

7. DL-2-Thiol-histidin (I). 61 g  $\alpha, \delta$ -Diamino- $\gamma$ -oxo-n-valeriansäure-dihydrochlorid (VIa) werden in 500 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und bei 90–100° mit 61 g Kaliumrhodanid in 4 Portionen in Abständen von je 30 Min. versetzt. Dann erhitzt man noch 1 Std. auf 80–90°, kocht kurz auf und filtriert mit Kohle. Das klare, hellgelbe Filtrat wird unter vorsichtiger Zugabe von Natriumcarbonat-decahydrat auf pH 5 gestellt, worauf das 2-Thiol-histidin ausfällt. Man lässt über Nacht im Eisschrank kristallisieren, nutzt ab und wäscht gut mit Wasser aus. Das gut abgepresste Rohprodukt wird noch feucht aus 31 Wasser umkristallisiert. Reinausbeute: 26 g (50%) (20 g 1. Fraktion + 6 g aus der Mutterlauge beim Einengen im Vakuum auf 200 cm<sup>3</sup>). Zers. über 300° ohne Schmelzen. Ninhydrin-Probe und Nitroprussid-Reaktion positiv. Zur Analyse wurde 48 Std. im Hochvakuum bei 120° getrocknet.

$C_6H_9O_2N_3S$  Ber. C 38,50 H 4,85 S 17,12 N 22,46%  
(187) Gef. „ 38,30 „ 4,86 „ 16,92 „ 21,17%<sup>1)</sup>

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. Waldmann) ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Es wird über eine Synthese von DL-2-Thiol-histidin berichtet, die über folgende Stufen verläuft: Acetonyl-acetamino-malonester  $\rightarrow$  ( $\omega$ -Bromacetonyl)-acetamino-malonester  $\rightarrow$  ( $\omega$ -Phtaryl-amino-acetonyl)-acetamino-malonester  $\rightarrow$   $\alpha, \delta$ -Diamino- $\gamma$ -oxo-n-valeriansäure  $\rightarrow$  DL-2-Thiol-histidin.

Wissenschaftliche Laboratorien  
der *F. Hoffmann-La Roche & Co., Aktiengesellschaft*, Basel.

---

## 5. Komplexbildner als Cofaktoren isolierter Zellgranula

von J. Raaflaub.

(18. XI. 54.)

Aus Leberzellen isolierte Granula – sog. Mitochondrien – bewahren, sofern sie in einem geeigneten Milieu suspendiert sind, während längerer Zeit ihre kompakte Struktur und die Fähigkeit, die Oxydation von Metaboliten des Intermediärstoffwechsels (Glieder des Zitronensäurezyklus usw.) zu katalysieren<sup>2)</sup>. Eine Reihe von Untersuchungen hat ergeben, dass die Stoffwechselaktivität dann verloren geht, wenn die Mitochondrien schwellen<sup>3)</sup><sup>4)</sup>. Eine eingehende Darstellung der mit der Schwellung gekoppelten chemischen und physikalisch-chemischen Veränderungen ist früher veröffentlicht worden<sup>4)</sup><sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> Stickstoffwerte stets zu niedrig; die Substanz ist sehr schwer verbrennbar.

<sup>2)</sup> F. Leuthardt & J. Mauron, Helv. physiol. pharmacol. Acta **8**, 386 (1950). — D. E. Green, Symposium sur le cycle tricarboxylique, II<sup>me</sup> Congrès international de Biochimie, Paris 1952.

<sup>3)</sup> J. W. Harman, Exper. Cell Res. **1**, 382 (1950).

<sup>4)</sup> J. Raaflaub, Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 142, 157 (1953).

<sup>5)</sup> O. Brenner-Holzach & J. Raaflaub, Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, 243 (1954).

Hier sei nur erwähnt, dass die Schwellung durch ATP<sup>1)</sup> verzögert, andererseits durch Spaltprodukte des ATP (z. B. Phosphat) beschleunigt werden kann. Auf welche Weise ATP die Volumenzunahme der Mitochondrien verzögert, war jedoch bisher schwer verständlich. In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche berichtet, die den Mechanismus dieses ATP-Effekts aufklären.

