

BBA 46023

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINTRITT VON OXALACETAT IN RATTENLEBERMITOCHONDRIEN

R. BOHNENSACK UND W. KUNZ

*Physiologisch-chemisches Institut, Medizinische Akademie Magdeburg, Leipziger Str. 44,
Magdeburg (DDR)*

(Eingegangen am 24. August, 1970)

SUMMARY

Investigation of the penetration of oxaloacetate into rat liver mitochondria

1. The penetration of oxaloacetate into rat liver mitochondria was estimated by fluorimetric measurement of the redox change of intramitochondrial pyridine nucleotides after addition of oxaloacetate. The initial change in fluorescence was proportional to NADH oxidation, as demonstrated by quantitative analysis of pyridine nucleotides.

2. The penetration was stimulated maximally by 1 mM Ca^{2+} . Mg^{2+} also stimulated penetration but to a lesser degree. K^+ (+ valinomycin) was without effect. Ca^{2+} had a stimulating effect also after preincubation with 4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazol (TTFB).

3. The penetration was almost completely inhibited by TTFB in a time-dependent process with a halflife at 0.5 min. In the presence of serum albumin the penetration was reactivated up to 80%. ATP caused acceleration of reactivation.

4. ATP alone inhibited the penetration in a competitive manner to the same degree as AMP. Higher concentrations of KCl also showed a competitive inhibition.

5. It is suggested that oxaloacetate is exchanged with endogenous anions, and the inhibition by TTFB is caused by loss of endogenous anions.

6. Because of the strong competitive inhibition by anions, the penetration of oxaloacetate seems to be of limited importance *in vivo*.

EINLEITUNG

Die Meinungen über die Permeabilität der Mitochondrienmembran für Oxalacetat gehen auseinander. Sie reichen von der völligen Impermeabilität¹, dem langsamem Eintritt²⁻⁴ und seiner energiebedürftigen Beschleunigung^{5,6} über die ausschliesslich an die energiebedürftige Kationenakkumulation geknüpfte Translokation⁷ bis zur freien Permeabilität⁸. Wir bestimmten deshalb erneut die Geschwindigkeit des Eintritts von Oxalacetat in Abhängigkeit vom energetischen Zustand der Mitochondrien und von der Zusammensetzung des Mediums. Die Ergebnisse werden im Hin-

Abkürzungen: TTFB, 4,5,6,7-Tetrachlor-2-trifluoromethylbenzimidazol; EGTA, Äthylen-glykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure.

blick auf den Eintrittsmechanismus und auf die Bedeutung des Oxalacetateintritts *in vivo* diskutiert.

METHODEN

Chemikalien

Oxalessigsäure, Tris, AMP (Dinatriumsalz) und ATP (Dinatriumsalz) wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen, Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure (EGTA) von Geigy, Basel, Rotenon von Sigma, St. Louis, Antimycin A (B grade) von Calbiochem, Los Angeles, und Valinomycin von Serva, Heidelberg. 4,5,6,7-Tetrachlor-2-trifluormethylbenzimidazol (TTFB) wurde uns freundlicherweise von Dr. Beechey, Sittingbourne, zur Verfügung gestellt. Das Rinderserumalbumin wurde im Forschungsinstitut für Impfstoffe, Dessau, hergestellt. Alle übrigen Chemikalien waren analysenrein. Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser bereitet. Zusätze von Rotenon, Antimycin, Valinomycin und TTFB erfolgten als alkoholische Lösungen. Oxalacetat wurde als Tris-Salz eingesetzt.

Mitochondrien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Rattenlebermitochondrien in 250 mM Saccharose, pH 7.4, isoliert⁹. Abweichend hiervon wurde zur Präparation von Ca^{2+} -verarmten Mitochondrien ein Medium von 250 mM Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7.6 (Ref. 6) benutzt. Die letzte Waschung und das Herstellen der Stammsuspension erfolgten ohne EGTA.

