von Cytochrom c mit der Atmungsgeschwindigkeit ist offensichtlich. ADP-Zugabe bei Beginn erschöpft das unter starker Atmungskontrolle stehende endogene Substrat. Die anschließend registrierten Effekte sind dann nur noch dem Glycerin 1-P als Substrat zuzuschreiben. Als ein Maß für die Kopplung der Atmung mit der oxydativen Phosphorylierung kann man (nach⁷¹) den Quotienten der Atmung unter ADP-Sättigung und nach ADP-Verbrauch ansehen. Er beträgt hier 3, während in vivo für den Flugmuskel beim Übergang Ruhe-Flug ein Quotient von mindestens 20 beobachtet wird. Man muß annehmen, daß die geringere Atmungskontrolle in isolierten Mitochondrien auf eine Schädigung bei der Isolierung aus dem Gewebe zurückzuführen ist. (Dafür sprechen auch die unten mitgeteilten Messungen des P/O-Quotienten der Mitochondrien.) Unter dem Vorbehalt, daß dies zutrifft, ist auch für den Insektenflugmuskel der gleiche Mechanismus der Atmungskontrolle nachgewiesen, wie er bisher für Leber und Herz von Warmblütern postuliert wurde. Eine Kontrolle der Atmung durch einen Metallkomplexbildner wie er von *Sacktor* und *Estabrook*^{61a, 73} für Flugmuskelmitochondrien gefordert wird, ist nunmehr unwahrscheinlich geworden, wenn auch gewisse Zusammenhänge zwischen der Funktion des Glycerin 1-P-oxydierenden Systems und divalenten Kationen bestehen.

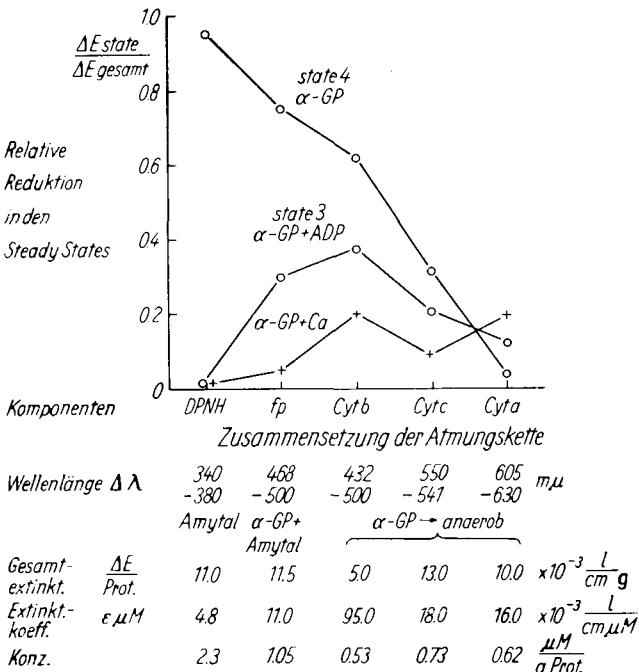


Abb. 19.

Abb. 19. Die Atmungskette in Flugmuskelmitochondrien. Zusammenfassung der mit dem Doppelstrahlspektrophotometer erhaltenen Daten (zur Versuchstechnik vgl. Abb. 18)⁶⁵). Der Reduktionsgrad in den einzelnen Zuständen der verschiedenen Komponenten ist auf die Maximalextinktion (in der Abbildung: Gesamtextinktion) bezogen, welche für jede Komponente durch eine Reduktionsreaktion ermittelt wurde, die Fremdextinktionen ausschließt.

Eine Zusammenstellung der mit dem Doppelstrahlspektrophotometer gemessenen stationären Zustände der Komponenten der Atmungskette demonstriert den Zusammenhang mit der oxydativen Phosphorylierung (Abb. 19). Die Atmungskette, versorgt mit Glycerin 1-P, aber nicht phosphorylierend (Status 4), also mit relativ geringem Elektronenfluß, weist vom Cytochrom a bis zum DPN

⁷¹) B. Chance u. M. Balscheffsky, ebenda 68, 283 [1958].

⁷²) B. Chance u. L. Packer, ebenda 68, 295 [1958].

⁷³) R. W. Estabrook, B. Sacktor u. B. Chance, XVth Internat. Congress of Zoology, Sect. VI, Paper 57.

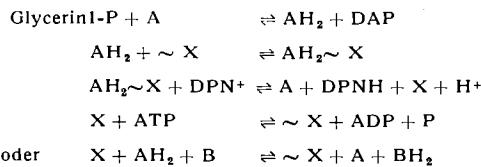
einen steigenden Reduktionsgrad auf. ADP-Zugabe erhöht den Elektronenfluß und bewirkt eine Oxydation aller Komponenten bis auf Cytochrom a, das partial reduziert wird. Der zwischen Cytochrom c und Cytochrom a liegende Umkehrpunkt stellt nach einer von *Chance* und *Williams*⁶⁾ unter gewissen Voraussetzungen entwickelten Theorie einen unmittelbar an der oxydativen Phosphorylierung beteiligten Reaktionsschritt dar. Nach dieser Theorie speichern die reduzierten Komponenten der Atmungskette Energie in Form von den Elektronentransport blockierenden, energiereichen Intermediärverbindungen.