*Slater & Cleland* haben die wichtige Entdeckung gemacht, dass Komplexon<sup>1)</sup> die Oxydation von  $\alpha$ -Ketoglutarsäure durch isolierte Herzzellgranula fördert und gleichzeitig morphologische Veränderungen der Granula (wie Schwellung usw.) verhindert. Die Wirkung von Komplexon beruht nach *Slater & Cleland* darauf, dass es störende Calciumionen komplex bindet<sup>2)</sup>. Da bekannt ist, dass Polyphosphate gute Komplexbildner für mehrwertige Kationen sind<sup>3)</sup>, ist es denkbar, dass die Ähnlichkeit der Effekte von ATP auf Leberzellgranula und von Komplexon auf Herzzellgranula durch die komplexchemischen Eigenschaften der beiden Verbindungen bedingt ist. Es erhebt sich die Frage, ob synthetische Komplexbildner vom Typus des Komplexons imstande sind, ATP als Cofaktor der Mitochondrienatmung zu ersetzen. Dank dem Entgegenkommen von Herrn Prof. *G. Schwarzenbach*, der uns eine Reihe von synthetischen Komplexbildnern zur Verfügung gestellt hat, konnte diese Frage experimentell geprüft werden.

### Versuchsergebnisse.

Zunächst haben wir den Einfluss von Komplexon auf die Schwellung von Lebermitochondrien untersucht. Komplexon sowie die andern synthetischen Komplexbildner der Tab. 1 hemmen die nichtosmotische Schwellung (zur Unterscheidung osmotischer von nichtosmotischer Schwellung siehe<sup>4)</sup>), und zwar besser und länger als ATP (Fig. 1). Offenbar sind gewisse mehrwertige Kationen für den nichtosmotischen Schwellprozess unerlässlich. In früheren Versuchen<sup>4)</sup> ist zwar gefunden worden, dass zweiwertige Kationen in einer Konzentration von  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$  m. die Schwellung verdünnter Mitochondrien hemmen, was als oberflächendichtender Effekt gedeutet wurde. Dies scheint zunächst unvereinbar mit dem Befund, dass durch Calcium- und Magnesium-Komplexbildner wie Komplexon die Schwellung ebenfalls verhindert wird. Eine Betrachtung der Kurven der Fig. 1 zeigt aber, dass zwei Wirkungen der bivalenten Kationen auseinandergehalten werden müssen: erstens die Beeinflussung des Schwellgrads der Mitochondrien (Ordinate E massgebend), wo Mg

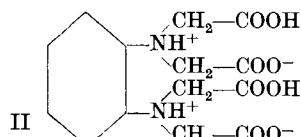
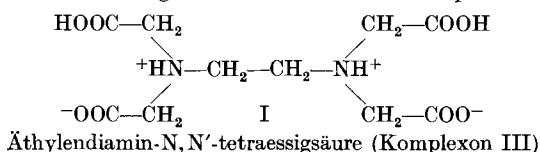
<sup>1)</sup> Verwendete Abkürzungen: *ATP*: Adenosintriphosphat; *Komplexon*: Äthylen-diamin-tetraacetat (= Komplexon III der *AG. B. Siegfried*, im angelsächsischen Schriftum auch *EDTA* oder *versene* genannt); *Glykolkomplexon*: Verbindung V der Tab. 1.

<sup>2)</sup> *E. C. Slater & W. K. Cleland*, Biochem. J. **55**, 566 (1953).

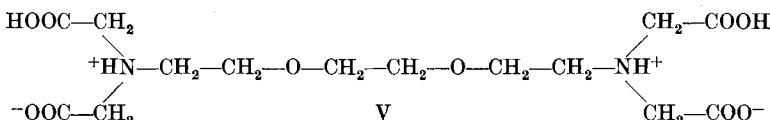
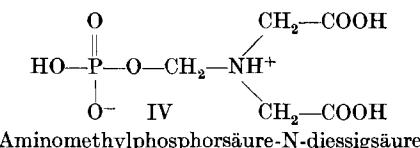
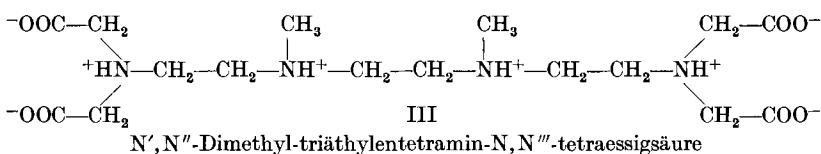
<sup>3)</sup> *J. R. Van Wazer & D. A. Campanella*, J. Amer. chem. Soc. **72**, 655 (1950).

<sup>4)</sup> *J. Raaflaub*, Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 142 (1953).

