

Über den Mechanismus der Hauptatmung des Taubenbrustmuskels.*)

Von

B. Gözsy und A. Szent-Györgyi.

(Aus dem Institut für Medizinische Chemie, Universität Szeged, Ungarn.)
(Der Schriftleitung zugegangen am 14. Januar 1934.)

Versuche, die von einem von uns vor etwa 10 Jahren (1925) ausgeführt waren, zeigten, daß an der aeroben Oxydation der Milchsäure ein Koferment beteiligt ist, dem die Rolle eines Wasserstofftransporteurs zwischen Dehydrierung und Sauerstoffaktivierung zugeschrieben werden muß. Die späteren Versuche unseres Laboratoriums führten dann zur teilweisen Isolierung und Identifizierung eines Koferments der Milchsäureoxydation. Dieses Koferment — ein Nucleotid (möglicherweise identisch mit v. Eulers Cozymase) — aktiviert jedoch die Dehydrase, und nicht den Wasserstofftransport. Waren also die obigen Beobachtungen richtig, so mußte außer diesem Koferment, der Milchsäure-Kodehydrase, an der Milchsäureoxydation als Wasserstofftransporteur auch noch ein anderer kofermentartiger Stoff beteiligt sein. Die Aufklärung dieser Frage schien um so wichtiger, weil die ausgedehnten Arbeiten dieses Laboratoriums zeigten, daß die Hauptatmung des zerkleinerten Muskels grundsätzlich ebenso verläuft wie die Oxydation der Milchsäure.

Methodisches.

Die Atmungsversuche wurden am Taubenbrustmuskel durchgeführt. Der Muskel wurde dem soeben getöteten Tiere entnommen, einige Minuten auf Eis gekühlt, sodann an der Latapie-Hackmaschine zerkleinert. Die Scheibe, die hinter der Siebplatte den zerschnittenen Muskel noch weiter zermahlt, wurde aus der Maschine herausgenommen, um einer zu weit-

*) Diese Arbeit wurde durch die Josiah Macy jr.-Stiftung, New York, unterstützt.

gehenden Zerkleinerung vorzubeugen. Der Muskelbrei bestand also aus kleinen Stückchen, die die Sieblöcher von 1,5 mm passierten.

Der zerkleinerte Muskel wurde in der 20fachen Menge eisgekühlten Wassers suspendiert, 10 Minuten lang gerührt, an einem Tuch filtriert, ausgepreßt, dann nochmals in gleicher Weise „gewaschen“, ausgepreßt und im Eisschrank von 0° C aufbewahrt. Zum Versuch wurden von diesem Muskelbrei je 10 g abgewogen und in 30 ccm 2,65/15 Mol. Phosphat von p_H 7 suspendiert. Für jeden Versuch wurde hiervon 1,5 ccm mit einer Pipette entnommen, dann mit Wasser oder sonstigen Zusätzen auf 4 ccm aufgefüllt, so daß die Endkonzentration des Phosphats M/15 wurde.

Der „ungewaschene Muskel“ wurde gleich nach dem Mahlen in Phosphat suspendiert und sogleich zum Respirationsversuch herangezogen.

Die aeroben Versuche geschahen im modifizierten Barcroft-Apparat¹⁾, der im Wasserbade von 37° C versenkt und geschüttelt wurde. Die Apparate wurden nach 10 Minuten Incubation geschlossen. Ablesungen wurden alle 10 Minuten vorgenommen. Die anaeroben Versuche mit Methylenblau wurden in der modifizierten Thunberggröhre angestellt.¹¹⁾ Wo nichts anderes hervorgehoben, wurde 1 ccm Methylenblau in der Verdünnung von 1:5000 zum Versuch verwendet.

Extrakte wurden aus Schweineherz hergestellt. Das Herz wurde möglichst bald nach dem Tode entnommen, auf Eis gekühlt, gemahlen und sogleich verarbeitet.

Milchsäure wurde stets in Form von racem. Lithiumlactat in einer Endkonzentration von 0,1 Mol. verwendet.

Nachprüfung älterer Versuche.