Die Zugabe von ADP spaltet die Intermediärverbindungen in Gegenwart von anorganischem Phosphat unter Bildung von ATP und gibt damit den Elektronentransport frei. Die Lokalisierung weiterer Schritte der oxydativen Phosphorylierung an der Atmungskette hängt von dem Angriffspunkt des Glycerin1-P ab. Auf Grund des Normalpotentials von Glycerin1-P zwischen DPN und Flavoprotein ist man geneigt, letzteres als dehydrierende Gruppe der Glycerin 1-P-Oxydase anzunehmen. Außerdem lassen sich (beispielsweise durch Extraktion mit Wasser) Glycerin1-P-Oxydase-Präparationen gewinnen, die kein DPN besitzen, aber mit den übrigen Komponenten der Atmungskette ausgestattet sind. Da man zwei Schritte der oxydativen Phosphorylierung zwischen Flavo-Protein und Sauerstoff annimmt, muß man wie für Succinat auch für Glycerin 1-P einen maximalen P/O = 2 setzen. Die in Abb. 18 demonstrierte Messung ergibt einen P/O = 1,65. Dies zeigt, daß die hier verwandten Mitochondrien oxydative Phosphorylierung mit guter Ausbeute ausführen. Folgende Befunde deuten darauf hin, daß der zweite Schritt der mit der Glycerin 1-P-Oxydation verbundenen oxydativen Phosphorylierung am Flavoprotein oder Cytochrom b stattfindet.

Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung

Unter ADP-Mangel wird das DPN von Atmungskontrolle führenden Mitochondrien durch Glycerin 1-P zu 70 bis 90% reduziert. Dies ließ sich durch enzymatische Analyse nachweisen und ist bereits im Differenzspektrum der Abb. 17 oben angedeutet. Die weitgehende Reduktion des DPN durch Glycerin1-P muß in Anbetracht des um etwa 100 mV über dem DPN liegenden Normalpotentials von Glycerin1-P unter Verbrauch freier Energie stattfinden (vgl. auch⁷⁴⁾). Die zusätzliche Energie wird den mit der oxydativen Phosphorylierung gekoppelten Reaktionen entnommen. Dabei bleibt es offen, ob es sich um eine vollständige Umkehrung der oxydativen Phosphorylierung unter Verbrauch von ATP handelt oder hier die Reversibilität der Bildung energiereicher Zwischenverbindungen ($\sim X$) demonstriert wird, die sich bei Glycerin1-P-Angebot an der Atmungskette ausbilden. Eine mögliche Reaktionsfolge sei hiermit angeführt: Glycerin1-P reduziert eine Komponente (A) der Atmungskette, wahrscheinlich ein Flavoprotein, die ebenfalls in DPN-freien, Glycerin1-P oxydierenden Präparationen vorkommt. Diese Komponente erreicht einen hohen Reduktionsgrad nur bei Hemmung der Atmung unter ADP-Mangel. Durch Verbindung mit einem energiespeichernden Intermediärprodukt der oxydativen Phosphorylierung ($\sim X$) geht die reduzierte Komponente (AH_2) selbst in einen energiereichen Zustand ($AH_2 \sim X$) über, der sie zur Reduktion des DPN befähigt. Somit wird die sonst in Gegenwart von ADP der oxydativen Phosphorylierung zugeführte Energie

in der Reduktion des DPN gespeichert. Folgendes Schema gibt diese Reaktionen wieder:



Die Impermeabilität der Mitochondrien-Membran für Diphosphopyridin-nucleotid

Da die umhüllende Doppelmembran die Mitochondrien vom Cytoplasma abtrennt, können ihre Permeabilitäts-eigenschaften den Weg des Wasserstoffs wesentlich beeinflussen. Die Isolierung der funktionstüchtigen Mitochondrien durch Zellfraktionierung hängt zum Teil von der Impermeabilität der Membran für die mitochondrialen Co-fermente ab. Daraus kann man umgekehrt schließen, daß die Membraneigenschaften von isolierten, funktionstüchtigen Mitochondrien dem physiologischen Zustand nahe kommen.

Funktionstüchtige (intakte) Mitochondrien-Präparationen sollen folgende Eigenschaften erfüllen: Sie oxydieren die Tricarbonsäure-Cyclussubstrate ohne Zusatz von Coenzymen. Sie besitzen einen hohen Grad von Atmungskontrolle, d. h. die Atmung verlangsamt sich wesentlich nach Erschöpfung des Phosphat-Acceptors. Sie führen die oxydative Phosphorylierung mit hoher Ausbeute aus. Bisher sind diese Kriterien nur für Mitochondrien aus Leber, Herzmuskel und Insektenflugmuskel nachgewiesen worden^{65, 67, 70, 71, 75}.

Von *Lehninger*⁷⁶⁾ wurde zuerst auf die selektive Permeabilität intakter Rattenlebermitochondrien für Wasserstoff-Donatoren hingewiesen. Er beobachtete, daß exogenes DPNH nur sehr langsam im Vergleich zu β -Hydroxybutyrat veratmet wird. Durch die Zugabe von Cytochrom c konnte ein sog. äußerer, nicht phosphorylierender Oxydationsweg für das exogene DPNH erschlossen werden. Wenn die Mitochondrien vorsichtig einem hypotonen Schock ausgesetzt werden, veratmen sie auch das exogene DPNH ohne Zusatz von Cytochrom c, nun unter Bildung von energiereichem Phosphat. Dieser innere Oxydationsweg steht bei intakten Mitochondrien offenbar nur dem endogenen DPNH zur Verfügung, das in den Mitochondrien von hineindiffundierenden Substraten reduziert wird. Diese Permeabilitätseigenschaften würden eine Blockierung des cytoplasmatischen DPNH von der Atmungskette bedeuten und umgekehrt ein Herausdiffundieren des mitochondrialen DPNH verhindern.

Daher läßt sich ein hoher Pyridinnucleotid-Gehalt nur in intakten, Atmungskontrolle führenden Mitochondrien nachweisen. Man muß annehmen, daß zumindest ein Teil der Pyridinnucleotide nicht frei im M-Raum diffundieren kann, sondern in enger Bindung mit spezifischen (aktiven) Orten steht.

Mitochondrien von	Cyt. c/Prot. μM g	DPN/Prot. μM g	DPN/Cyt. c	TPN/Prot. μM g	TPN/Cyt. c
Rattenleber	0,3	2,2	7,0	3,6	13
Locusta					
Flugmuskel ..	0,75	4,0	5,3	<0,2	<1
Rattenherz ⁷¹⁾ ..	0,45	2,0	3,3	—	—

Tabelle 6
Pyridinnucleotid-Gehalt in Mitochondrien⁷⁸⁾

⁷⁵⁾ M. Rabinovitz, M. P. Stuhberg u. P. D. Boyer, Science [Washington] 114, 641 [1951].