**Tabelle 1.**



## 1,2-Diaminocyclohexan-tetraessigsäure



Äthylenglykol-bis- $\beta$ -aminoäthyläther-N,N'-tetraessigsäure (abgekürzt Glykolkomplexon)

und Ca gleichartig wirken (der erreichte Schwellgrad ist geringer als ohne bivalente Kationen) und zweitens die Beeinflussung des zeitlichen Verlaufs der Schwellung (Abszisse massgebend), wo  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  verschieden wirken ( $Ca^{2+}$  beschleunigt,  $Mg^{2+}$  beschleunigt nicht). Der letztere Effekt tritt gegenüber ersterem um so mehr hervor, je konzentrierter die Mitochondriensuspension ist. Wird die Stamm-suspension  $M_1$  nur 1:3 verdünnt, so genügt der Zusatz von Ca-Ionen allein, um eine rasche, weitgehende Schwellung in Gang zu bringen, während Mg-Ionen diese verzögern (Fig. 2). Auch in der bei Stoff-wechselsversuchen üblichen Mitochondrienkonzentration (Stamm-suspension  $M_1$  1:10 verdünnt) ist nur dieser Calciumeffekt wichtig und deswegen führen schon geringe Mengen Calcium-Ionen zu einem vorzeitigen Stillstand der Atmung (Fig. 3). Eine gewisse Menge von Calcium ist offenbar in den isolierten Mitochondrien selbst enthalten, wobei dahingestellt sei, ob dieses Calcium bereits intracellulär an die Granula fixiert war oder, wie Versuche von *Slater & Cleland* wahr-

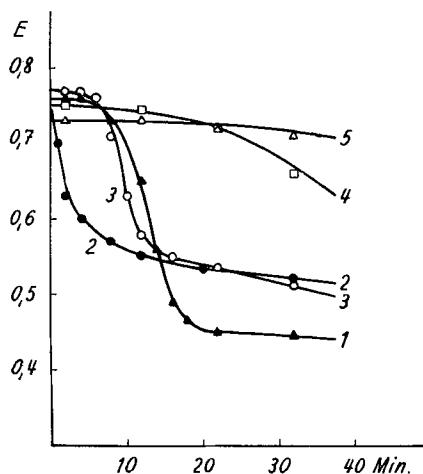


Fig. 1.

Die Beeinflussung der nicht-osmotischen Schwellung von Mitochondrien in verdünnter Suspension durch zweiwertige Kationen (Mg, Ca) und durch Komplexbildner (Komplexon, ATP). Milieu: Mitochondrien  $M_1$  1 : 200 verdünnt in isotonischer Mannitlösung und  $10^{-3}$ -m. Na-phosphat, pH = 6,9; T = 20°.

- |  |                              |
|--|------------------------------|
| 1. Kontrolle ohne weitere Zusätze.       | 4. + ATP $10^{-3}$ -m.       |
| 2. + $\text{CaCl}_2 2 \cdot 10^{-4}$ -m. | 5. + Komplexon $10^{-3}$ -m. |
| 3. + $\text{MgCl}_2 2 \cdot 10^{-4}$ -m. |                              |

Die Extinktion E ist dem Schwellungsgrad der Mitochondrien umgekehrt proportional.

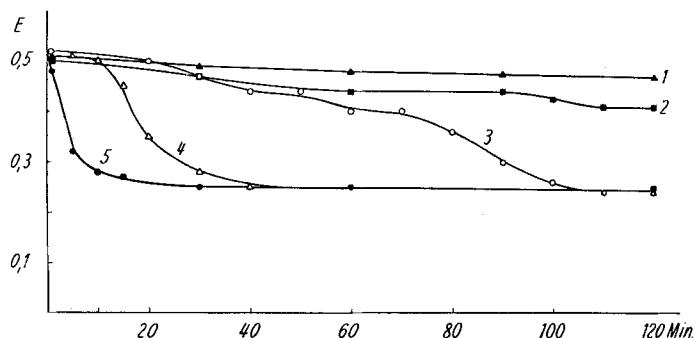


Fig. 2.

Die Beeinflussung der nicht-osmotischen Schwellung von Mitochondrien in konzentrierter Suspension durch zweiwertige Kationen (Mg, Ca) und Komplexon. Milieu: Mitochondrien  $M_1$  1 : 3 verdünnt in isotonischer Mannitlösung. pH = 6,7 (durch aus den Mitochondrien herausdiffundierende Metabolite genügend gepuffert). T = 20°.