Der gewaschene Muskel vermag weder Sauerstoff aufzunehmen, noch Methylenblau zu entfärben. Nach Zugabe von Milchsäure bleiben beide Versuche negativ, oder es wird nur sehr wenig Sauerstoff aufgenommen und Methylenblau äußerst langsam entfärbt. Nach Zugabe von 0,5 mg Kodehydrase (die an und für sich dem Muskel zugesetzt weder die Entfärbung, noch die Sauerstoffaufnahme wesentlich befördert) zeigt der Muskel in Gegenwart von Milchsäure eine energische Dehydrierung. Der Farbstoff wird in 3—5 Minuten entfärbt. Nach dieser kurzen Entfärbungszeit geurteilt erwartet man, daß der Muskel im aeroben Versuch eine ansehnliche Sauerstoffaufnahme zeige. Die Sauerstoffaufnahme jedoch bleibt Null oder erreicht nur ganz niedrige Werte. Nur ausnahmsweise erhält man eine mäßige Sauerstoffaufnahme, die auf ein ungenügendes Waschen des Muskels hindeutet.

Da der gewaschene Muskel Bernsteinsäure wie auch p-Phenylendiamin energisch oxydiert, sein Sauerstoffaktivierungsferment („Atmungsferment“) also nicht gestört ist, kann geschlossen werden,

daß zu dieser Oxydation noch weitere Stoffe nötig sind, die beim Waschen entfernt wurden.

Diese Schlußfolgerung mußte natürlich auch durch den direkten Beweis bekräftigt werden *). Es zeigte sich nun, daß durch verschiedene Extrakte die Sauerstoffaufnahme, d. h. die aerobe Oxydation der Milchsäure, wieder in Gang gesetzt werden kann. Derartige rohe Extrakte enthalten stets auch Kodehydrase, so daß dieser Stoff nicht zugefügt werden muß. Hierdurch ist also die obige Schlußfolgerung auch direkt bewiesen, und sind die älteren Ergebnisse bestätigt. Als Beispiel seien folgende Versuche angeführt.

Versuch 1. Zum gemahleneu Herzmuskel wird Aceton zugesetzt. Auf je 1 g Muskel 1 ccm Aceton. Es wird durchgemengt, dann ausgepreßt, der Saft filtriert, das Aceton in Vacuo entfernt. Gewaschener Taubenbrustmuskel wird im Respirometer mit 1 ccm Extrakt bzw. 1 ccm Extrakt plus Milchsäure versetzt. Sauerstoffaufnahme in 30 Minuten ohne Milchsäure 44 cmm, mit Milchsäure 284 cmm.

Versuch 2. Der Herzmuskelbrei wird mit 0,5 % Trichloressigsäurelösung versetzt (1 ccm pro Gramm Muskel) und auf 65° C erwärmt, abgekühlt, filtriert, neutralisiert. Weiter wie oben. Sauerstoffaufnahme ohne Milchsäure 86, mit Milchsäure 208 cmm.

Versuch 3. Wie 2. Muskel mit Trichloressigsäure nur auf 55° erwärmt. Sauerstoffaufnahme 132 bzw. 424 cmm.

Versuch 4. Ein wie in Versuch 1 mit Aceton behandelter Muskel wird mit Wasser extrahiert. 1 ccm Wasser pro Gramm Muskel. Sauerstoffaufnahme 12 bzw. 232 cmm.

Allgemeines über das Koferment und Succinat.

Es konnte also angenommen werden, daß an der Milchsäureoxydation bzw. an der Hauptatmung außer der Kodehydrase auch noch ein anderes Koferment beteiligt sei. Die nächste Frage war nun die nach der chemischen Natur dieser Substanz. Bei einer solchen Analyse stehen zwei Wege offen. Man kann die Koferment enthaltenden Extrakte fraktionieren, die aktive Komponente isolieren und identifizieren. Man kann aber auch

*) Logischerweise hätte das System durch Methylenblau reaktiviert werden müssen. Man hätte erwartet, Methylenblau würde durch die Dehydrase reduziert, würde sich in Gegenwart von O₂ spontan reoxydieren und somit die Verbindung mit dem Sauerstoff herstellen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das Methylenblau in Gegenwart von Milchsäure und O₂ die Dehydrase inaktiviert. Ohne O₂ oder Milchsäure ist der Farbstoff für das Ferment unschädlich.

versuchen, die bekannten Bestandteile der Extrakte auf ihre Aktivität und mögliche Kofermentnatur zu prüfen. In vorliegender Arbeit wird über solche Versuche mit Bernsteinsäure berichtet.

