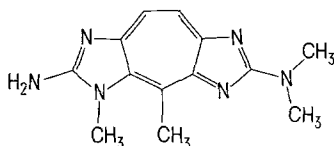


Inhibition of Succinic Oxidase Activity of Beef Heart Mitochondria by a New Fluorescent Metabolite, Zoanthoxantin

Zoanthoxantin is a new chemical compound recently isolated from *Parazoanthus* cf. *axinellae* (Zoantharia)¹. It is a derivative of 1,3,5,7-tetrazacyclopent [f] azulene, a heterocyclic compound not previously described in living systems:



The function of this substance, which exhibits a strong fluorescence, is entirely unknown. In this paper its properties as a noncompetitive inhibition of the succinic oxidase activity of beef heart submitochondrial particles is reported. Zoanthoxantin can be considered an inhibitor of mitochondrial respiration as effective as other known

inhibitors such as 2,3-Dimercaptopropanol (BAL), phenanthroline, amytal, etc.².

Materials and methods. Electron Transport Particles (ETP) were obtained by a modification of the method of BERNSTEIN and WAINIO³. A fresh beef heart, trimmed from fat tissue and ligaments, was ground and weighed and the mince was washed with cold water for 1 h with occasional stirring. The water was removed by filtration and the solid material was homogenized in a Waring blender with 0.04 M phosphate buffer pH 7.0 (3 ml per g of fresh tissue).

After removal of the cellular debris by low speed centrifugation (1500 g for 20 min), the mitochondrial particles were sedimented at 30,000 g in a Spinco preparative ultracentrifuge Mod. L50 for 1 h. Myoglobin and excess of cytochrome c were removed by washing twice with 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 (1:3 v/v) and the material was resuspended in a minimal amount of buffer at the same pH value. The protein concentration, as determined by the biuret method, was brought to 25 mg per ml using the same buffer.

The oxygen consumption was determined polarographically using a Gilson oxygraph. The reaction mixture contained: ETP, cytochrome c, Na-succinate, zoanthoxantin and 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. The experiments were carried out at 35°C. Since zoanthoxantin is relatively insoluble in water it was dissolved in 0.1 M HCl. The presence of hydrochloric acid at the final concentration used does not affect the oxygen consumption of the preparation.

Results and discussion. The oxygen consumption of beef heart submitochondrial particles in presence of sodium succinate was determined using different amounts of zoanthoxantin. As shown in Figure 1, this substance has a remarkable inhibitory effect, which is clearly dependent on the concentrations used and which reaches a value of about 50% at 5.7×10^{-4} M. The values obtained with different concentrations of substrate and of zoanthoxantin (Figure 2) were used for calculating the kinetics of the reaction. The K_m and V_{max} (Table) indicate that the substance is a noncompetitive inhibitor of the succinic oxidase system.

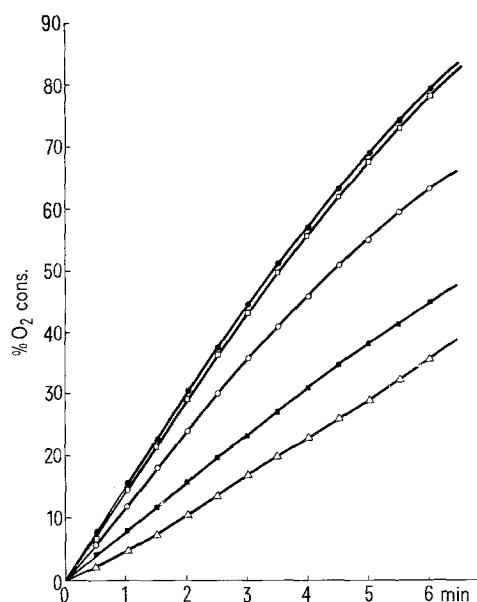


Fig. 1. The oxidation of succinate in the presence and absence of zoanthoxantin. ● no zoanthoxantin, □ 5.52×10^{-5} M, ○ 1.38×10^{-4} M, ■ 2.76×10^{-4} M and △ 5.52×10^{-4} M zoanthoxantin. Reaction mixture for the control and the experimentally contained phosphate 60 mM, pH 7.4; ETP 0.554 mg (in terms of protein); cytochrome c 27 μ M; sodium succinate 20 mM in a total volume of 1.5 ml, in the presence or absence of zoanthoxantin at the concentration indicated. Sodium succinate was added last to start the reaction.

