

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

75. JAHRGANG

NR. 19 · SEITE 881–948

7. OKTOBER 1963

Dieses Heft und seine Beiträge sind

OTTO WARBURG

zum 80. Geburtstag am 8. Oktober 1963 gewidmet

Gleichgewicht und Ungleichgewicht im System der Glykolyse [*]

VON PROF. DR. TH. BÜCHER UND CAND. MED. W. RÜSSMANN

INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT MARBURG/LAHN

Otto Warburg in Dankbarkeit und Verehrung zum 80. Geburtstag gewidmet

Zur Diskussion steht die Beziehung zwischen der Stromstärke im Netz des energieliefernden Stoffwechsels und der Ablenkung seiner Glieder aus dem Gleichgewicht. Im Rahmen der Besprechung neuer Analysen von Metabolitgehalten werden die Phänomene der Gegenläufigkeit von Potentialdifferenzen und der Homoeostasie zellulärer Metabolitproportionen behandelt. Messungen stationärer Relaxationszeiten und ihre Anwendung auf Grund einer Anregung von Alberti werden mitgeteilt. Die Ergebnisse bestätigen und ergänzen die Vorstellungen von intrazellulären Redoxbeziehungen, die der Arbeitskreis der Verfasser in dieser Zeitschrift vor fünf Jahren entwickelt hat. Die maximale Differenz zwischen den Redoxpotentialen des Lactat/Pyruvat- und des DPNH/DPN-Systems wird auf 2 mV berechnet. In vivo zu messende Ablenkungen des Systems Glycerophosphat/Dihydroxyacetonphosphat werden im Zusammenhang mit der Stromstärke des Glycerophosphat-Cyclus behandelt.

1. Ordnung der Ungleichgewichte

Für die Naturphilosophie ist das Phänomen fortlaufenden Ungleichgewichtes im Lebendigen alter Bestand. Seine Erforschung im naturwissenschaftlichen Sinne ist mit Liebigs „Minimum-Gesetz“ und mit Blackmans Konzept des „limiting factor“ eingeleitet worden [1]. Vor allem Blackmans Formel „...the rate of a process is

limited by the pace of the slowest factor“ und daran anschließende Begriffe wie geschwindigkeitsbegrenzende Reaktion [2, 3], master reaction [4, 5], pace maker [6] usw., fordern und beschreiben eine formale und quantitative Ordnung der Ungleichgewichte in der lebendigen Organisation.

Worauf es hier ankommt, lässt sich in der Gegenüberstellung des wilden und des regulierten Wasserlaufes ver-

[2] A. Pütter, Z. allg. Physiol. 16, 574 (1914).

[3] H. Holzer in: Biologie und Wirkung der Fermente, 4. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie. Springer, Berlin–Göttingen–Heidelberg 1953, besonders S. 89.

[4] A. C. Burton, J. cell. comp. Physiol. 9, 1 (1936); 14, 327 (1939).

[5] H. L. Booij u. H. P. Wolvekamp, Bibliotheca biotheoretica (Leiden) 1, 145 (1944).

[6] H. A. Krebs u. H. L. Kornberg, Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. 49, 212 (1957).

[*] Unter Verwendung der Manuskripte von Vorträgen auf Tagungen der Gesellschaft für Physiologische Chemie in Berlin (Herbst 1959) und der Belgischen Gesellschaft für Biologische Chemie in Leuven (Frühjahr 1962). Die hier beschriebenen Arbeiten wurden vom Schwerpunktsprogramm „Experimentelle Zellforschung“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom „Fonds der chemischen Industrie“ unterstützt.

[1] F. F. Blackman, Ann. Bot. (London) 19, 281 (1905).

anschaulichen. Das vor der Regulierung (Abb. 1a) in allen Abschnitten etwa gleich große Gefälle wird durch den Einbau einer Barriere in *Staustrecken* und *Fallstrecken* geordnet (Abb. 1b). Ein entsprechend großer Querschnitt (geringer Widerstand) des Flußbettes gleicht die Geringfügigkeit des Gefälles in den Staustrecken aus.

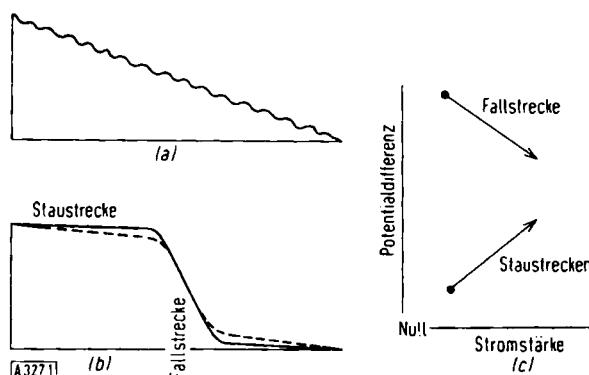


Abb. 1. Schematische Darstellung (a) eines wilden, (b) eines regulierten Wasserlaufs und (c) der Änderung der Potentialgefälle an der Fallstrecke und auf den Staustrecken bei steigender Stromstärke.

Leonor Michaelis hat sich dieses Modells bei der Darstellung der Redoxketten bedient [7]. Es demonstriert, daß die mit der Regulierung des Wasserlaufes geschaffene Ordnung der Ungleichgewichte organisatorisch zweierlei bewirkt: sie erleichtert die Kontrolle der Spie-

gel und der Stromstärke; sie konzentriert die Arbeitsfähigkeit des Systems. Um die Stärke des Wasserstroms (aus einem stromaufwärts liegenden Reservoir) einzustellen, bedarf es lediglich des Anhebens oder Senkens der Barriere. Die Fallstrecke ist das limitierende Glied. Im elektrischen Analogon hätte man an dieser Stelle einen Regelwiderstand einzusetzen.

Bei steigender Stromstärke ändern sich die Gefälle in einer charakteristischen, in Abb. 1b durch eine punktierte Linie angedeuteten Weise: der Potentialabfall über das limitierende Glied sinkt, und er steigt über die Staustrecke. Das ist in Teil c der Abb. 1 angedeutet worden. Dieses Prinzip der *Gegenläufigkeit* der Potentialdifferenzen wird man immer dann finden, wenn ein *limitierendes Glied* zwischen „*Staustrecken*“ liegt. Es vermag uns bei der Suche nach *Staustrecken* und limitierenden Gliedern zu helfen.

2. Ein Beispiel

Einigermaßen übersichtliche Verhältnisse für die Prüfung des Dargelegten bieten Gewebe, in denen die Stärke des Stoffwechsels in Abhängigkeit vom Status der Aktivität kurzfristig und erheblich wechseln kann. Ein Beispiel ist der *willkürliche Skelettmuskel*. Hier kann die Stromstärke des energieliefernden Stoffwechsels, besonders in der Embden-Meyerhof-Kette der Glykolyse (Abb. 2), um Größenordnungen ansteigen. *Hohorst* und

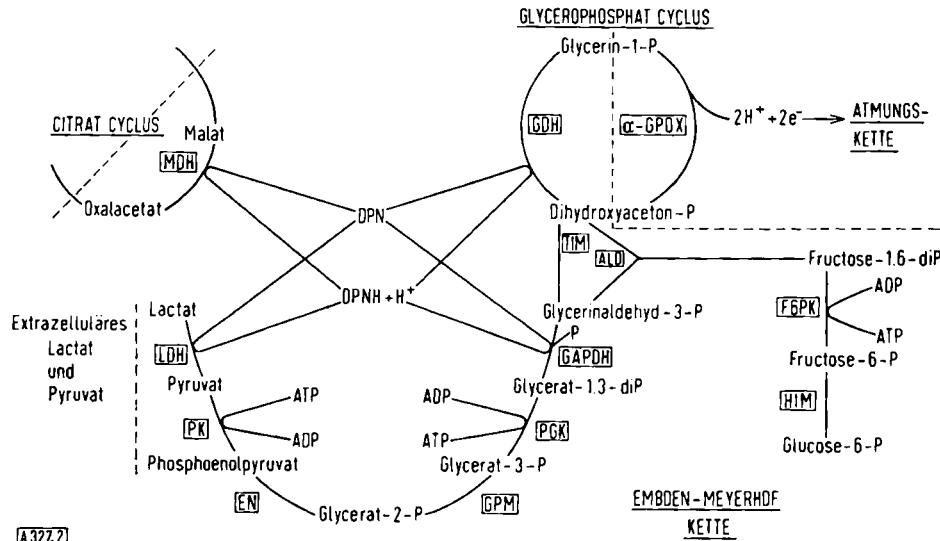


Abb. 2. Stoffwechselschema [**].

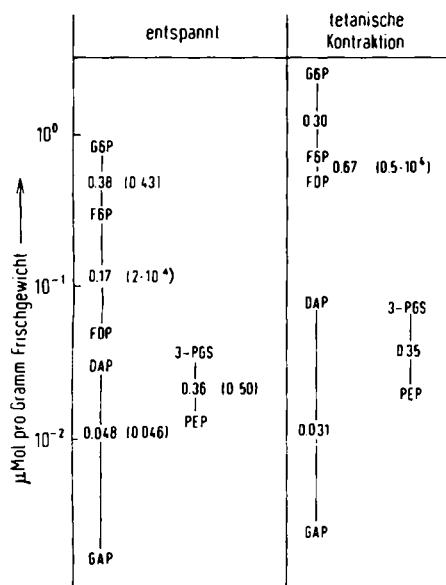
[**] Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit verwendet:

| | |
|------|--|
| ALD | = Aldolase |
| ADP | = Adenosindiphosphat |
| ATP | = Adenosintriphosphat |
| DAP | = Dihydroxyacetophosphat |
| DPN | = Diphosphopyridinucleotid |
| DPNH | = reduziertes DPN |
| EN | = Enolase |
| FDP | = Fructose-1,6-diphosphat |
| F6P | = Fructose-6-phosphat |
| F6PK | = Fructose-6-phosphat-Kinase (Phosphofructokinase) |
| GAP | = Glycerinaldehyd-3-phosphat |

[7] L. Michaelis: Oxydations-Reduktionspotentiale mit besonderer Berücksichtigung ihrer physiologischen Bedeutung. 2. Aufl. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1933.

| | |
|--------|---|
| GAPDH | = Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase |
| GDH | = Glycerophosphat-Dehydrogenase |
| α-GP | = Glycerin-1-phosphat |
| G6P | = Glucose-6-phosphat |
| GPM | = Glyceratphosphat-Mutase |
| α-GPOX | = Glycerin-1-phosphat-Oxydase |
| HIM | = Hexosemonophosphat-Isomerase |
| Lac | = Lactat |
| LDH | = Lactat-Dehydrogenase |
| MDH | = Malat-Dehydrogenase |
| P | = Phosphat |
| PEP | = Phosphoenolpyruvat |
| PGK | = Phosphoglyceratkinaise |
| 2-PGS | = Glycerat-2-phosphat |
| PK | = Pyruvatkinase |
| Pyr | = Pyruvat |
| TIM | = Triosephosphat-Isomerase |

Mitarbeiter [8, 9] haben in letzter Zeit die Änderungen vollständiger Metabolitmuster der Embden-Meyerhof-Kette im Bauchdeckenmuskel der Ratte beim Übergang zur tetanischen Kontraktion untersucht. Abbildung 3 gibt einen Ausschnitt aus diesen Messungen. Wenn wir sie an Hand des Modells des regulierten Fluxes deuten wollen, müssen wir die Quotienten der Metabolitgehalte errechnen [10, 11] und sie den Gleichgewichtskonstanten gegenüberstellen. Wie üblich, wurden bei der Bildung der Quotienten die Produkte in den Zähler gesetzt. Die Gleichgewichtskonstanten findet man ebenfalls in der Abbildung. Bei der Mehrzahl der Metabolitpaare waren diese ohne weiteres zu ermitteln, da sie zu Zwei-Partner-Reaktionen gehören [12]. Beim Paar F6P/FDP bedurfte es dagegen noch einer besonderen Annahme (vgl. Legende zu Abb. 3).