- |  |  |
|--|--|
| 1. + Komplexon $10^{-3}$ -m.             | 4. + $\text{CaCl}_2 10^{-4}$ -m.         |
| 2. + $\text{MgSO}_4 4 \cdot 10^{-4}$ -m. | 5. + $\text{CaCl}_2 4 \cdot 10^{-4}$ -m. |
| 3. Kontrolle ohne weitere Zusätze.       |  |

Vor der Bestimmung jedes einzelnen Kurvenpunktes wird durch Mischen von je  $0,1 \text{ cm}^3$  1 : 3 verdünnter Mitochondriensuspension +  $9,9 \text{ cm}^3$  isot. Mannit die zur Photometrie geeignete Mitochondrienverdünnung hergestellt. Die Extinktion E ist dem Schwellungsgrad der Mitochondrien umgekehrt proportional.

scheinlich machen, erst durch den Isolierungsprozess an diese gebunden wird. Für eine optimale und langdauernde Stoffwechselaktivität isolierter Zellgranula ist es demnach wichtig, diese Calcium-Ionen zu binden. Sowohl mit Herzzellgranulä<sup>1)</sup> als auch mit Leberzellgranula (Fig. 3) lässt sich so die Oxydation von  $\alpha$ -Ketoglutarat durch Zusatz von Komplexon zum üblichen Ansatzmilieu wesentlich verlängern. Diese Versuche, die die Ergebnisse von *Slater & Cleland* ergänzen, zeigen also das ähnliche Verhalten von Zellgranula verschiedener Organe in bezug auf morphologische und funktionelle Veränderungen und ihre Beeinflussung durch Calcium und Komplexon.

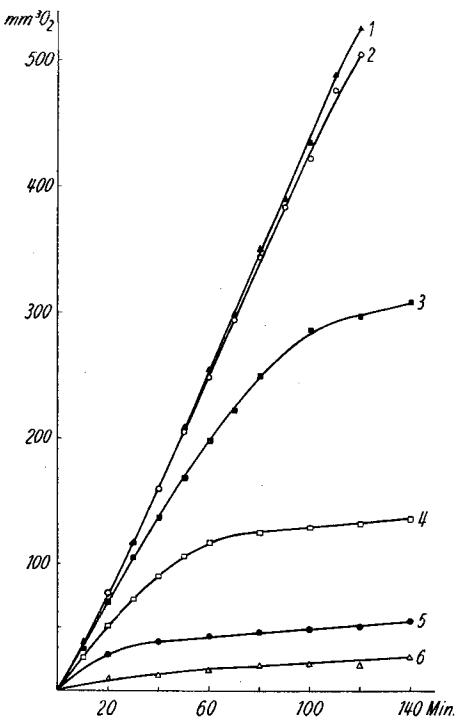


Fig. 3.

Der Effekt von Calcium und Komplexon auf den Sauerstoffverbrauch von Lebermitochondrien.

Substrat:  $\alpha$ -Ketoglutarat  $10^{-2}$ -m. Im üblichen Ansatzgemisch (s. Exper. Teil) sind zusätzlich enthalten:

1. ATP  $10^{-3}$ -m. + Komplexon  $10^{-3}$ -m.
2. ATP  $10^{-3}$ -m. + Komplexon  $10^{-3}$ -m. +  $\text{CaCl}_2 3 \cdot 10^{-5}$ -m.
3. ATP  $10^{-3}$ -m.
4. ATP  $10^{-3}$ -m. +  $\text{CaCl}_2 3 \cdot 10^{-5}$ -m.
5. ATP  $10^{-3}$ -m. +  $\text{CaCl}_2 10^{-4}$ -m.
6. Leerwert ohne Substrat.

Wenn nun, wie in der Einleitung ausgeführt wurde, eine entscheidende Funktion des dem Milieu zugefügten ATP darin besteht, das Calcium zu binden, so sollte ATP als Cofaktor isolierter Granula durch synthetische Komplexbildner ersetzbar sein. In der Tab. 1 sind die wichtigsten der geprüften Komplexbildner zusammengestellt worden. Die vier zuerst aufgeführten Säuren können ATP nicht ersetzen. Dagegen geht in Anwesenheit des Glykolkomplexons (Verbindung V in Tab. 1) die Oxydation von Malat oder Fumarat fast

<sup>1)</sup> E. C. Slater & W. K. Cleland, Biochem. J. 55, 566 (1953).

Tabelle 2.

Verbindungen (s. Tab. 1)	1 $pK_1$	2 $pK_2$	3 $pK_3$	4 $pK_4$	5 $\log K_{CaY}$	6 $\log K_{MgY}$	7 $\frac{[CaY]}{[Ca]}$
	$\left(K_1 = \frac{(H)(H_3Y)}{(H_4Y)}\right)$	$\left(K_2 = \frac{(H)(H_2Y)}{(H_3Y)}\right)$	$\left(K_3 = \frac{(H)(HY)}{(H_2Y)}\right)$	$\left(K_4 = \frac{(H)(HY)}{(HY)}\right)$	$\left(K_{CaY} = \frac{[CaY]}{[Ca](Y)}\right)$	$\left(K_{MgY} = \frac{[MgY]}{[Mg](Y)}\right)$	
I	2,0	2,7	6,16	10,26	10,59	8,69	$4,0 \cdot 10^1$
II	2,4	3,5	6,12	11,70	12,5	10,3	$7,9 \cdot 10^1$
III	3,05	5,15	8,99	10,54	9,45	4,31	$0,8 \cdot 10^1$
IV	2,0	2,25	5,57	10,76	7,18	6,28	$0,14 \cdot 10^1$
V	2,1	2,65	8,85	9,46	11,0	5,21	$4,8 \cdot 10^3$

Komplexchemische Daten der untersuchten Komplexbildner.

