

Die Oxalessigsäurebildung in Lebermitochondrien und ihr Einfluß auf die Succinatoxydation bei Zusatz von Äthylendiamin-tetraessigsäure

Von

Wolfgang Kunz, Fritz Müller und Erich Strack

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig

(Der Schriftleitung zugegangen am 10. März 1960)

Äthylendiamin-tetraessigsäure (= EDTA) setzt die spontane Succinatoxydation isolierter Rattenlebermitochondrien herab. Tyler¹ führte diesen Effekt auf vermehrte Oxalessigsäure-(OAA-)Bildung zurück, während wir in früheren Untersuchungen² angehäufter OAA nur einen Teil der EDTA-Wirkung zuschrieben. Im gleichen Sinne wie Tyler deuteten auch Swingle, Axelrod und Elvehjem³ ihre Befunde: Die Succinatoxydation wird durch die intermediär anfallende OAA gehemmt, und Ca^{2+} -Ionen beschleunigen sie, weil diese die OAA-Bildung beeinträchtigen.

Um nun den Einfluß des Metaboliten OAA auf die Succinatoxydation unter EDTA zu studieren, bestimmten wir die Bildung von OAA unter Hydrazinzusatz und verglichen mit ihr unter den gleichen Bedingungen die Geschwindigkeit der Succinatoxydation. Atmungsversuche, bei denen wir an Stelle von Hydrazin L-Glutamat zur Beseitigung der anfallenden OAA einsetzten, dienten als weitere Kontrolle.

Material und Methode

Mitochondrien aus Lebern von Albinoratten präparierten wir in 0,25 *m* Saccharose ohne EDTA-Zusatz, wie früher beschrieben wurde².

Photometrische OAA-Bestimmung nach Straub⁴: Die Versuchsansätze wurden in Erlenmeyerkölbchen mit einem Fassungsvermögen von 50 ml unter Luftzutritt 15 oder 30 Min. bei 38° inkubiert. Jeder Ansatz bestand aus 1,5 ml Mitochondriensuspension (etwa 0,2 g% N), 2,1 ml Kaliumphosphatpuffer, p_{H} 7,4 und 1,2 ml Dinatriumsuccinatlösung, die 0,485 mg Hydrazin-dihydrochlorid enthielt. Nach 5 Min. Inkubationsdauer wurde jedem Kölbchen nochmals 0,6 ml einer Hydrazin-dihydrochlorid-Lösung (0,606 mg) zugesetzt. Die Endkonzentrationen betrugen für das Substrat $1,12 \cdot 10^{-2}$ *m*, für den Phosphatpuffer $1,7 \cdot 10^{-2}$ *m*, für EDTA

¹ D. B. Tyler, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 88, 333 [1955]; D. B. Tyler, J. biol. Chemistry 216, 395 [1955].

² W. Kunz, W. Friedel, F. Müller, Pham van Sô u. E. Strack, diese Z. 310, 265 [1958].

³ K. F. Swingle, A. E. Axelrod u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry 145, 581 [1942].

⁴ F. B. Straub, diese Z. 244, 117 [1936].

als Dinatriumsalz (soweit dem Puffer zugegeben) bei N-Werten $< 0,2 \text{ g\%}$ $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, bei höherem N-Gehalt $5,6 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ und für Hydrazin $2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$. Durch Zugabe von 1 ml 10proz. Schwefelsäure und 1 ml 10proz. Na_2WO_4 wurde die Reaktion nach der angegebenen Versuchsdauer abgestoppt. Das gefällte Eiweiß zentrifugierten wir in der Kühlzentrifuge ab.

Zu 2 ml des klaren Überstehenden wurden 0,2 ml einer frisch zubereiteten gesättigten NaNO_2 -Lösung pipettiert, umgeschüttelt und 5 Min. danach 2 ml konz. Kalilauge zugesetzt. Der ausfallende Niederschlag wurde erneut abzentrifugiert, und die Extinktion des gelblich gefärbten, klaren Überstehenden im Zeiß-Universal-Spektrophotometer bei $430 \text{ m}\mu$, $d = 1 \text{ cm}$, gemessen. Unter entsprechenden Bedingungen wurde mit OAA (Schuchardt), die wir papierchromatographisch auf ihren Brenztraubensäuregehalt untersuchten, eine Eichkurve ermittelt. Photometrisch noch gut faßbar war auf diese Weise eine OAA-Konzentration von $6 \cdot 10^{-5} \text{ m}$.