¹ L. CARIELLO, S. CRESCENZI, G. PROTA, F. GIORDANO and L. MAZZARELLA, Chem. Comm. 99 (1973).

² W. W. WAINIO, in: *The Mammalian Mitochondrial Respiratory Chain* (Eds. B. HORECKER, N. O. KAPLAN, J. MARMUR and H. A. SCHERAGA; Academic Press, New York and London 1970), p. 112.

³ E. H. BERNSTEIN and W. W. WAINIO, J. biol. Chem. 223, 361 (1958).

Values for K_m and V_{max} (succinate) for control and zoanthoxantin-inhibited particulate succinate-oxidase

Zoanthoxantin	Concentration in assay	K_m	V_{max}
mg/l	moles/l	mM	% O ₂ cons./min
0.00	0.00	10.52	20.00
0.07	2.76×10^{-4}	10.52	10.80
0.14	5.52×10^{-4}	10.52	7.77

The values were calculated from Figure 2. K_m was calculated as $-1/\text{intercept on the abscissa}$. V_{max} was calculated as $1/\text{intercept on the ordinate}$.

This substance, which is present in relatively large amounts in *P. axinellae* and which cannot be related to any other known organic compound occurring in living organisms, probably has no physiological significance in

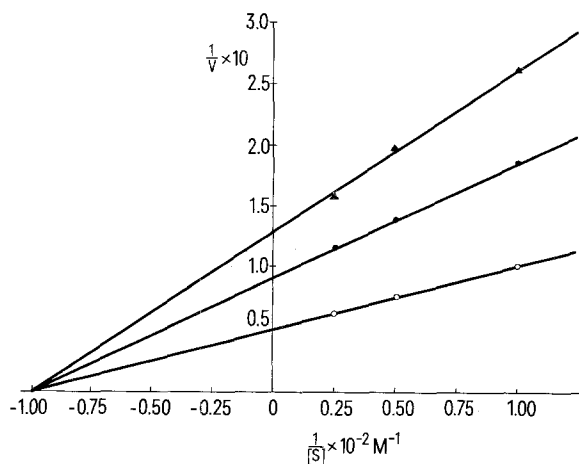


Fig. 2. Reciprocal plots of substrate concentration with respect to initial activity of succinate oxidase system in the presence of inhibitor. Velocities are expressed in per cent O_2 uptake/min. $\circ$ no zoanthoxantin, $\bullet$ $2.76 \times 10^{-4} \text{ M}$ zoanthoxantin, $\blacktriangle$ $5.52 \times 10^{-4} \text{ M}$ zoanthoxantin. The reaction mixture (1.5 ml) contained 60 mM phosphate pH 7.4; 0.554 mg ETP (in terms of protein); 27 μM cytochrome c; zoanthoxantin at the concentration indicated; sodium succinate concentration was varied from 10 mM to 40 mM.

the respiration of the animal. The noncompetitive inhibitory action of zoanthoxantin on succinic oxidase activity indicates that it is not involved in the respiratory chain either as substrate or as coenzyme. However, since the inhibition remained constant with respect to time, it seems unlikely that this substance acts as an electron acceptor but rather exerts its inhibitory action at the site of substrate dehydrogenation.

In view of the strongly fluorescent properties of this molecule, its use as an inhibitor of mitochondrial respiration is of particular interest with respect to its possible utilization as a probe of those molecular events occurring at the site of inhibition.

Résumé. La zoanthoxantine est un nouveau composé aromatique, très fluorescent, caractérisé par le chromophore 1,3,5,7-tétrazacyclopent[f]azulen. On démontre l'action inhibitrice de ce métabolite sur une préparation submitochondriale de cœur de bœuf et le type d'inhibition en a été déterminé. On envisage aussi la possibilité d'utiliser la zoanthoxantine comme indicateur moléculaire dans la zone d'inhibition.

L. CARIELLO and B. TOTA⁴

Department of Biochemistry and Physiology,
Stazione Zoologica, and Institute of Preventive Medicine,
University, Naples (Italy), 28 June 1973.

