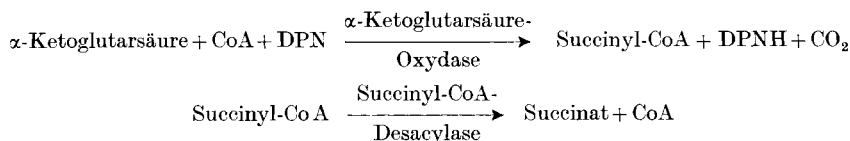


104. Über die Wirkung von Komplexbildnern und Metallkationen auf die enzymatische Oxydation von Ketoglutarensäure

von O. Brenner-Holzach und J. Raaflaub.

(14. III. 56.)

Im Laufe von Untersuchungen über CoA¹⁾, bei denen der optische Test nach *Von Korff*²⁾ benutzt wurde, stellten wir fest, dass das verwendete Enzymsystem durch ATP hemmbar ist. Es handelt sich bei diesem Test um die enzymatische Oxydation der α -Ketoglutarensäure; der Reaktionsverlauf erfolgt nach den nachstehenden zwei Gleichungen und kann auf Grund der Extinktionszunahme durch das gebildete DPNH direkt im Photometer verfolgt werden.



Schon *Von Korff* hat in der oben zitierten Arbeit eine Hemmung des optischen Testes durch ATP, ADP und Pyrophosphat kurz erwähnt, ohne sich aber mit deren Ursache zu befassen.

Fig. 1 zeigt die Hemmung des Enzymsystems durch ATP, ADP und PP.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen, in deren Verlauf die Bedeutung der komplexchemischen Eigenschaften der Adenosinphosphate erkannt worden ist³⁾⁴⁾, schien uns die Annahme naheliegend, dass auch die Hemmung des optischen Testes durch Polyphosphate komplexchemisch bedingt sein könnte.

Versuche mit Äthylendiamin-tetraessigsäure (Komplexon). Wenn die Hemmung des Enzymsystems durch ATP und ähnliche Verbindungen durch Entzug eines enzymaktivierenden Metalls bedingt ist, so muss ein Komplexbildner, wie er in der analytischen Chemie gebräuchlich ist (z. B. Komplexon), ebenfalls eine Aktivitäts-senkung bewirken. Fig. 2 zeigt den Effekt verschiedener Konzentrationen Komplexon auf das Enzymsystem.

¹⁾ Verwendete Abkürzungen: CoA = Coenzym A, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, PP = Pyrophosphat, DPN = Diphosphopyridinnucleotid, DPNH = reduziertes Diphosphopyridinnucleotid, ADE = Anthranildiessigsäure, Komplexon = Äthylendiamin-tetraessigsäure, Glycolkomplexon = Glycolätherdiamin-tetraessigsäure.

²⁾ M. W. Von Korff, J. biol. Chemistry **200**, 401 (1953).

³⁾ J. Raaflaub, Helv. physiol. pharmacol. Acta **12**, C 88 (1954).

⁴⁾ J. Raaflaub, Helv. **38**, 27 (1954).

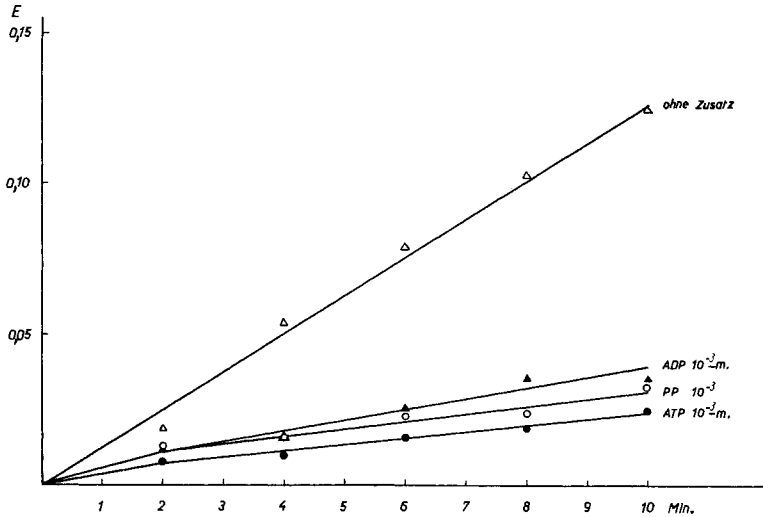


Fig. 1.