Die Anwesenheit von Succinat, Fumarat und Apfelsäure in Geweben wurde bereits von Einbeck und später von Moyle nachgewiesen. Sollte die Bernsteinsäure nur einen Brennstoff darstellen, so ist ihre Anwesenheit im Muskel in der gefundenen Menge schwer zu begreifen. Wie wir nämlich seit Thunbergs, Batteli und Sterns Untersuchungen wissen, enthält der Muskel, sowie auch alle anderen Gewebe ein äußerst aktives Ferment, Succinoxydon genannt, das Bernsteinsäure mit einer ungeheuren Geschwindigkeit (wie Einbeck zeigte, zu Fumarsäure) zu oxydieren vermag. In vivo müssen also Bernsteinsäure und das Succinoxydon nebeneinander bestehen, ohne aufeinander einzuwirken, oder aber müssen jederzeit gewaltige Mengen Bernsteinsäure verbrannt werden, was sehr unwahrscheinlich ist.

Die Existenz dieses Bernsteinsäureoxydons war bis jetzt unbegreiflich. Während alle oder sicherlich die meisten Brennstoffe der Hauptatmung an einem Dehydrierungssystem verbrannt werden, das recht labil ist und eines Dehydrierungskofermentes bedarf, ist zur Oxydation der Bernsteinsäure allein ein ganz besonderes System da, das kein Koferment nötig hat und sich durch seine hohe Resistenz verschiedenen physikalischen und chemischen Eingriffen gegenüber auszeichnet. Es ist kaum denkbar, daß dieses System nur zufallsweise Bernsteinsäure oxydiert. Schon die Kinetik der Bernsteinsäureoxydation spricht dagegen, da die Geschwindigkeit der Oxydation der Bernsteinsäure von der Konzentration des Substrates unabhängig ist, und die Oxydation schon bei minimaler Säuremenge mit maximaler Sauerstoffaufnahme verläuft. Dies deutet darauf hin, daß das Enzym spezifisch zur Oxydation der Bernsteinsäure gebaut ist.

Es mag befremdend wirken, einer so einfachen Substanz wie der Bernsteinsäure eine katalytische Tätigkeit zuzuschreiben. Es mag aber darauf hingewiesen werden, daß einerseits F. Knoop bei ähnlich einfach gebauten Substanzen ähnliche katalytische Funktionen gefunden hat, daß aber andererseits trotz der einfachen Struktur Bernsteinsäure aus atomphysikalischen bzw. chemischen Gründen — wie dies eingehend von Quastel erörtert wurde — eine ganz einzig dastehende Substanz darstellt. Sie allein hat 2 benachbarte C-Atome, die beide zugleich α - und β -C-Atome

sind. Dieser Umstand verleiht dem Molekül Eigenschaften, die es für eine derartige katalytische Aktivität in einzig dastehender Weise geeignet macht.

Der Gegenstand vorliegender Arbeit ist also die Frage, ob dem Succinat die Bedeutung eines Katalysators zukommt. Seine Rolle wäre die eines Wasserstofftransporteurs, eingeschaltet zwischen Dehydrasen, bzw. Nährstoffe einerseits und Sauerstoff andererseits. Durch die Succinoxidase würde das Succinat oxidiert, dann durch den Wasserstoff der dehydrierten Nahrungsstoffe reduziert. Das Succinoxidon selber würde in diesem Falle die positive Hälfte des Systems der Hauptatmung darstellen.

Atmungshemmung durch Malonat.