Chemische Bestimmungen

Der Proteingehalt der Mitochondrienstammsuspension wurde mit der Biuretmethode ermittelt¹⁰. Oxalacetat und sein Zersetzungsprodukt Pyruvat wurden enzymatisch^{11,12} bestimmt. Die Verunreinigung durch Pyruvat betrug maximal 10%. Kontrollversuche mit einem Pyruvatzusatz in dieser Grösse zeigten keine signifikanten Unterschiede. NADH und NADPH wurden polarographisch in einem Cycling-System⁹, Ca^{2+} durch photometrische Titration¹³ bestimmt.

Messung der Eintrittsgeschwindigkeit des Oxalacetats

Die Eintrittsgeschwindigkeit des Oxalacetats wurde nach dem von HASLAM UND KREBS⁵ beschriebenen Prinzip ermittelt. Die Standardreaktionsmischung enthielt 250 mM Saccharose, 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.4) und 1 μM Rotenon. Die Reaktionstemperatur betrug 22°. Je 3 ml der Reaktionsmischung wurden mit 50 μl Mitochondrienstammsuspension (etwa 1.5 mg Protein) vorinkubiert. Nach 1 min oder später, wenn angegeben, wurde die Reaktion durch Zusatz von Oxalacetat gestartet. Das Zeitintervall von mindestens 1 min war erforderlich, um eine ausreichende Reduktion der intramitochondrialen Pyridinnukleotide durch endogenes Substrat zu erreichen. Die durch den Oxalacetatzusatz ausgelöste Oxidation der Pyridinnukleotide wurde fluorimetrisch registriert¹⁴. Zum raschen Einmischen des Oxalacetats fertigten wir nach einer Anregung von Dr. WOLNY, Wroclaw, eine mechanische Zugabevorrichtung an, mit der sich eine Mischzeit von 0.25 sec erreichen liess. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten bezogen wir auf die Fluoreszenz, die an der jeweiligen Präparation nach 1 min Vorinkubation in der rotenonhaltigen

Standardreaktionsmischung gemessen wurde. Die Nulllinie wurde ohne Anregungslicht geschrieben. Der Differenz wurden 100 Fluoreszenzeinheiten zugeordnet. Die Angabe der Geschwindigkeiten erfolgte in Fluoreszenzeinheiten/min.

ERGEBNISSE

Oxidation der intramitochondrialen Pyridinnukleotide durch zugesetztes Oxalacetat

Die Brauchbarkeit der fluorimetrischen Messmethode wurde durch enzymatische Bestimmungen des NADH- und NADPH-Gehaltes überprüft (Fig. 1). Die fluorimetrischen Kurven zeigen einen zweiphasigen Verlauf. Nach den Analysenwerten erfolgt in der ersten raschen Phase die Oxidation von NADH, während der NADPH-Gehalt keine signifikanten Veränderungen zeigt. Erst nach weitgehender Oxidation des NADH setzt in der zweiten langsamen Phase die Oxidation von NADPH ein. Offenbar findet im Gegensatz zu den Beobachtungen von HASLAM UND KREBS⁵ unter den gewählten Bedingungen keine rasche Transhydrogenierung zwischen dem NADP- und dem NAD-System statt. In der Anfangsphase besteht ausreichende Proportionalität zwischen Fluoreszenzänderung und NADH-Oxidation. Der Proportionalitätsfaktor stimmt trotz unterschiedlicher Inkubationsbedingungen gut überein. Er beträgt (20 ± 1) Fluoreszenzeinheiten/nMol NADH pro mg protein.

Abhängigkeit der Eintrittsgeschwindigkeit des Oxalacetats von den Vorinkubationsbedingungen