Die Atmungsversuche führten wir nach der Warburg-Methode durch. Den Einfluß des zweizeitigen Hydrazinzusatzes auf die Atmungsgeschwindigkeit untersuchten wir mit doppelnasigen Kölbehen. Entsprechend unserer früheren Versuchsanordnung² setzten wir im Hauptraum 0,5 ml Mitochondriensuspension (etwa 0,2 g% N) und 0,7 ml Phosphatpuffer pH 7,4 mit den jeweils angegebenen Zusätzen (EDTA, Hydrazin) und in dem einen Seitenarm 0,4 ml Succinatlösung als Substrat ein. Die zweite Hydrazinmenge von 0,4 ml wurde durch Einkippen aus dem zweiten Seitenarm nach 5 Min. Versuchsdauer zugesetzt. Die Endkonzentrationen entsprachen den oben genannten. Inkubiert wurde bei 38° mit O_2 als Gasphase. Nach 5, 10, 30, 60 und 90 Min. Versuchsdauer wurde abgelesen. Die Vorbereitungszeiten betrugen für die O_2 -Begasung 2 Min. und für das Temperieren 4 Min. Sie wurden auch auf die Gefahr größerer Schwankungen im ersten Ableseintervall hin so kurz gewählt, um den DPN-Verlust vor dem Start möglichst klein zu halten.

Die Atmungsgeschwindigkeit unter Glutaminsäurezusatz wurde in Kölbehen mit einem Seitenarm gemessen. Das Endvolumen betrug darin 1,6 ml, die Endkonzentrationen entsprachen den oben beschriebenen. Konzentration und Art der Zugabe der mit Kalilauge neutralisierten L-Glutaminsäure (Schuchardt) sind in der Legende und im Text angegeben.

Ergebnisse

Bereits Swingle, Axelrod und Elvehjem³ wiesen darauf hin, daß metabolisch entstehende OAA schwierig quantitativ zu erfassen ist. Versuche dieser Art wurden mit wechselndem Erfolg durchgeführt^{1, 5, 6}. Ihre Ergebnisse sind wegen der geringen Stabilität der OAA mit großen Fehlern behaftet. Dies trifft besonders für alle jene Anordnungen zu, bei denen man die Anhäufung dieser β -Ketosäure nach einer bestimmten Versuchsdauer ohne besondere Schutzvorkehrungen mißt. Unsere Versuche mit der manometrischen Methode nach Krebs und Eggleston⁷ und mit der kolorimetrischen Bestimmung der OAA nach papierchromatographischer Auftrennung⁸ verliefen daher auch wenig befriedigend. Bessere Resultate erzielten wir, als wir nach dem Verfahren von Banga⁹ unseren Ansätzen neutralisiertes Hydrazin-hydrochlorid zusetzten, um-

⁵ D. V. Cohn, J. biol. Chemistry **233**, 299 [1958].

⁶ W. Keller u. L. Denz, diese Z. **314**, 153 [1959].

⁷ H. A. Krebs u. L. V. Eggleston, Biochem. J. **39**, 408 [1945]; **42**, 294 [1948].

⁸ D. Cavallini u. N. Frontali, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **13**, 439 [1954].

⁹ J. Banga, diese Z. **244**, 130 [1936].

die aus dem Malat entstehende OAA abzufangen. Das Hydrazon der OAA läßt sich nach Straub⁴ quantitativ in die 4-Nitroso-pyrazolon-carbonsäure-(3) überführen, deren lebhaft gefärbtes Kaliumsalz sich ausgezeichnet photometrisch bestimmen läßt. Durch die von uns eingesetzten EDTA-Konzentrationen wurden die photometrischen Meßergebnisse nicht beeinträchtigt.

Hydrazin hemmt bekanntlich die Atmung in höheren Konzentrationen deutlich. Wir setzten es daher vorsichtshalber in zwei Portionen zu. Die Konzentration betrug beim Start $1 \cdot 10^{-3} m$. Nach 5 Min. Versuchsdauer wurde die zweite Portion hinzugekippt, denn schon nach diesem kurzen Intervall müßte ein nicht unbeträchtlicher Teil des Hydrazins gebunden worden sein, wenn die von Anfang an deutliche Hemmung der Succinatoxydation nur durch OAA-Anhäufung bedingt wäre.