Hemmung des optischen Testes durch ATP, ADP und PP.

Ansätze: Standardkomponenten: 0,1 ml 0,1-m. Cystein-HCl (mit 1-n. KOH frisch neutralisiert); 0,1 ml 0,2-m. α -Ketoglutar säure pH 7; 0,05 ml Oxydase; 0,05 ml Desacylase; Wasser ad 3 ml Endvolumen und 0,1 ml 0,5% DPN.

Variable Komponenten: 0,1 ml CoA (60 γ /ml); 0,1 ml 1-m. Glykokollpuffer pH 9,85 mit NaCl; je 0,3 ml 10^{-3} -m. ATP, ADP oder PP.

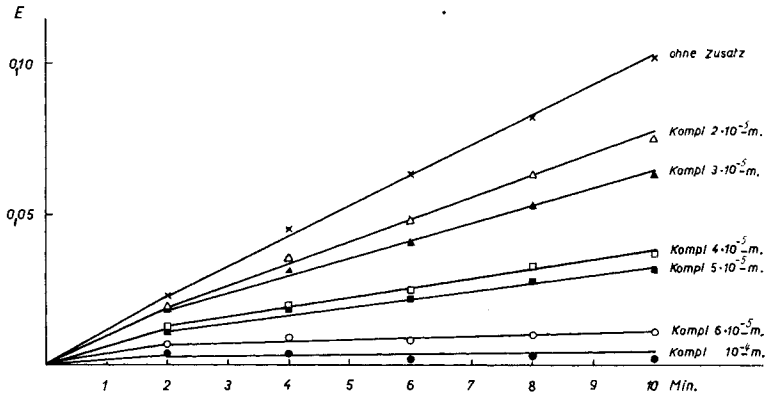


Fig. 2.

Hemmung des optischen Testes durch Komplexon.

Ansätze: Standardkomponenten vgl. Fig. 1.

Variable Komponenten: 0,1 ml CoA (60 γ /ml); 0,1 ml 1-m. Glykokollpuffer pH 9,85 mit NaCl; dazu 0,12 ml, 0,18 ml, 0,24 ml, 0,3 ml, 0,36 ml, 0,6 ml $5 \cdot 10^{-4}$ -m. Komplexon pH 7.

Wenn die Hemmung durch Metallbindung zustande kommt, so muss das Enzym bei Zugabe des entsprechenden Metalls wieder reaktiviert werden. In Fig. 3 und Fig. 4 sind Reaktivierungsversuche nach Inaktivierung des Enzymsystems durch Komplexon dargestellt: Ma-

gnesium ist nur wenig wirksam, während Calcium das Enzymsystem zu seiner vollen Aktivität zurückbringt.

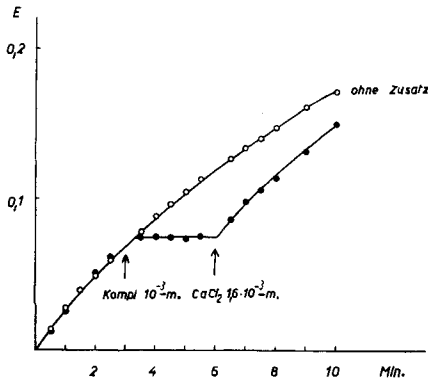


Fig. 3.

Hemmung des optischen Testes durch Komplexon und Reaktivierung mit Calcium.