Fig. 2 zeigt, dass die Eintrittsgeschwindigkeit des Oxalacetats mit der Länge

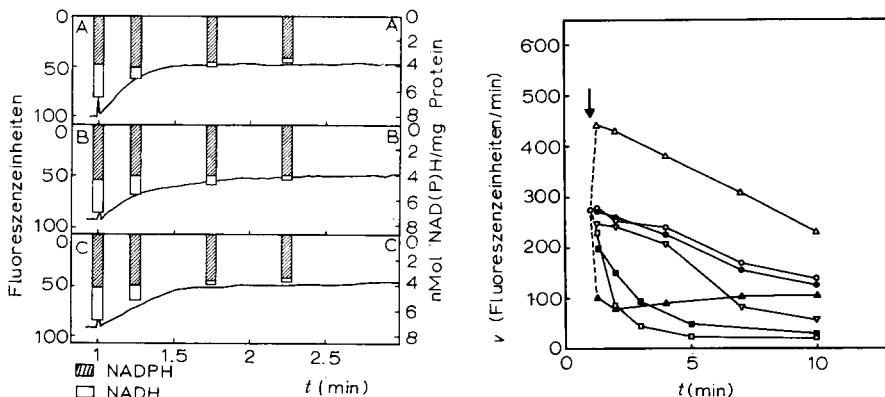


Fig. 1. Oxidation der intramitochondrialen Pyridinnukleotide durch zugesetztes Oxalacetat. Bei $t = 0$ min wurden die Mitochondrien (0.5 mg Protein pro ml Ansatz) zugesetzt, bei $t = 1$ min Oxalacetat. Für die fluorimetrische Registrierung (ausgezogene Kurve) betrug das Ansatzvolumen 3 ml. Die analytischen Bestimmungen erfolgten aus Parallelansätzen gleicher Zusammensetzung mit einem Ausgangsvolumen von 18 ml in Proben von 3 ml. A. Standardreaktionsmischung (250 mM Saccharose, 20 mM Tris-HCl, 1 μ M Rotenon, pH 7.4), 50 μ M Oxalacetat; B. Standardreaktionsmischung + 3 mM ATP, 200 μ M Oxalacetat; C. 125 mM KCl + 20 mM Tris-HCl + 1 μ M Rotenon, pH 7.4, 500 μ M Oxalacetat. Temperatur 22°.

Fig. 2. Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Oxalacetateintritts von der Vorinkubation unter verschiedenen Bedingungen. Parallelansätzen aus 250 μ l Mitochondriensuspension (etwa 7.5 mg Protein) und 15 ml Standardreaktionsmischung (cf. Fig. 1) wurden nach 1 min (Pfeil) zugesetzt: ●, 1 mM KCN; ▽, 1 mM KCN + 1 mM Arsenit; △, 1 mM CaCl₂; ▲, 3 mM ATP; ■, 1 μ M Antimycin; □, 1 μ M TTFB; ○, Kontrolle ohne Zusätze. Zu den angegebenen Zeiten erfolgte die Messung der Eintrittsgeschwindigkeit in 3-ml-Proben bei 22°. Start mit 100 μ M Oxalacetat.

der Vorinkubationsperiode abnimmt. Obwohl durch Rotenon die Oxidation der endogenen Substrate nur zu 85–95% gehemmt werden soll⁵, bewirkt eine Blockade der Restatmung durch 1 mM KCN keine signifikante Änderung. Wird die Restatmung dagegen durch Antimycin A blockiert, so ergibt sich ein rascher Abfall der Eintrittsgeschwindigkeit. Eine noch stärkere Abnahme tritt in Gegenwart des Entkopplers TTFB auf. Durch den Ansatz mit Arsenit lässt sich ausschliessen, dass die Messergebnisse durch eine Oxalacetatbeseitigung über Citrat verfälscht werden. Dieser Prozess ist durch Arsenit hemmbar^{8,15}, Arsenit führt jedoch zu keiner beschleunigung der NADH-Oxidation durch Oxalacetat. ATP bewirkt einen sofortigen starken Abfall der Eintrittsgeschwindigkeit, verhindert aber deren weiteres Absinken. 1 mM Ca^{2+} löst dagegen einen Anstieg auf 150 bis 200% aus, je nach der eingesetzten Mitochondrienpräparation. Das relative Ausmass dieser Stimulierung ist dabei in erster Näherung unabhängig von der Dauer der Vorinkubationsperiode. Die verhältnismässig hohe Ca^{2+} -Konzentration (1 mM) wurde gewählt, weil damit der Effekt maximal ist (siehe unten). Die in Fig. 2 dargestellten Ergebnisse sprechen nicht für eine Aktivierung des Oxalacetateintritts durch ATP. Wir verglichen daher die Eintrittsgeschwindigkeit unter unseren Standardbedingungen (100 μM Oxalacetat, pH 7.4; cf. Tabelle I) mit der im Ansatz nach GRIFFITHS⁶ UND HASLAM (10 μM Oxalacetat; pH 7.6, EGTA-Präparation der Mitochondrien; cf. Tabelle II). Wie Tabelle I zeigt, führt die Vorinkubation über 5 min mit Rotenon oder mit Rotenon + Antimycin A zu einer deutlichen Abnahme der Eintrittsgeschwindigkeit. Unter ATP liegen die Daten niedriger, bleiben jedoch über das Vorinkubationsintervall konstant. Bei pH 7.6 (Tabelle II) verläuft die Abnahme der Eintrittsgeschwindigkeit unter Rotenon rascher; sie liegt nach 5 min Vorinkubation bereits unter dem Wert mit Rotenon + Antimycin A + ATP. Letzterer entspricht jedoch innerhalb der Fehlergrenze dem Vergleichswert in Tabelle I, wenn man das unterschiedliche Oxalacetatangebot in Rechnung stellt. Kleine Ca^{2+} -Konzentrationen (50 μM) beeinflussen den Oxalacetateintritt in Mitochondrien, deren Ca^{2+} -Gehalt unter 2 nMol/mg Protein liegt, mit Antimycin A + ATP nicht. Daraus folgt, dass ATP lediglich der starken zeitlichen Abnahme der Eintrittsgeschwindigkeit im Ansatz mit Antimycin A entgegenwirkt.