⁷⁶⁾ A. L. Lehninger, Harvey Lectures 12, 176 [1955].

⁷⁴⁾ B. Chance u. G. Hollunger, Fed. Proc. 16, 703 [1957].

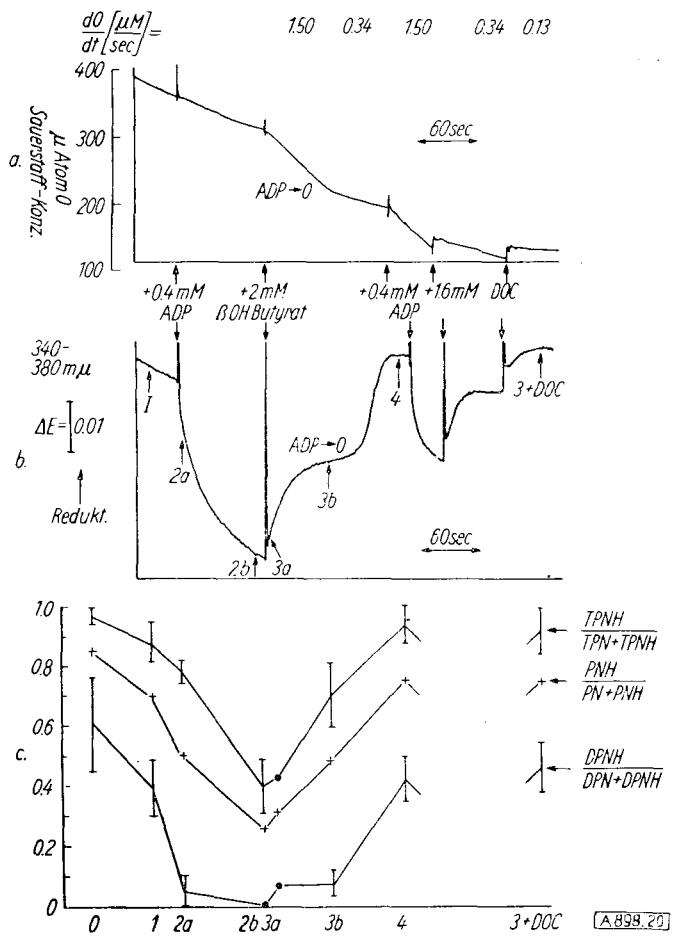


Abb. 20. Pyridinnucleotide in Leber-Mitochondrien bei verschiedenen Zuständen⁷⁸⁾. Zusammensetzung der Suspension: 2,1 mg Prot./ml Rattenleber-Mitochondrien, 0,25 M Saccharose, 0,01 TRA-Puffer, 4 mM PO₄, 6 mM MgCl₂, pH 7,2, 25 °C.

- a. Atmungsregistrierung mit der rotierenden Platinelktrode. Die Atmungsgrößen sind den entsprechenden Kurvenabschnitten zugeordnet.
- b. Kinetik und Steady States der Pyridinnucleotide, registriert mit dem Doppelstrahlspktrophotometer (Meßstrahl 340 m μ , Vergleichsstrahl 380 m μ). DOC = Desoxycorticosteron.
- c. Analyse auf Pyridinnucleotide. Für jede Analyse wurde zu der mit Pfeilen gekennzeichneten Zeit der Fig. B in der Küvette je ein Ansatz alkalisch oder sauer inaktiviert. In dem neutralisierten Überstand wurde auf DPN, TPN, DPNH und TPNH mit enzymatischen Testen analysiert. Enzymatische TPNH-Bestimmung mit Glutathion-dehydrogenase (Delbrück, unveröffentlicht). Die Striche entsprechen der Streuung von Messungen an 5–8 verschiedenen Mitochondrien-Präparationen. Die Linien stellen die Verbindung der Mittelwerte dar. Der Reduktionsgrad der Pyridinnucleotide ist in der Kurve PNH/PN + PNH (PN = DPN + TPN usw.) aus den Mittelwerten der einzelnen berechnet.

Pyridinnucleotid-Gehalt des M-Raums

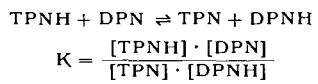
In der Tab. 6 ist eine Zusammenfassung der Pyridinnucleotid-Gehalte von drei Atmungskontrolle führenden Mitochondrien-Präparationen zusammengestellt. Der Pyridinnucleotid-Gehalt ist sowohl auf den Protein- als auch auf den Cytochrom-c-Gehalt bezogen. Dieser letztere Wert gibt das Verhältnis der Pyridinnucleotide zur Atmungskette wieder. Die Angaben für Leber und Flugmuskel sind Mittelwerte aus einer Reihe von enzymatischen, am enteiweißten Extrakt durchgeführte Analysen. Der Wert für Herzmuskel-Mitochondrien wurde den spektroskopischen Bestimmungen⁷¹⁾ entnommen. Er würde also auch den TPN-Gehalt einschließen. Die große Ähnlichkeit der Differenzspektren von Herzmuskel-Mitochondrien und Flugmuskel-Mitochondrien macht jedoch wahrscheinlich, daß fast alles im Herzmuskel beobachtete Pyridinnucleotid aus DPN besteht. Wir vermuten also, daß das Fehlen wesentlicher Mengen TPN typisch für Muskel-Mitochondrien ist. Die Analyse an Lebermitochondrien steht in guter Überein-

stimmung mit den von Kaplan und Mitarbeitern⁷⁷⁾ erhaltenen Werten, soweit die Umrechnung als zuverlässig angesehen werden darf.