Ansatz: Standardkomponenten vgl. Fig. 1. Variable Komponenten: 0,2 ml CoA (60 γ /ml), 0,1 ml 1-m. Glykokollpuffer pH 9,85 mit NaCl; 0,05 ml $6 \cdot 10^{-2}$ -m. Komplexon zur Zeit 3' und 0,05 ml 0,1-m. CaCl_2 zur Zeit 6'.

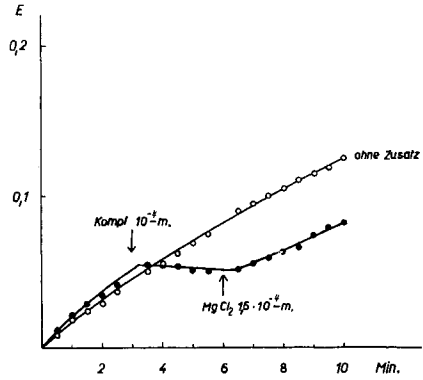


Fig. 4.

Hemmung des optischen Testes durch Komplexon und Reaktivierung mit Magnesium.

Ansatz: Standardkomponenten vgl. Fig. 1. — Variable Komponenten gleich wie in Fig. 3, aber anstelle des CaCl_2 zur Zeit 6' 0,05 ml 0,1-m. MgCl_2 .

Um weitere Anhaltspunkte über die Metallabhängigkeit der Reaktion zu erhalten, wurde versucht, mit verschiedenen Metallsalzen den optischen Test direkt, ohne vorherigen Zusatz von Komplexbildner zu beeinflussen. Fig. 5 zeigt die Wirkung einiger der untersuchten Kationen.

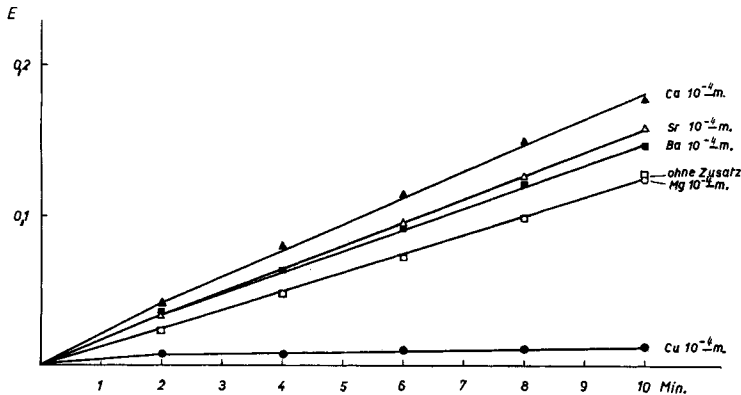


Fig. 5.

Einwirkung verschiedener Metallsalze auf den optischen Test.

Ansätze: Standardkomponenten vgl. Fig. 1.

Variable Komponenten: CoA und Glykokollpuffer wie bei Fig. 1, dazu je 0,3 ml 10^{-3} -m. Lösungen der Metallsalze.

Kupfer hemmt den optischen Test, Magnesium ist indifferent und Calcium aktiviert stark (als Vergleich CoA ohne Metallzusatz).

Gleich wie Kupfer, d. h. hemmend, wirken Mangan und dreiwertiges Eisen. Gleich wie Magnesium, d. h. indifferent, verhalten sich Beryllium, Nickel, Cobalt und Chrom. Wie Calcium, d. h. aktivierend, wirken Strontium und Barium, letzteres allerdings nur sehr wenig.