In einer ersten Versuchsreihe prüften wir die OAA-Bildung in Parallelansätzen mit und ohne EDTA nach insgesamt 15 Min., in einer zweiten nach 30 Min. Inkubationsdauer. Dazu führten wir eine große Anzahl von OAA-Bestimmungen in 21 Serien unter verschiedenen Bedingungen durch, die jedoch immer das gleiche aussagten: Nach 15 Min. Versuchsdauer ließen sich keine signifikanten Unterschiede auffinden, nach 30 Min. kam stets eine Erhöhung der OAA-Werte in den EDTA-haltigen Ansätzen um etwa 100% heraus. Die Ergebnisse mit der im methodischen Teil angegebenen Anordnung gibt die Tab. 1 wieder.

Tab. 1. OAA-Anhäufung bei der Succinatoxydation (μ Mol OAA pro mg Mitochondrien-N; Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von je 4 Ansätzen nach 30 Min. Inkubationsdauer).

	Ohne EDTA-Zusatz	Mit EDTA-Zusatz
1	$0,11 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,00$
2	$0,10 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,01$
3	$0,12 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,00$
4	$0,11 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$

Nach dieser Beobachtung schien es interessant, unter entsprechenden Bedingungen die Succinatoxydation manometrisch zu verfolgen. Es sollte geklärt werden, ob die eingesetzte Hydrazinmenge die Atmungsgeschwindigkeit schon wesentlich beeinträchtigt und inwieweit sie die EDTA-Wirkung beeinflußt. Vorversuche ergaben, daß $2,8 \cdot 10^{-4} m$ EDTA bei höheren Mitochondrienkonzentrationen ($N > 0,2 g\%$) nicht ausreicht, um die Succinatoxydation in der gewohnten Weise zu hemmen. In diesen Ansätzen war mit Eriochromschwarz T als Indikator keine überschüssige EDTA mehr nachweisbar. Erhöhung der EDTA-Konzentration führte wieder zu der bekannten Verminderung der Atmungsgeschwindigkeit, die jedoch nicht unter das früher² bereits beschriebene Minimum absank.

Um auch bei größeren Mitochondrienkonzentrationen die volle EDTA-Wirkung zu erzielen, verdoppelten wir die Konzentration des Komplexbildners gegenüber der früheren Anordnung.

Die Geschwindigkeit der Succinatoxydation ohne EDTA-Zusatz ist so groß, daß sich bereits nach 40 Min. Versuchsdauer ein Substratmangel bemerkbar macht. Ein relativ unverfälschtes Bild ergeben daher nur die Werte der ersten 30 Versuchsminuten.

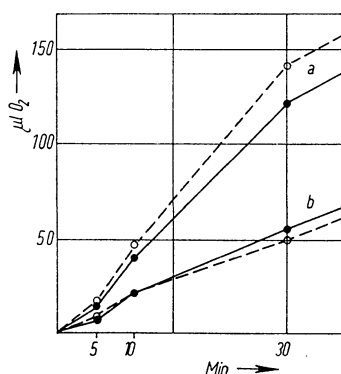


Abb. 1. Einfluß von $2 \cdot 10^{-3} m$ Hydrazin auf die Succinatoxydation und in Gegenwart von EDTA. Die angegebenen Zahlen ($\mu l O_2$) sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von je 8 Versuchen. $\% I =$ Hemmung in Prozent. Zum Versuchsbeginn Hydrazin: $1 \cdot 10^{-3} m$, nach 5 Min. auf $2 \cdot 10^{-3} m$ erhöht.