Nach den ausgedehnten Arbeiten Quastels und seiner Mitarbeiter über Succinoxidation besitzen wir in der Malonsäure ein spezifisches Mittel zur Hemmung der Bernsteinsäureoxydation. Für die Adsorption der Bernsteinsäure an ihrer Dehydrase ist nach Quastel und Wooldridge die Gruppierung $-C \cdot CH_2 \cdot COOH$ maßgebend. Die Malonsäure, die der Bernsteinsäure am nächsten verwandte Dicarbonsäure, enthält diese maßgebende Atom-Gruppierung auf das theoretisch kleinste Molekül doppelt. In Bestätigung von Quastels Versuchen fanden wir, daß die Malonsäure die Oxydation der Bernsteinsäure durch den gewaschenen Muskel sehr weitgehend spezifisch zu hemmen vermag. Diese Hemmung beruht auf der Hemmung der Dehydrase. Auf die Sauerstoffaktivierung, wie durch p-Phenylendiaminoxidation gezeigt werden kann, hat die Malonsäure keinen Einfluß. Auch können wir bestätigen, daß die Hemmung der Bernsteinsäureoxydation durch Malonsäure durchaus spezifisch ist. Die Dehydrierung (Methylenblaufärbung) des ungewaschenen Muskels, oder die Dehydrierung von Milchsäure oder Fructosediphosphat wird durch Malonsäure*) nicht gehemmt.

*) Unseres Erachtens kann aber die starke spezifische Hemmung der Bernsteinsäureoxydation durch Malonat nicht einfach auf die Anwesenheit der $C \cdot CH_2 \cdot COOH$ Gruppierung zurückgeführt werden. Sicher spielt bei der Hemmung auch die große Ähnlichkeit im Bau des gesamten Moleküls eine bedeutende Rolle, ist doch Malonsäure das nächste niedere Homologe der Bernsteinsäure. Würde die Anwesenheit der obigen Gruppierung allein maßgebend sein, so würde man auch durch die höheren Homologe eine ähnliche Hemmung erwarten. Bei Glutarsäure ist jedoch die Hemmung bereits sehr schwach. Bei den höheren Gliedern wie Adipinsäure, Pi-

Spielt also Bernsteinsäure im Oxydationsmechanismus als Wasserstofftransporteur eine bedeutende Rolle, so muß auch die Atmung durch Malonsäure stark gehemmt werden.

Die Versuche zeigen, daß die Sauerstoffaufnahme des Muskels durch Malonsäure sehr weitgehend gehemmt wird. Schon durch ganz geringe Konzentrationen, wie $\frac{1}{400}$ Mol. kann eine sehr weitgehende Atmungshemmung erreicht werden, so daß Malonsäure trotz ihrer einfachen Struktur den bekannten stärksten Atmungsgiften an die Seite gestellt werden kann, die es uns auch gestatten, die Atmung an einer neuen Stelle zu vergiften.

Die Hemmung der Atmung des Muskels und der Bernsteinsäureoxydation laufen, wie aus der Tabelle ersichtlich, durchaus parallel. Da, wie in unseren früheren Studien gezeigt (vgl. Banga et al.), ein geringer Teil der Atmung im zerkleinerten Muskel stets durch Nebenreaktionen bedingt wird, wird man natürlich erwarten, daß die Hemmung der Normalatmung gegenüber Bernsteinsäureoxydation etwas zurückbleibt.

Mol. konzentrierter Malonsäure	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$
% Atmungshemmung, ungewaschener Muskel	86	84	80	76	66	66
% Atmungshemmung, gewaschener Muskel, Bernsteinsäure. $\frac{1}{40}$			90	88	76	64

Die Hemmung der Atmung beruht auf einer spezifischen Adsorptionsverdrängung. Werden die Prozente Hemmungen und die zugehörigen Konzentrationen der Malonsäure in ein Koordinatensystem eingetragen, so erhält man eine für Adsorptionsvorgänge charakteristische logarithmische Kurve. Das Ausmaß der Hemmung der Bernsteinsäureoxydation durch Malonsäure hängt auch von der Konzentration der Bernsteinsäure ab. So gab z. B. 1 mg Malonsäure in Gegenwart von 5 mg Succinat eine Hemmung von

malinsäure, Korksäure und Azelainsäure ist eine schwache unspezifische Hemmung aller Dehydrierungsprozesse zu beobachten.

Auch scheint es nicht ganz ausreichend, neben der Dehydrase vom Typus der Bernsteinsäuredehydrase allgemein nur noch eine Dehydrase vom Typus der Milchsäure mit der Gruppe $\text{CO}\cdot\text{COH}^*$ oder $\text{COH}\cdot\text{COH}^*$ (H^* bedeutet mobilen H) zu unterscheiden. In unseren Versuchen hemmt Tartronsäure die Methylenblaufärbung am ungewaschenen Muskel in hohem Maße, ohne jedoch die Milchsäure- oder Fructose-Phosphat-Dehydrierung zu hemmen.