⁴ We are indebted to Professor A. AZZI for helpful criticism and discussion.

Der Gehalt an freien ninhydrinpositiven Verbindungen im Extremitätengewebe von *Amblystoma mexicanum*

Über das Spektrum der freien Aminosäuren vieler Organismen¹, darunter auch die Amphibien, liegen Daten vor. So hat CHEN² den Gehalt an freien Aminosäuren von verschiedenen Amphibien-Embryonen bestimmt und, abgesehen von geringen quantitativen Unterschieden bei allen untersuchten Spezies, das gleiche Inventar an ninhydrinpositiven Verbindungen registriert. HERNANDEZ und COULSON³ versuchten die Zusammensetzung des Aminosäure-pools als taxonomisches Kriterium zu verwenden. Dabei ermittelten sie die Konzentration der freien Aminosäuren in ganzen Tieren, unter anderem auch bei *Amblystoma tigrinum*. Im Rahmen von Untersuchungen über biochemische Veränderungen während der Extremitätenregeneration wurde festgestellt, dass sich der Gehalt an freien Aminosäuren eng benachbarter Gewebe wie Haut und darunterliegende Muskulatur sehr stark voneinander unterscheidet. Die Bestimmungen erfolgten an etwa 12 Monate alten Axolotln. Das in flüssigem Stickstoff eingefrorene und gefriergetrocknete Material, Haut bzw. darunterliegendes Gewebe (im wesentlichen Muskulatur, der Knochen wurde entfernt) aus dem Stylopodium der Vorderextremität, wurde mit einem Gemisch aus Methanol/Chloroform/Wasser (12/5/3, v/v)⁴ im Glashomogenisator zerkleinert und dreimal extrahiert. Eine vierte Extraktion erfolgte mit 80% Äthanol. Die nach Zentrifugation (4 min bei 10 000 g) vereinigten Überstände wurden zur Abscheidung des Chloroforms mit einer geeigneten Menge Wasser und Chloroform versetzt und 30 sec lang ausgeschüttelt. Die klare, wässrig-methanolisch-äthanolische Phase wurde danach abgetrennt und im Rotationsverdampfer (12 mm Hg; max. 35°C) bis zur

Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde für die säulenchromatographische Bestimmung in 0,1 n HCl und Natriumcitratpuffer (0,2 n, pH 2,2) aufgenommen.

Die Analyse der Extrakte erfolgte durch Auftrennung in einem Aminosäure-Analysator (Beckmann Unichrom) mit Austauscherharz Typ M 72 (bzw. M 81 für die basischen Aminosäuren). In Abwandlung des üblichen Verfahrens⁵ wurde zur optimalen Auftrennung die Elutionsgeschwindigkeit auf 40 ml/h herabgesetzt. Der erste Elutionspuffer (0,20n Natriumcitrat) wurde von pH 3,25 auf 3,23 abgeändert. Als zweiter Puffer diente wie üblich 0,20n Natriumcitrat pH 4,25. Pufferwechsel erfolgte nach 198 min. Während der Analyse wurde die Säulentemperatur erhöht. Als bester Temperaturgradient, besonders für die Auftrennung von Prolin und Glutaminsäure und der früh im Eluat erscheinenden Verbindungen, erwies sich eine Temperaturerhöhung von 32°C auf 54°C nach 120 min (Aufheizzeit 68 min). Für die basischen Aminosäuren ergab das Standardverfahren⁵ die besten Resultate. Den Extrakten wurde Norleucin als interner Standard zugesetzt (Genauigkeit des Analysenverfahrens = $\pm 2,7\%$).

¹ J. T. HOLDEN, *Amino Acid Pools-Distribution, Formation and Functions of free Amino Acids* (Elsevier, Amsterdam 1962).

² P. S. CHEN, *Int. J. Biochem.* 1, 669 (1970).

³ T. HERNANDEZ und R. A. COULSON, *Comp. Biochem. Physiol.* 38B, 679 (1971).

⁴ R. L. BIELESKY und N. A. TURNER, *Analyt. Biochem.* 17, 278 (1966).

⁵ D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN und S. MOORE, *Analyt. Chem.* 30, 1190 (1958).