A 327.3

Abb. 3. Metabolitgehalte im Bauchdeckenmuskel der Ratte [8, 9] (zur analytischen Methodik vgl. [11]). Gleichgewichtskonstanten [16] in Klammern. Berechnung von $[ATP]/[ADP]$ im Falle des Phosphofructokinase-Quotienten [vgl. Gl. (a)] mit Hilfe der Gehalte an Kreatinphosphat (KP) und Kreatin (K): $[ATP]/[ADP] = 10 \times \{KP\}/\{K\}$. $\{FDP\}/\{F6P\} = K_{eq} \cdot [ATP]/[ADP] = 10 \times 10^3 \cdot \{KP\}/\{K\}$.

Aus der Gegenüberstellung der Quotienten stationärer Metabolitgehalte und der Gleichgewichtskonstanten erkennt man zweierlei:

1. Die Quotienten können in zwei Kategorien unterteilt werden: in der ersten sind sie von gleicher Größenordnung wie die Gleichgewichtskonstanten, in der zweiten besteht ein erhebliches Ungleichgewicht ($[F6P]/[FDP]$).
2. Beim Übergang von der Ruhe zur Aktivität zeigen die Quotienten der ersten Kategorie die Tendenz abzunehmen, während der Quotient der zweiten Kategorie steigt (um den Faktor 4).

[8] H. J. Hohorst, M. Reim u. H. Bartels, Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 137, 142 (1962).

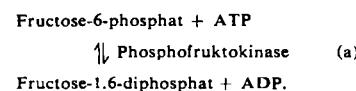
[9] H. J. Hohorst in P. Karlson: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.

[10] Th. Bücher u. M. Klingenberg, Angew. Chem. 70, 552 (1958).

[11] H. J. Hohorst, F. H. Kreutz u. Th. Bücher, Biochem. Z. 332, 18 (1959).

[12] Th. Bücher, Pure appl. Chem. 6, 209 (1963).

Nach dem im ersten Abschnitt Gesagten erkennen wir als limitierendes Glied die durch das Enzym *Phosphofructokinase* katalysierte Reaktion



Die anderen Metabolitpaare dürfen wir „Staustrecken“ stromauf und stromab des limitierenden Gliedes zuordnen (Abb 1c).

Etwa im gleichen Sinne stellten Holzer und Holldorf [13] in der Gärungskette der Hefe „geschwindigkeitsbegrenzende Reaktionen“ und „Gleichgewichtsreaktionen“ (Hexosemono-phosphat-Isomerase, Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Alkohol-Dehydrogenase) einander gegenüber, und teilt Hess [14] seine vollständigen Metabolitmuster der Glykolyse in Ehrlich-Ascites-Tumoren in drei Gruppen von „quasi-Gleichgewichtsintermediaten“ ein, die durch jeweils eine „quasi-irreversible“ Reaktion (Phosphofructokinase, Phosphoglyceratkinase und Pyruvatkinase) getrennt werden. In Tabelle 1 findet man auch Werte von Mann et al. [15], die sich zu einem frühen Zeitpunkt ebenfalls um die Problematik und Dynamik der Metabolitmuster bemüht haben.

Tabelle 1. Quotienten von Metabolitgehalten in verschiedenen Zellen (Gleichgewichtskonstanten K_{eq} nach Burton [16] in Klammern).

| | Hefe [15] | Ascites-Tumor [14] | Skelettmuskel [7] Ruhe | Skelettmuskel [7] Arbeit |
|-----------------------|-----------|--------------------|---------------------------|-----------------------------|
| G6P/F6P (0,43) | 0,33 | 0,23 | 0,38 | 0,30 |
| 3-PGS/2-PGS (0,17) | 0,45 | 0,43 | 0,12 | 0,30 |
| 2-PGS/PEP (3,0) | | 1,6 | 3,0 | |

3. Limitierende Glieder (Definitionen)

Unsere Studie wird sich in erster Linie mit „Staustrecken“ (im Bereich der Embden-Meyerhof-Kette) beschäftigen. Zuvor seien der Begriffsbildung, speziell dem Begriff des limitierenden Gliedes, einige weitere Überlegungen gewidmet.

Wir erwähnten, daß die Gliederung in Stau- und Fallstrecken die Arbeitsfähigkeit des Systems konzentriert: „Kraftwerke“ sind nur im Bereich der Fallstrecken sinnvoll. Dabei ist zu bedenken, daß die Gewinnung maximaler Nutzarbeit das Ungleichgewicht und damit die Möglichkeit der Kontrolle aufhebt. Variationsfähigkeit und Regelbarkeit bedürfen einsinnig wirkender („rückwirkungsfreier“) Glieder [17], d. h. erheblicher Ungleichgewichte. Dennoch vermag auch ein ideal funktionieren-

[13] H. Holzer u. A. Holldorf in W. Ruhland: Handbuch der Pflanzenphysiologie. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960, Bd. XII/1.

[14] B. Hess in P. Karlson: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.

[15] P. F. E. Mann, W. E. Trevelyan u. J. S. Harrison in: Recent Studies in Yeast and their Significance in Industry. Society of Chemical Industry, London 1958, besonders S. 68.

[16] K. Burton, Ergebni. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. 49, 275 (1957).

[17] H. Mittelstaedt: Regelungsvorgänge in der Biologie, Beifeste zur Regelungstechnik. R. Oldenbourg, München 1956.

des Kraftwerk *mittelbar* als kontrollierendes Glied zu wirken. Sein Widerstand (z. B. seiner Turbinen und Generatoren) hängt nämlich von der entnommenen Leistung ab. Es ist an den Prozeß gekoppelt, der freie Energie verbraucht. Das kontrollierende Ungleichgewicht wird auf diese Weise in den Bereich der energieverbrauchenden Prozesse verlagert. Solche Verhältnisse sind für die Kontrolle des energieliefernden Stoffwechsels durch den Kreislauf des Phosphats von entscheidender Bedeutung. Das „cross-over-theorem“ von *Chance* [18] darf in diesem Sinne als ein Spezialfall des in den vorangehenden Abschnitten dargelegten Prinzips der Gegenläufigkeit der Potentialgefälle im Bereich *mittelbar limitierender Glieder* angesehen werden.

Die Phosphofructokinase-Reaktion, das limitierende Glied des in Abb. 3 behandelten Abschnittes der Embden-Meyerhof-Kette, ist kein Kraftwerk. Sie ist ein *unmittelbar limitierendes Glied*. Als ein solches setzt sie einen erheblichen Betrag freier Energie in Wärme um. Analog der Erhaltung eines Überdruckes in einem undichten Gefäß ist nämlich die Erhaltung *stationärer Ungleichgewichte* in Reaktionsketten an eine ständige Verwandlung freier Energie in Wärme gebunden [19, 20]. Die notwendige Leistung L [Arbeit/Zeit] ist proportional der Stromstärke V_{st} [Mol/Zeit] und dem Potentialabfall [Gl. (1)].

$$L = V_{st} RT \ln \frac{\Gamma}{K_{eq}} \quad (1)$$

K_{eq} = Gleichgewichtskonstante (thermodynamisch), vgl. Gl. (2).

Γ = „Massenwirkungsquotient“ im Ungleichgewicht, vgl. Gl. (4).

Dieser ständige Verlust an freier Energie ist gering in den „Staustrecken“, dagegen groß in der Phosphofructokinase-Reaktion. Er ist der Preis, der energetisch für die Variabilität der Stromstärke gezahlt wird.

Gleichung (1) ergibt sich aus der thermodynamischen Definition von *Gleichgewicht* und *Ungleichgewicht*. Im Gleichgewicht erlischt bekanntlich die Arbeitsfähigkeit der Systeme, erreicht die Entropie ein Maximum ($dS = 0$). In diesem Sinne ist das Gleichgewicht statisch; die Konzentrationen – oder exakter die Aktivitäten – der Partner chemischer Reaktionen stehen in den Proportionen des Massenwirkungsgesetzes.

$$K_{eq} = \frac{[\bar{P}] [\bar{Q}] \dots}{[\bar{A}] [\bar{B}] \dots} \quad (2)$$

Ungleichgewichte können stationär und nicht stationär sein. Der stationäre Status des Ungleichgewichts wird auch als „Fließgleichgewicht“ bezeichnet [20].

Über die „Schrittmacher-Reaktion“ schreiben *Krebs* und *Kornberg* [6]: „There is a general principle which may guide the search for pacemakers. As pacemakers are reactions of variable rate, the level of substrate

[18] *B. Chance u. G. R. Williams*, Adv. Enzymol. 17, 65 (1956).

[19] *W. Kuhn*, Ergeb. Enzymol. 5, 1 (1936); Angew. Chem. 48, 215 (1936).

[20] *L. v. Bertalanffy*: Biophysik des Fließgleichgewichts. Sammlung Vieweg, Braunschweig 1953.

[21] *C. F. Cori* in *O. H. Gaebler*: Enzymes, Units of Biochemical Structure and Function. Henry Ford Hospital International Symposium, Academic Press, New York 1956, S. 573.

concentration of the pacemaker must vary inversely with the rate: it must increase when the reaction rate decreases“. Dürfen wir die Phosphofructokinase-Reaktion in diesem Sinne als Schrittmacher-Reaktion bezeichnen? Wir erkennen in Abb. 3, daß die Metabolitgehalte sowohl von F6P als auch von FDP mit *wachsender Stromstärke ansteigen*. Ihre Veränderung ist der für den „pacemaker“ geforderten Veränderung entgegengesetzt. Die Ursache dieses Phänomens liegt in weiteren limitierenden Gliedern stromaufwärts des betrachteten Stoffwechselabschnittes, der Phosphorylase-Reaktion und der Glucokinase-Reaktion. Besonders die Aktivierung der Phosphorylase führt zu einer momentanen Ausschüttung von Glucosephosphaten aus dem Glykogen-Reservoir [22, 23], die auch in Abbildung 3 deutlich wird.

In diesen Verhältnissen haben wir auch den Grund dafür zu suchen, daß die Phosphofructokinase-Reaktion in vielen Arbeiten über die Regulation der Glykolyse nicht beachtet worden ist.

Wir müssen es uns an dieser Stelle versagen, auf die in letzter Zeit gewonnenen Erkenntnisse über die Funktionen dieses Gliedes und seines Mechanismus einzugehen [10, 24–27]. Doch wollen wir den Vorteil festhalten, den die Betrachtung der *Veränderungen von Gehaltsquotienten* gegenüber derjenigen absoluter Metabolitgehalte bietet.

4. Metabolitgehalte in Ruhe und Aktivität

Um die Flußgeschwindigkeit einer Kette zu beherrschen, sollte prinzipiell der Einbau *eines* limitierenden Gliedes genügen. Wie wir soeben gesehen haben, enthält die Glykolysekette des Muskels *mehrere limitierende Glieder*. Da wir es mit einem biologischen System zu tun haben, ist es erlaubt, nach dem Sinn dieser höheren Komplexität zu fragen.

Eine der möglichen Antworten kann sich darauf beziehen, daß der Stoffstrom unter bestimmten physiologischen Bedingungen auch in der umgekehrten Richtung fließt. Da die freie Energie des chemischen Reaktionsvermögens in *genormten Quantitäten*, den sogenannten energiereichen Phosphatbindungen, eingesetzt wird, sind für die Rückläufigkeit, analog den Schleusen im regulierten Wasserlauf, *energetisch brauchbare Abschnitte* erforderlich.