Kurven a: ohne EDTA

Kurven b: mit EDTA

○ — ○ — ○ — ○: ohne Hydrazin

● — ● — ● — ●: mit Hydrazin

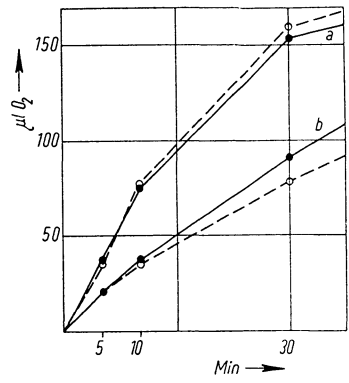
Min.	○ — ○ — ○ — ○		% I	● — ● — ● — ●		% I
	$a \pm s_{\bar{x}}$	$b \pm s_{\bar{x}}$		$a \pm s_{\bar{x}}$	$b \pm s_{\bar{x}}$	
5	$16,2 \pm 2,6$	$8,4 \pm 2,8$	48,0	$15,8 \pm 3,3$	$7,7 \pm 2,8$	51,3
10	$45,4 \pm 5,1$	$20,4 \pm 5,8$	55,2	$41,3 \pm 2,8$	$20,6 \pm 4,0$	50,2
30	$140,7 \pm 5,9$	$51,5 \pm 6,4$	63,4	$119,0 \pm 4,1$	$54,0 \pm 6,8$	54,7

In Abb. 1 sind die Atmungszuwachskurven und Zahlenwerte dieser Serie dargestellt. Man sieht, daß die eingesetzte Hydrazinmenge die spontane Succinatoxydation im 30-Min.-Wert um etwa 15% vermindert. Diese Hemmwirkung wird bei den Werten mit EDTA nicht deutlich. Hier ist der Sauerstoffverbrauch bei Ansätzen mit Hydrazin im 30-Min.-Wert sogar etwas größer als bei den Ansätzen ohne das Ketoreagenz. Vergleicht man die Kurven ohne Hydrazin mit denen mit Hydrazin, so sieht man, daß die Hemmung der Succinatoxydation, die durch EDTA bedingt ist, durch Hydrazin tatsächlich zu einem kleinen Teil beseitigt wird. Diese Wirkung bahnt sich im 10-Min.-Wert bereits an und wird eindeutig nach 30 Min. Das entspricht durchaus den photometrisch gewonnenen Ergebnissen. Nun ist Hydrazin ein unphysiologischer Stoff, und es ließ sich wegen seiner toxischen Wirkung nicht prüfen, ob höhere Konzentrationen den EDTA-Effekt noch weiter aufheben.

Besser geeignet schien ein physiologischer Weg, die sich vermehrt bildende OAA über die L-Asparaginsäure- α -Ketoglutarat-Transaminase zu beseitigen. Wir führten daher eine Reihe von Versuchen durch, bei denen wir nach dem Temperieren aus dem Seitenarm des Warburg-Kölbehens Succinat und L-Glutamat gemeinsam einkippten, so daß die Endkonzentration für jedes Substrat $1,12 \cdot 10^{-2}$ betrug.

Abb. 2. Einfluß von $1,12 \cdot 10^{-2} m$ Glutamat (mit dem Substrat zugesetzt) auf die Succinatoxydation und in Gegenwart von EDTA. Die angegebenen Zahlen ($\mu l O_2$) sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von je 8 Versuchen. $\% I$ = Hemmung in Prozent.

Kurven a: ohne EDTA
 Kurven b: mit EDTA
 o — o — o: ohne Glutamat
 • — • — •: mit Glutamat

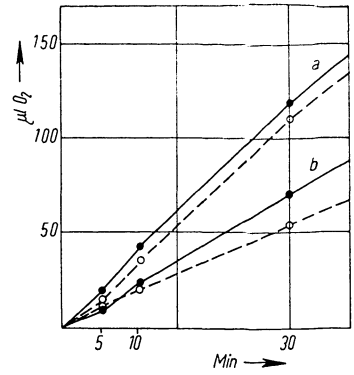


Min.	o — o — o		$\% I$	• — • — •		$\% I$
	$a \pm s_{\bar{x}}$	$b \pm s_{\bar{x}}$		$a \pm s_{\bar{x}}$	$b \pm s_{\bar{x}}$	
5	$35,3 \pm 2,1$	$20,2 \pm 2,7$	42,8	$37,4 \pm 3,1$	$20,9 \pm 2,5$	44,0
10	$76,1 \pm 6,9$	$36,5 \pm 1,9$	52,2	$75,5 \pm 6,0$	$38,7 \pm 2,1$	48,7
30	$159,8 \pm 9,2$	$78,3 \pm 3,6$	51,0	$154,9 \pm 7,4$	$90,9 \pm 6,1$	41,3

Die Ergebnisse gibt Abb. 2 wieder. Während die Werte ohne EDTA durch das Glutamat kaum verändert werden, erhöht dieses den Sauerstoffverbrauch während 30 Min. in Gegenwart von EDTA um etwa 10%. Setzt man die doppelte Glutamatmenge ein, so wird diese Wirkung etwa um 1% deutlicher (16 Bestimmungen). Eine Glutamat-Konzentration von $5,6 \cdot 10^{-2} m$ bei gleichbleibender Succinatmenge (Abb. 3)

Abb. 3. Einfluß von $5,6 \cdot 10^{-2} m$ Glutamat (mit dem Substrat zugesetzt) auf die Succinatoxydation und in Gegenwart von EDTA. Die angegebenen Zahlen ($\mu l O_2$) sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von je 4 Versuchen. $\% I$ = Hemmung in Prozent.

