

Gegensatz dazu kann sich die Repression der Enzymsynthese durch NH_4^+ nur mit der Geschwindigkeit auf den Enzymgehalt der Zellen auswirken, mit der die „Verdünnung“ des Enzyms durch Zellvermehrung stattfindet. Es handelt sich bei der Hefe um Zeiträume in der Größenordnung von Stunden[16]. Da von der Aufrechterhaltung des L-Isoleucin-Spiegels die Proteinsynthese abhängt, ist verständlich, daß die Isoleucin-Synthese durch einen sehr schnell reagierenden Mechanismus reguliert wird. Veränderungen des NH_4^+ -Gehaltes im Nährmedium werden unter natürlichen Bedingungen nicht rasch erfolgen. Es ist daher ausreichend, wenn die Anpassung an einen veränderten NH_4^+ -Gehalt durch einen langsam ansprechenden Mechanismus, nämlich durch Steuerung der Ge-

schwindigkeit der Enzymsynthese, stattfindet. Aktivitätshemmung („feed back“) ist demnach ein Mittel der raschen „Feinkontrolle“ des Stoffwechsels, Repression der Enzymsynthese ist ein Mittel der „auf lange Sicht“ wirkenden „Grobkontrolle“ [17].

Herrn Prof. Dr. O. Wiss (Hoffmann-La Roche, Basel) danken wir für Pyridoxalphosphat und Pyridoxaminphosphat. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung danken wir für Unterstützung unserer Arbeiten.

Eingegangen am 15. August 1963 [A 326]

[17] H. A. Krebs, Tagung der Nobelpreisträger in Lindau (Bodensee); J. M. Ashworth u. H. L. Kornberg, *Biochim. biophysica Acta* 73, 519 (1963).

Reversibilität der Energieumwandlungen in der Atmungskette [*]

VON DOZ. DR. M. KLINGENBERG

PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT MARBURG

Otto Warburg zum 80. Geburtstag

Die Umwandlung von Verbrennungsenergie in Phosphatbindungsenergie bei der oxydativen Phosphorylierung ist reversibel. Daher können Redoxreaktionen in der Atmungskette gegen das Gefälle des Redoxpotentials ablaufen, wenn Energie zugeführt wird. Diese Energie kann entweder aus dem ATP oder direkt aus energiereichen Zwischenverbindungen der oxydativen Phosphorylierung entnommen werden. – Im Mittelpunkt der vorliegenden Ausführungen steht das Postulat eines aus der Reversibilität resultierenden Gleichgewichtes in der Atmungskette. Damit wird eine einheitliche Betrachtungsweise für verschiedene Erscheinungen der oxydativen Phosphorylierung geboten. Dieses Gleichgewicht kann sich über mehrere Komponenten der Atmungskette erstrecken. Die Atmung entspricht einem Fließgleichgewicht in der Atmungskette, das mit zunehmender Atmungsgeschwindigkeit immer stärker vom statischen Gleichgewicht abweicht. Die Atmung kann somit durch das Phosphorylierungspotential des ATP reguliert werden. – Der stationäre Reduktionszustand der Atmungsketten-Komponenten kann als Funktion sowohl des Phosphorylierungspotentials als auch der von beiden Enden auf die Atmungskette einwirkenden Redoxpotentiale gedeutet werden. Die Atmungskette reagiert auf die beiden Extremfälle einer minimalen oder maximalen Differenz der Redoxpotentiale mit charakteristischen Mustern der Reduktionszustände ihrer Komponenten. Die durch das Phosphorylierungspotential überbrückten Redoxpotentialdifferenzen können an einem Phosphorylierungsschritt beispielsweise 280 mV betragen. – Auch in kinetischer Hinsicht sind die Bedingungen eines Gleichgewichtes in der Atmungskette erfüllt: die Geschwindigkeiten der Rückreaktion der Elektronen- oder Wasserstoffübertragung sind von gleicher Größenordnung wie diejenigen der Vorwärtsreaktion.

1. Einleitung

Die Vereinigung des Substratwasserstoffs mit Sauerstoff über die Atmungskette – die frühzeitig von *Otto Warburg* untersucht wurde – ist im tierischen Stoffwechsel die Reaktionsfolge mit dem größten Energiegefälle. Es ist daher zu verstehen, daß diese Reaktionsfolge meist als irreversibel galt. Diese Ansicht beruhte vermutlich

darauf, daß der Gesamtprozeß der zellulären „Verbrennung“ als Analogie zur Knallgas-Verbrennung gesehen wurde. Da in der Atmungskette die Oxydationsenergie in die Energie der Phosphorsäureanhydrid-Bindung des Adenosin-triphosphats (ATP) [**] umgewandelt wird, muß eine Umkehrung der Substratverbrennung aber prinzipiell – bei Umkehrung der Energieumwandlung – möglich sein. Voraussetzung hierfür ist eine feste „Kopplung“ zwischen den Redoxreaktionen und den Reaktionen der Energieüberführung in ATP. Tatsächlich konnte unter dieser Voraussetzung Reversibilität für den

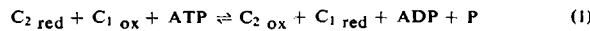
(Fußnote [**] siehe Seite 901)

[*] Nach Vorträgen am Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison, und an der Johnson Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia, im April 1962.

größten Teil der Atmungskette nachgewiesen werden. Die Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung ist nicht als eine nur *in vitro* mögliche, extreme Verkehrung der physiologischen Verhältnisse anzusehen. Sie ermöglicht ein statisches, energieabhängiges Gleichgewicht innerhalb der Atmungskette mit wichtigen Konsequenzen für die Energieüberführung *in vivo*. Die wichtigste Anwendung dürfte die Regulation der Atmung sein. Das statische Gleichgewicht ist dabei der Grenzfall, von dem das tatsächlich vorliegende Fließgleichgewicht mit zunehmender Atmungsgeschwindigkeit zunehmend abweicht. Wir werden den Aspekt des energieabhängigen Gleichgewichtes in der Atmungskette bei der Deutung der verschiedenen Phänomene der Reversibilität besonders hervorheben.