Kolonne 1—4: Säuredissiationskonstanten.

Kolonne 5—6: Komplexbildungskonstanten für Ca und Mg.

Kolonne 7: Die Calciumbindung unter den Milieubedingungen des Atmungsversuchs im *Warburg-Manometer*, d. h.  $[CaY]/[Ca]$  ist berechnet für den Fall, dass:  $pH = 7,0$ ,  $\Sigma Y = 10^{-3}$  m.,  $\Sigma Mg = 3 \cdot 10^{-3}$  m. und  $\Sigma Ca \ll \Sigma Y$ .

Die in der Tabelle aufgeführten Konstanten gelten streng nur für 20° und die Ionensstärke  $\mu = 0,10$ , während im Milieu des *Warburg-Ansatzes* die Temperatur 38° und die Ionensstärke  $\mu = ca. 0,07$  betragen. Die berechneten Quotienten  $[CaY]/[Ca]$  dürften dadurch aber kaum beeinflusst werden.

Weitere Daten der Komplexbildner der Tab. 2 sind zu finden bei *G. Schwarzenbach* u. Mitarb. für I<sup>1</sup>), für IV<sup>2</sup>), für II<sup>3</sup>), für III<sup>3</sup> und für V<sup>4</sup>).

<sup>1)</sup> *G. Schwarzenbach & H. Ackermann*, Helv. **30**, 1798 (1947).

<sup>2)</sup> *G. Schwarzenbach & H. Ackermann*, Helv. **32**, 1682 (1949).

<sup>3)</sup> *G. Schwarzenbach, H. Ackermann & P. Ruckstuhl*, Helv. **32**, 1175 (1949).

<sup>4)</sup> *H. Senn*, Diss. Universität Zürich 1954.

ebenso gut vor sich wie mit ATP (abgesehen von einer initialen Phase, in der ATP deutlich überlegen ist (Fig. 4). Pyruvat, Citrat, Ketoglutarat und Glutamat werden mit Glykolkomplexon zwar schlechter oxydiert als mit ATP, aber wesentlich besser als mit einem andern Komplexbildner oder ohne Komplexbildner überhaupt (Tab. 3).

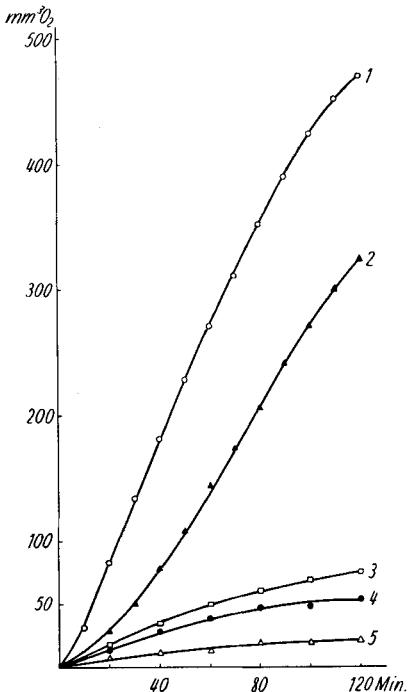


Fig. 4.

Tabelle 3.

Effekt verschiedener Komplexbildner auf den Sauerstoffverbrauch isolierter Lebermitochondrien.

Substrat	mit ATP	mit Glykolkomplexon	mit Komplexbildner	ohne Komplexbildner
Malat oder Fumarat . . .	471	325	76	54
Pyruvat . . . . .	556	258	106	101
Citrat . . . . .	686	296	292	178
α-Ketoglutarat . . . . .	514	197	62	31
Glutamat . . . . .	532	232	89	58

Die Zahlen geben den Sauerstoffverbrauch in  $\text{mm}^3$  in 120 Min. in Anwesenheit verschiedener Komplexbildner und Substrate wieder. Im üblichen Ansatzgemisch (s. exper. Teil) sind zusätzlich in  $10^{-3}$ -m. Konzentration ATP, Glykolkomplexon oder Komplexbildner und in  $10^{-2}$ -m. Konzentration die Na-Salze der Substrate enthalten. Die Versuche mit verschiedenen Substraten sind mit Mitochondrien verschiedener Tiere gemacht worden, so dass die Zahlen der Tabelle streng nur in horizontaler Richtung zu vergleichen sind.