TABELLE I

EINTRITTSGESCHWINDIGKEIT VON OXALACETAT (100 μM) IN MITOCHONDRIEN, DIE OHNE EGTA BEI pH 7.4 PRÄPARIERT WURDEN

Die Vorinkubation erfolgte in Standardreaktionsmischung (cf. Fig. 1) + angegebenen Zusätzen bei 22°. Das Ansatzvolumen betrug 3 ml, der Gehalt an Mitochondrienprotein 0.5 mg/ml.

Zusätze	Eintrittsgeschwindigkeit des Oxalacetats (Fluoreszenzeinheiten/min)		Δ Fluoreszenzeinheiten/min (%)
	1 min	5 min	
—	472	208	-56
3 mM ATP	145	147	+ 2
1 μM Antimycin	236	56	-76
1 μM Antimycin + 3 mM ATP	114	112	-2

Reaktivierung des Oxalacetateintritts nach Vorinkubation mit TTFB

Um einen weiteren Einblick in die Zusammenhänge zwischen energetischem Zustand der Mitochondrien und der Geschwindigkeit des Oxalacetateintritts zu erhalten, wurden Mitochondrien 5 min mit TTFB (+ Rotenon) vorinkubiert (Fig. 3). Ca^{2+} führt auch unter diesen Bedingungen zu einer sofortigen Stimulierung des Oxalacetateintritts, wobei das relative Ausmass der Stimulierung wesentlich grösser ist als ohne Vorinkubation mit TTFB (cf. Fig. 2), der Absolutbetrag dagegen viel geringer. Ein Zusatz von Serumalbumin zur Bindung des TTFB bewirkt eine zunehmende Reaktivierung des Oxalacetateintritts. Dieser Vorgang lässt sich durch ATP beschleunigen. ATP ist dagegen wirkunglos, wenn TTFB nicht durch Serum-

TABELLE II

EINTRITTSGESCHWINDIGKEIT VON OXALACETAT (10 μM) IN MITOCHONDRIEN, DIE MIT 1 mM EGTA BEI pH 7.6 PRÄPARIERT WURDEN

Die Vorinkubation erfolgte 5 min bei 22° in einem Medium folgender Zusammensetzung: 250 mM Saccharose + 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) + 0.5 μM Rotenon + Zusätze, wie angegeben. Das Ansatzvolumen betrug 3 ml, der Gehalt an Mitochondrienprotein 0.5 mg/ml.