2. Übersicht

Die Rückreaktion der oxydativen Phosphorylierung besteht im Prinzip in der ATP-abhängigen Redoxreaktion zwischen zwei Atmungsketten-Komponenten C₂ und C₁:



Hier wird vorausgesetzt, daß der ATP-verbrauchende Reaktionsweg im umgekehrten Sinn mit dem Weg der ATP-Synthese bei der oxydativen Phosphorylierung

Hierbei wird chemische Bindungsenergie, welche in einer noch unbekannten Form zwischen der Redoxenergie und der Phosphatbindungsenergie auftreten kann, mit dem Symbol $\sim X$ bezeichnet. Sie kann entweder an der Atmungsketten-Komponente selbst oder einer anderen unbekannten Verbindung lokalisiert sein. Diese, kein Phosphat enthaltende Energie-Zwischenform wird besonders auf Grund von Untersuchungen über die Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung gefordert. Die Reversibilität der Phosphorylierung (2) hatte sich schon früh aus dem durch Mitochondrien katalysierten Austausch zwischen $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ und ATP sowie zwischen H_2^{18}O , ATP und PO_4^{3-} ergeben [1-5]. Die Bedeutung dieser Reaktion für die oxidative Phosphorylierung wurde wiederholt bezweifelt, obwohl starke Argumente dafür erbracht wurden. Offenbar ist sie nur an einem der drei Phosphorylierungsschritte der Atmungskette – dem im Flavin-Bereich auftretenden Schritt – beteiligt.

Die Umkehrbarkeit der Partialreaktion (3) wurde ebenfalls vor der Reversibilität der Reaktion (1) entdeckt: mitochondrielles DPN wird in atmenden Mitochondrien durch Substrate reduziert, die primär von Flavoproteinen dehydriert werden [6-9].

Heute liegt umfangreiches experimentelles Material über die Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung in vielen Reaktionsweisen der Atmungskette vor. Die hier-

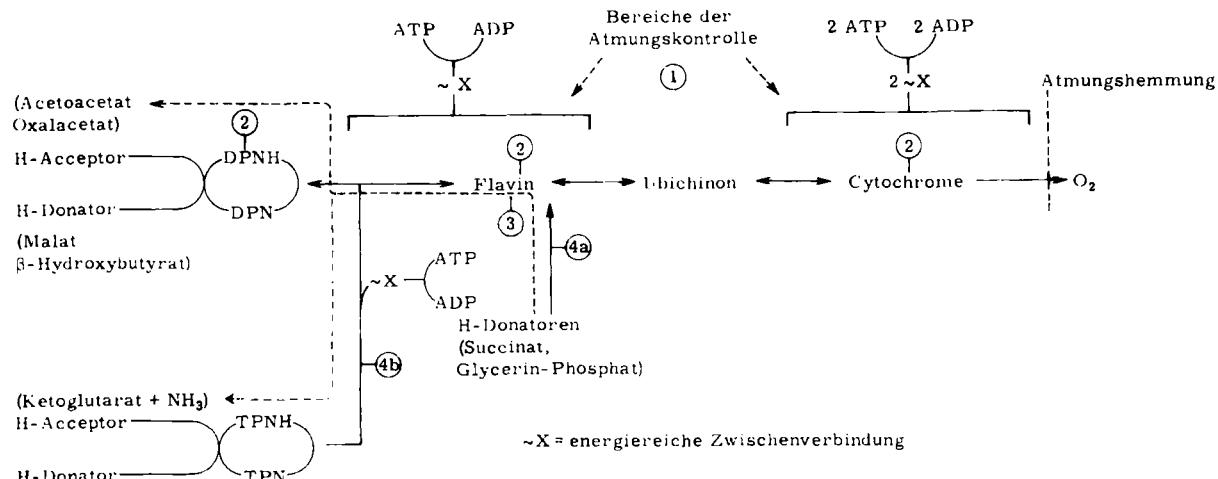
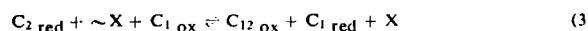


Abb. 1. Reaktionsschema verschiedener Erscheinungen der Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung. In Kreisen stehende Zahlen beziehen sich auf die Aufzählung im Text.

übereinstimmt. Reaktion (1) kann aufgeteilt werden in die Energie-Übertragung



und die mit der Energie-Übertragung gekoppelte Redoxreaktion



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

- ADP = Adenosin-diphosphat
- ATP = Adenosin-triphosphat
- Cyt = Cytochrom
- DPN = Diphosphopyridinucleotid
- DPNH = reduziertes DPN
- KG = α -Ketoglutarat
- OxAc = Oxalacetat
- P = Phosphat
- TPN = Triphosphopyridinucleotid
- TPNH = reduziertes TPN
- Ubiquinon = Ubichinon

zu erforderliche feste Koppelung zwischen Oxydation und Energieüberführung ist in physiologisch intakten Trägern der Atmungskette, den Mitochondrien, verwirklicht, die daher das bevorzugte Präparat für diese

- [1] *P. D. Boyer, W. W. Luchsinger u. A. B. Falcone*, *J. biol. Chemistry* 223, 405 (1956).
 - [2] *C. Cooper u. A. L. Lehninger*, *J. biol. Chemistry* 224, 561 (1958).
 - [3] *H. Löw, P. Siekewitz, L. Ernster u. O. Lönberg*, *Biochim. biophysica Acta* 29, 392 (1958).
 - [4] *G. R. Drysdale u. M. Colu*, *J. biol. Chemistry* 233, 1574 (1958).
 - [5] *P. D. Boyer*: *Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry* (Tokyo and Kyoto). Pergamon Press, Oxford 1963, Bd. 2, S. 301.
 - [6] *Th. Bücher u. M. Klingenberg*, *Angew. Chem.* 70, 552 (1958).
 - [7] *M. Klingenberg, W. Stenzka u. E. Ritt*, *Biochem. Z.* 332, 47 (1959).
 - [8] *B. Chance u. G. Hollunger*, *Fed. Proc.* 16, 703 (1957).
 - [9] *B. Chance u. G. Hollunger*, *J. biol. Chemistry* 236, 1534 (1961).

Untersuchungen sind. Die folgende kurze Aufzählung beschränkt sich auf vollständig reversible Reaktionsfolgen, d.h. auf solche Reaktionen, die mit ATP erreicht wurden. Zur Erläuterung der Zusammenhänge dient das in Abbildung 1 angegebene Schema.

1. Atmungskontrolle durch ATP [10, 11].
2. Beeinflussung des stationären Redoxmusters der Atmungskette und Umkehrung der Wasserstoff- oder Elektronenübertragung in der Atmungskette durch ATP
 - a) in atmenden Mitochondrien [10–12]
 - b) in Mitochondrien mit gehemmter Atmung [13–16].
 3. ATP-induzierte Wasserstoffübertragung zwischen exogenen Wasserstoffdonatoren und -acceptoren [11, 17–26].
 4. ATP-abhängige Redoxreaktionen außerhalb der Atmungskette
 - a) Stimulierung der Succinat-Oxydation [27–29]
 - b) Wasserstoff-Übertragung zwischen dem DPN- und TPN-System in Mitochondrien [30, 31]
 - c) energieabhängige Wasserstoff-Übertragung zwischen Substraten, die primär von Pyridinnucleotiden dehydriert werden [21, 32, 33].