Redoxstatus der Pyridinnucleotide im M-Raum

Die Trennung des C-Raums und M-Raums durch eine für DPNH als impermeabel erwiesene Membran ermöglicht ein vom C-Raum abweichendes Redoxpotential der Pyridinnucleotide im M-Raum. Im folgenden sei versucht, das Redox-Potential des DPN- und TPN-Systems sowie ihre Kopplung miteinander mit Hilfe der in Abb. 20 beschriebenen Versuche zu ermitteln⁷⁸⁾. Im Gegensatz zu den Untersuchungen am C-Raum werden hier die Redox-Zustände am isolierten M-Raum durch direkte enzymatische Analyse der Pyridinnucleotide bestimmt, so daß zwischen gebundenem und freiem PN nicht unterschieden wird. Die Bestimmung der Redox-Potentiale der mitochondrialen Pyridinnucleotid-Systeme erfordert aber – wie oben erörtert – die Kenntnis der Spiegel der oxydierten und reduzierten Form. Diese lassen sich prinzipiell bei Berücksichtigung der Bindungskonstanten der Pyridinnucleotide an den Enzymen aus den Gehaltsbestimmungen berechnen. Da wir hierüber kaum Daten für die mitochondrialen Enzyme besitzen, wird der Versuch unternommen, über den bereits für den C-Raum eingeschlagenen Weg der Substratspiegelmessung eines mit dem DPN-System im Gleichgewicht stehenden Redox-Paares auf das DPN-Redox-Potential zu schließen. Hierzu dient das TPN-System, das mit dem DPN-System im Gleichgewicht steht, und für dessen Normalpotential eine Annahme eingeführt wird. Das über die Gleichgewichtskonstante errechnete effektive Normalpotential E_0^* (vgl. S. 559) des DPN gestattet die Anwendung der Nernstischen Formel auf die Gehalte von DPN und DPNH zur Berechnung des Redox-Potentials des DPN-Systems.

Bei der Analyse der Abb. 20 muß man unterscheiden zwischen den echten stationären Zuständen (State 1, 3b, 4 und 3+ DOC), in denen man ein Gleichgewicht zwischen dem DPN- und TPN-System vermuten kann, und den Übergangszuständen (2a, 2b, 3a), die die Auf trennung und kinetische Kopplung des DPN und TPN-Systems demonstrieren. Aus Abb. 20c geht hervor, daß das TPN-System unter sämtlichen Bedingungen einen höheren Reduktionsgrad aufweist als das DPN-System. Das Verhältnis der Reduktionsgrade der beiden Systeme ist unabhängig vom angebotenen Substrat wie Versuche mit Succinat und Pyruvat-Malat zeigten. Offenbar stehen das DPN- und TPN-System im Gleichgewicht miteinander über die Transhydrogenase-Reaktion.



Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion läßt sich aus den Reduktionsgraden der stationären Zustände berechnen. Sie beträgt für die stationären Zustände 1, 4 und 3+ DOC; $K = 11$. Damit würde das effektive Normalpotential des mitochondrialen DPN-Systems um 30 mV zum Negativen verschoben sein gegenüber dem TPN-System. Wenn man die Annahme einführt, daß das Normalpotential des mitochondrialen TPN-Systems gleich dem des freien TPN ist, läßt sich das Normalpotential E_0^* des DPN-Systems zu $E_0^* = -324 - 30 = -354$ mV berechnen. Die Verschiebung des DPN-Normalpotentials E_0^* um weitere -10 mV beim Übergang vom inaktiven Status 4

⁷⁷⁾ B. K. Jakobson, N. O. Kaplan, J. biol. Chemistry 226, 603 [1956].

⁷⁸⁾ M. Klingenberg u. W. Stenzka, Biochem. Z., im Druck.

zum phosphorylierenden Status 3, in dem $K = 22$ wird, deutet auf die enge Kopplung des DPN mit der oxydativen Phosphorylierung hin.

Wie sich diese Ergebnisse mit der von *Chance* und Mitarbeitern⁸⁰⁾ entwickelten Theorie, daß das mitochondriale DPNH im Status 4 in einer energiereichen Verbindung vorliegt, vereinbaren lassen, bleibe dahingestellt. Die Ergebnisse widersprechen dem von *Chance* und Mitarbeitern⁷⁹⁾ auf Grund spektroskopischer Messung erhobenen Befund, daß das DPNH im Status 4 mindestens zu 99% reduziert vorliegt. Tatsächlich findet, wie auch von *Chance* und Mitarbeitern argumentiert, eine nur geringfügige weitere Reduktion des DPN beim Übergang in den anaeroben Zustand statt. Ein Reduktionsgrad von über 60% wurde nur im Status 0 der Mitochondrien vor der Inkubation, in welchem sie durch endogenes Substrat anaerob gehalten werden, oder im nichtphosphorylierenden Status 4 mit Succinat als Substrat beobachtet.

Es ist wahrscheinlich, daß das DPN-System wie im C-Raum so auch im M-Raum über DPN-spezifische Dehydrogenasen mit entsprechenden Substrat-Redox-Paaren im Status 4 und im Anaeroben im Gleichgewicht steht. Redox-Paare mit einem Normalpotential in der Nähe des mitochondrialen DPNs bilden Isocitrat-Ketoglutarat und β -Oxybutyrat-Acetoacetat. Substratbestimmungen an diesen Systemen würden die Existenz dieses Gleichgewichts bestätigen. Der höchste Reduktionsgrad mitochondrialen DPNs mit 70–90% Reduktion wurde bisher in den intakten Flugmuskel-Mitochondrien mit Glycerin 1-P als Substrat beobachtet. Zusammen mit dem Reduktionsgrad des DPN von 70% mit Succinat als Substrat in Lebermitochondrien weist dies auf das negative Potential der energiereichen Zwischenverbindung hin (vgl. oben), die diese Substrate an der Atmungskette bilden. Es erweist sich also, daß im M-Raum das DPN- und TPN-System, anders als im C-Raum, durch die Gegenwart der Transhydrogenase auf gleichem Redox-Potential liegen. Das effektive Redox-Potential liegt mit -356 mV im Status 4 und -334 mV im Status 3 erheblich unter dem Redox-Potential des DPN-Systems und über dem Redox-Potential des TPN-Systems im C-Raum.