Zusätze	Eintrittsgeschwindigkeit des Oxalacetats (Fluoreszenzeinheiten/min)
1 μM Antimycin	7
1 μM Antimycin + 3 mM ATP	3
1 μM Antimycin + 3 mM ATP + 50 μM CaCl_2	9
	9

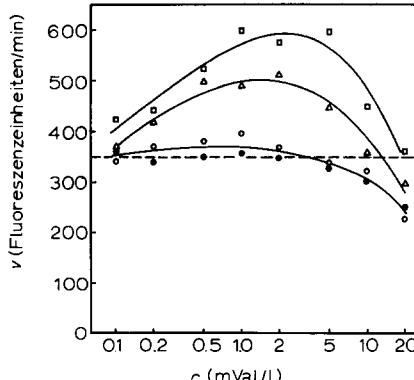
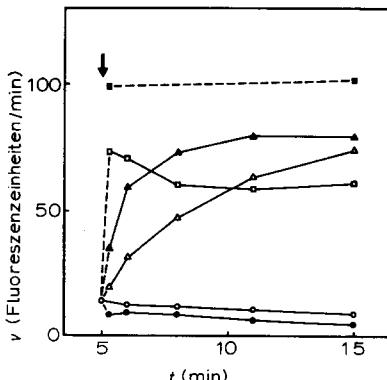


Fig. 3. Reaktivierung des Oxalacetateintritts nach Vorinkubation mit TTFB. Inkubation in Standardreaktionsmischung + 1 μM TTFB, übrige Bedingungen wie in Fig. 2. Bei $t = 5$ min (Pfeil) wurden folgende Zusätze gemacht: ○, keine; ●, 3 mM ATP; △, 1.5% Rinderserumalbumin; ▲, 1.5% Rinderserumalbumin + 3 mM ATP; □, 1 mM CaCl_2 . Im Kontrollansatz (■) ohne TTFB wurden ebenfalls nach 5 min 1.5% Rinderserumalbumin + 3 mM ATP zugesetzt.

Fig. 4. Einfluss der ionalen Zusammensetzung des Mediums auf den Oxalacetateintritt. Die Vorinkubation erfolgte für 1 min in 3 ml Standardreaktionsmischung mit folgenden Zusätzen: □, CaCl_2 in angegebener Konzentration; △, MgCl_2 in angegebener Konzentration; ○, KCl in angegebener Konzentration; ●, 0.5 μg Valinomycin + KCl in angegebener Konzentration. -----, Kontrolle ohne Zusätze. Die übrigen Bedingungen entsprechen Tabelle I.

albumin abgefangen wird, obwohl in dem untersuchten Zeitintervall das zugesetzte ATP nur teilweise durch die TTFB-stimulierte ATPase hydrolysiert sein dürfte¹⁶. Der Kontrollansatz ohne TTFB zeigt, dass die erreichte Reaktivierung nach 10 min etwa 80% beträgt.

Einfluss der ionalen Zusammensetzung des Mediums auf den Oxalacetateintritt

Fig. 4 gibt zu erkennen, dass $MgCl_2$ ähnlich wie $CaCl_2$ den Oxalacetateintritt beschleunigt, jedoch in geringerem Ausmass. Durch KCl wird dagegen keine messbare Stimulierung erreicht, auch nicht in Gegenwart von Valinomycin. Aus Fig. 4 geht ferner hervor, dass bei Ionenkonzentrationen über 5 mM Val/l eine Hemmung des Oxalacetateintritts einsetzt. Diese Hemmung ist unabhängig von der Art des Kations. Sie beträgt nach vollständigem Austausch der Saccharose im Medium durch NaCl oder KCl gleicher Osmolarität bei einem Oxalacetatzusatz von 100 μM 97% (cf. Fig. 5). Es wird vermutet, dass sie durch den Gehalt an Cl^- bedingt ist.