Die Umkehrung des Elektronen- oder Wasserstofftransports in der Atmungskette wurde zunächst ohne ATP-Zusatz in atmenden Mitochondrien beobachtet. Hier wird die bei der Atmung erzeugte chemische Bindungs-

- [10] M. Klingenberg u. P. Schollmeyer, Biochem. Z. 333, 335 (1960).
- [11] M. Klingenberg: Symposium on Biological Structure and Function. Academic Press, New York, 1961, Bd. 2, S. 227.
- [12] M. Klingenberg u. P. Schollmeyer, Biochem. Z. 335, 231 (1961).
- [13] B. Chance, J. biol. Chemistry 236, 1544 (1961).
- [14] B. Chance: Symposium on Biological Structure and Function, Academic Press, New York 1961, Bd. 2, S. 119.
- [15] M. Klingenberg u. P. Schollmeyer, Biochem. biophys. Res. Commun. 4, 43 (1961).
- [16] M. Klingenberg u. P. Schollmeyer, Biochem. Z. 335, 243 (1961).
- [17] M. Klingenberg u. H. v. Häfen, Fed. Proc. 21, 55 (1962).
- [18] M. Klingenberg, u. H. v. Häfen Biochem. Z., im Druck.
- [19] L. Ernster: Symposium on Biological Structure and Function. Academic Press, New York 1961, Bd. 2, S. 139.
- [20] M. Klingenberg u. H. v. Häfen, Biochem. Z. 337, 120 (1963).
- [21] M. Klingenberg: Vortrag beim Symposium über Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen, Wien 1962.
- [22] H. Loew, H. Krueger, u. D. M. Ziegler Biochem. biophys. Res. Commun. 5, 231 (1961).
- [23] D. R. Sanadi, A. L. Fluharty u. T. E. Andredi, Biochem. biophys. Res. Commun. 8, 200 (1962).
- [24] F. A. Hommes Biochem. biophys. Res. Commun. 8, 248 (1962).
- [25] B. Chance u. U. Fugman, Biochem. biophys. Res. Commun. 4, 317 (1961).
- [26] L. Packer u. B. Danton, Fed. Proc. 21, 53 (1962).
- [27] G. F. Azzone u. L. Ernster, Nature (London) 187, 65 (1960).
- [28] M. Klingenberg u. P. Schollmeyer, Biochem. biophys. Res. Commun. 4, 38 (1961).
- [29] B. Chance u. B. Hagiwara, Biochem. biophys. Res. Commun. 3, 1 (1960).
- [30] M. Klingenberg: Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry, Moskau 1961. Pergamon Press, Oxford 1963, Bd. 2, S. 46.
- [31] L. Danielson u. L. Ernster, Biochem. biophys. Res. Commun. 10, 91 (1963).
- [32] J. M. Tager, Proc. biochem. Soc. 84, 64 P (1962).
- [33] L. Danielson u. L. Ernster, Biochem. biophys. Res. Commun. 10, 85 (1963).

energie – offenbar in einer Zwischenform, d.h. ohne erst ATP zu bilden, – von der Rückreaktion der Wasserstoff-Überführung verbraucht. Besonders deutlich wird die Wirksamkeit dieser Energie-Zwischenform, wenn atmende Mitochondrien Wasserstoff in größerer Menge gegen das Redoxpotential von einem Substrat auf das andere pumpen [19, 20]. Ein Beispiel bietet die Wasserstoff-Überführung vom Succinat (Normalpotential $E'_0 = +50$ mV bei pH = 7) auf Acetoacetat (Normalpotential $E'_0 = -260$ mV bei pH = 7).

3. Energieabhängiges Redoxgleichgewicht

Zum Verständnis dieser Phänomene wurde ein energieabhängiges Redoxgleichgewicht in der Atmungskette postuliert [16, 34, 35]: Die Komponenten der Atmungskette können im Redoxgleichgewicht stehen, indem das Redoxpotential einer Komponente durch die Bildung einer energiereichen Zwischenform soweit – z.B. zu negativen Werten – verschoben wird, daß es gleich dem Potential der Nachbarkomponente wird (Abb. 2). Diese Zwischenform steht im Phosphorylierungsgleichgewicht mit dem ATP/ADP-System. Die alternierenden Redox- und Phosphorylierungsgleichgewichte bilden ein System von Gleichgewichten über die gesamte Atmungskette. Dieser Aspekt erwies sich als besonders fruchtbar für die Analyse der ATP-Effekte bei der vollständigen Umkehrung der oxydativen Phosphorylierung. Er erlaubt nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Deutung dieser Effekte [36].

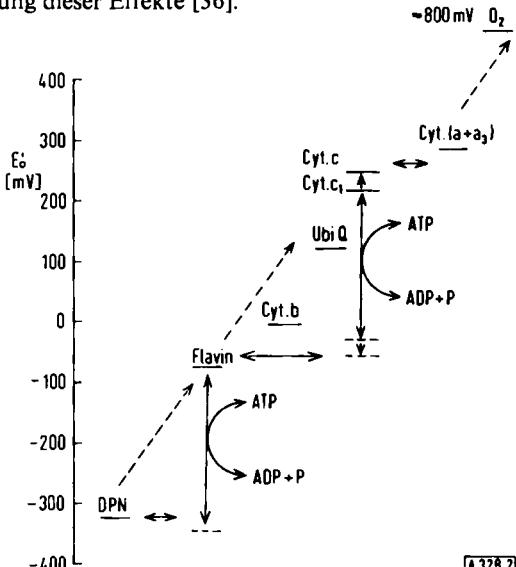


Abb. 2. Das Gleichgewicht in der Atmungskette. Die Atmungsketten-Komponenten sind entsprechend ihrer Normalpotentiale (pH = 7) angeordnet. Ihre Redoxpotentiale werden durch die Bildung einer energiereichen Zwischenform im Phosphorylierungsgleichgewicht mit dem ATP zum Negativen verschoben. Die eingezeichnete Verschiebung um 280 mV ist für anaerobe Bedingungen ermittelt worden [36]. Die Gleichgewichte sind durch ausgezogene Pfeile, Ungleichgewichte durch gestrichelte Pfeile bezeichnet. Die alternierende Folge der Redox- (\leftrightarrow) und Phosphorylierungs- ($\uparrow\downarrow$) Gleichgewichte ergibt das Gesamtgleichgewicht in der Atmungskette.

Ordinate: Normalpotential E'_0 [mV] bei pH = 7.

- [34] M. Klingenberg in: Bedeutung der freien Nucleotide, 11. Kolloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, Mosbach 1960. Springer, Heidelberg 1961, S. 82.
- [35] M. Klingenberg u. Th. Bücher, Biochem. Z. 334, 1 (1961).
- [36] M. Klingenberg, Biochem. Z. 335, 263 (1961).