Kurven a: ohne EDTA
 Kurven b: mit EDTA
 o — o — o: ohne Glutamat
 • — • — •: mit Glutamat



Min.	o — o — o		$\% I$	• — • — •		$\% I$
	$a \pm s_{\bar{x}}$	$b \pm s_{\bar{x}}$		$a \pm s_{\bar{x}}$	$b \pm s_{\bar{x}}$	
5	$17,5 \pm 2,1$	$12,5 \pm 1,7$	28,5	$19,3 \pm 1,6$	$10,5 \pm 2,1$	45,5
10	$36,6 \pm 3,2$	$20,7 \pm 0,5$	43,5	$43,5 \pm 3,3$	$22,5 \pm 2,2$	48,3
30	$111,3 \pm 4,6$	$53,3 \pm 2,9$	52,0	$117,8 \pm 4,4$	$71,0 \pm 2,5$	39,8

hebt jedoch die EDTA-Wirkung nicht weiter auf. Dafür sind aber die Atmungswerte ohne EDTA durch den Glutamatzusatz etwas größer geworden. Dieser Zuwachs muß auf die Oxydation von Glutamat zurückgeführt werden, die DPN-abhängig ist.

Um zu untersuchen, ob sich schon vor der Succinatzugabe aus Substraten, die den Mitochondrien noch anhaften, etwa OAA anhäuft, die die Succinatdehydrogenase hemmt, setzten wir schließlich Glutamat bereits dem Puffer zu. In die so vorbereiteten und gekühlten Gefäße wurde dann die Mitochondriensuspension einpipettiert. Die Endkonzentration für Glutamat betrug auch hier $5,6 \cdot 10^{-2} m$. Die Ergebnisse dieser Reihe stimmen mit den Befunden, die in der vorangegangenen Abbildung dargestellt sind, praktisch überein (8 Bestimmungen). Eine Anhäufung von OAA aus endogenem Substrat ist daher unwahrscheinlich.

Diskussion

Zweifellos vermag EDTA das mitochondrieneigene DPN zu stabilisieren, wie andere Untersucher^{1, 10} es schon wiederholt beschrieben haben. Folglich wird aus Succinat über Fumarat und Malat vermehrt OAA gebildet, wie aus unseren Versuchen ebenfalls hervorgeht. Aber auch wenn man die intermediär entstehende OAA während des Versuches abfängt, erreicht man nicht die Atmungsgeschwindigkeit wie im System ohne EDTA. Weder das Hydrazin noch größere Glutamatzusätze, bei welchen anfallende OAA durch das mitochondrieneigene Ferment zu Asparaginsäure und α -Ketoglutaräure transaminiert wird, heben die Hemmung der Succinatoxydation durch EDTA auf. In beiden Fällen wird die Succinatoxydation unter EDTA nur um etwa 10% beschleunigt. Zudem ist der EDTA-Einfluß schon in den 5- und 10-Min.-Werten deutlich ausgeprägt, während Hydrazin bzw. Glutamat erst 10 Min. nach Versuchsbeginn sichtbar wirkt. Unwahrscheinlich ist auch, daß noch aus der Leber stammendes Substrat während der Vorbereitungsphase von den Mitochondrien oxydiert wird und dabei vielleicht OAA entsteht, die das Ferment hemmt. Vor dieser Zeit zugesetztes Glutamat beeinträchtigt die EDTA-Wirkung nämlich nicht. Unsere photometrischen Bestimmungen der OAA und die Atmungsversuche mit $5,6 \cdot 10^{-2} m$ Glutamat lassen erkennen, daß auch im System ohne Stabilisator noch funktionsfähiges DPN vorhanden sein muß, denn sonst dürfte weder OAA gebildet noch Glutamat oxydiert werden. EDTA verlangsamt die Succinatoxydation nicht nur, indem es die OAA-Bildung vermehrt, sondern es müssen noch weitere Ursachen bestehen.