Abhängigkeit der Eintrittsgeschwindigkeit von der Oxalacetatkonzentration

In Fig. 6 ist die Eintrittsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Oxalacetatkonzentration bei verschiedenen Vorinkubationsbedingungen nach EADIE¹⁷ dargestellt. Die den Geraden in Fig. 6 entsprechenden kinetischen Konstanten sind in Tabelle III zusammengestellt. Man sieht, dass die Aktivierung durch Ca^{2+} auf einer Steigerung der Maximalgeschwindigkeit und der Affinität beruht, während die Hemmungen durch hohe KCl-Konzentrationen und durch ATP kompetitiven Charakter haben. ATP wirkt offenbar wenig spezifisch, da AMP den gleichen Effekt zeigt. Demnach kann die ATP-Hemmung nicht auf der Aktivierung von Konkurrenzreaktionen beruhen, wie etwa der Umwandlung von Oxalacetat in Phosphoenol-

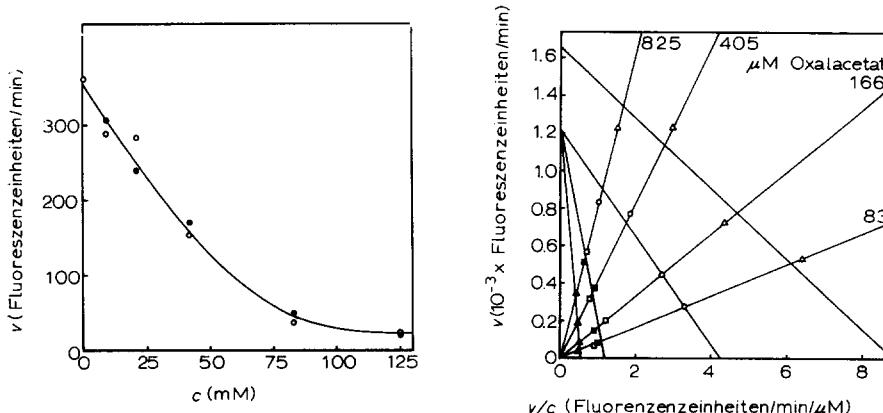


Fig. 5. Oxalacetateintritt bei höherer Ionenkonzentration. Die Saccharose der Standardreaktionsmischung wurde durch NaCl (○) oder KCl (●) der angegebenen Konzentration ersetzt, so dass die Osmolarität konstant blieb. Die übrigen Bedingungen entsprechen Fig. 4.

Fig. 6. Kinetik des Oxalacetateintritts nach Inkubation mit verschiedenen Effektoren (Darstellung nach EADIE¹⁷). Die Standardreaktionsmischung enthielt folgende Zusätze: ○, keine; □, 3 mM ATP; ■, 3 mM AMP; △, 1 mM $CaCl_2$; ▲, 125 mM KCl statt 250 mM Saccharose. Die übrigen Bedingungen entsprechen Fig. 4. Der Start erfolgte mit den angegebenen Oxalacetatkonzentrationen.

pyruvat oder dem Abbau endogener Fettsäuren, was zu einem zusätzlichen NADH-Angebot und einer Oxalacetatbeseitigung durch Acetyl-CoA führen würde^{8, 15}.

DISKUSSION

Unsere Versuchsergebnisse lassen keine unmittelbaren Zusammenhang zwischen dem energetischen Zustand der Mitochondrien und der Eintrittsgeschwindigkeit von Oxalacetat erkennen. Sowohl deren Abnahme unter TTFB als auch ihre Reaktivierung durch ATP nach Ablösen des TTFB mit Serumalbumin verlaufen langsamer als die entkoppelnerstimulierte Hydrolyse des endogenen ATP¹⁶ bzw. die Adeninnukleotidtranslokation¹⁸.

Auch die Ca^{2+} -abhängige Beschleunigung des Eintritts ist nicht energiebedürftig, weil es (i) unter den gewählten Bedingungen (endogenes Substrat + Rotenon) zu keiner Ca^{2+} -Akkumulation kommt¹⁹, weil (ii) die Ca^{2+} -abhängige Beschleunigung auch in Gegenwart von TTFB erfolgt und weil (iii) die zur optimalen Stimulierung notwendige Ca^{2+} -Konzentration (1–2 mM) bereits entkoppelnde Wirkung hat²⁰. Ca^{2+} wirkt wahrscheinlich auch nicht als permeables Gegenion, da K^+ + Valinomycin unter gleichen Bedingungen keinen Effekt haben.