Im Gleichgewicht ist der Redoxzustand der an der oxydatischen Phosphorylierung beteiligten Atmungsketten-Komponenten eine Funktion des Phosphorylierungspotentials des ATP, d. h. des Quotienten $[ATP]/[ADP][P]$. Außerdem sollte die Reversibilität der oxydatischen Phosphorylierung in jedem Fall eine Funktion dieses Quotienten sein. Darüberhinaus hat die Annahme eines energie-abhängigen Redoxgleichgewichts kinetische Konsequenzen. Beispielsweise sollte in der Nähe des Gleichgewichts die Geschwindigkeit der Rückreaktion im Elektronentransport in der gleichen Größenordnung wie die Vorwärtsreaktion, d. h. die Atmung, liegen. In der mit oxydativer Phosphorylierung gekoppelten Atmung stellt sich ein Fließgleichgewicht ein, das nunmehr als ein vom statischen Gleichgewicht im allgemeinen nicht weit entfernter Zustand aufgefaßt werden muß. Damit können die Fließgleichgewichte in der Atmungskette mit Hilfe der verhältnismäßig einfachen Methoden analysiert werden, die zur Analyse von Relaxationsspektren chemischer Reaktionen entwickelt [37] und auch auf Reaktionen mit isolierten Enzymen angewendet wurden [38, 39].

4. Atmung

Bei physiologisch intakten Präparaten hängen die Geschwindigkeiten der Atmung und der Phosphorylierung voneinander ab: die Atmungsgeschwindigkeit kann durch die Phosphorylierungsgeschwindigkeit limitiert werden. Wenn diese durch Mangel an Substraten der Phosphorylierung, ADP oder Phosphat, gehemmt ist, ist auch die Atmung gehemmt. *Lardy* [40] und *Chance* [41, 42] haben bei der Analyse dieser als „Atmungskontrolle“ bezeichneten Regulation der Atmung den Mangel an ADP oder Phosphat als kontrollierenden Faktor bezeichnet. Ein dem ADP und Phosphat entgegengesetzter Einfluß von ATP wurde nicht bemerkt. Daher wurde ein „ADP-trigger“-Mechanismus für die Regulation der Atmung postuliert [43]. Da die Atmungskontrolle hier als Hemmung und Aktivierung verstanden wird, handelt es sich bei dieser Theorie um einen kinetischen Kontrollmechanismus. Prinzipiell verschieden ist die Atmungskontrolle auf der Basis des Phosphorylierungsgleichgewichtes. In diesem Fall sollte die Atmung durch die Konzentrationen von ADP und Phosphat auf der einen Seite und von ATP auf der anderen Seite reguliert werden. Das wäre der thermodynamische Mechanismus der Atmungskontrolle.

Erste Hinweise für die Existenz des thermodynamischen Mechanismus wurden an Skelettmuskel-Mitochondrien bei der ATP-induzierten Hemmung der Atmung beob-

[37] *M. Eigen, G. Kurtze u. K. Tamm*, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. 57, 103 (1953).

[38] *G. G. Hammes u. R. A. Alberti*, J. Amer. chem. Soc. 82, 1564 (1959).

[39] *Th. Bücher u. W. Rüssmann*, Angew. Chem. 75, 881 (1963).

[40] *H. A. Lardy*: Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry, Brüssel 1955. Academic Press, New York 1956, S. 287.

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

[42] *B. Chance u. G. R. Williams*, J. biol. Chemistry 217, 383. (1955).

[43] *B. Chance*: Ciba Symposium on the Regulation of Cell Metabolism. Churchill Ltd., London 1959, S. 91.

achtet [10, 11]. In weiteren Untersuchungen gelang es, in Lebermitochondrien die Abhängigkeit der Atmung von der Konzentration an ADP und ATP nachzuweisen [44]. Abbildung 3 illustriert an Hand einer simultanen

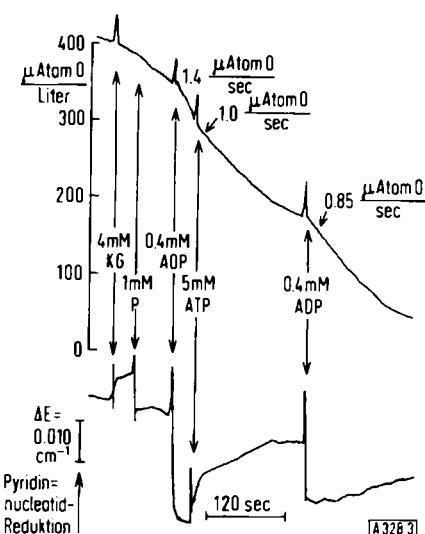


Abb. 3. Der entgegengesetzte Einfluß von ADP und ATP auf die Atmungsaktivität und den Redoxzustand der Pyridinnucleotide in Mitochondrien. Simultane Registrierung der Atmung und Absorption der Pyridinnucleotide in einer Suspension von Lebermitochondrien. 2 mg Protein in 0,5 ml Saccharose-EDTA-Medium, pH = 7,2, 25 °C.

Die Atmung mit α -Ketoglutarat (KG) als Substrat wird durch Zugabe von ADP beschleunigt und darauf durch Zusatz von ATP partiell gehemmt, bevor das ADP verbraucht ist. Die Pyridinnucleotide werden nach dem Zusatz von ADP oxydiert und nach Zusatz von ATP stärker reduziert. Nach dem Verbrauch der ersten Gabe von ADP wird erneut ADP zugefügt, jedoch wird die Atmung jetzt nur zu einer geringeren Geschwindigkeit beschleunigt und die Pyridinnucleotide weniger oxydiert als vor dem ATP-Zusatz.

Spektrophotometrisch wurde die Differenz der Absorptionen bei 340 m μ (Maximum der DPNH-Bande) und 405 m μ (Bezugswellenlänge) registriert.

Registrierung der Atmungsaktivität und der Pyridin-nucleotid-Absorption, daß ATP-Zusatz die durch ADP voll stimulierte Atmung partiell hemmen kann. Gleichzeitig wechseln die Pyridinnucleotide in einen mehr reduzierten Zustand über. Diese mit der Atmungshemmung einhergehende Pyridinnucleotid-Reduktion zeigt, daß ATP durch Umkehrung der oxydatischen Phosphorylierung einen der Wirkung von ADP entgegengesetzten Effekt hat. In diesem durch ATP induzierten Zustand der Atmungskette sind, ähnlich wie unter ADP-Mangel (im „kontrollierten Status“), die Pyridinnucleotide mehr reduziert als bei ADP-Sättigung (im „aktiven Status“) [44]. Die Atmungsaktivität hängt also vom Quotienten $[ATP]/[ADP]$ ab (Abb. 4). Ohne ATP ist die Atmung mit etwa 0,05 mM ADP halbmaximal, in Übereinstimmung mit den Daten von *Chance* und *Williams* [42]. Die halbmaximale Atmung bedarf jedoch in Gegenwart von ATP bedeutend höherer ADP-Konzentrationen: 0,1 mM

[44] *M. Klingenberg*, unveröffentlicht.