76%, in Gegenwart von 45 mg Succinat eine Hemmung von 39% (gewaschener Muskel, Sauerstoffaufnahme).

Natürlich könnte eingewendet werden, daß die Hemmung der Atmung durch Malonsäure nicht notwendigerweise auf der Hemmung einer katalytischen Funktion beruhe, sondern daß Malonsäure einfach die Dehydrierung der Brennstoffe — sei es Bernsteinsäure oder andere Stoffe desselben Typus — verhindere. Daß dies aber nicht zutrifft, kann in einfacher Weise gezeigt werden, wenn ungewaschener Muskel auf seine Dehydrierung, d. h. Methylenblauentfärbung untersucht wird. Malonsäure vermag nicht die Methylenblauentfärbung zu verzögern, so daß geschlossen werden kann, daß Stoffe, die durch Malonat gehemmt werden, als Brennstoffe bzw. Wasserstoffdonatoren keine wesentliche Rolle spielen können. Alle anderen, der Malonsäure ähnlich einfach gebauten Atmungsgifte, wie Oxalat, Glyoxalat, Tartronat, Mesoxalat, die die Sauerstoffaufnahme des zerkleinerten Muskels stark verzögern, hemmen auch die Methylenblauentfärbung in gleichem Maße.

Atmungssteigerung durch Succinat und Fumarat.

Der in Phosphorlösung suspendierte, zerkleinerte Muskel stellt ein Atmungssystem dar, in dem alle Glieder noch anwesend, in dem aber leicht diffusible Stoffe, wie die Bernsteinsäure, weitgehend verdünnt sind. Werden diese durch ihre Verdünnung zum limitierenden Faktor der Atmung, so muß durch ihre Zugabe die Atmung gesteigert werden.

Wird nun 1 ccm 0,1 Mol. Bernsteinsäure dem System zugesetzt, so zeigt sich gleich zu Beginn des Versuches eine erhöhte Sauerstoffaufnahme, die man der Oxydation der Bernsteinsäure zu Fumarsäure zuschreiben könnte. In 20—30 Minuten ist bereits um so viel mehr Sauerstoff aufgenommen, als es der Oxydation der zugesetzten Bernsteinsäure zu Fumarsäure entspricht. Der Mehrverbrauch macht hier aber keinen Halt. Während sich aber die Kurve des Sauerstoffverbrauches beim Muskel ohne Succinat bald abzuflachen beginnt, geht die erhöhte Atmung des Muskels mit Bernsteinsäure ungehindert weiter, so daß dieser Muskel bald um 100—600% mehr Sauerstoff verbraucht als die Kontrolle.

In gleicher Weise verhält sich der Muskel, wenn an Stelle der Bernsteinsäure Fumarsäure zugesetzt wird.

Obwohl der gewaschene Muskel Bernsteinsäure nur zu Fumarsäure zu oxydieren vermag, könnte doch daran gedacht werden, daß der ungewaschene Muskel befähigt ist, die Säure vollständig abzubauen, und der erhöhte Sauerstoffverbrauch nach Zufügung dieser Substanz nicht durch ihre katalytische Wirkung, sondern einfach durch ihre vollständige Oxydation bedingt sei. Zur Oxydation der Bernsteinsäure zu Fumarsäure sind bloß zwei, zur Oxydation zu CO_2 und H_2O 16 Äquivalente nötig.