Wir nehmen daher an, dass Oxalacetat gegen endogene Anionen ausgetauscht und seine Eintrittsgeschwindigkeit neben kompetitiven Hemmungen des Carrier-systems durch den Gehalt an austauschbaren Anionen bestimmt wird. TTFB und in weit geringerem Masse das infolge seiner phenolischen OH-Gruppe anionische Antimycin A hemmen dann über eine Entleerung des endogenen Anionenpools, während ATP nach Ablösen von TTFB eine Reakkumulation aus dem Medium und eine Neubildung endogener Anionen aus dem Lipidpool bewirken könnte. Für diese Deutung spricht auch, dass die halbmaximale Wirkung von Antimycin A auf den Oxalacetateintritt bei 0.2 nMol/mg Mitochondrienprotein beobachtet wurde, während ESTABROOK²¹ bei Lebermitochondrien eine halbmaximale Hemmung der Atmung bereits bei 0.04 nMol/mg Mitochondrienprotein fand.

Der Effekt von Erdalkaliionen auf die Eintrittsgeschwindigkeit beruht wahrscheinlich nicht auf einer einfachen Membranschädigung, weil er sich auch unter physiologischer Mg^{2+} -Konzentration nachweisen lässt.

Aufgrund der starken kompetitiven Hemmbarkeit scheint *in vivo* dem direkten

TABELLE III

KINETISCHE KONSTANTEN FÜR DEN OXALACETATEINTRITT IN RATTENLEBERMITOCHONDRIEN.

Die Konstanten wurden nach Fig. 6 berechnet.

Zusätze	Maximalgeschwindigkeit (10^{-3} Fluoreszenzeinheiten/min)	Scheinbare K_M (mM)	Inhibitor-konstante K_I (mM)
—	1.2	0.29	—
1 mM Ca^{2+}	1.6	0.19	—
3 mM ATP	1.2	1.1	1.1
3 mM AMP	1.2	1.1	1.1
125 mM KCl anstelle von 250 mM Sacch.	1.2	2.4	18

Eintritt von Oxalacetat in Lebermitochondrien wenig Bedeutung für den Zellstoffwechsel zuzukommen. Wird die festgestellte Beziehung zwischen der Fluoreszenzänderung und dem Gehalt an NADH (20 Fluoreszenzeinheiten/nMol NADH pro mg Protein) zugrundegelegt, so folgt mit den Daten aus Tabelle III für eine Oxalacetatkonzentration von $10 \mu\text{M}$ eine Eintrittsgeschwindigkeit von 0.25 nMol/min pro mg Protein im KCl-Medium. Da als intrazelluläre Anionen in erster Linie Phosphate statt Cl^- auftreten, sollte sie noch niedriger liegen, denn die untersuchten Phosphatverbindungen AMP, ATP (cf. Tabelle III) und P_i^{22} zeigen wesentlich kleinere Hemmkonstanten als KCl. Damit wäre ein einfacher Oxalacetat-Malat-Shuttle²³ für den Wasserstofftransport zwischen Cytosol und Mitochondrien nicht ausreichend. Inzwischen wurde von LUMENG UND DAVIS²⁴ gezeigt, dass für die Veratmung von extramitochondrialem NADH neben Malat-Dehydrogenase auch extramitochondriale Glutamat-Oxalacetat-Transaminase notwendig ist. Das ist eine direkte experimentelle Bestätigung des von BORST²⁵ vorgeschlagenen Aspartat-Malat-Shuttle für den Wasserstofftransport.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Oxalacetateintritt in Rattenlebermitochondrien wurde fluorimetrisch über die Oxidationsgeschwindigkeit der intramitochondrialen Pyridinnukleotide gemessen. Quantitative Pyridinnukleotidbestimmungen zeigten, dass die initiale Fluoreszenzänderung ausschliesslich durch NADH-Oxidation verursacht wird und proportional dazu verläuft.

2. Der Eintritt wird durch 1 mM Ca^{2+} optimal stimuliert, in geringerem Masse durch Mg^{2+} . K^+ (+ Valinomycin) sind wirkungslos. Ca^{2+} aktiviert auch nach Vorinkubation mit 4,5,6,7-Tetrachlor-2-trifluormethylbenzimidazol (TTFB).