[*] Die Bezeichnungen „kontrollierter“ und „aktiver“ Status beziehen sich auf das Verhalten der Atmung von Mitochondrien in Abhängigkeit von der oxydatischen Phosphorylierung. Sie stellen Extremfälle dar. Der „kontrollierte“ Status liegt vor, wenn infolge Mangel an Substraten der oxydativen Phosphorylierung (Phosphat oder ADP), nicht aber an oxydierbaren Substraten, die Phosphorylierung und die hiermit gekoppelte Atmung gehemmt sind. Im „aktiven Status“ sind bei Sättigung mit Phosphat und ADP oxydative Phosphorylierung und daher die Atmung voll aktiviert.

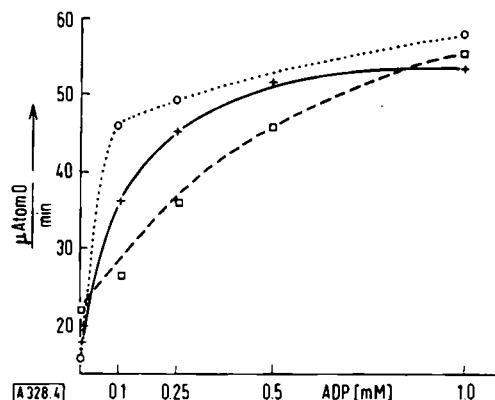


Abb. 4. Die Atmungsaktivität von Mitochondrien in Abhängigkeit vom Phosphorylierungspotential, das durch Änderung des Quotienten $[ATP]/[ADP]$ variiert wird. Lebermitochondrien inkubiert im Saccharose-EDTA-Medium, $pH = 7$, $25^\circ C$.

o = kein ATP; + = 2,5 mM ATP; □ = 5 mM ATP.

ADP bei 2,5 mM ATP und 0,25 mM ADP bei 5 mM ATP. Zur vollen Atmung werden in Gegenwart von 5 mM ATP etwa 1 mM ADP statt 0,1 mM ADP in Abwesenheit von ATP benötigt. Der Zusammenhang zwischen der Atmungsaktivität und dem Quotienten $[ATP]/[ADP]$ entspricht der Auffassung, daß die Atmung durch das Gleichgewicht zwischen dem ATP/ADP-System und der Atmungskette kontrolliert wird. Die Atmungskontrolle ist demnach eine Funktion der Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung.

Diese hier an isolierten Mitochondrien untersuchten Beziehungen sind von besonderem Interesse für die physiologische Atmungskontrolle, da ATP *in vivo* in den meisten Zellen in relativ hoher Konzentration enthalten ist. Die Atmungsaktivität einer Zelle sollte demnach eine prinzipiell ähnliche Abhängigkeit vom Verhältnis $[ATP]/[ADP]$ zeigen, wie sie in Abbildung 4 dargestellt wurde. Demnach steige die Atmung nur verhältnismäßig langsam mit der ADP-Konzentration an, und wäre erst bei höherem ADP-Spiegel voll aktiviert. Sie kann durch Änderung des ADP-Spiegels über einen weiten Bereich reguliert werden und folgt damit subtil dem unterschiedlichen ATP-Verbrauch des Organs. Im Gegensatz dazu bietet der „kinetische Mechanismus“, infolge des engen Regulationsbereiches, eine mehr abrupte Regulation der Atmung. Damit wären verschiedene Experimente neu zu interpretieren, die auf der Basis der kinetischen Theorie der Atmungskontrolle ausgewertet wurden, z.B. die Frage, nach der ADP-Menge, die bei der Muskelarbeit bei einer Kontraktion des Muskels freigesetzt wird [45, 46].

5. Die Redoxmuster der Atmungskette

Änderungen im Redoxzustand der Atmungsketten-Komponenten, die durch eine Umkehrung des Wasserstoffs- oder Elektronenflusses zu erklären sind, waren die ersten Hinweise auf die Reversibilität der oxydativen

[45] B. Chance u. C. M. Connelly, *Nature (London)* 179, 1235 (1957).

[46] B. Chance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 81, 477 (1959).

Phosphorylierung. Nachdem in Einzelfällen die Reduktion der Pyridinnucleotide in Mitochondrien beobachtet worden war [6, 9], wurde die allgemeine Bedeutung dieses Phänomens an Mitochondrien verschiedenen Ursprungs erkannt [7]. Darüber hinaus erwies sich auch die Reduktion des Eisen-Flavoprotein-Komplexes in der Atmungskette als energieabhängig [35]. Bis dahin bestraf die Reversibilität nur den Phosphorylierungsschritt im DPN-Flavin-Bereich der Atmungskette. Es gelang dann nach Änderung der Versuchsbedingungen, die Reversibilität des Elektronentransports auch im Cytochrombereich nachzuweisen [13–16].

Für ein allgemeines Verständnis scheint es zweckmäßig, zunächst die Phänomene des rückwärts laufenden Wasserstoff- oder Elektronentransports zu vernachlässigen und statt dessen das statische Bild der „Redoxmuster“ zu betrachten, an Hand deren sich der Redoxzustand der Komponenten in verschiedenen Funktionszuständen der Atmungskette vergleichen läßt. Der Begriff des energie-abhängigen Gleichgewichtes kann besonders fruchtbar auf diese Redoxmuster angewendet werden.

Die Redoxmuster folgen häufig einem überraschend einfachen Schema. Der Einfluß der Atmungskontrolle, den wir bereits vor einigen Jahren in dieser Zeitschrift an Insektenflugmuskel-Mitochondrien demonstrierten [46a], sei hier in Abbildung 5a noch einmal gezeigt: In Gegenwart eines Substrates (Succinat) und von Phosphat (kontrollierter Status), fällt der prozentuale Reduktionsgrad der Atmungsketten-Komponenten von der Substratseite, d.h. vom DPN, bis zum Cytochrom a hin ab. In Gegen-

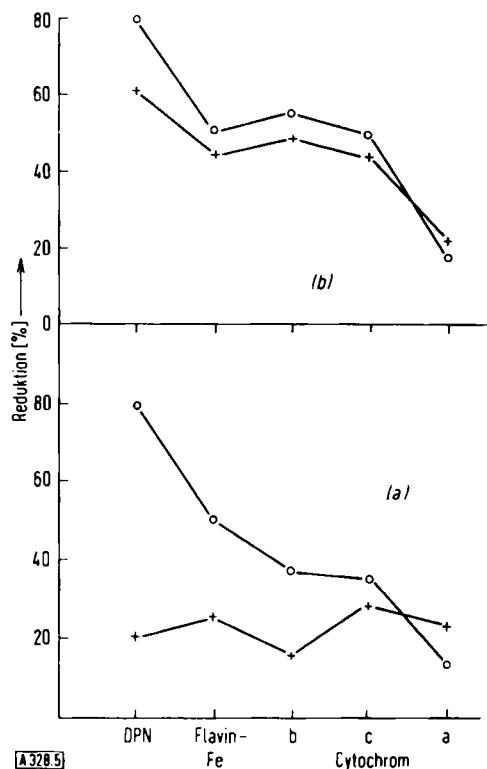


Abb. 5. Redoxmuster der Atmungskette in atmenden Mitochondrien. Stationäre Redoxzustände vor (o—o) und nach (+—+) Zugabe von 0,25 mM ADP. Lebermitochondrien inkubiert in luftgesättigtem Saccharose-EDTA-Medium, $pH = 7,2$, $25^\circ C$, 4 mM Succinat, 1 mM PO_4^{3-} .