Der kinetische Zusammenhang zwischen den beiden Pyridinnucleotid-Systemen wird durch die DPN-TPN-Analyse an den Übergängen von einem Status in den anderen erfaßt. Bereits bei der Registrierung der Pyridinnucleotid-Absorption mit dem Doppelstrahlphotometer bemerkte man, daß bei Zugabe von ADP zu Mitochondrien im Status 1 oder Status 4 eine rasche Oxydation der Pyridinnucleotide (Status 2a) stattfindet, die eine weitere langsame Oxydation über mehrere Minuten nach sich zieht (Status 2b). Auf Zugabe von Substrat für diesen Zustand bemerkte man eine geringe, rasche Reduktion, die wiederum von einer langsamen Reaktion begleitet wird. Die Analyse im Status 2a und 3a zeigt, daß das DPN dem TPN vorangeht. Die rasche, am Doppelstrahlphotometer beobachtete Oxydation und Reduktion entspricht auch quantitativ dem DPN. Die Ergebnisse lassen sich gut deuten, wenn man annimmt, daß das DPN eine Komponente der Atmungskette bildet, während das TPN über die Transhydrogenase mit dem DPN gekoppelt ist. Es ist bekannt, daß die Transdehydrogenase in den Mitochondrien lokalisiert ist⁸⁰⁾. Die an isolierten Rattenleber-Mitochondrien gemessene Transhydrogenase-Aktivität⁸¹⁾ kommt der

hier an intakten Mitochondrien abschätzbarer Aktivität sehr nahe.

Die Steuerung des Redox-Potentials des TPN durch das DPN und damit durch die Regulation der Atmungskette dürfte eine große Rolle auch für den Stoffwechsel des C-Raums spielen.

Steroidwirkung auf die Atmungskette

Es ist bekannt, daß Steroidhormone die Atmung von isolierten Mitochondrien mit DPN-spezifischen Substraten hemmen (vgl. z. B.⁸²⁾). In Untersuchungen mit *H. J. Hübener*⁸³⁾ haben sich eine Reihe von Steroiden wie Corticosteron, Östradiol, Testosteron, Desoxy-corticosteron als hochwirksame Blocksubstanzen für die Atmungskette erwiesen. In Abb. 20 wird der Effekt nach Zugabe von Desoxycorticosteron zum Status 3 (ausreichend Substrat und ADP) der Mitochondrien gezeigt. Er ist noch mit $10 \cdot 10^{-6}$ molarer Steroid-Konzentration nachweisbar. Die Pyridinnucleotide gehen dabei in einen Reduktionszustand über, der bei maximaler Hemmung dem Status 4 (Atmungshemmung unter ADP-Mangel) entspricht. Wenn dieser Effekt der Steroidhormone physiologische Bedeutung hat, dann stellt er einen von der Atmungskontrolle durch oxydative Phosphorylierung grundsätzlich verschiedenen, aber ebenfalls sehr wirksamen Steuerungsmechanismus dar, der in der direkten Blockierung des Elektronenflusses durch die Atmungskette besteht.

Glycerin 1-P-Cyclus

Mit dem Einblick in die vielfältigen Funktionen der Pyridinnucleotide ist zugleich die Erkenntnis gewonnen worden, daß diese in ihren verknüpfenden Funktionen, wenn nicht ausschließlich, so doch weitgehend auf das Wechselspiel der Redox-Systeme innerhalb der einzelnen Räume beschränkt bleiben. Daraus ergibt sich die unter zellphysiologischen Aspekten besonders dringende Aufgabe, die Möglichkeiten für Redox-Beziehungen zwischen den Räumen neu zu überdenken. In dieser Hinsicht wollen wir die unseres Wissens von *A. v. Szent-Györgyi*^{87, 88)} erstmals konsequent durchgeführte Konzeption der Wassersstoff-Überführung durch Kreisläufe von Intermediär-Metaboliten erörtern.

Wir haben bereits dargelegt, daß einander wirkungsmaßig entsprechende Enzyme beiderseits jener Membran lokalisiert sind, die den M-Raum umschließt. Die oben über Malat-dehydrogenasen mitgeteilten Befunde könnten dazu verführen, das C_4 -Dicarbonsäure-System *Szent-Györgyi*s unmittelbar aufzugreifen, zumal sich aus Abb. 14 erkennen läßt, daß auch Transaminasen auf beiden Seiten der Mitochondrienmembran angetroffen werden, selbst in solchen Geweben, die wie die Flugmuskeln der Insekten und das Herz weitgehend auf die Energietransformation ausgerichtet sind.

Um uns nicht im Hypothetischen zu verlieren, fassen wir stattdessen die Gegebenheiten zusammen, welche uns veranlaßt haben, für die Flugmuskeln der Wanderheuschrecken einen Glycerin 1-P-Cyclus zu formulieren²⁰⁾, der die Redox-Systeme des C-Raums und des M-Raums mit-

⁸²⁾ W. Wernitsch, H. J. Hübener u. St. Cloeren, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

⁸³⁾ H. J. Hübener, M. Klingenberg u. Th. Bücher, Biochem. Z., im Druck.

⁸⁴⁾ A. Kragh u. T. Weis-Fogh, J. exp. Biology, 27, 344 [1950].

⁸⁵⁾ M. Klingenberg u. Th. Bücher, Biochem. Z., im Druck.

⁸⁶⁾ M. Klingenberg u. A. Delbrück, Vortrag auf der gemeinsamen Tagung der deutschen u. schweizerischen Physiol. Chemiker, Basel, Sept. 1957.

⁸⁷⁾ A. v. Szent-Györgyi u. Mitarb., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 224, 1 [1934], 244, 105 [1936].