3. TTFB führt mit einer Halbwertszeit von etwa 0.5 min zu einer weitgehenden Hemmung des Eintritts, die durch Serumalbumin partiell aufhebbar ist. Die Reaktivierung mit Serumalbumin lässt sich durch ATP beschleunigen.

4. ATP allein führt zu einer starken kompetitiven Hemmung des Eintritts, AMP hemmt in etwa gleichem Ausmass. Auch hohe Cl^- -Konzentrationen hemmen.

5. Es wird vermutet, dass Oxalacetat gegen endogene Anionen ausgetauscht wird und die TTFB-Hemmung auf einer Verarmung an endogenen Anionen beruht.

6. Aufgrund der starken kompetitiven Hemmbarkeit durch Anionen scheint dem Oxalacetateintritt aus dem cytoplasmatischen in das mitochondriale Kompartiment *in vivo* wenig Bedeutung zuzukommen.

DANK

Die Autoren möchten Frl. I. Schmidl und Frl. R. Bonhage für ausgezeichnete technische Mitarbeit und Frau Dr. I. Steinbrecht für die Durchführung der Pyridinnukleotidbestimmung danken.

LITERATUR

- 1 J. B. CHAPPELL, *Brit. Med. Bull.*, 24 (1968) 150.
- 2 W. KUNZ, *Verhandl. Ges. exp. Med. DDR*, Bd. 4, Theodor Steinkopff, Dresden, 1963, S. 43.
- 3 E. A. JONES UND H. GUTFREUND, *Biochem. J.*, 87 (1963) 639.

- 4 W. KUNZ, *Z. Physiol. Chem.*, 334 (1963) 128.
- 5 J. M. HASLAM UND H. A. KREBS, *Biochem. J.*, 107 (1968) 659.
- 6 D. E. GRIFFITHS UND J. M. HASLAM, *Biochem. J.*, 109 (1968) 921.
- 7 J. B. CHAPPELL UND B. H. ROBINSON, *Biochem. J.*, 105 (1967) 18P.
- 8 A. B. WOJTCZAK, *Biochim. Biophys. Acta*, 172 (1969) 52.
- 9 I. STEINBRECHT UND W. KUNZ, *Acta Biol. Med. Germ.*, im Druck.
- 10 A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL UND M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- 11 T. BÜCHER, R. CZOK, W. LAMPRECHT UND E. LATZKO, in H. U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962, S. 253.
- 12 H. J. HOHORST UND M. REIM, in H. U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962, S. 335.
- 13 R. QUICKER UND H. J. DULCE, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 6 (1968) 176.
- 14 W. KUNZ UND G. BÖHME, *Acta Biol. Med. Germ.*, 22 (1969) 643.
- 15 A. B. OESTREICHER, S. G. VAN DEN BERGH UND E. C. SLATER, *Biochim. Biophys. Acta*, 180 (1969) 45.
- 16 H. W. HELDT UND M. KLINGENBERG, *European J. Biochem.*, 4 (1968) 1.
- 17 G. S. EADIE, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 85.
- 18 E. PFAFF, H. W. HELDT UND M. KLINGENBERG, *European J. Biochem.*, 10 (1969) 484.
- 19 J. BIELAWSKI UND A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 4316.
- 20 B. CHANCE, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 2729.
- 21 R. W. ESTABROOK, *Biochim. Biophys. Acta*, 60 (1962) 236.
- 22 W. KUNZ, G. BÖHME, R. BOHNENSACK UND G. LUTZE, in L. WOJTCZAK, W. DRABIKOWSKI UND H. STRZELECKA-GOLASZEWSKA, *Biochemistry of Intracellular Structures: Mitochondria and Endoplasmic Reticulum*, PWN, Warszawa, 1969, S. 35.
- 23 H. A. KREBS, in E. C. SLATER, Z. KANIUGA UND L. WOJTCZAK, *Biochemistry of Mitochondria*, Academic Press and Polish Scientific Publishers, London and Warsaw, 1967, S. 105.
- 24 L. LUMENG UND E. J. DAVIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 197 (1970) 93.
- 25 P. BORST, *Proc. 5th Intern. Congr. Biochem.*, Moscow, 1961, Vol. 2, Pergamon, London, 1963, S. 233.