(a) Mitochondrien ohne ATP. (b) Mitochondrien mit 5 mM ATP.

[46a] Siehe [6] und dort die Abbildungen 18 und 19.

wart von ADP ist der Reduktionsgrad dagegen ausgeglichen. Dieses Verhalten wurde prinzipiell bereits von *Chance* und *Williams* [47] in ihren grundlegenden Arbeiten über die Redoxzustände der Atmungskette beobachtet. In Gegenwart von ATP bleibt der Abfall des Reduktionsgrades dagegen auch nach Zusatz von ADP erhalten (Abb. 5b): die verhältnismäßig geringen Verschiebungen nach Zugabe von ADP spiegeln den nur partiellen Übergang vom kontrollierten in den aktiven Status wieder. In diesem Fall ist die Atmung, wie oben gezeigt wurde, auch nur partiell aktiviert (vgl. Abb. 2). Die Redoxmuster der Atmungskette stellen sich somit unter dem gegensätzlichen Einfluß von ADP und ATP zwischen den Extremen des „aktiven“ und des „kontrollierten“ Status ein.

Wenn die Atmung, und damit der Elektronenfluß durch die Atmungskette, durch Entfernung des Sauerstoffs oder durch Hemmung mit Cyanid ausgeschlossen werden, treten Redoxmuster eines anderen Typs auf (Abb. 6).

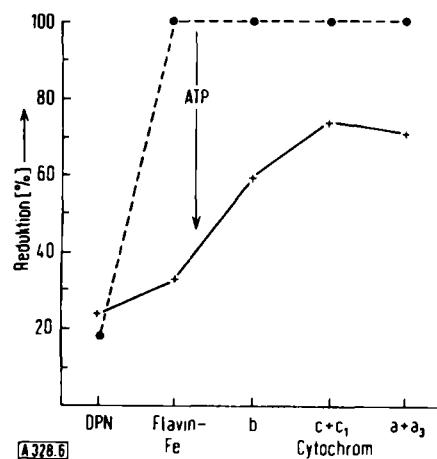


Abb. 6. Redoxmuster der Atmungskette in Mitochondrien mit gehemmter Atmung. Redoxzustand der Atmungsketten-Komponenten in Lebermitochondrien vor und nach Zugabe von 1 mM ATP. Als Atmungshemmung ist 1 mM KCN und als Wasserstoffacceptor auf der DPN-Seite 1 mM Oxalacetat zugesetzt worden.

In Abwesenheit von ATP sind dann die Atmungsketten-Komponenten vollständig oder weitgehend reduziert. Erst unter dem Einfluß von ATP werden sie partiell oxidiert, indem jetzt durch eine Umkehrung des Elektronenflusses Reduktionsäquivalente von den Cytochromen und Flavoproteinen zur Substratseite verschoben werden. Sie können dort vom DPN der Mitochondrien und von DPNH-oxydierenden Stoffen aufgenommen werden. Mit diesen Experimenten wurde die Umkehrung des Elektronentransports im Cytochrombereich bis einschließlich Cytochrom a aufgezeigt [13–16].

Die Muster der stationären Redoxzustände können unter diesen Bedingungen (im Gegensatz zu den Redoxmustern der atmenden Mitochondrien) einen Anstieg des Reduktionsgrades vom Substrat zum Sauerstoff hin zeigen. Dieser Anstieg ist besonders deutlich in Gegenwart DPNH-oxydierender Substrate und einer geringen ATP-Konzentration (vgl. Abb. 6). Er läßt sich durch das energieabhängige Redoxgleichgewicht wie folgt erklären: Auf der Substratseite sind die Redoxpotentiale in [47] B. *Chance* u. G. R. *Williams*, J. biol. Chemistry 217, 409 (1955).

Gegenwart eines Überschusses von Wasserstoffacceptor verhältnismäßig positiv und auf der Seite der Cytochromeoxydase ohne Sauerstoff relativ negativ. Gerade umgekehrt ist die Versorgung der Atmungskette bei dem in Abbildung 4 gezeigten Einfluß von ATP auf atmende Mitochondrien: es herrscht ein Überschuß an reduzierendem Substrat und Sauerstoff, so daß die Differenz zwischen den endständigen Redoxpotentialen verhältnismäßig klein wird [30]. Die Reduktionszustände der Atmungsketten-Komponenten stehen damit – als Folge des die Atmungskette überspannenden Gleichgewichtes – unter dem Einfluß der endständigen Redoxpotentiale.

6. Kinetik

Der Übergang der Atmungskette vom Nicht-Gleichgewichts- in den Gleichgewichtszustand kann zu einem Netto-Hin- oder Rückfluß von Reduktionsäquivalenten führen. Nahe dem Gleichgewicht sollte die Geschwindigkeit der Rückreaktion ebenso groß wie die der Hinreaktion sein. Zwei Möglichkeiten stehen zur Messung der Hin- und Rückreaktion im Elektronentransport zur Verfügung: die Verfolgung der Redoxänderungen der Atmungsketten-Komponenten selbst oder die Messung des gesamten Elektronentransportes Substrat → Sauerstoff (Atmung) und Substrat → Substrat, bei der man einen um Größenordnungen höheren Umsatz findet, da hier die Atmungsketten-Komponenten als Katalysatoren der Gesamtreaktion wirken.