Anhand des Beispiels der Citratoxydation sei gezeigt, dass immer auch die Komplexbildungseigenschaften der andern Komponenten des Milieus, insbesondere auch der Substrate, zu berücksichtigen sind. Die Oxydation von Citrat in einem Milieu, das nur  $Mg^{2+}$  und Phosphatpuffer enthält, ist wesentlich besser als diejenige der andern Glieder des Zitronensäurezyklus (Malat, Ketoglutarat, usw.) unter den gleichen Ansatzbedingungen (Fig. 5). Dies beruht sehr wahrscheinlich auf der beträchtlichen Bindung von Calcium durch Citrat (Komplexbildungskonstante  $K = 10^3$ .<sup>2</sup>).

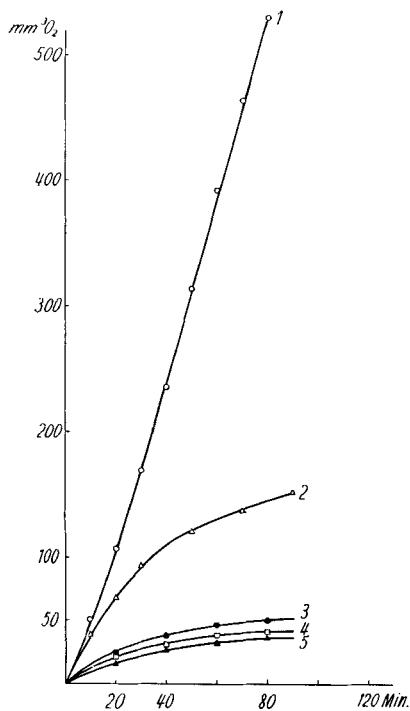


Fig. 5.

Der Sauerstoffverbrauch von Lebermitochondrien mit verschiedenen Substraten ohne Komplexbildner.

Im üblichen Ansatzgemisch (s. Exper. Teil) sind zusätzlich enthalten:

1. Citrat  $10^{-2}$ -m. + ATP  $10^{-3}$ -m.
2. Citrat  $10^{-2}$ -m.
3. Malat  $10^{-2}$ -m.
4. Pyruvat  $10^{-2}$ -m.
5.  $\alpha$ -Ketoglutarat  $10^{-2}$ -m.

### Diskussion.

Seit der grundlegenden Arbeit von *F. Lipmann*<sup>1)</sup> werden ATP-Effekte in der Biochemie in der Regel auf die sog. „energiereichen Phosphatbindungen“ zurückgeführt. Die komplexchemischen Aspekte des ATP dagegen sind nur von vereinzelten Forschern für spezielle Fragen berücksichtigt worden<sup>2)3)4)</sup>. Die Notwendigkeit, isolierten Zellgranula ATP (oder AMP, das rasch zu ATP phosphoryliert wird)

<sup>1)</sup> *F. Lipmann*, Adv. in Enzymol. **1**, 99 (1941).

<sup>2)</sup> *I. Mandl, A. Grauer & C. Neuberg*, Biochim. biophys. Acta **8**, 654 (1952).

<sup>3)</sup> *V. Distefano & W. F. Neuman*, J. biol. Chemistry **200**, 759 (1953).

<sup>4)</sup> *H. G. Hers*, Biochim. biophys. Acta **8**, 424 (1952).

als Cofaktor zuzugeben, ist allgemein anerkannt. Eine Erklärung für diese Notwendigkeit konnte aber bisher nicht gegeben werden. Ein Fortschritt war die Erkenntnis, dass ATP strukturelle Veränderungen von Zellgranula wie Schwellung und die damit verbundene Abnahme der Stoffwechselaktivität verzögert<sup>1)</sup><sup>2)</sup><sup>3)</sup>). Nachdem *Slater & Cleland* gezeigt haben, dass der Zusatz von Komplexon zum üblichen, ATP-enthaltenden Ansatzmilieu die Struktur und den Stoffwechsel von Herzzellgranula stabilisiert, ist es naheliegend, für den Komplexon- und ATP-Effekt eine gemeinsame komplexchemische Ursache anzunehmen. *Cleland & Slater*<sup>3)</sup> dagegen suchen die Ursache für den ATP-Effekt im „energiereichen Phosphat“: „Both the spontaneous transformation (entspricht der nichtosmotischen Schwellung) and the enzymic inactivation are greatly slowed by versene (= Komplexon), ATP or ADP. It seems likely, that a common factor, possibly the level of some energy-rich phosphorus compound in the sarcosome, determines the onset of both morphological and biochemical changes.“