[22] *C. F. Cori*: Currents in Biochemical Research. Interscience, New York 1956, S. 198.

[23] *W. H. Danforth, E. Helmreich u. C. F. Cori*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1191 (1962).

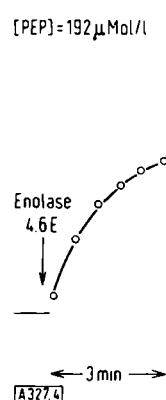
[24] *H. A. Lardy u. R. E. Parks jr.* in *O. H. Gaebler*: Enzymes, Units of Biological Structure and Function, Henry Ford Hospital International Symposium. Academic Press, New York 1956, S. 584.

[25] *T. E. Mansour u. J. M. Mansour*, J. biol. Chemistry 237, 629 (1962).

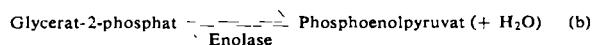
[26] *J. V. Passonneau u. H. O. Lowry*, Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 10 (1962).

[27] *Th. Bücher* in: 7. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie. Springer, Berlin–Göttingen–Heidelberg 1961, S. 129.

Ein weiterer noch wenig beachteter Aspekt [12, 27] ist in Geweben, die auf eine rasche Änderung der Stromstärke angewiesen sind, die Vorbereitung der bei der Aktion auftretenden Metabolitmuster während der Ruhe. Bei der Organisation des Stoffwechsels wirken in den



Um ein Beispiel zu geben, nehmen wir an, die in Abbildung 4 dargestellte Enolase-Reaktion



Eingangsbezirken Substanzen, die in Ausgangsbezirken erzeugt werden. Diese Koppelung bewirkt theoretisch und experimentell, daß die Stoffwechselketten sich nach volliger Verarmung an Zwischenmetaboliten erst nach langdauernder Induktion in den stationären Zustand aufschaukeln können. In der Gärungsforschung hat dieses Phänomen die Bezeichnung „Angärung“ erhalten. Rasch agierende Gewebe, die, wie der Skelettmuskel, innerhalb des Bruchteils einer Sekunde den Status der Leistung und des Stoffwechsels verändern, bedürfen daher nicht nur gefüllter Energiespeicher, sondern auch einer Vorbereitung des Metabolitmusters.

Die Stromstärke (errechnet für den Ruhestatus aus der Atmungsgröße, für den Status tetanischer Kontraktion aus dem Zuwachs an Lactat [8]) unterscheidet sich in den beiden Abteilungen der Abb. 3 mindestens um den Faktor 100. In Anbetracht dessen müssen wir die Veränderungen im Muster der Metabolitgehalte und besonders die Änderungen der Proportionen als geringfügig bezeichnen. Physiologische Erfordernisse der Funktionsbereitschaft lassen uns dieses Phänomen als sinnvoll erscheinen. Die *Funktionsbereitschaft durch Homöostasie zellulärer Metabolitproportionen* erfordert das Zusammenwirken mehrerer limitierender Glieder. Etwa ein Drittel der Metabolitspiegel unterliegen ihrer Kontrolle. Die restlichen zwei Drittel werden – wie Abbildung 3 eindrucksvoll zeigt – durch das Massenwirkungsgesetz eingestellt. Mit ihnen beschäftigen wir uns in den folgenden Abschnitten.

5. Relaxation

Würden wir eine der Teilreaktionen einer Stoffwechselkette (die Reaktionspartner und das katalysierende Prinzip) im Gedankenexperiment momentan von der fließenden Kette trennen, dann begäne diese isolierte Reaktion unmittelbar, sich in den Status des Gleichgewichts zu begeben. Die *Anfangsgeschwindigkeit dieser Relaxation entspräche der Stromstärke der Kette*, aus der wir die Reaktion herausgehoben hätten.

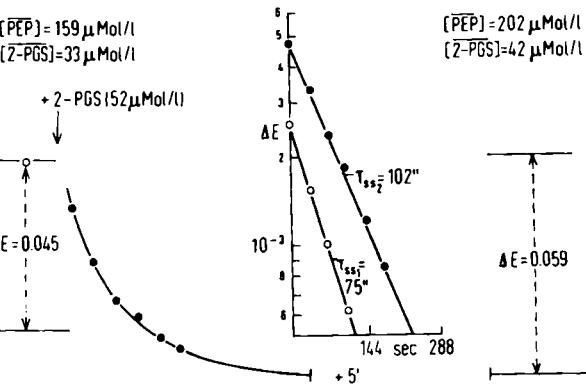


Abb. 4. Einstellung des Gleichgewichts der Enolase-Reaktion
Glycerat-2-phosphat \rightleftharpoons Phosphoenolpyruvat.

Beginn links nach Zusatz von 4,6 Einheiten Enolase aus Kaninchennuskulatur [34]. Registrierung bei 240 μ m, d = 1 cm (Beckmann DKI). 100 mM Imidazolpuffer, 0,8 mM MgSO₄; pH = 6,8; 37 °C.

Auswertung im halblogarithmischen Netz (Kreise und Punkte) unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Substratzugabe.
 ΔE = Änderung der Extinktion.

sei aus der in Abbildung 2 und 3 gezeigten Stoffwechselkette des arbeitenden Muskels herausgehoben worden (Metabolite, Enzym und aktivierendes Mg²⁺). Wie Warburg und Christian gezeigt haben [28], läuft die Reaktion nach der ersten Ordnung ins Gleichgewicht. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also in jedem Zeitpunkt proportional zur Ablenkung $\Delta[A]$ der Substratkonzentration vom Gleichgewichtswert:

$$-\frac{d(\Delta[A])}{dt} = k \Delta[A] \quad (3)$$

$$\Delta[A]_t = \Delta[A]_0 e^{-kt}$$

[A], [P] = beliebige Konzentration von Substrat und Produkt

\bar{A} , \bar{P} = Konzentration im Gleichgewicht

$\Delta[A] = [A] - \bar{A} =$ Ablenkung der Substratkonzentration aus dem Gleichgewicht. Der Zusammenhang zwischen $\Delta[A]$ und Γ , dem in Gl. (1) eingesetzten „Massenwirkungsquotienten“, im Ungleichgewicht ist [*]: $\Gamma = [\bar{P}] - \Delta[A]$

$$[\bar{A}] + \Delta[A]$$

Mit Gleichung (2) erhält man dann:

$$\Delta[A] = \frac{[\bar{P}] (K_{eq} - \Gamma)}{K_{eq} \Gamma + K_{eq}} \quad (4)$$

Wird das System durch Zugabe einer geringen Metabolitkonzentration erneut aus dem Gleichgewicht ge-

[*] In einer vorangehenden Arbeit [29] haben wir den Konzentrationsquotienten im Massenwirkungsgleichgewicht mit \bar{Q} und den im Ungleichgewicht mit Q bezeichnet. Nunmehr verwenden wir für ersten K_{eq} und für letzteren das von W. Kuhn [19] bereits eingeführte Zeichen Γ , nicht zuletzt um Verwechslungen mit der zweckmäßigen Bezeichnungsweise Clelands [30] im Bereich der Enzymkinetik zu vermeiden. Dort bedeutet [Q] die Konzentration eines zweiten Produktes, vgl. Gl. (14).

[28] O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 310, 384 (1941).

[29] H. Schimassek, B. Kadenbach, W. Rübsamen u. Th. Bücher in G. Weber: Symposium on Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Liver. Pergamon Press 1963, im Druck.

[30] W. W. Cleland, Biochim. biophysica Acta 67, 104 (1963).

hoben, dann wiederholt sich der Prozeß der Relaxation (Punkte in Abb. 5).

Die Relaxationszeit [**] τ_{ss} , das Reziproke der monomolekularen Reaktionskonstante k :

$$\tau_{ss} = \frac{1}{k}, \quad (5)$$

ist die Zeit, in der die Ablenkung auf den e-ten Teil des Ausgangswertes abklängt.

ersetzen wir, das Dargelegte zusammenfassend, in Gl. (3) die beliebige Ablenkung $\Delta[A]$ durch $\Delta[A]_{st}$, die Ablenkung der durchflossenen Reaktion im stationären Zustand, und zugleich $\frac{d(\Delta[A])}{dt}$ durch V_{st} , die Stromstärke, dann erkennen wir, daß die Ablenkung und die Stromstärke in einer einfachen Beziehung zueinander stehen:

$$V_{st} = k \Delta[A]_{st} = \frac{\Delta[A]_{st}}{\tau_{ss}}; \quad (6)$$

Alberty, dessen Arbeitskreis wir in diesem Zusammenhang Pionierarbeit verdanken [31], hat darauf hingewiesen, daß Gl. (6) dem Ohmschen Gesetz analog ist:

$$\text{Stromstärke} = \frac{\text{Spannung}}{\text{Widerstand}}$$

Dem Begriff der Relaxation entsprechend, gilt Gl. (6) allgemein nur für geringe Ablenkungen vom Gleichgewicht. Doch ist ein für ihre Anwendung günstiger Umstand, daß eine große Zahl enzymatisch katalysierter Reaktionen auch nach größeren Ablenkungen dem Gleichgewicht nach der ersten Ordnung zustrebt: nicht nur die hier genannte Enolase-Reaktion, sondern beispielsweise auch das komplizierte Testsystem der Phosphoglyceratkinese [33] (vgl. auch Abb. 9).

6. Zwei-Partner-Reaktion (Enolase)

Nach *Hammes* und *Alberty* [31] gehen wir bei der Ableitung der Relaxationszeit einer enzymatischen Reaktion von der allgemeinen Gleichung der Reaktionsgeschwindigkeit aus. Sie ergibt sich nach der Michaelis-Haldane-Theorie unter Annahme stationärer Konzentrationen der intermediären Enzym-Substrat- oder Enzym-Produkt-Komplexe. Wir verwenden die von *Cleland* [30] angegebene Nomenklatur [vgl. Gl. (1) bis (3)].

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{\frac{V_1}{K_a} [A] - \frac{V_2}{K_p} [P]}{1 + \frac{[A]}{K_a} + \frac{[P]}{K_p}} \quad (7)$$

K_a, K_p = Michaeliskonstanten

V_1, V_2 = Maximalgeschwindigkeiten für Hin- und Rückreaktion.

Nach Gl. (4) ist $[A] = [\bar{A}] + \Delta[A]$ und $[P] = [\bar{P}] - \Delta[A]$. Mit $\Delta[A] \ll [\bar{A}], [\bar{P}]$ ergibt sich

[**] Unter Relaxationszeit τ_{ss} verstehen wir hier die nach enzymkinetischen Gesichtspunkten definierte Relaxationszeit des stationären Zustandes. Wir haben die Bezeichnung von *Hammes* und *Alberty* [31] übernommen.

[31] G. G. Hammes u. R. A. Alberty, J. Amer. chem. Soc. 82, 1564 (1960).

[32] R. A. Alberty, J. Amer. chem. Soc. 75, 1928 (1953).