⁸⁸⁾ K. Laki, ebenda 249, 57 [1937].

⁷⁹⁾ B. Chance u. G. R. Williams, J. biol. Chemistry 217, 409 [1955].
⁸⁰⁾ G. F. Humphrey, Biochem. J. 65, 546 [1957].
⁸¹⁾ P. A. Vignais u. P. M. Vignais, J. biol. Chemistry 229, 265 [1957].

einander verbindet (Abb. 16): Aus den Abbildungen 10 und 11 geht hervor, daß dieses Gewebe unter allen Funktionszuständen relativ hohe Gehalte an Glycerin 1-P aufweist, bemerkenswerterweise selbst dann, wenn die anfangs ausschließliche Kohlehydrat-Verbrennung nach etwa einstündigem Flug mehr und mehr durch eine Fettverbrennung abgelöst wird. Die Beziehungen des Glycerin 1-P zur DPN-Gruppe des C-Raums sind oben im einzelnen besprochen worden. In ihrer Kinetik werden sie durch die in Abb. 11 dargestellte Bilanz einer sehr kurzen tetanischen Phase des Flugmuskels unter Anaerobiose charakterisiert. Wir dürfen aus diesen Versuchen schließen, daß Wasserstoff aus dem DPN-System des C-Raums mit einer Flußgeschwindigkeit der Größenordnung $1000 \mu\text{Mol/gfr/h}$ in das Glycerin 1-P-System einströmen kann. Die Atmungsgrößen des M-Raums sind aus dem unteren Teil der Tab. 7 ersichtlich. Man sieht in der letzten Spalte, daß ein Viertel bis ein Zehntel des während des Fluges im Durchschnitt veratmeten Wasserstoffs aus dem Glycerin 1-P des C-Raums zufließen kann. Für reine Kohlehydrat-Atmung und bei ausschließlicher Lokalisation der Redox-Systeme des Citrat-Cyclus im M-Raum wird bekanntlich ein Sechstel des insgesamt verbrannten Wasserstoffs im C-Raum frei. Nehmen wir an, daß nur unwesentliche Mengen der in Abb. 10 eingetragenen Glycerin 1-P-Gehalte in gebundener Form vorliegen und der lösende Raum ein Drittel des GeWEBSGEWECHTES ausmacht, dann liegt der Ruhe-Spiegel des Glycerin 1-P, der etwa dem Flug-Spiegel der ersten halben Stunde entspricht, bei $1,5 \text{ mM}$. In diesem Fall könnte tatsächlich der ganze im C-Raum anfallende Wasserstoff über den Glycerin 1-P-Cyclus in den M-Raum eingeschleust werden.

So weit wir sehen, liegt der einzige wesentliche Einwand gegen diese Rekonstruktion der Funktion des Ganzen aus den Funktionen der Teile darin, daß möglicherweise das Permeabilitätsverhalten unserer Mitochondrien durch die Präparation alteriert worden ist. Zwar ist es uns erstmals gelungen, Mitochondrien aus Insektenflugmuskeln zu isolieren, welche Atmungskontrolle zeigen, doch entspricht der Kontrollquotient noch nicht der Größenordnung, die man aus dem Verhalten der intakten Flugmuskeln⁸⁴⁾ fordern muß (mindestens 20). Unsere besten Präparationen zeigen mit Glycerin 1-P als Substrat einen Kontrollquotienten von 3, mit Malat-Pyruvat als Substrat von 8, so daß eine beträchtliche Schädigung der Strukturen nicht ausgeschlossen werden kann.

⁸³⁾ H. Rein u. M. Schneider: Physiologie des Menschen, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.

Zu der in der Tabelle verzeichneten Atmungsgröße bei Zusatz von DPNH ist zu bemerken, daß aus technischen Gründen die Konzentration tausendfach größer gewählt werden mußte, als dem Spiegel der Zelle im C-Raum entspricht. Wie wir an anderer Stelle darlegen werden, reduziert sich dieser Wert bei physiologischen Konzentrationen exogenen DPNHs erheblich, selbst wenn die Permeabilitätsverhältnisse und die Besetzung der spezifischen Bindungsorte durch intramitochondriales DPNH unberücksichtigt bleiben. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, daß es unseres Wissens bislang noch keinem Untersucher gelungen ist, Atmungskontrolle bei der Veratmung exogenen DPNHs durch Mitochondrien nachzuweisen.

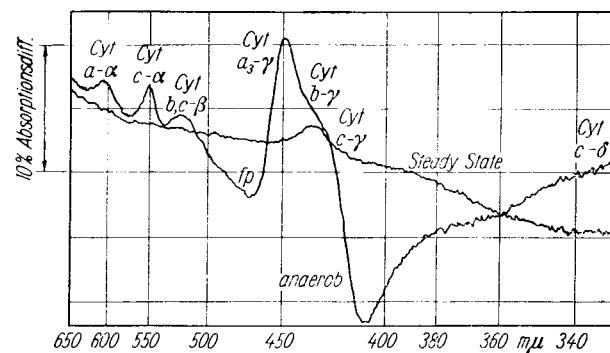
Der Feinbau (Abb. 1) und das Enzymverteilungsmuster des C-Raums (Abb. 12) weisen die Flugmuskeln der Insekten als in mancher Hinsicht einzigartige Gewebe aus. Das Eindringen der Tracheen in die Zelle bis an den Rand der einzelnen Mitochondrien und der Mangel an Lactat-dehydrogenase zeigen sie — den Gegebenheiten, unter denen sie ihre Funktionen erfüllen, entsprechend — als extrem aerob eingestellte Organe. Man wird sich daher fragen, ob auch der erörterte Glycerin 1-P-Cyclus zu den Besonderheiten dieses Gewebes zu zählen ist und — zumindest in quantitativer Hinsicht — keine größere Bedeutung für Warmblütergewebe hat.