Aus einer Reihe von synthetischen Komplexbildnern vom Typus des Komplexons ist einer, das Glykolkomplexon (s. Tab. 1), gefunden worden, der imstande ist, ATP als Cofaktor der Mitochondrienatmung zu ersetzen, bei der Oxydation von Malat und Fumarat praktisch vollwertig, bei der Oxydation von Pyruvat, Ketoglutarat, Citrat und Glutamat partiell. Dies weist eindeutig auf die Wichtigkeit der Komplexbildung von ATP hin, denn als Energiespender ist das Glykolkomplexon zweifellos untauglich.

Isolierte Lebermitochondrien sind wegen der an sie gebundenen Calcium-Ionen instabil. Als Cofaktor wird somit ein Komplexbildner benötigt, der Calcium bindet und im übrigen das Stoffwechselgeschehen nicht stört. Am besten werden diese Forderungen vom ATP erfüllt. Von den synthetischen Komplexbildnern kommt das Glykolkomplexon dem ATP am nächsten. Dies hängt möglicherweise mit den besonderen komplexchemischen Eigenschaften dieses Stoffes zusammen. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, zeichnet sich das Glykolderivat durch eine sehr grosse Bindung von Calcium und eine nur geringe Bindung von Magnesium aus. Bei pH = 7 ist praktisch überhaupt keine Bindung von Magnesium vorhanden. Es lässt sich errechnen, dass im Mg-reichen Milieu, in dem der O-Verbrauch der Mitochondrien gemessen wird, das Calcium am stärksten durch Glykolkomplexon gebunden wird (s. letzte Rubrik (CaY)/(Ca) in Tab. 2). Erst durch das Auffinden anderer Komplexbildner, die im Atmungsversuch ebenso wirksam oder wirksamer als das Glykolkomplexon sind, wird sich jedoch herausstellen, ob und wie weit neben der Komplexbildung für Calcium andere Faktoren eine Rolle spielen.

<sup>1)</sup> *J. Raaflaub*, Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 142, 157 (1953).

<sup>2)</sup> *O. Brenner-Holzach & J. Raaflaub*, Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, 243 (1954).

<sup>3)</sup> *K. W. Cleland & E. C. Slater*, Quart. J. of microscop. Sci. **94**, 329 (1953).

Es sei festgehalten, dass aus den Versuchen keinesfalls geschlossen werden soll, die Atmung der Mitochondrien sei ATP-unabhängig. Funktionstüchtige Mitochondrien enthalten ja intragranulär fixiert pro mg N etwa 0,1 Mikromol Adenosinphosphate<sup>1)</sup>. Die Zugabe von ATP zum Milieu jedoch wird in Anwesenheit von Glykolkomplexon weitgehend überflüssig.

Unsere Versuche zeigen, dass es ATP-Wirkungen gibt, bei denen ATP nicht als Donator von „energiereichem Phosphat“ sondern als Komplexbildner wirkt. Dass dies kein Ausnahmefall ist, soll bei anderer Gelegenheit näher ausgeführt werden. Von einem tieferen Verständnis der mannigfachen Wirkungsweise des ATP, dieses für die meisten biochemischen und physiologischen Prozesse wichtigen Stoffes, ist man noch weit entfernt. Sicher ist, dass bisher allzu einseitig nur die energetischen Aspekte des ATP berücksichtigt wurden. Dies geht schon daraus hervor, dass die Komplexbildungskonstanten von ATP mit Erdalkali-Ionen und anderen Kationen nur unvollständig bekannt sind. Für den Ca-ATP-Komplex geben *Distefano & Neuman* die Dissoziationskonstante =  $8,7 \cdot 10^{-5}$  an<sup>2)</sup>. *Spicer* schliesst aus Verschiebungen der Elektrotitrationenkurven von ATP in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  auf eine beträchtliche Komplexbildung, ohne quantitative Daten zu geben<sup>3)</sup>. Neueste Messungen von *Melchior* ergeben, dass auch  $K^+$  und  $Na^+$  an ATP schwach gebunden werden<sup>4)</sup>. Eine gründliche Bearbeitung der Komplexchemie der biochemisch wichtigen Polyphosphate steht aber noch aus.

### Experimenteller Teil.

Chemikalien.  $K_2$ -ATP: *Pabst Lab.*, Milwaukee, Wisc.  $Na_2$ -Äthylendiamin-tetraacetat: *AG. vorm. B. Siegfried*, Zofingen. 1,2-Diaminocyclohexan-tetraacetat: *J. R. Geigy AG.*, Basel. Die andern synthetischen Komplexbildner (Verbindungen III–V der Tab. 1) wurden uns von Herrn Prof. *G. Schwarzenbach*, Chem. Institut der Universität, Zürich, zur Verfügung gestellt.