[33] Th. Bücher, Biochem. biophysica Acta I, 292 (1947).

$$-\frac{d\Delta[A]}{dt} = \Delta[A] \frac{\frac{V_1}{K_a} + \frac{V_2}{K_p}}{1 + \frac{[\bar{A}]}{K_a} + \frac{[\bar{P}]}{K_p}} \quad (8)$$

Da gleichzeitig gilt:

$$-\frac{d\Delta[A]}{dt} = \frac{\Delta[A]}{\tau_{ss}} \quad (3)$$

ist

$$\tau_{ss} = \frac{1 + \frac{[\bar{A}]}{K_a} + \frac{[\bar{P}]}{K_p}}{\frac{V_1}{K_a} + \frac{V_2}{K_p}} \quad (9)$$

Mit Verwendung der „Haldane-Alberty-Beziehung“ [32]

$$\frac{V_1 \cdot K_p}{V_2 \cdot K_a} = K_{eq} = \frac{[\bar{P}]}{[\bar{A}]} \quad (7a)$$

erhalten wir

$$\tau_{ss} \cdot V_1 = \frac{[\bar{P}]}{K_{eq} + 1} + \frac{K_{eq} K_a}{K_{eq} + 1} \quad (10)$$

Abbildung 5 gibt die Zusammenstellung einer größeren Anzahl von Relaxationsmessungen mit dem Enzym Enolase (kristallisiert aus Kaninchenmuskel [34]). Die im oben diskutierten Versuch (Abb. 4) gemessenen Werte

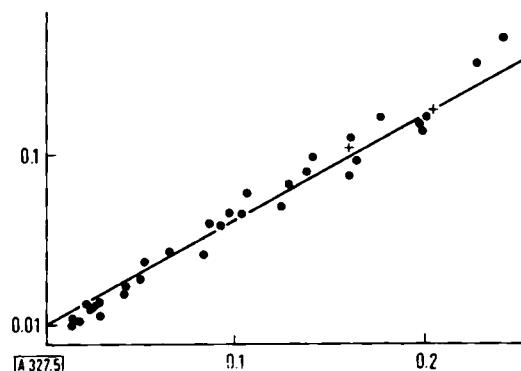


Abb. 5. Enolase-Reaktion: Relaxationszeit \times Enzymeinheiten pro Volumeneinheit (Ordinate) gegen Gleichgewichtskonzentration des Phosphoenolpyruvats (Abszisse). Die Kreuze entsprechen den Werten der in Abb. 4 wiedergegebenen Versuche. Konstanten der Regressionsgeraden im Text [Gleichung (11)].

Ordinate: $\tau_{ss} \cdot V_1$ [mMol/l].

Abszisse: [PEP] [mMol/l].

sind durch Kreuze gekennzeichnet. Man erkennt, daß die Relaxationszeit von der eingesetzten Enzymaktivität (eingeführt durch die Geschwindigkeit der Hinreaktion V_1 [Enzymeinheiten [*] pro ml]) und von der Gleichgewichtskonzentration der Metabolite abhängt. Analog zu Gl. (10) wird die Regressionsgerade durch Gl. (11) wiedergegeben.

$$\tau_{ss} \cdot V_1 = [\bar{P}] \cdot 0,56 + 0,01 \quad [\text{mMol/l}] \quad (11)$$

V_1 = Enzymeinheiten pro ml [*]

Zur Anwendung dieser Beziehungen auf die Verhältnisse in der Staustrecke des arbeitenden Muskels setzen wir nach Gl. (4)

[34] R. Czok u. Th. Bücher, Adv. Protein Chem. 15, 315 (1960).

[*] Eine Einheit entspricht dem Umsatz von einem μ Mol Substrat pro Stunde im Standardtest [35] bei der Temperatur des Relaxationsexperiments.

$$\Delta[A]_{st} = \frac{[\bar{P}] (K_{eq} - \Gamma)}{K_{eq}\Gamma + K_{eq}}, \quad (4a)$$

Γ hat darin die Bedeutung eines Quotienten der Konzentrationsprodukte („Massenwirkungsquotienten“) im stationären Ungleichgewicht [vgl. Gl. (1) und (4)]. $\Delta[A]_{st}$ ist bereits im Zusammenhang mit Gl. (6) definiert worden.

Die Beziehung (4a) für $\Delta[A]_{st}$ können wir in Gl. (6) einsetzen, so daß sich ergibt:

$$V_{st} = \frac{1}{\tau_{ss}} \frac{[\bar{P}] (K_{eq} - \Gamma)}{K_{eq}\Gamma + K_{eq}}$$

Um die Relaxationszeit des Gewebeenzymes zu erhalten, teilen wir den in vitro gemessenen Wert durch die Proportion $[Enzymeinheiten \text{ im Gewebe}] / [Enzymeinheiten \text{ im Relaxationsexperiment}]$ [*]:

$$(\tau_{ss})_{\text{Gewebe}} = \frac{(V_{st} \cdot V_1)_{\text{Exp.}}}{(V_1)_{\text{Gewebe}}} \quad (12)$$

Dazu wurde die im Muskel lokalisierte Enolase erschöpfend extrahiert und unter den gleichen Bedingungen getestet (30000 Einheiten/g Frischgewicht bei 37 °C), unter denen V_1 des Relaxationsexperiments ermittelt worden war (4-10 Einheiten/ml). Wir wagen also anzunehmen, daß die Enzymmoleküle im zellulären Milieu und bei vielhundertfach größerer Konzentration ebenso wirken wie in der homogen verdünnten Lösung. Mit dieser Annahme erhalten wir

$$V_{st} = \frac{(V_1)_{\text{Gewebe}}}{(\tau_{ss} V_1)_{\text{Exp.}}} \frac{[\bar{P}] (K_{eq} - \Gamma)}{K_{eq}\Gamma + K_{eq}} \quad (13)$$

In diesem Sinne ist in Abbildung 6 die Beziehung zwischen der Stromstärke der Glykolyse im Bauchdeckenmuskel der Ratte und der Ablenkung der Enolase-Reaktion aus dem Gleichgewicht für verschiedene Werte der Gleichgewichtskonzentration des Phosphoenolpyruvats dargestellt worden. Tatsächlich trifft man bei Ablenkun-

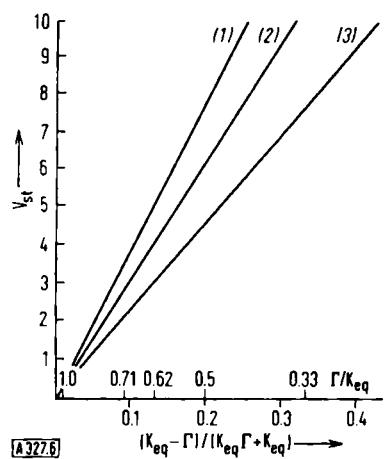


Abb. 6. Beziehung zwischen Stromstärke der Muskel-Glykolyse (Ordinate) und Ungleichgewicht in der Enolase-Reaktion (Abszisse) [Gl. (13)].

$(V_1)_{\text{Gewebe}} = 30 \cdot 10^3$ Einheiten pro Gramm Frischgewicht; 37 °C; $(\tau_{ss} \cdot V_1)_{\text{Exp.}}$ aus Abb. 5.

Kurve (1): $[P] = 56 \text{ mμMol/g Frischgew.}$

(2): $[P] = 28 \text{ mμMol/g Frischgew.}$

(3): $[P] = 14 \text{ mμMol/g Frischgew.}$

Ordinate: V_{st} [mμMol/Std. x g Frischgew.]

Abszisse, oben: Γ/K_{eq} .

unten: $(K_{eq} - \Gamma)/(K_{eq}\Gamma + K_{eq})$.

gen (Abszisse: Γ/K_{eq}), die den am Organ gemessenen Werten entsprechen (Abb. 3), die Größenordnung der Stromstärke (Ordinate: V_{st}), die sich aus der Bildung von Lactat in situ ergibt [7]. Der Ordnung halber sei bemerkt, daß hier Messungen an verschiedenen Spezies kombiniert worden sind (Enzym des Kaninchens, Muskel der Ratte).

7. Vier-Partner-Reaktion in der Staustrecke (Lactat-Dehydrogenase)

Die Behandlung symmetrischer Reaktionen mit vier Partnern $A + B \rightleftharpoons P + Q$ ist wesentlich schwieriger als die von Zwei-Partner-Reaktionen. Sie ist jedoch wichtig, weil der *Eingriff koppelter Nucleotide* in den Intermediastoffwechsel zumeist über Vier-Partner-Reaktionengeschieht. Vier-Partner-Reaktionen, die in Staustrecken liegen, gestatten Aussagen über den Status koppelter Nucleotid-Systeme, die unter Umständen auf anderem Wege nicht erhältlich sind [10, 11, 36]. Da definitionsgemäß im Gleichgewicht die Potentialdifferenz zwischen zwei gegenüberliegenden Partnern numerisch gleich und entgegengesetzt der des anderen Paars ist, läßt sich beispielsweise das Redoxpotential des DPNH/DPN-Systems demjenigen gleichsetzen, das aus dem Quotienten der Gehalte seiner Partner errechnet wird.

Auf Grund eigener Beobachtungen und auf Grund solcher der Gruppe von *Lynen* und *Holzer* [36], haben wir vor fünf Jahren entsprechende zellphysiologische Konsequenzen für den Redoxstatus der extramitochondrialen Pyridinnucleotide der Leber gezogen [10]. Unser Argument für den quasi-statischen Zustand des Lactat-Dehydrogenase-Systems



war die annähernde Übereinstimmung der Redoxpotentiale dreier DPN-abhängiger extramitochondrialer Substratpaare der ruhenden Leber [10, 11, 27]. *Hohorst* et al. [21, 38] haben in der Zwischenzeit gezeigt, daß diese Annäherung der Redoxpotentiale auch bei Bewegungen der Absolutwerte, sei es durch Abstellen der Blutversorgung (Ischämie) [37], sei es durch diätetische oder endokrine Einflüsse [38], gewahrt wird.

Neue Argumente hat *Schimassek* durch Fortführung seiner *Durchströmungen* der Rattenleber mit synthetischem Perfusionsmedium im geschlossenen, extrakorporalen Kreislauf bringen können [39, 40].

Der Abstrom gebildeten Lactats in metabolisierende Bezirke außerhalb der Leber ist hier ausgeschlossen. Da

[35] Th. Bücher, D. Pette u. W. Luh in *Hoppe-Seyler-Thierfelder: Handbuch der physiologisch-chemischen Analyse*, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, im Druck.

[36] H. Holzer, G. Schulze u. F. Lynen, Biochem. Z. 328, 252 (1956).

[37] H. J. Hohorst, F. H. Kreutz u. M. Reim, Biochem. biophys. Res. Commun. 4, 159 (1961).

[38] H. J. Hohorst, F. H. Kreutz, M. Reim u. H. Hübener, Biochem. biophys. Res. Commun. 4, 163 (1961); E. Kirsten, R. Kirsten, H. J. Hohorst u. Th. Bücher, ibid. 4, 169 (1961).

[39] H. Schimassek, Life Sciences 1, 629, 635 (1962).

[40] H. Schimassek, Biochem. Z. 336, 460, 468 (1963).

auch im Bereich des Leberparenchyms nennenswerte Möglichkeiten für einen Verbrauch von Lactat ohne Beteiligung der Lactat-Dehydrogenase fehlen, befindet sich das System Lactat/Pyruvat in einer Sackgasse.