Falls es erlaubt ist, die in den Abb. 5 und 6 mitgeteilten Gehalt-Quotienten Glycerin 1-P/Dihydroxyaceton-P in erster Näherung den Spiegelquotienten des C-Raums gleichzusetzen, würde das im Vergleich zum Lactat-System wesentlich positivere Redox-Potential des Glycerin 1-P-Systems in Gehirn, Herz und Skelettmuskeln bei relativ hoher Aktivität der Glycerophosphat-dehydrogenase für eine hohe Flußrate sprechen. Das Meyerhof-Green-Enzym wurde von Tung u.a.⁶⁰⁾ aus Kaninchenmuskeln und von Ringler und Singer⁶⁴⁾ aus Gehirn isoliert. Bemerkenswerterweise ist es uns jedoch nicht gelungen, das Enzym in Herzmuskel-sarkosomen nachzuweisen.

In intakten Rattenleber-Mitochondrien läßt sich das Meyerhof-Green-Enzym nachweisen⁶⁶⁾ (Abb. 21). Zur genaueren Messung ist man allerdings gezwungen, die Atmung mit endogenem Substrat durch Hemmung mit Amytal zu unterbinden. Diese Substanz blockiert die Atmungskette zwischen den spezifischen Reaktionen des DPN-Systems und dem Flavoprotein und somit die Atmung der endogenen DPN-spezifischen Substrate, ohne die Oxydation von Glycerin 1-P zu unterbinden. Allerdings zeigen solche Präparate keine Atmungskontrolle mehr. Die Differenzspektren

Substrat (exogen)	Konz. m Molar	$\mu\text{Atom O}$ $\text{gProt}^{-1}\text{h}^{-1}$	Cytochrom c- in Mitochondrien	Cyt. c Turnover $1/\text{h}$	Cytochrom c- in Gewebe	$\mu\text{Atom O}$ $\text{gfr}^{-1}\text{h}^{-1}$	% Mitoch.-Atmung in vivo-Atmung
Rattenleber Mitoch.:							
— Glycerin 1-P	2	$0,65 \times 10^3$		$1,8 \times 10^3$		22	11
DPNH (exo)	1	$0,55 \times 10^3$	0,35 $\mu\text{M Cyt. c}$	$1,6 \times 10^3$	12×10^{-3} $\mu\text{M Cyt. c}$	19	9
α -Ketoglut.	2	$2,9 \times 10^3$	$8,3 \times 10^3$ gProt^{-1}			100	50
β -Oxybutyr.	2	$3,6 \times 10^3$		$10,3 \times 10^3$		125	62
Leber in vivo⁸³⁾							
Locusta Flugmuskel Mitoch.:							
Glycerin 1-P	2	32×10^3		43×10^3		1550	22
Glycerin 1-P	0,5	$17,5 \times 10^3$	0,75 $\mu\text{M Cyt. c}$	23×10^3	36×10^{-3} $\mu\text{M Cyt. c}$	850	12
DPNH (exo)	1	11×10^3	15×10^3 gProt^{-1}			540	7
Pyruvat + Malat	2	22×10^3		29×10^3		1000	9
α -Ketoglut.	2	$5,5 \times 10^3$		$7,5 \times 10^3$		260	2
Muskel im Flug⁸⁴⁾							
				200×10^3		7200	

Tabelle 7. Atmungsaktivitäten von Mitochondrien und ihre Beziehung zur Atmung der Gewebe⁸⁵⁾



[A 898, 21]

Abb. 21. Glycerin 1-P + $\frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow$ Dihydroxyacetone-P + H_2O in Lebermitochondrien in Gegenwart von ADP (1,5 mM) und P (4 mM). Differenzspektren im stationären Zustand (0–3 Min) nach Substratzugabe und anaerob (15 min nach Zugabe)⁸⁶. Die Atmung mit endogenem Substrat wurde mit Amytal (Isoamyl-äthyl-barbiturat) (2 mM) blockiert. Vergleichslösung und Meßlösung unterscheiden sich durch den Substratzusatz, die beiden Kurven durch den Zeitpunkt der Registrierung. Die Bande der Pyridinnucleotide fehlt, da diese unter Amytal bereits in der Vergleichslösung reduziert ist.

der Abb. 21 demonstrieren, wie Glycerin 1-P mit der Atmungskette der Lebermitochondrien reagiert. Im stationären Zustand erscheint nur die Bande des Cytochrome b. Nach Verbrauch des Sauerstoffs werden die Komponenten der Atmungskette durch Glycerin 1-P völlig reduziert. Die Absorptionsbande der Pyridin-nucleotide ist im Differenzspektrum nicht sichtbar, da diese durch die Anwesenheit von Amytal in der Meß- und Vergleichsküvette von endogenem Substrat in gleicher Weise reduziert sind. Der Versuch, die Atmungsgröße der Lebermitochondrien auf das Frischgewicht des Gewebes zu beziehen, wie wir ihn in

Tab. 7 durchgeführt haben, begegnet der Schwierigkeit, daß der Cytochrome c-Gehalt, auf den wir die Atmungsgröße der Mitochondrien beziehen, für das ganze Gewebe wegen der Interferenz des Hämoglobins nicht sicher gemessen werden kann. Die Daten in den letzten Spalten der Tabelle sind daher nur in der Größenordnung zu werten. Der Glycerin 1-P-Gehalt der Leber läßt auf einen Spiegel von mindestens der gleichen Höhe schließen, wie er in den Atmungsversuchen mit Mitochondrien angewendet wurde. Ziehen wir den Vergleich zwischen der Leber und den Flugmuskeln, dann ergibt sich, daß die Relation zwischen mitochondrialer Glycerin 1-P-Atmung und Gesamtatmung im Lebergewebe etwa halb so hoch ist wie im Flugmuskel. Sie entspricht sich also in der Größenordnung, während die Relationen der absoluten Atmungsgrößen der verschiedenen Substrate auf qualitativ wesentlich unterschiedliche Verhältnisse hindeuten.