Versuchstiere. Weisse Ratten, jeweils 16–24 Std. vor Versuchsbeginn auf Hunger gesetzt.

Darstellung der Mitochondrien. Die Lebermitochondrien sind nach einem früher publizierten Verfahren isoliert worden<sup>5)</sup>. Die in dieser Weise erhaltene konzentrierte Stammssuspension in isotonischem Mannit (0,3-m.) sei  $M_1$ .

Messung der Schwellung der Mitochondrien. Das angewandte photometrische Verfahren ist früher beschrieben worden<sup>5)</sup>. Die Messung geschieht in 200 bis 300fach verdünnter Suspension. Die Abnahme der Extinktion – bzw. die Abnahme des Streulichtefekts – bedeutet Schwellung der Mitochondrien.

Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs. Diese erfolgt in der üblichen Weise manometrisch nach der Methode von *Warburg* bei 38° mit Luft im Gasraum. Das Milieu enthält (Angaben in Endkonzentration in 3 cm<sup>3</sup> Versuchsansatz): K-Phosphat 0,008-m.,  $MgSO_4$  0,003-m., Mannit 0,18–0,24-m., Mitochondrien  $M_1$  1:10 verdünnt. pH des

<sup>1)</sup> *O. Brenner-Holzach & J. Raaflaub*, Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, 243 (1954).

<sup>2)</sup> *V. Distefano & W. F. Neuman*, J. biol. Chemistry **200**, 759 (1953).

<sup>3)</sup> *S. S. Spicer*, J. biol. Chemistry **199**, 301 (1952).

<sup>4)</sup> *N. C. Melchior*, J. biol. Chemistry **208**, 615 (1954).

<sup>5)</sup> *J. Raaflaub*, Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, 142, 157 (1953).

Gemisches: 7,1. Die Konzentrationen zusätzlicher Ansatzbestandteile (Substrate, Komplexbildner) sind in den Legenden der Abbildungen angegeben. Die komplexbildenden Säuren sind vor Zugabe zum Milieu auf ein pH von 7,0 neutralisiert worden. Wenn bei pH 7 eine Komplexbildung mit Mg-Ionen des Milieus eintritt, verschiebt sich das pH nach sauer. Solange die Konzentration des Komplexbildners wesentlich unter derjenigen des Phosphatpuffers liegt, braucht diese pH-Verschiebung aber nicht weiter berücksichtigt zu werden, da geringe pH-Variationen keinen Einfluss auf den O-Verbrauch der Mitochondrien haben.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

Herrn Prof. *F. Leuthardt* und Herrn Prof. *G. Schwarzenbach* möchte ich auch an dieser Stelle für die mir gewährte Unterstützung sowie für wertvolle Anregungen und Kritik meinen besten Dank aussprechen. Frl. *I. Leupin* danke ich für die sorgfältige Durchführung eines Grossteils der Versuche.

#### SUMMARY.

Ethylenediaminetetra-aceticacid and other chelating agents of the same type inhibit the swelling of liver mitochondria and enhance their oxygen consumption. This is probably due to complex formation of the Calcium ions.

In the presence of one of the five chelating agents tested (Glykolkomplexon, s. Tab. 1) respiration of mitochondria proceeds fairly well without the addition of ATP. This suggests that ATP, as a co-factor of isolated mitochondria, acts as a complexing agent.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Zürich.

---

## 6. Über neue, leistungsfähige Laboratoriums-Zentrifugen<sup>1)</sup>.

1. Mitteilung

von E. Wiedemann.

(30. IX. 54.)

Die Wirksamkeit oder Leistungsfähigkeit einer Zentrifuge wird durch den höchsten damit erreichbaren Schwerewert definiert, der zumeist im entsprechenden Multiplum der Erdschwere  $g$  ausgedrückt wird. Dieser  $g$ -Wert ist proportional dem Produkt aus dem wirksamen Radius  $r$  (Abstand der Probe vom Rotationszentrum) und dem Quadrat der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  (die in direkter Relation zur Umlaufgeschwindigkeit steht):

$$g \sim r \times \omega^2.$$

---

<sup>1)</sup> Teilweiser Auszug aus zwei Vorträgen des Verfassers, gehalten am 22. Juni 1954 vor der Gesellschaft deutscher Chemiker, Ortsgruppe Darmstadt, und am 24. Juni 1954 vor der Physikalisch-medizinischen Gesellschaft Würzburg.