Die Geschwindigkeit der Rückreaktion im Elektronentransport kann bei der ATP-abhängigen Oxydation der Cytochrome in Mitochondrien mit gehemmter Atmung gemessen werden [44]. Hierbei ist zu sichern, daß die Geschwindigkeit tatsächlich durch den Elektronentransport und nicht z. B. durch die Permeabilität des ATP in die Mitochondrien limitiert wird. Wie die Abbildung 7a

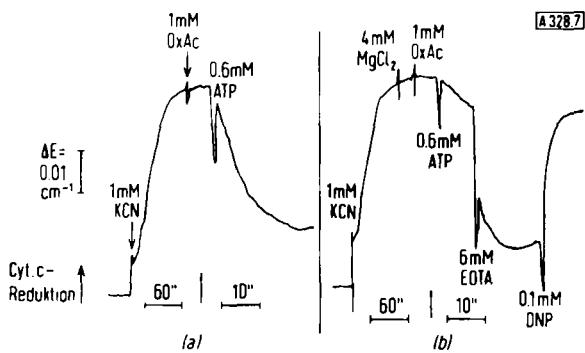


Abb. 7. Kinetik der Rückreaktion im Elektronentransport: die ATP-induzierte Oxydation von Cytochrom c in Mitochondrien mit gehemmter Atmung. Registrierung der UV-Absorption einer Suspension von Lebermitochondrien mit dem Doppelstrahlspktrophotometer. 2 mg Protein im Saccharose-EDTA-Medium, 9,5°C. Cytochrom c wird nach Zugabe von KCN zuerst durch endogene Wasserstoffdonatoren der Mitochondrien reduziert.

(a) Die Oxydation von Cytochrom c tritt (nach vorheriger Zugabe von Oxalacetat als Acceptor des Wasserstoffs vom DPNH) auf ATP-Zusatz ein. Die Oxydationsgeschwindigkeit ist relativ gering.
 (b) Die Geschwindigkeit der Oxydation von Cytochrom c ist nach vorheriger Zugabe von Mg^{2+} noch kleiner als im Fall (a). Nach Zusatz von Äthylenamin-tetraacetat (EDTA), 10 sec nach ATP-Zugabe, wird Cytochrom c schnell oxidiert. Der folgende Zusatz eines Entkopplers der oxydativen Phosphorylierung (Dinitrophenol, DNP) verursacht eine rasche Reduktion. Spektrophotometrisch wurde die Differenz der Absorptionen bei 550 $\mu\mu$ (Maximum der α -Bande des Cytochrom c) und 540 $\mu\mu$ (Bezugswellenlänge) registriert.

zeigt, verläuft die durch ATP gestartete Oxydation des Cytochrom c verhältnismäßig langsam. Eine viel größere Geschwindigkeit der Rückreaktion wird gefunden, wenn man zunächst ATP in Gegenwart eines Überschusses von Magnesium, d.h. in Form des ATP-Mg-Komplexes für einige Sekunden auf die Mitochondrien einwirken läßt (Abb. 7b). ATP-Mg hat ein niedrigeres Phosphorylierungspotential als freies ATP. Auf Zusatz von EDTA wird dann Cytochrom c schneller oxydiert, als es sich mit der hier verwendeten Registriereinrichtung messen läßt. Es ist anzunehmen, daß zunächst ATP in Form des relativ unwirksamen ATP-Mg in die Mitochondrien diffundieren kann, und dann am Reaktionsort durch EDTA aus diesem Komplex plötzlich freigesetzt wird. Auf diese Weise werden viel höhere Geschwindigkeiten (und damit möglicherweise die wahren Geschwindigkeiten der Rückreaktion im Elektronentransport) als beim Start mit ATP gemessen.

Die Geschwindigkeit der Rückreaktion kann außerdem an dem durch die Mitochondrien und damit durch die Enzyme der Atmungskette katalysierten, energieabhängigen Wasserstofftransport zwischen zwei Substraten gemessen werden. Hierfür werden Succinat als reduzierendes und Acetoacetat oder Ketoglutarat + NH₃ als oxydierendes Substrat verwendet [11, 17–21] (vgl. Abb. 1). Dabei wird nur die Rückreaktion im DPN-Flavin-Bereich der Atmungskette durchlaufen. Die Kinetik dieser Reaktion wird an Hand der verschwindenden und gebildeten Substrate erfaßt. Diese „Über-Alles“-Experimente erstrecken sich über Minuten anstatt über Sekunden, wie die Untersuchungen der Cytochrom-Oxydation.

Ein Vergleich beider Methoden ist in Tabelle 1 angestrebt, indem der Cytochrom-c-Gehalt als gemeinsamer Bezugspunkt für die Konzentration der Atmungsketten-Komponenten gewählt wurde. Die aus den Registrierungen nur abschätzbaren Geschwindigkeiten der ATP-induzierten Cytochrom-c-Oxydation können zum Ver-

Tabelle 1. Geschwindigkeit der Rückreaktion im Elektronentransport der Atmungskette. Lebermitochondrien im Saccharose-EDTA-Medium.

Bedingungen	Temp. [°C]	Geschwindigkeit als Wechselzahl von Cytochrom c [min ⁻¹]
Cytochrom c ↓ Oxalacetat + ATP + ATP + Mg ²⁺ + ATP + Mg ²⁺ + EDTA	9,5	4 0,8 20
Succinat ↓ Acetoacetat aerob anaerob (N ₂)	28	110 70

gleich mit den Daten der Substratreaktion etwa mit dem Faktor 5 multipliziert werden, um für die Temperaturdifferenz von 18 °C zwischen beiden Meßanordnungen zu kompensieren. Damit würde die hier als Cytochrom-Wechselzahl angegebene Geschwindigkeit des Elektronentransportes Cytochrom → Substrat (ca. 100 min⁻¹) etwa gleich der Geschwindigkeit des Wasserstofftrans-

ports Succinat → Acetoacetat und damit gleich der Rückreaktion im DPN-Flavin-Bereich. Dieser Wert gleicht der Geschwindigkeit der Hinreaktion, die aus der Atmungsaktivität bestimmt wird: Cytochrom-c-Wechselzahl bei der Oxydation von β-Hydroxybutyrat: 110 min⁻¹, von Succinat: 440 min⁻¹.

Damit sind die kinetischen Voraussetzungen für die Existenz eines energieabhängigen Redoxgleichgewichtes in der Atmungskette erfüllt. Von *Chance* und *Hagihara* [48] war für die Geschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion aus Messungen der durch ATP induzierten Oxydation von Cytochrom c ein Verhältnis 25:1 ermittelt worden. Dies führte zu einer Interpretation der Rückreaktionen, die das energieabhängige Redoxgleichgewicht in der Atmungskette ausschließt [49]. In Anbetracht der oben beschriebenen Experimente ist die von diesen Autoren beobachtete, geringe Geschwindigkeit der Rückreaktion wahrscheinlich auf eine Behinderung der Diffusion des ATP zur Atmungskette zurückzuführen.