Eingegangen am 18. August 1958 [A 898]

Berichtigung

Im Aufsatz „Reaktionen des Schwefels mit araliphatischen sowie aliphatischen Verbindungen“ von R. Wegler, E. Kühle und Werner Schäfer, diese Ztschr. 70, 351 [1958], muß es auf Seite 362, linke Spalte, Zeile 18 heißen: „... und führen in sehr guten Ausbeuten zu Malonsäure-dithioamiden (Ruhrchemie AG., Erf. H. Feichtinger, DAS. 1003212 vom 22. 1. 1955).“ und in Zeile 41: „... Umsetzung von N-(ε-Chlor-n-amyl)-benzoësäureamid mit Schwefel und Ammoniumpolysulfid (Ruhrchemie AG., Erf. H. Feichtinger und H. Tummes, DBP.-Anm. R 8460 vom 1. 3. 1952)“.

Werner Schäfer [A 897]

Zuschriften

Zum Mechanismus der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Krebszellen

Von Prof. Dr. H. HOLZER und Dr. S. FRANK

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Freiburg/Brsrg.

Vor kurzem zeigten O. Warburg und Mitarbeiter¹⁾, daß die Hemmung der Glykolyse von Ascitestumorzellen durch Röntgenstrahlen quantitativ durch Einwirkung des entstehenden Wasserstoffperoxyds auf die Krebszellen zu erklären ist. Da H. Maass und Mitarbeiter²⁾ fanden, daß Röntgenstrahlen die stationäre DPN-Konzentration in Ascitestumorzellen erniedrigen, lag die Vermutung nahe, daß das durch Röntgenstrahlen entstehende H_2O_2 die DPN-Senkung bewirkt und so die Glykolyse hemmt.

Tabelle 1 zeigt, daß H_2O_2 -Konzentrationen, wie sie nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf in Manometrie-Gefäßen suspendierte Asciteszellen gefunden wurden¹⁾, die Glykolyse stark hemmen und die DPN-Konzentration in den Zellen auf etwa 1/6 des Kontrollwertes senken. Der Aufbau von Triosephosphat und

Fructosediphosphat in den mit H_2O_2 behandelten Zellen zeigt, daß das abgesunkene DPN eine Hemmung der Triosephosphat-Dehydrierung bewirkt und so die Glykolyse hemmt. Es liegt demnach ein völlig gleichartiger Eingriff des H_2O_2 (und damit der Röntgenstrahlen) in den Kohlenhydratstoffwechsel der Ascites-tumorzellen vor, wie wir ihn für carcinostatisch wirksame Äthylenimmin-Verbindungen und N-Lost-Derivate beschrieben haben^{3, 4)}. Der gleichartige Wirkungsmechanismus von Röntgenstrahlen und Carcinostatica wird noch dadurch unterstrichen, daß in beiden Fällen die Glykolyse-Hemmung durch Zusatz von Nicotinsäureamid aufgehoben werden kann (Tabelle 1), da diese Substanz dem Absinken des DPN-Spiegels durch Förderung der DPN-Synthese und Hemmung des DPN-Abbaues entgegenwirkt. Bei den carcinostatischen Äthylenimin- und N-Lost-Verbindungen verhindert Nicotinsäureamid das Absinken der DPN-Konzentration und bewirkt so ein Ausbleiben der Heilung Jensen-Sarkom tragender Ratten⁴⁾; man könnte deshalb auf Grund der gleichartigen Wirkung von Carcinostatica und Röntgenstrahlen eine Strahlenschutzwirkung des Nicotinsäureamids verstehen.

Die Versuche der Tab. 1 sprechen für eine Glykolyse-Hemmung durch Erniedrigung des DPN-Spiegels. Da das Enzym Triosephosphat-Dehydrogenase sehr empfindlich gegen H_2O_2 ist⁵⁾, wäre

	Glykolyse ($\text{mm}^3\text{CO}_2/\text{h/mm}^3$ Zellen)	DPN in $\mu\text{M}/\text{mm}^3$ Zellen $\times 10^4$	TP in $\mu\text{M}/\text{mm}^3$ Zellen $\times 10^4$
Kontrolle	2,2	3,1	5,8
+ Nicotinsäureamid	1,6	3,0	—
+ H_2O_2	0,3	0,5	9,1
+ Nicotinsäureamid + H_2O_2	1,4	2,1	—

Tabelle 1. Glykolyse, Diphosphopyridinucleotid (DPN)-, Triosephosphat (TP = Dihydroxy-acetonphosphat + Phosphoglycerin-aldehyd)- und Fructose-diphosphat (FDP)-Konzentrationen nach 60 min. Inkubation von Ascitestumorzellen unter anaeroben Bedingungen (Gasraum 100 % CO_2 ; $p_{\text{H}} = 6,0$) in Glucose-haltiger Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung. Die Bedingungen der Manometrie und die Analysemethoden sind bei³⁾ beschrieben. Endkonzentration an H_2O_2 $5,6 \times 10^{-5}$ Mole/l und an Nicotinsäureamid $1,6 \cdot 10^{-2}$ Mole/l

	Glykolyse mm^3CO_2 je h je mm^3 Zellen	In % der Kontrolle	Aktivität d. Tri- osephosphat- Dehydrogenase in % d. Kontrolle
Kontrolle	2,1	100 %	100 %
+ H_2O_2 ($7,9 \times 10^{-5}$ Mole/l)	0,55	26 %	63 %
+ Jodessigsäure ($2,5 \times 10^{-5}$ Mole/l)	0,26	12 %	<5 %

Tabelle 2. Aktivität von Triosephosphat-Dehydrogenase in Asciteszellen nach Hemmung der Glykolyse mit H_2O_2 bzw. Jodessigsäure. Inkubationsbedingungen wie bei Tabelle 1. Die Methode zur Bestimmung der Triosephosphat-Dehydrogenase-Aktivität ist bei³⁾ angegeben