Succinat vermag sich ähnlich anderen Stoffen bereits bei 0° in den Mitochondrien anzureichern¹¹. Ob es sich bei diesem Befund um eine echte Permeation oder mehr um adsorptive Vorgänge handelt, sei dahin-

¹⁰ R. L. Lester, Y. Hatefi u. E. Welch, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **29**, 103 [1958].

¹¹ J. E. Amoore, *Biochem. J.* **70**, 718 [1958].

gestellt. Weiterhin beobachteten Lipsett und Corwin¹² mit $3,3 \cdot 10^{-3} m$ Succinat keine Mitochondrienschwellung im Tris-Saccharose-Medium mit PO_4^{3-} und Mg^{2+} -Zusatz, sie fanden sie aber, wenn die Succinatkonzentration auf $2 \cdot 10^{-2}$ erhöht wird. Demnach könnte das große Substratangebot und die daraus folgende Substratanhäufung am Wirkungs-ort zur Mitochondrienschwellung führen und die Funktion ändern. Frühere Versuchsergebnisse von uns machen es wahrscheinlich, daß die intakte Mitochondrienmembran unter physiologischen Bedingungen die Substrataufnahme beschränkt. Durch Zerstören der Zelle wird bei der Präparation auch die biologische Funktionseinheit gestört, und durch Art und Konzentration der Zusätze zur Inkubationsflüssigkeit werden wahrscheinlich die kolloidchemischen Eigenschaften der Mitochondrienmembran, ihre Ladung und damit ihre Oberflächenaktivität verändert. Unter der Vielzahl der Einfluß nehmenden Stoffe stört das beim Homogenisieren freigesetzte Ca^{2+} besonders stark¹³. EDTA bindet aber die störenden Metallionen und verhindert weitgehend einen vorzeitigen DPN-Verlust sowie eine unphysiologisch schnelle Substratoxydation. Die von einigen Autoren¹⁴⁻¹⁶ für den EDTA-Effekt immer wieder diskutierte direkte Bindung von EDTA an die Mitochondrien ließ sich experimentell ausschließen. Hierüber wird an anderer Stelle berichtet werden.

Zusammenfassung

1. Durch Inkubation von intakten Mitochondrien mit Succinat unter Sauerstoff und in Gegenwart von EDTA werden frühere Befunde bestätigt, wonach EDTA zu einer vermehrten Bildung von Oxallessigsäure (OAA) führt, während die spontane Succinatoxydation gehemmt wird.

2. Wird die in Gegenwart von EDTA gebildete OAA entweder durch Hydrazin oder durch L-Glutamat abgefangen, so nimmt die spontane Succinat-Oxydation in beiden Fällen nur um 10% zu.

3. Daraus wird geschlossen, daß die durch EDTA herabgesetzte Succinatoxydation nur zu einem kleinen Teil auf eine OAA-Anhäufung zurückzuführen ist.

Summary

1. Results from the incubation of intact mitochondria with succinate, under oxygen in the presence of EDTA, have confirmed previous findings, that EDTA causes an increase in oxaloacetic acid (OAA) formation, whereas the spontaneous oxidation of succinate is inhibited.

¹² M. N. Lipsett u. L. M. Corwin, J. biol. Chemistry **234**, 2448 [1959].

¹³ E. C. Slater u. K. W. Cleland, Biochem. J. **55**, 566 [1953].

¹⁴ F. E. Hunter jr., J. Davis u. L. Carlat, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **20**, 237 [1956].

¹⁵ F. E. Hunter jr., R. Malison, W. F. Bridgers, B. Schutz u. A. Atchison, J. biol. Chemistry **234**, 693 [1959].

¹⁶ R. W. v. Korff u. R. M. Twedt, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **23**, 143 [1957].

2. If the OAA formed in the presence of EDTA is trapped with L-glutamate or hydrazine, the spontaneous oxidation of succinate only increases by 10%.

3. It is concluded, that the accumulation of OAA is responsible, only to a small extent, for the inhibition of succinate oxidation.

Prof. Dr. Dr. E. Strack, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Leipzig, Leipzig C1, Liebigstraße 16.