7. Thermodynamik

Die Thermodynamik gibt den Rahmen für das energieabhängige Redoxgleichgewicht: die freie Energie des ATP/ADP-Systems muß äquivalent der freien Energie sein, die sich aus der Differenz der Redoxpotentiale zwischen den Atmungsketten-Komponenten C₂ und C₁ [Gl. (1)] ergibt. Quantitative Untersuchungen an Mitochondrien mit gehemmter Atmung ergaben den erwarteten Zusammenhang zwischen dem Redoxquotienten des Cytochrom c (C_{red}/C_{ox}) und dem Phosphorylierungspotential [ATP]/[ADP][P] [36]. Bei dem Quotienten C_{red}/C_{ox} = 1 wurde ein „Normal“-Phosphorylierungspotential $\Delta F = -12,8$ kcal/Mol gemessen. Dieses entspricht einer Redoxpotential-Differenz $\Delta E = 260$ mV. Damit kann in zwei aufeinander folgenden Phosphorylierungsschritten die Differenz der Normalpotentiale zwischen Cytochrom c und DPN ($\Delta E = 520$ mV) überbrückt werden.

In atmenden Mitochondrien ist offenbar ein höheres Phosphorylierungspotential zur Einstellung des Gleichgewichtes erforderlich. Die Abhängigkeit der Atmungsaktivität vom Quotienten [ATP]/[ADP] (vgl. Abb. 3) läßt ein „Normal“-Phosphorylierungspotential [ATP]/[ADP][P] = 15 l/mMol abschätzen, wenn die Atmung halbmaximal ist. Dieses entspricht $\Delta F = -14,5$ kcal/Mol und einem Redoxpotential $\Delta E = 320$ mV.

Die Unterschiede im Phosphorylierungspotential zwischen den Experimenten unter aeroben und anaeroben Bedingungen können auf Grund der Unterschiede zwischen den terminalen Redoxpotentialen an der Atmungskette erklärt werden. In den atmenden Mitochondrien liegen die Redoxpotentiale zwischen den Enden der Atmungskette relativ weit auseinander, was oben bereits besprochen wurde. Die Überbrückung dieser relativ großen Potentialdifferenz im Gleichgewicht fordert daher

[48] B. *Chance* u. B. *Hagihara*: Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry, Moskau 1961. Pergamon Press, Oxford 1963, Bd. 5, S. 3.

[49] B. *Chance*, J. biol. Chemistry 236, 1577 (1961).

auch ein höheres Phosphorylierungspotential. In Mitochondrien mit gehemmter Atmung dagegen rücken die Redoxpotentiale verhältnismäßig nahe zusammen infolge des Ausschlusses von Sauerstoff und dem Überschuß an oxydierenden Substraten, so daß die Atmungskette bereits mit einem geringeren Phosphorylierungspotential überspannt werden kann.

8. Schlußfolgerungen

Auf Grund der Reversibilität kann die Energieausbeute der oxydativen Phosphorylierung im Prinzip sehr hoch sein. Dieses gilt jedoch nach unseren bisherigen Kenntnissen nur für die Spanne zwischen Substrat und Cytochrom a, die bei $\Delta E \approx 520$ bis 600 mV prinzipiell bereits durch zwei Phosphorylierungsschritte überbrückt werden kann. Die Reversibilität des dritten Phosphorylierungsschrittes, der bei der Sauerstoffaktivierung durch die Cytochromoxydase liegen sollte, ist bisher nicht nachgewiesen worden. Es ist denkbar, daß dieser Schritt, bei dem eine besonders große Redoxpotential-Differenz (ΔE ca. 420 bis 520 mV) zu überbrücken ist, auch unter einem extremen Phosphorylierungspotential nicht reversibel wird. In diesem Sinne werden die Effekte der Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung, z. B. die Atmungskontrolle, nur durch die beiden ersten Phosphorylierungsschritte verursacht.

Die Reversibilität ist nicht nur für die zellphysiologische Wirksamkeit und Energieausbeute der oxydativen Phos-

phorylierung wichtig. Ihr Studium bietet auch einen neuen Weg zur Erforschung des Mechanismus der Energieübertragung und der damit assoziierten Redoxreaktionen in der Atmungskette. Die bisher noch nicht identifizierte Zwischenform der Energie, welche bei der Umwandlung der Redox- in die Phosphatbindungsenergie auftreten muß, kann vom ATP her statt vom Elektronentransport gebildet werden. Außerdem lassen sich durch das Studium der Reversibilität die Bedingungen ermitteln, unter denen sich diese Zwischenform in größerer Menge ansammeln sollte. Damit bietet die Untersuchung der Reversibilität auch ein Hilfsmittel zur Aufklärung des Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung, das bereits vielfach angewendet wird.

Eine weitere, hier nicht näher erörterte physiologische Bedeutung hat die Reversibilität möglicherweise bei dem „aktiven“ Transport, bei dem mit Hilfe von „Redoxpumpen“ ein cyclischer, durch ATP getriebener Elektronentransport und damit eine den „aktiven“ Transport bewirkende Ladungsverschiebung eintritt [50]. Es ist außerdem diskutiert worden, ob die Umkehrung der Sauerstoffaufnahme eine Rolle bei der photosynthetischen Sauerstoff-Bildung spielt [51].

Diese Untersuchungen wurden durch den Fonds der Chemischen Industrie und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Eingegangen am 22. August 1963 [A 328]

[50] R. E. Davies, Symp. Soc. exp. Biol. 8, 453 (1954).

[51] B. Chance, J. biol. Chemistry 236, 1549 (1961).

Nicht-hormonale Kontrolle des Glucosestoffwechsels in normalen und malignen Geweben

VON DOZ. DR. DR. H. TIEDEMANN

HEILIGENBERG-INSTITUT, HEILIGENBERG, KREIS ÜBERLINGEN/BODENSEE

Herrn Prof. Dr. Otto Warburg zum 80. Geburtstag gewidmet

Die Steuerung des Glucose-Abbaus sowie der Gluconeogenese hängt von enzymatischen Rückkopplungsreaktionen ab. Bei der Kontrolle der Glykolyse sind die beiden ersten, durch die Enzyme Hexokinase und Phosphofructokinase katalysierten Reaktionsschritte von besonderer Bedeutung.

Alle Organismen sind mehr oder weniger zur Anpassung an verschiedene Lebensbedingungen befähigt. Die Anpassung wird durch Umstellungen des Stoffwechsels ermöglicht. In den letzten Jahren wurde der Glucose-Stoffwechsel unter diesem Gesichtspunkt eingehend untersucht. Er kann hormonal kontrolliert werden, hängt aber, wie Lynen [1] und Johnson [2] erstmals gezeigt ha-

ben, auch von anderen Teilprozessen des Stoffwechsels, und zwar von der Atmung und der damit gekoppelten oxydativen Phosphorylierung, ab. Die mit dieser Kontrolle verbundenen Regelvorgänge, insbesondere die Steuerung durch die Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion sollen in dieser Arbeit beschrieben werden.

[1] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 546, 120 (1941).

[2] M. J. Johnson, Science (New York) 94, 200 (1941).