Dass Magnesium im Aktivierungsversuch (Fig. 5) indifferent ist, im Reaktivierungsversuch (Fig. 4) aber leicht aktivierend wirkt, lässt sich durch einen Verdrängungseffekt beim Reaktivierungsversuch erklären: Die Enzymlösung enthält auch nach längerer Dialyse noch Calcium; dieses wird durch Komplexon gebunden. Bei Zugabe eines Überschusses an Magnesium wird ein Teil des komplexgebundenen Calciums trotz höherer Komplexbildungskonstante ($\log K_{CaZ} = 10,7$, $\log K_{MgZ} = 8,7$)⁵) aus dem Komplex verdrängt und kommt so wieder zur Wirkung. Eine Bestätigung dieser Auffassung ergeben Versuche mit Glycolkomplexon (Glycolätherdiamin-tetraessigsäure). Analog den Versuchen mit Komplexon tritt auch mit Glycolkomplexon eine vollständige Hemmung des Enzymsystems ein. Die Zugabe von Calcium bringt volle Aktivität zurück (Fig. 6). Da aber die Komplexbildungs-

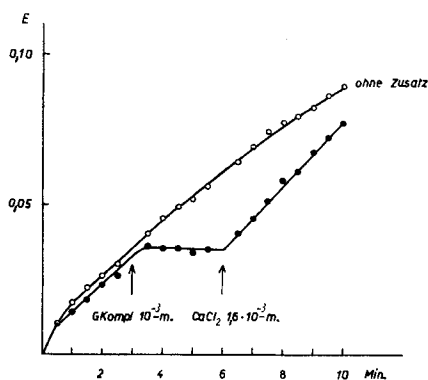


Fig. 6.

Hemmung des optischen Testes durch Glycolkomplexon und Reaktivierung mit Calcium.

Ansatz: Der Ansatz ist gleich wie in Fig. 3. Glycolkomplexon $6 \cdot 10^{-2}$ -m.

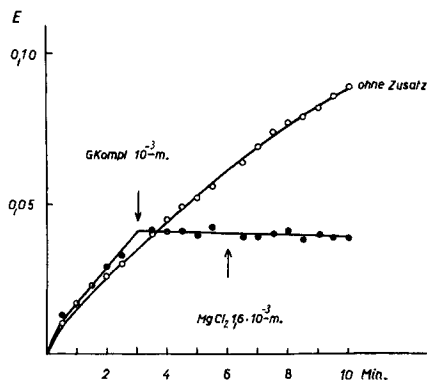


Fig. 7.

Hemmung des optischen Testes durch Glycolkomplexon und Reaktivierungsversuch mit Magnesium.

Ansatz: Der Ansatz ist gleich wie in Fig. 4. Glycolkomplexon $6 \cdot 10^{-2}$ -m.

konstante von Glycolkomplexon mit Magnesium um einen Faktor von beinahe 10^6 kleiner ist als diejenige mit Calcium ($\log K_{MgZ} = 5,2$, $\log K_{CaZ} = 11,0$)⁵), vermag Magnesium hier das glycolkomplexon gebundene Calcium nicht zu verdrängen. Magnesium bewirkt daher keine Reaktivierung (Fig. 7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur Calcium und in geringem Masse Strontium und Barium auf das Enzymsystem aktivierend wirken. Es gibt bis jetzt keine Anhaltspunkte dafür, dass Stron-

⁵) G. Schwarzenbach, Die komplexometrische Titration, Stuttgart 1955, S. 7 und 87.

tium und Barium im lebenden Organismus als Enzymaktivatoren wirken. Es scheint sich daher bei unserem System um Calcium-Enzyme zu handeln. Wir können aber zur Zeit nicht angeben, welches der beiden Enzyme, die Oxydase oder die Desacylase, vom Enzym abhängig ist.

Nebenbei sei bemerkt, dass die Konzentrationsreihe mit Komplexon (siehe Fig. 2) einen Hinweis auf die Grössenordnung der in den Enzymlösungen vorhandenen Calciummenge gibt. Da die Calciumbindung von Komplexon bei pH 9,3 beträchtlich ist ($\log K_{CaZ} = 9,6$), kommt die Versuchsserie von Fig. 2 einer Titration des Calciums gleich. Die minimale Komplexonkonzentration, mit der eine totale Enzyminaktivierung erzielt wird, entspricht der Konzentration der im Ansatz vorhandenen Calcium-+ Schwermetallionen.