Um diese Frage zu entscheiden, wurde in einer Versuchsreihe der Muskelsuspension (diesmal in $\frac{1}{45}$ Mol. Phosphat) je 1 ccm Mol. $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{40}$, $\frac{1}{80}$ Fumarsäure zugesetzt. Als Kontrolle diente Muskel mit 1 ccm Wasser. Nach Schluß der Respirometer wurde die Sauerstoffaufnahme 90 Minuten lang verfolgt. Die spontane Sauerstoffaufnahme wurde durch die Fumarsäure auf das 3-, 2,6-, 2,5- und 1,8-fache gesteigert. Sollte die Zunahme des Sauerstoffverbrauches durch die irreversible vollständige Oxydation der Fumarsäure erklärt werden, so mußte im ersten Ansatz $\frac{1}{3}$, im zweiten $\frac{1}{2}$, im dritten und vierten die gesamte Fumarsäure zu CO_2 und H_2O oxydiert sein. Daß dies jedoch nicht der Fall war, zeigte die chemische Analyse. Nach Enteiweißung der Flüssigkeiten mit Trichloressigsäure wurde die gesamte zugesetzte Fumarsäure wiedergefunden, und zwar zu $\frac{3}{4}$ als Äpfelsäure, zu $\frac{1}{4}$ als Fumarsäure, da bekanntlich Fumarsäure durch den Muskel zu $\frac{3}{4}$ zu Äpfelsäure hydriert wird.

Die Äpfelsäure wurde polarimetrisch in Gegenwart von Uranylacetat bestimmt. Die Fumarsäure wurde durch Titration mit KMnO_4 ermittelt. Die Titration gibt nur Näherungswerte. 1 Mol. Fumarsäure verbraucht 4 Äquivalente; der weitere Verbrauch verläuft langsam. Diese beginnende Verlangsamung kann als Endpunkt genommen werden. Natürlich wurde die Korrektur für den Verbrauch des Kontrollversuches ohne Fumarsäure berücksichtigt.

Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen Clutterbucks, der auch kein Verschwinden der Fumarsäure findet und darauf seine auch von uns benutzte Bestimmungsmethode gründet.

Hiermit ist also gezeigt, daß die Zunahme des Sauerstoffverbrauches bei Zusatz von Fumarsäure rein katalytischer Natur ist, wobei die Bernstein- bzw. Fumarsäure die Rolle des Katalysators spielt.

Atmungshemmung durch Maleinsäure.

Einen weiteren Beweis für die Bedeutung des Succinats, und zugleich ein weiteres schönes Beispiel spezifischer Atmungshemmung durch Adsorptionsverdrängung bildet die, durch Thunberg entdeckte hemmende Wirkung der Maleinsäure. Ebenso wie die Malonsäure vermag auch die Maleinsäure die Atmung schon in sehr geringer Konzentration sehr weitgehend zu hemmen. Beide Säuren hemmen die Atmung in gleichem Maße. Bei beiden Stoffen scheint diese hohe Aktivität mit dem einfachen chemischen Bau in Widerspruch zu stehen. Thunberg selbst stand ganz erstaunt dieser Aktivität gegenüber, die ihm um so unverständlicher schien, da doch Maleinsäure auch selber als Wasserstoffdonator wirkte.

Die Analyse am ungewaschenen Muskel gibt über den Mechanismus der Hemmung keinen Aufschluß. Die Dehydrierungsprozesse (d. h. Entfärbung von Methylenblau) werden durch Maleinat nicht gehemmt. Auch hat Maleinat keinen Einfluß auf die Sauerstoffaktivierung. Der gewaschene Muskel gibt auch keine Erklärung. Weder die Dehydrierung (Methylenblauentfärbung) von Lactat noch die von Hexosediphosphat oder Succinat wird durch Maleinat gehemmt.

Die katalytische Funktion des Systems Bernsteinsäure (Fumarsäure) gibt ebenso wie für Malonat auch für Maleinat eine befriedigende Erklärung. Während Malonat der Bernsteinsäure am nächsten verwandt ist, steht Maleinat der Fumarsäure am nächsten. Es kann also erwartet werden, daß an der Fermentoberfläche Maleinat mit Fumarat in Konkurrenz treten und die Atmung entsprechend hemmen wird, wenn Fumarat bei dieser eine bedeutende Rolle spielt. Dementsprechend wird auch die atmungssteigernde Wirkung von Fumarat (1 ccm 0,1 Mol.) durch die gleiche Menge Maleinat gänzlich ausgeschaltet*).

Zusammenfassung.

An dem Atmungsprozeß des zerkleinerten Taubenbrustmuskels ist außer der Kodehydrase auch ein anderer kofermentartiger Stoff beteiligt.

*) Malonsäure vermag die Atmungssteigerung durch Fumarat nicht zu hemmen.