Die bei Veränderung der Sauerstoffversorgung (Abb. 7) oder bei der Belastung mit Lactat [40] beobachtete Elastizität zeigt den dynamischen Charakter des stationären

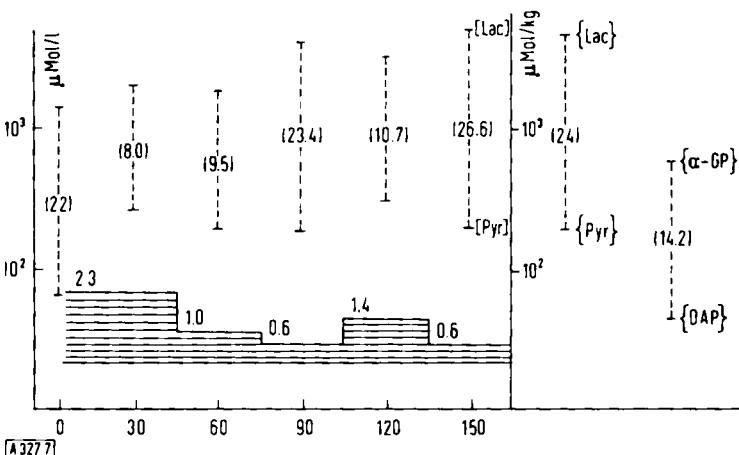


Abb. 7. Perfusion der isolierten Rattenleber mit synthetischem „Blut“ im geschlossenen Kreislauf [39, 40]. Ordinate: Konzentrationen des Lactats (oben) und Pyruvats (unten) im Medium bei wechselnder Durchströmungsstärke. In Klammern: Quotienten. Bei Stromstärken < 1 wird der Sauerstoffverbrauch des Gewebes ($200 \mu\text{Atom/g} \times \text{Std.}$) nicht mehr voll gedeckt. Der hohe Quotient zu Beginn des Versuches ist eine Folge der Ischämie des Organs während der Überführung in den Kreislauf. Rechts: Gewebsgehalte bei Versuchsende:
 $\{\alpha\text{-GP}\}/\{\text{DAP}\} \times \{\text{Pyruvat}\}/\{\text{Lactat}\} = 0.59$ (vgl. auch Tabelle 4). Die Zahlen am Profil, im linken Teil, unten, geben die Durchströmungsstärken in ml/min pro g Leber an.
 Ordinate: Konzentration [$\mu\text{Mol/l}$] oder Gehalt [$\mu\text{Mol/kg}$ Frischgew.]
 Abszisse: Zeit [min].

Zustandes. Das isolierte Organ baut dabei in dem wesentlich größeren Volumen des Perfusionskreislaufes (100 ml gegenüber 10 bis 15 ml Blut) sowohl in der Konzentration als auch in der Redox-Proportion etwa die gleichen Werte auf, wie man sie im Blutplasma findet.

Des weiteren geht aus diesen Versuchen eine Übereinstimmung zwischen den im Gewebe analysierten *Zellulärgehalten* und den in der Durchströmungsflüssigkeit gemessenen *Konzentrationen* der Metabolite hervor (Tabelle 2). Lynens Postulat [41], „daß die Berechnung absoluter Konzentrationswerte aus analytischen Daten, bei deren Gewinnung die Zellstruktur zerstört wurde, ohne Sinn ist“, gilt nicht im hier erörterten Bereich. Die in den vorangegangenen Abschnitten dargelegten Verhältnisse in Schimasseks System ermöglichen vielmehr

Tabelle 2. Perfusion der isolierten Leber im geschlossenen System. Metabolitwerte im Gewebe (korrigiert für Gehalt an Medium und interstitieller Flüssigkeit) und im Medium nach dreistündiger Durchströmung unter Standardbedingungen [40].

| | Zellulärgehalt [11] [$\mu\text{Mol/kg}$] | Konzentration im Medium [$\mu\text{Mol/l}$] |
|----------------|---|--|
| Lactat | 3,5 | 3,5 |
| Pyruvat | 0,37 | 0,33 |
| Lactat/Pyruvat | 9,5 | 10,5 |

[41] F. Lynen in: Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957. Pergamon Press, London 1958, besonders S. 28.

eine einwandfreie und durchaus sinnvolle Zuordnung absoluter Metabolitgehalte zu zellulären, thermodynamisch verwertbaren Konzentrationen.

Wenn absoluter Zellulärgehalt und Konzentration übereinstimmen, dann gilt dies natürlich um so mehr für die Quotienten der Gehalte. Damit wird auch das unter Verwendung des Gehaltsquotienten berechnete Redoxpotential thermodynamisch verwertbar. Angesichts der fundamentalen Bedeutung des Redoxpotentials im DPNH/DPN-System des extramitochondrialen Raumes verdienen Schimasseks Versuche besondere Beachtung. Im folgenden Abschnitt werden wir weitere (kinetische) Argumente dafür bringen, daß das System Lactat/Pyruvat ein brauchbarer Indikator für dieses Potential ist. In Untersuchungen, deren Existenz uns bedauerlicherweise bei der Abfassung früherer Mitteilungen entgangen war, hat Huckabee [42] beim Menschen und im Tierversuch folgendes gezeigt: für die Erkennung eines zellulären Sauerstoffmangels sind nicht die Bewegungen des Lactat-Spiegels im Plasma, sondern der Quotient Lactat/Pyruvat maßgebend. Durch Injektion der Metabolite oder von Bicarbonat und durch Hyperventilation konnte er große Schwankungen des Lactat-Spiegels, ohne Beeinflussung des Quotienten Lactat/Pyruvat, erzeugen. Die Analogie zu den dargestellten Perfusionsversuchen ist weitgehend. Dieser Aspekt wird durch Tabelle 3 er-

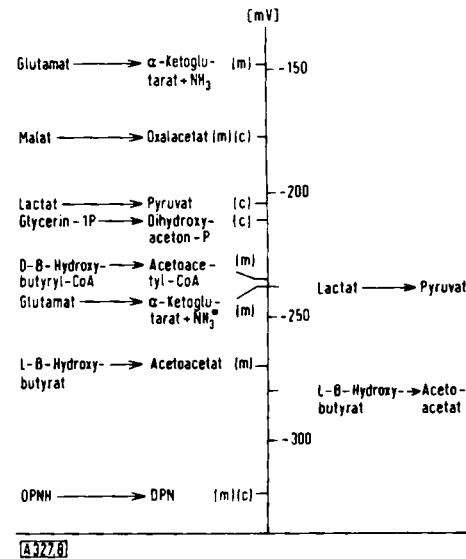


Abb. 8. Zur Koordination zellulärer Redoxpotentiale durch das Blutplasma. Links: Mittelpotentiale zellulärer Redoxsysteme bei pH = 7 und 37 °C. Rechts: Potentiale („Ist“-Potentiale [10]) der Redoxsysteme des Blutplasmas. Die mit (c) bezeichneten Systeme des extramitochondrialen Raumes (c-Raum [10, 52]) einzelner Zellen (links) werden über das System Lactat-Pyruvat (rechts) gekoppelt. Die Homöostasie dieses Potentials gibt die Basis für das Redoxspiel der DPN-abhängigen Systeme des extramitochondrialen Raumes. Analoges wird mit Bezug auf die (m)-Systeme für das Paar β-Hydroxybutyrat-Acetoacetat des Plasmas diskutiert ([43] sowie [44–46]). $- \bullet [\text{NH}_3] = \text{mMol/l}$.

[42] W. Huckabee, J. clin. Invest. 37, 244, 255, 264 (1958).

[43] M. Klingenberg u. H. v. Häfen, Biochem. Z. 337, 120 (1963).

[44] P. Borst in: Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry, Moskau 1961. Pergamon Press, London 1963, Bd. II, besonders S. 233.

[45] P. Borst in Th. Bicher: Redoxfunktionen Cytoplasmatischer Strukturen, Symposium, Wien 1962. Wiener Medizinische Akademie für Ärztliche Fortbildung, Wien 1962, besonders S. 189.

[46] P. Borst in P. Karlson: Funktionelle und Morphologische Organisation der Zelle. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.

Tabelle 3. Einfluß verschiedener Perfusionsbedingungen auf den Lactat/Pyruvat-Quotienten in der Leber und im Perfusionsmedium [40].

| Perfusionsbedingungen | Organ {Lactat} {Pyruvat} | Medium [Lactat] [Pyruvat] |
|--|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Homologes Blut</i> | 9,6 | 8,0 |
| <i>Synthetisches Medium [a]</i> | | |
| Kontrolle | 10 | 10 |
| verminderter Durchfluß | 25 | 26 |
| Prednisolon-Zusatz (Durchfluß normal) | 17,7 | 18,2 |

[a] Tyrodelösung, Serumalbumin, Rindererythrocyten [39].

weitert. Sie demonstriert im extrakorporalen System Einflüsse regulatorischer Mechanismen auf das Redoxpotential im extramitochondrialen, DPN-abhängigen Bereich, wie sie Hohorst et al. [38] teilweise bereits im Tierexperiment beschrieben haben.

Die Übereinstimmung der Redoxpotentiale in Gewebe und Plasma führt uns dazu, die interstitielle Flüssigkeit und das Plasma des Blutes gewissermaßen als „gemeinsame Staustrecke“ der extramitochondrialen Lactat-Dehydrogenase-Systeme der Zellen eines Organs und schließlich auch aller Organe zu betrachten [10] (Abb. 8). Klingenberg [43] hat diese These kürzlich auf das System β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat mit Bezug auf die Kopplung mitochondrialer Kompartimente ausgedehnt (vgl. auch [45, 46]).

8. Ablenkung der Vier-Partner-Reaktion

Wie der in Abbildung 9 dargestellte Versuch zeigt, erfordert die Messung von Relaxationszeiten der Vier-Partner-Reaktionen im optischen Test keinen größeren

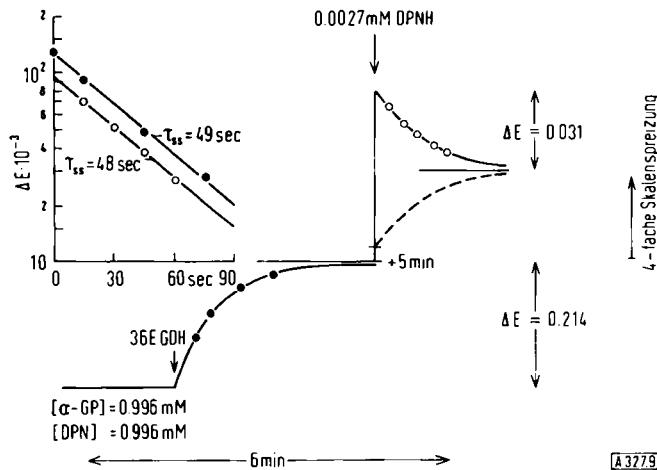
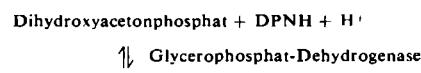


Abb. 9. Einstellung des Gleichgewichts und Relaxation (nach Zusatz von DPNH) der Glycerophosphat-Dehydrogenase-Reaktion



im optischen Test: Beginn links mit Zusatz von 36 E/ml Glycerophosphat-Dehydrogenase aus Kaninchennuskulatur [34]; Registrierung bei 334 m μ , d = 4 cm, Photometer Eppendorf, 4-fache Spreizung der Skala vor Zugabe einer geringen Menge DPNH. KH₂PO₄/K₂HPO₄-Puffer, Ionenstärke μ = 200 mM, pH = 6,88, 37 °C. Die gestrichelte Kurve deutet die Abnahme der Dihydroxyacetophosphatkonzentration an. Sie wurde unter der Annahme $\Delta DAP = \Delta DPNH$ berechnet.

Aufwand als im Fall der Zwei-Partner-Reaktionen. Die oben erwähnten Schwierigkeiten der Auswertung erwachsen aus den bedeutend komplizierteren Mechanismen am Enzym wie auch aus der größeren Zahl der Partner in der Reaktion.

Meßtechnisch praktizierbar, und im Falle stationär arbeitender Gewebe auch zellphysiologisch gerechtfertigt, ist der Sonderfall, daß eine der Metabolitkonzentrationen konstant bleibt und daß die Konzentrationen zweier weiterer Partner groß gegen die Abweichung eingesetzt werden. Eine derartige, in der Wahl der Zahlenwerte den zellulären Verhältnissen angepaßte Anordnung ist in Abbildung 10 dargestellt worden. Die Ablenkung wird

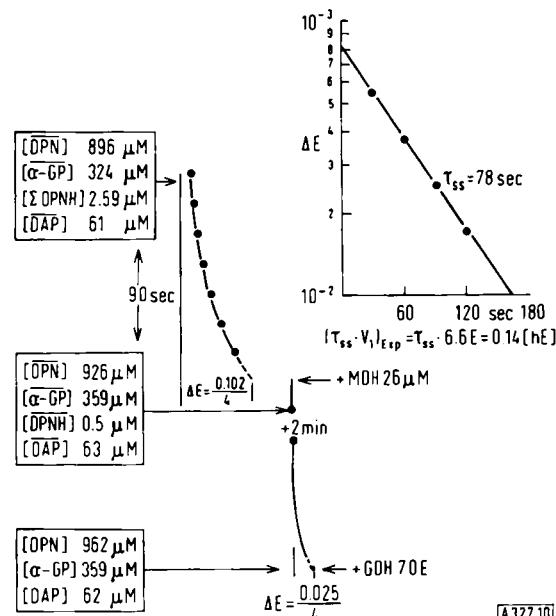


Abb. 10. Relaxation der Glycerophosphat-Dehydrogenase-Reaktion nach Zusatz einer DPNH-puffernden Konzentration von Malat-Dehydrogenase. Beginn unten mit Zusatz von 7 Einheiten Enzym/ml entsprechend Abb. 9. Registrierung bei 334 m μ , d = 2,0 cm (Photometer Eppendorf), 4-fache Spreizung der Skala; K-Phosphat-Puffer, Ionenstärke μ = 60 mM; 0,7 mM EDTA; pH = 7,2; 25 °C. Der Zusatz von 26 μM Malat-Dehydrogenase (36 · 10³ g/Mol) hat einen unspezifischen Extinktionsprung zur Folge. [ΣDPNH] = freies und an MDH gebundenes DPNH.

dort durch Zugabe eines DPNH-bindenden Proteins (dialysierte Malat-Dehydrogenase [*]) in puffernder Konzentration erzeugt. Das Enzymprotein bindet 1 Mol DPNH pro 36 · 10³ Gramm. Die Dissoziationskonstante wurde durch fluorimetrische Titration mit DPNH in Gegenwart von DPN, α-GP und DAP bestimmt.

$$D_{(DPNH-MDH)} = \frac{[MDH][DPNH]}{[MDH - DPNH]} = 3 [\mu\text{Mol/l}]$$

Die Titration zeigte auch, daß eine wesentliche Verfälschung der Ergebnisse durch die Bildungsgeschwindigkeit des MDH-DPNH-Komplexes nicht zu erwarten war. Die Reaktion wurde bei 334 m μ annähernd im isobestischen Punkt [47] verfolgt. Die bei 25 °C gemessenen Relaxationszeiten, bezogen auf eine Enzymeinheit pro Milliliter, sind für Lactat- und Glycerophosphat-

[*] Herrn Dr. H. U. Bergmeyer, C. F. Boehringer u. Soehne GmbH, Biochemische Abteilung, Tutzing, danken wir für die Malat-Dehydrogenase.

[47] A. Pfeifferer u. E. Hohnholz, Biochem. Z. 331, 245 (1959).

Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel [34] etwa gleich. Sie liegen in einer größeren Reihe von Versuchen zwischen 0,12 und 0,25 Std. × Einheit/ml. Ein störender Effekt besteht in der Überlagerung der Extinktionsablenkung durch eine geringe aber stetige Extinktionsabnahme noch unbekannter Natur, die bei der notwendigen großen Skalenexpansion die genaue Festlegung der Endwerte erschwert.

Setzen wir analog Gl. (4) für die symmetrische Vier-Partner-Reaktion

$$\Gamma = \frac{[P][Q]}{[A][B]} = \frac{([\bar{P}] - \Delta[B])([\bar{Q}] - \Delta[B])}{([A] + \Delta[B])([B] + \Delta[B])} \quad (14)$$

dann ist unter der Voraussetzung $[A] = \text{const.}$ ($A = \text{DPNH}$)

$$\Gamma = K_{\text{eq}} - \frac{\Delta[B]}{[\bar{P}]} - \frac{\Delta[B]}{[\bar{Q}]} + \frac{(\Delta[B])^2}{[\bar{P}][\bar{Q}]} \quad (15)$$

$$1 + \frac{\Delta[B]}{[B]}$$

Nehmen wir weiterhin an ($B = \text{Pyruvat}$ oder $\text{Dihydroxyacetophosphat}$)

$$\frac{\Delta[B]}{[\bar{P}]} \ll 1 \text{ und } \frac{\Delta[B]}{[\bar{Q}]} \ll 1$$

dann vereinfacht sich die Beziehung (15) zu

$$\frac{\Delta[B]}{[B]} = \frac{K_{\text{eq}}}{\Gamma} - 1 \quad (16)$$

Mit Hilfe der Gleichungen (6), (12) und (16) ergibt sich, analog Gl. (13),

$$\left(\frac{V_{\text{st}}}{V_1} \right)_{\text{Gewebe}} = \frac{[\bar{B}]_{\text{st}}}{(\tau_{ss} \cdot V_1)_{\text{Exp}}} \left(\frac{K_{\text{eq}}}{\Gamma} - 1 \right) \quad (17)$$

Die unter vereinfachenden Voraussetzungen erhaltene Gleichung (17) ist im Zusammenhang mit der oben erwähnten Relaxationszeit der DPN-spezifischen Dehydrogenasen in Abb. 11 ausgewertet worden. Auf der

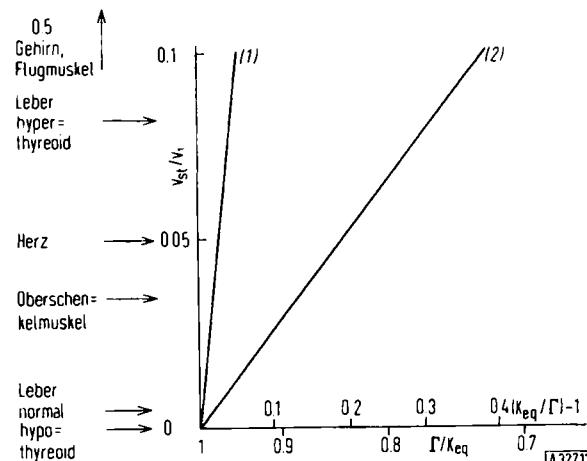


Abb. 11. Beziehung zwischen Stromstärke und Ungleichgewicht in der Lactat-Dehydrogenase-Reaktion (1) und in der Glycerophosphat-Dehydrogenase-Reaktion (2) [Gl. (17)].

Kurve (1): $[\bar{B}] = 0,3 \text{ mMol/l}$

(2): $[\bar{B}] = 0,04 \text{ mMol/l}$

$(\tau_{ss} \cdot V_1)_{\text{Exp.}} = 0,15 \text{ mMol/l}$

Ordinate: V_{st}/V_1

Abszisse, oben: $(K_{\text{eq}}/\Gamma) - 1$

unten: Γ/K_{eq}

Die Pfeile an der Ordinate zeigen die Proportionen der Enzymaktivitäten von $\alpha\text{-GPOX}$ und GDH (vgl. Tab. 4) in Geweben der Ratte und im Flugmuskel der Wanderheuschrecke an ($E_{\alpha}\text{-GPOX}/EGDH$).

Ordinate ist die Relation der Stromstärke V_{st} zur maximalen Enzymaktivität V_1 des Gewebes aufgetragen worden. Die Kurve kann daher zur Abschätzung der Verhältnisse in verschiedenen Geweben dienen, doch ist zu bedenken, daß $(\tau_{ss} \cdot V_1)_{\text{Exp.}}$ mit Glycerophosphat- und Lactat-Dehydrogenase aus dem Skelettmuskel des Kaninchens gemessen wurden.

Für die Diskussion des *Lactat-Dehydrogenase-Systems* ist die steilere Gerade maßgebend (Kurve 1), entsprechend einer Pyruvat-Konzentration von 0,3 mMol/l.

Die aus 1 g Leber-Frischgewicht der Ratte extrahierte und *in vitro* getestete Aktivität der Lactat-Dehydrogenase entspricht bei 37°C einem Umsatz von 30 bis 40 mMol/Stunde. Das ist ein maximaler, für $(V_1)_{\text{Gewebe}}$ einzusetzender Wert; ein minimaler Wert läßt sich (Tab. 4, Spalte 7) aus der *Lactatbildung im Organ* bei einsetzender Ischämie zu 1,7 mMol/g Frischgewicht-Stunde errechnen. Der wirkliche Wert für $(V_1)_{\text{Gewebe}}$ liegt wahrscheinlich ziemlich nahe der oberen Grenze.

In Bezug auf eine obere Grenze der Stromstärke läßt sich aussagen, daß sie beträchtlich unterhalb der maximalen Atmungsgröße des Organs liegen muß. Die maximale Atmungsgröße in der Leber der Ratte beträgt 0,6 mAtom Sauerstoff/g Frischgewicht · Stunde. Dieser Wert entspricht auch dem aus Ischämieversuchen abschätzbar Umsatz von „energiereichem“ Phosphat = 2 mAtom/g Frischgewicht · Stunde.

Die Proportion des maximalen Wertes der Stromstärke zum minimalen Wert für $(V_1)_{\text{Gewebe}}$, also der obere Grenzwert, beträgt

$$\left(\frac{V_{\text{st}}}{V_1} \right)_{\text{max}} = \frac{0,6}{1,7} = 0,35 \quad (18)$$

Dem entspricht nach Abbildung 11, Kurve 1

$$\left(\frac{\Gamma}{K_{\text{eq}}} \right)_{\text{Pyr. Lac.}} = 0,85 \quad (19)$$

also eine Abweichung des „Massenwirkungsquotienten“ Γ von 15 %. Da τ_{ss} unabhängig von der Richtung der Abweichung ist, gilt der errechnete Wert von 15 % für beide Reaktionsrichtungen. Der Abweichung des Massenwirkungsquotienten entspricht die Differenz der Potentiale

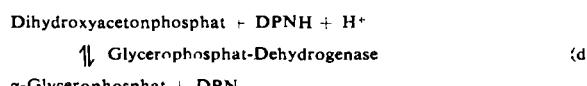
$$\Delta E = - \frac{RT}{2F} \ln \frac{\Gamma}{K_{\text{eq}}} = 2 \text{ mV.}$$

Unsere Berechnung liefert einen maximalen Wert der Abweichung des Redoxpotentials des Systems DPNH/DPN von demjenigen des Systems Lactat/Pyruvat am Wirkort der Lactat-Dehydrogenase. Die physiologische Abweichung wird auch unter extremen Bedingungen wesentlich kleiner sein, da die wirkliche Stromstärke kleiner und vor allem der wirkliche Wert für $(V_1)_{\text{Gewebe}}$ wesentlich größer angenommen werden müssen als die in die Rechnung eingesetzten Werte.

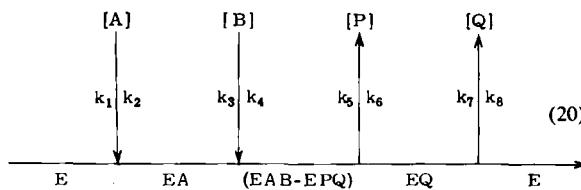
Mit diesen Berechnungen schließt sich der Ring der Indizien um den Status des Lactat/Pyruvat-Systems der Leber bezüglich seiner Verwendung als Indikator für das Redoxpotential des extramitochondrialen Systems DPN/DPNH. Sie zeigen, daß der Anzeigefehler vernachlässigbar ist ($\ll 2 \text{ mV}$).

9. Glycerophosphat-Dehydrogenase

Für die Reaktion $A + B \rightleftharpoons P + Q$ sind hinsichtlich der enzymatischen Katalyse verschiedene Mechanismen denkbar. Bloomfield et al. [48] sowie Cleland [30] haben sie diskutiert. In Bezug auf den Mechanismus der durch Glycerophosphat-Dehydrogenase (v. Euler-Baranowski-Enzym) katalysierten Reaktion



lässt sich aus fluorimetrischen Titrationen ableiten, daß DPNH und DPN unmittelbar mit dem Enzymprotein reagieren. Der von uns für orientierende Rechnungen gewählte Mechanismus ist durch die Bildung von „Zentralkomplexen“ gekennzeichnet. Zur Vereinfachung der Rechnungen und der besseren Übersichtlichkeit halber, nehmen wir eine bestimmte Reihenfolge bei der Bildung transitorischer Komplexe, gemäß der folgenden, von Cleland eingeführten Darstellung, an („ordered Bi Bi“) [*]:



Nach dem Verfahren von King und Altman (zitiert bei [30]) leitet sich aus diesem Schema folgende Gleichung der stationären Reaktions-Geschwindigkeit ab

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{(k_1 k_3 k_5 k_7 [A][B] - k_2 k_4 k_6 k_8 [P][Q]) E_t}{k_2(k_4 + k_5) k_7} \quad (21)$$

$$+ k_1(k_4 + k_5) k_7 [A] + k_2(k_4 + k_5) k_8 [Q]$$

$$+ k_3 k_5 k_7 [B] + k_2 k_4 k_6 [P]$$

$$+ k_1 k_3 (k_5 + k_7) [A][B] + (k_2 + k_4) k_6 k_8 [P][Q]$$

$$+ k_1 k_4 k_6 [A][P] + k_1 k_3 k_6 [A][B][P]$$

$$+ k_3 k_5 k_8 [B][Q] + k_3 k_6 k_8 [B][P][Q]$$

In der zweckmäßigen Nomenklatur von Cleland stellt sie sich folgendermaßen dar ([30], besonders S. 127):

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{V_1 V_2 \left([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_{eq}} \right)}{K_{ia} K_b V_2 + K_b V_2 [A] + K_a V_2 [B] + V_2 [A][B] + \{ \begin{array}{l} \frac{K_q V_1 [P]}{K_{eq}} + \frac{K_p V_1 [Q]}{K_{eq}} + \frac{V_1 [P][Q]}{K_{eq}} + \frac{K_q V_1 [A][P]}{K_{ia} K_{eq}} \\ + \frac{K_a V_2 [B][Q]}{K_{iq}} + \frac{V_2 [A][B][P]}{K_{ip}} + \frac{V_1 [B][P][Q]}{K_{ib} K_{eq}} \end{array} \} } \quad (22)$$

K_a usw. = Michaeliskonstanten ($[B]$ im Sättigungsbereich, $[P]$ und $[Q]$ abwesend).

V_1 = Maximalgeschwindigkeit ($[A]$ und $[B]$ im Sättigungsbereich, $[P]$ und $[Q]$ abwesend).

V_2 analog V_1 für die Rückreaktion.

K_{ia} usw. = Hemmungskonstanten (Dissoziationskonstanten von EA usw.; alle Konstanten haben die Dimension $\mu\text{Mol/l}$).

[48] V. Bloomfield, L. Peller u. R. A. Alberty, J. Amer. chem. Soc. 84, 4365, 4367, 4375 (1962).

[*] Die graphische Darstellung der Reaktionssequenz ist von links nach rechts zu lesen. Das Enzym ist durch die horizontale

τ_{ss} erhalten wir durch eine dem auf die Zwei-Partner-Reaktion angewandten Verfahren von Hammes und Alberty (vgl. Seite 886) analoge Abwandlung. Unter der Annahme $\Delta A \ll [A], [B], [P], [Q]$ sowie unter ausgiebiger Verwendung der von Cleland angegebenen „Haldane“-Beziehungen (vgl. [30] Seite 128) ergibt sich:

$$\frac{K_{ia} K_b + K_b [\bar{A}] + K_a [\bar{B}] + [\bar{A}][\bar{B}] + \frac{K_a}{K_{iq}} [\bar{B}][\bar{Q}] + \frac{1}{K_{ip}} [\bar{A}][\bar{B}][\bar{P}]}{\tau_{ss} \cdot V_1} = \frac{[A] + [\bar{B}] + \frac{[\bar{P}]}{K_{eq}} + \frac{[\bar{Q}]}{K_{eq}}}{+ \frac{V_1}{V_2 K_{eq}} \left(K_q [\bar{P}] + K_p [\bar{Q}] - [\bar{P}][\bar{Q}] + \frac{K_q}{K_{ia}} [\bar{A}][\bar{P}] + \frac{1}{K_{ib}} [\bar{B}][\bar{P}][\bar{Q}] \right)}$$

$$[A] + [\bar{B}] + \frac{[\bar{P}]}{K_{eq}} + \frac{[\bar{Q}]}{K_{eq}} \quad (23)$$

Bleiben $[\bar{P}], [\bar{Q}]$ und $[\bar{A}][\bar{B}]$ konstant, dann läßt sich $\tau_{ss} \cdot V_1$ als Funktion von $[B]$ darstellen:

$$\tau_{ss} \cdot V_1 = \frac{\alpha [\bar{B}]^2 + \beta [\bar{B}] + \gamma}{[\bar{B}]^2 + \delta [\bar{B}] + \eta} \quad [\mu\text{Mol/l}] \quad (24)$$

Setzen wir die in orientierenden Experimenten nach der Methode von Florini und Vestling [48a] und durch fluorimetrische Titration ermittelten kinetischen Konstanten ein (Ta-

Tabelle 4. Kinetische Konstanten

Messung nach

Florini und Vestling

$$V_1 = 3,8 \mu\text{Mol/l} \cdot \text{Std.}$$

$$V_2 = 0,8 \mu\text{Mol/l} \cdot \text{Std.}$$

$$K_a = 2 \mu\text{Mol/l}$$

$$K_b = 30 \mu\text{Mol/l}$$

$$K_p = 530 \mu\text{Mol/l}$$

$$K_q = 980 \mu\text{Mol/l}$$

25 °C, 50 mMol/l Triäthanolamin-Puffer, 5 mMol/l EDTA, pH = 7,5, $K_{eq} = 2,5 \cdot 10^4$

$$K_{ia} = 0,01 \mu\text{Mol/l}$$

$$K_{iq} = 2,8 \mu\text{Mol/l}$$

belle 4) und betrachten die Ausdrücke mit K_{ib} und K_{ip} als hinreichend klein, so ist die Gleichung (19) mit

$$[\bar{B}] = [\bar{DAP}] \quad [\bar{P}] = [\bar{x-GP}] = 200 \mu\text{Mol/l}$$

$$[A] \cdot [B] = 4(\mu\text{Mol/l})^2 \quad [\bar{Q}] = [\bar{DPN}] = 500 \mu\text{Mol/l}$$

$$\tau_{ss} \cdot V_1 = \frac{350 [\bar{DAP}]^2 + 117 [\bar{DAP}] + 80 \cdot 10^3}{[\bar{DAP}]^2 + 2,7 \cdot 10^{-2} [\bar{DAP}] + 4} \quad [\mu\text{Mol/l}] \quad (25)$$

Es zeigt sich, daß mit abnehmender Gleichgewichtskonzentration von $[A] \cdot [\bar{DAP}]$ die Relaxationszeit zunimmt. Die graphische Darstellung der Funktion ähnelt einer Hyperbel.

Unsere Messungen (Abb. 12) über die Beziehung zwischen $\tau_{ss} \cdot V_1$ und der Gleichgewichtskonzentration des Dihydroxyacetophosphats entsprechen der oben zitierten Theorie insofern, als sich im Bereich niedriger Konzentrationen von $[\bar{DAP}]$ eine starke Variation von $\tau_{ss} \cdot V_1$ zeigt. Auch die Form der Kurve ähnelt der nach Gl. (25) dargestellten. Jedoch liegen die aus Gl. (25) er-

Linie gekennzeichnet. Oberhalb stehen freie Substrate (A, B, \dots) und Produkte (P, Q, \dots), unterhalb die transitorischen Komplexe. Die Zentralkomplexe (EAB) und (EPQ) sind dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht an bimolekularen Reaktionen mit Substraten oder Produkten teilnehmen, sondern nur (monomolekular) Spaltung oder Isomerisierung erleiden können.

[48a] R. Florini u. C. S. Vestling, Biochim. biophysica Acta 25, 575 (1957).

rechneten Zahlenwerte für $\tau_{ss} \cdot V_1$ ganz erheblich über den experimentellen. Ähnlich verhält es sich bei der Enolase-Reaktion. Auch hier wird die Form der experi-

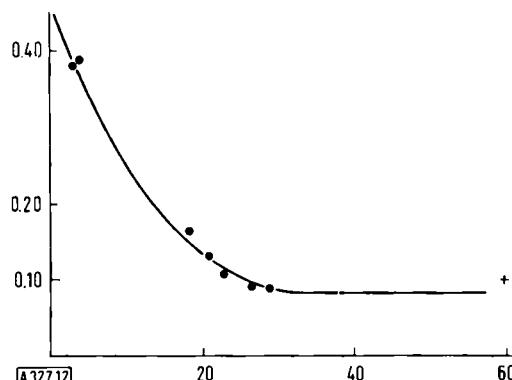


Abb. 12. Glycerophosphat-Dehydrogenase-Reaktion: Relaxationszeit \times Enzymeinheiten pro Volumeneinheit (Ordinate) gegen Gleichgewichtskonzentration von Dihydroxyacetonephosphat (Abszisse). Versuche nach dem Typ von Abb. 9 ($[DAP] \times [DPN]$ ungefähr konstant), jedoch $pH = 7,2$; Ionenstärke $\mu = 0,1$. Das Kreuz entspricht dem in Abb. 10 wiedergegebenen Versuch.
Ordinate: $\tau_{ss} \cdot V_1$ [$\mu\text{Mol/l}$].
Abszisse: $[DAP]$ [$\mu\text{Mol/l}$].

10. Glycerophosphat-Cyclus

Das System Glycerophosphat/Dihydroxyacetonephosphat darf nicht ohne weiteres analog dem System Lactat/Pyruvat behandelt werden. Erstens ist die zelluläre Aktivität der GDH um mindestens eine Größenordnung geringer (Tab. 4) als die der LDH (außer in Flugmuskeln von Insekten [49, 52]). Zweitens ist V_{st}/V_1 nicht nur eine Funktion von τ_{ss} und Γ/K_{eq} , sondern nach Gl. (17) auch von $[B]$. Die Metabolitgehalte im Glycerophosphat-System sind wesentlich kleiner als diejenigen im Lactat-System.

Drittens steht das Glycerophosphat-System nicht in einer Sackgasse, sondern im Pendelverkehr zwischen zwei differenten Redoxbeziehungen: Im Glycerophosphat-Cyclus ist es durch die extramitochondriale Glycerophosphat-Dehydrogenase an das extramitochondriale DPNH/DPN-System und durch die Glycerophosphat-Oxydase (Meyerhof-Green-Enzym) an die Atmungskette gekoppelt (Abb. 2 rechts oben). Die im aeroben Status einsinnig wirkende *mitochondriale Reaktion*

Tabelle 4. Zum zellulären Status der Systeme Lactat/Pyruvat und Glycerophosphat/Dihydroxyacetonephosphat: Enzymaktivitätsgehalte (Spalten 2 bis 5), Quotienten der Metabolitgehalte (Spalte 6) und in vivo gemessene Stromstärken (Spalten 7 und 8). Die Enzymaktivitäten wurden in Gewebsextrakten und isolierten Mitochondrien unter Standardbedingungen (25°C) gemessen. Bei 37°C wären die Enzymwerte um das 2- bis 2,5-fache größer. Die Stromstärken wurden aus Metabolitbewegungen in Ischämie-Versuchen errechnet.

| Organ | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------|-----------|----------|---|--|--|---|--|
| | LDH [a] | GDH [a] | α -GPOX [b] | $\frac{\alpha\text{-GPOX}}{\text{GDH}} \cdot 10^2$ | $\frac{[\alpha\text{-GP}]}{[DAP]} \cdot \frac{[\text{Pyr}]}{[\text{Lac}]}$ | Stromstärken in vivo Lactat-Bildung [$\mu\text{Mol/Std.} \times \text{g Frischgew.}$] | Glycerophosphat-Bildung [$\mu\text{Mol/Std.} \times \text{g Frischgew.}$] |
| | | | [$\mu\text{Mol/Std.} \times \text{g Frischgew.}$] | | | | |
| Gehirn (Ratte) [m] | 1700 | 74 | 36 | 49 | 0,11 [c] (0,17) [k] | | |
| Herz (Ratte) | 26000 | 236 | 13 | 5,6 | 0,11 [d] (0,2) [k] | | |
| Herz (Hund) | 18000 | 670 | 34 [a] | 5,1 | 0,1 [e] | 240 [e] | 36 |
| Skelettmuskel (Ratte) | 30000 | 2600 | 90 | 3,5 | 0,23 [f] (0,46 [k]) | 9200 [f] | 640 |
| Leber | | | | | | | |
| hyperthyreoid | 24000 [h] | 2200 [h] | 190 [i] | 8,6 | 0,3 [g] | | |
| normal | 14000 | 2300 | 15 [i] | 0,6 | 0,7 [g] | 1700 [f] | 190 |
| hypothyreoid | 16000 [h] | 2800 [h] | 1 [i] | 0,04 | 0,9 [g] | | |

[a] Nach Messungen von D. Pette, unveröffentlicht.

[b] Nach Messungen von B. Kadenbach, unveröffentlicht.

[c] Nach Messungen von W. Wesemann u. H. J. Hohorst [9].

[d] Nach Messungen von Th. Bücher u. G. Hermann [10].

[e] Nach Messungen von M. Klarwein et al. [58], Kammerflimmern.

[f] Nach Messungen von H. J. Hohorst et al., [8, 9, 37].

[g] Nach Messungen von H. Schimassek [29].

[h] Nach Messungen von H. Mitzkat u. G. Rassner, unveröffentlicht; vgl. auch [60]. Signifikanz der Abweichungen vom Normalwert nicht gesichert.

[i] Nach Messungen von B. Kadenbach u. H. Brandau [59].

[k] Quotienten in Klammern wurden auf den Plasmawert $[\text{Lac}]/[\text{Pyr}] = 10$ bezogen.

[l] $[\alpha\text{-GP}]/[\text{Pyr}]/[DAP]/[\text{Lac}] = 0,8$.

[m] vgl. auch [53].

mentell ermittelten Abhängigkeit des Produktes $\tau_{ss} \cdot V_1$ von der Metabolitkonzentration durch die Theorie dargestellt, dagegen weichen die Zahlenwerte ganz erheblich ab.

Angesichts dieser Diskrepanzen wird es bei dem derzeitigen Stand der Theorie geraten sein, die im zellphysiologischen Bereich anzuwendenden Relaxationszeiten zu messen und auf ihre Berechnung mit Hilfe der Michaelis-Konstanten zu verzichten (vgl. [14]). Aus dem gleichen Grund sollte sich die Einführung von τ_{ss} als Parameter in mathematischen Modellen als vorteilhaft erweisen.

ist das *limitierende Glied*. Ein gleicherweise für den funktionellen Zusammenhang wichtiger Umstand ist die Lage

[49] E. Zebe, A. Delbrück u. Th. Bücher, Biochem. Z. 331, 254 (1959); Ber. Physiol. 189, 115 (1957).

[50] Th. Bücher, „Redoxbeziehungen des α -Glycerophosphats“, S.-Ber. Ges. Beförderung ges. Naturwiss. Marburg 85, 383 (1963).

[51] Y. P. Lee u. H. A. Lardy, Fed. Proc. 20, 224 (1961); Y. P. Lee, A. E. Takemori u. H. A. Lardy, J. biol. Chemistry 234, 305 (1959) [*].

[52] A. Delbrück, E. Zebe u. Th. Bücher, Biochem. Z. 331, 273 (1959).

[53] B. Sacktor u. L. Packer, J. Neurochem. 9, 371 (1962).

[*] Durch ein Versehen ist das letzte Zitat in vorangegangenen Arbeiten [12, 29] nicht aufgeführt worden.

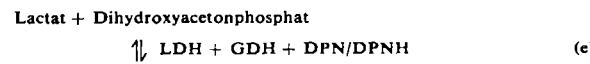
des Redoxpotentials des extramitochondrialen DPNH/DPN-Systems gut 80 mV oberhalb des Mittelpotentials (Abb. 8) [10, 44–46].

Der Redoxstatus des extramitochondrialen DPNH/DPN-Systems wird durch das System Lactat/Pyruvat angezeigt (vgl. Abschnitte 7 und 8). Bereits in früheren Mitteilungen wurden Abweichungen der Redoxpotentiale zwischen dem Lactat- und dem Glycerophosphat-System im Zusammenhang mit dem Glycerophosphat-Cyclus diskutiert [10, 49, 50]. Um die nunmehr verfügbare weitergehende Information zu nutzen, haben wir die in verschiedenen Geweben gefundenen Proportionen (vgl. Tab. 4) der Aktivitäten von Glycerophosphat-Dehydrogenase und Glycerophosphat-Oxydase der Ordinate in Abb. 11 (V_{st}/V_1) gegenübergestellt. Dem liegt die Annahme zugrunde, V_{st} sei dem Aktivitätsgehalt an (limitierendem) mitochondrialem Enzym und $(V_1)_{Gewebe}$ sei dem Aktivitätsgehalt an extramitochondrialem Enzym proportional.

Für das betrachtete System ist Kurve 2 maßgebend. Die den Pfeilen gegenüber der Ordinate entsprechenden Abschnitte der Abszisse lassen uns teilweise beträchtliche Ablenkungen von Γ/K_{eq} erwarten. Daß solche Ablenkungen tatsächlich gefunden werden und dem hier geführten Gedankengang zugeordnet werden können, sei abschließend am Beispiel der Leber aufgezeigt [29].

Lardy hat entdeckt, daß die zelluläre Aktivität der mitochondrialen Glycerophosphat-Oxydase der induzierenden Wirkung des Schilddrüsenhormons unterliegt [51]. Die Aktivität des extramitochondrialen Enzyms bleibt unbeeinflußt. Tatsächlich läßt sich durch Fütterung oder Entzug des Schilddrüsenhormons die Proportion $\alpha\text{-GPOX/GDH}$ im Bereich zweier Größenordnungen variieren (Tabelle 4, Spalte 5 unten).

Um die entsprechenden Abweichungen der Metabolitproportion $\{\alpha\text{-GP}\}/\{\text{DAP}\}$ zu demonstrieren, dürfen wir die Quotienten $\{\text{Lac}\}/\{\text{Pyr}\}$ als Indikatoren für das Redoxpotential im extramitochondrialen DPNH/DPN-System heranziehen (vgl. Abschnitt 8). Im Gleichgewicht



beider DPN-abhängigen Systeme ist in dem von uns angewandten Ionenmilieu

$$\frac{[\alpha\text{-GP}]}{[\text{DAP}]} \cdot \frac{[\text{Pyr}]}{[\text{Lac}]} = 0,8 \quad (26)$$

und damit

$$\frac{\Gamma}{K_{eq}} \approx \frac{1}{0,8} \cdot \frac{\{\alpha\text{-GP}\} \cdot \{\text{Pyr}\}}{\{\text{DAP}\} \cdot \{\text{Lac}\}} \quad (27)$$

Bei Einsatz der in Tabelle 4, Spalte 6 unten, gegebenen Meßwerte findet man für Γ/K_{eq} im hypothyreoiden Status 1,1, im normalen Status 0,8 und im hyperthyreoiden Status 0,4. Die den Pfeilen an der Ordinate in Abbildung 11 entsprechenden Abszissenabschnitte zeigen hypothyreoid 1, normal 0,98 und hyperthyreoid 0,78.

Eine zahlenmäßig genaue Übereinstimmung der durch die Rechnung vorhergesagten Werte mit den im Organ gemessenen wäre beim gegenwärtigen Stand des Verfahrens zufällig. Bereits die Übereinstimmung der Richtungen und der Proportionen, wie sie sich bei der Gegenüberstellung von Abbildung 11 und Tabelle 4 zeigen, ist ein überzeugendes Argument für die Existenz des Glycerophosphat-Cyclus *in vivo* in der Leber der Ratte [10]. Dazu sei bemerkt, daß mit der Charakterisierung und Lokalisierung der Enzyme (Zusammenfassung in [50]) und der Messung der in Tabelle 4 eingetragenen Proportionen alles geschehen ist, was *in vitro* zum Beweis des Glycerophosphat-Cyclus beigetragen werden kann. Rekonstruktionsversuche mit Hilfe von Homogenatfraktionen oder mit Hilfe isolierter Mitochondrien und GDH bedeuten – gleicherweise bei positivem [54–56] wie negativem [57] Ergebnis – nicht mehr als eine Messung der kinetischen Konstanten der Enzyme unter schlecht zu definierenden Bedingungen.

Wie die Daten und Ausführungen dieses Abschnittes zeigen, erleidet das System α -Glycerophosphat/Dihydroxyacetophosphat bereits bei geringen Stromstärken merkliche Ablenkungen aus dem Gleichgewicht. Auch im normalen Status der Leber ist eine genaue Übereinstimmung der Redoxpotentiale der Systeme Lactat/Pyruvat und α -Glycerophosphat/Dihydroxyacetophosphat nicht zu erwarten. In dieser Hinsicht müssen wir frühere Ausführungen [10, 11] berichtigten.

Eingegangen am 20. August 1963 [A 327]

- [54] E. J. Ciaccio u. D. L. Keller, Fed. Proc. 19, 34 (1960).
- [55] P. Borst, Biochim. biophysica Acta 57, 256 (1962).
- [56] B. Sacktor u. A. Dick, J. biol. Chemistry 237, 3259 (1962).
- [57] R. Hedman, E. M. Suranyi, R. Luft u. L. Ernster, Biochem. biophys. Res. Commun. 8, 314 (1962).
- [58] M. Klarwein, W. Lamprecht u. E. Lohmann, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 328, 41 (1962).
- [59] B. Kadenbach, H. Brandau u. Th. Bücher, Enzymologia biol. clin., im Druck.
- [60] J. R. Tata, L. Ernster, O. Lindberg, E. Arrhenius, S. Pedersen u. R. Hedman, Biochem. J. 86, 408 (1963).