Versuche mit ATP. Der Zusatz steigender Mengen ATP (siehe Fig. 8) zum Testsystem ergibt ein ähnliches Bild wie mit Komplexon (vgl. Konzentrationsreihe mit Komplexon in Fig. 2). Der wesentliche Unterschied besteht aber darin, dass ATP erst bei ungefähr zehnmal grösserer Konzentration dieselbe Hemmung wie Komplexon bewirkt.

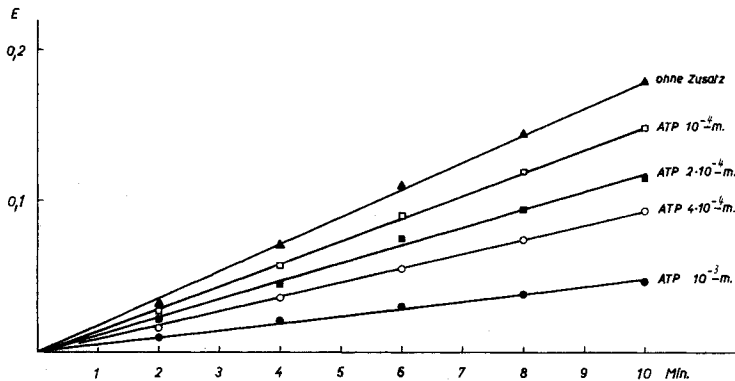


Fig. 8.

Hemmung des optischen Testes durch ATP.

Ansätze: Standardkomponenten vgl. Fig. 1.

Variable Komponenten: CoA und Glykokollpuffer wie in Fig. 1, dazu 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,6 ml, 1,2 ml 10^{-3} -m. und 0,3 ml 10^{-2} -m. neutralisierte ATP-Lösung.

In Analogie zu den Versuchen mit Komplexon liess sich zeigen, dass auch die Hemmung durch ATP mit einem Überschuss an Calcium aufhebbar ist. Weitere Versuche ergaben aber, dass ATP und ADP trotz verschiedener Komplexbildungskonstanten ($\log K_{CaATP} = 3,6$, $\log K_{CaADP} = 2,8$)⁶⁾ ungefähr gleich hemmen, und dass Citrat trotz beträchtlicher Calcium-Komplexbildung ($\log K_{CaCitrat} = 3,2$)⁶⁾ nur eine geringe Hemmung bewirkt. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Hemmung durch ATP und ADP zusammengesetzter Natur ist und durch verschiedene Mechanismen zustande kommt.

⁶⁾ A. E. Martell & G. Schwarzenbach, Helv. **39**, 653 (1956).

Metallpufferkurven geben uns die Möglichkeit, verschiedene Hemmtypen zu differenzieren. Zu diesem Zweck untersuchten wir die Calciumabhängigkeit des Systems Oxydase-Desacylase mit einem Calciumpuffer. Anthranildiessigsäure (ADE) erwies sich für unsere Zwecke als günstig. In Fig. 9 ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Calciumionenkonzentration, gepuffert mit ADE, dargestellt.

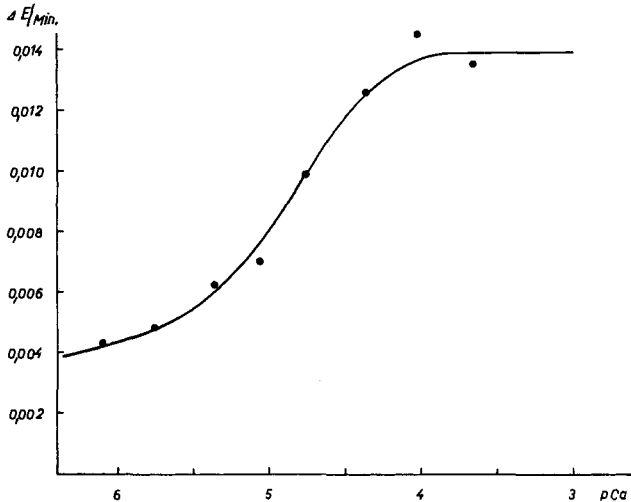


Fig. 9.

Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pCa, gepuffert mit Anthranildiessigsäure.
 Ansätze: Standardkomponenten mit Ausnahme der Oxydase wie in Fig. 1. Oxydase 1:5 verdünnt mit 0,1-m. NaCl und davon 0,2 ml im Ansatz.
 Variable Komponenten: 0,1 ml CoA (60 γ /ml), 0,1 ml 1-m. Glykokollpuffer pH 9,85 ohne NaCl; dazu 0,15 ml, 0,3 ml, 0,6 ml, 0,9 ml, 1,2 ml, 1,5 ml und 1,8 ml NaCaADE und die entsprechende Menge Na₃ADE ad 1,8 ml.

Ist die Hemmung durch einen bestimmten Stoff nur durch Calciumbindung bedingt, so sollte sie in einem ausreichend calciumgepufferten Milieu nicht in Erscheinung treten.

Versuche mit ATP bei einem pCa von 4 (Fig. 10) ergaben, dass ATP auch bei dieser praktisch optimalen Calciumionenkonzentration die Reaktion hemmt. Dies bestätigt die Vermutung, dass die ATP-Hemmung nicht ausschliesslich komplexchemischer Natur ist. Es ist dabei noch ein Vorgang beteiligt, der auf der kompetitiven Verdrängung des CoA durch das ATP beruht, wie sich durch Versuche mit höheren CoA-Konzentrationen zeigen liess. Wir werden diesen zweiten Hemmtypus im folgenden kurz als *Kompetition* bezeichnen.

Eine Differenzierung der Hemmechanismen von ATP ist durch einen Vergleich der drei Versuchsserien möglich: a) Konzentrationsreihe von ATP in einem Enzymsystem ohne Calcium-Zusatz (siehe

Fig. 8); b) Konzentrationsreihe von ATP in calciumgepuffertem System ($pCa = 4$) (siehe Fig. 10); c) Konzentrationsreihe von ATP in

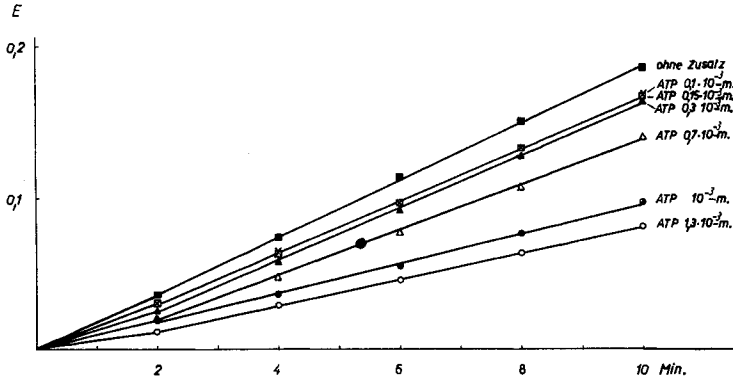


Fig. 10.

Konzentrationsreihe von ATP im gepufferten System $pCa = 4$.

Ansätze: Standardkomponenten vgl. Fig. 1.

Variable Komponenten: 0,1 ml CoA (60 γ /ml), 0,1 ml 1-m. Glykokollpuffer pH 9,85 ohne NaCl; 1,65 ml 10^{-2} -m. NaCaADE; 0,15 ml 10^{-2} -m. Na_3 ADE; dazu 0,5 ml, 0,4 ml, 0,3 ml, 0,2 ml, 0,1 ml, 0,05 ml und 0,03 ml 10^{-2} -m. neutralisiertes ATP.

Gegenwart von überschüssigem Calcium (Totalkonz. = $2 \cdot 10^{-3}$ m.) (siehe Fig. 11).

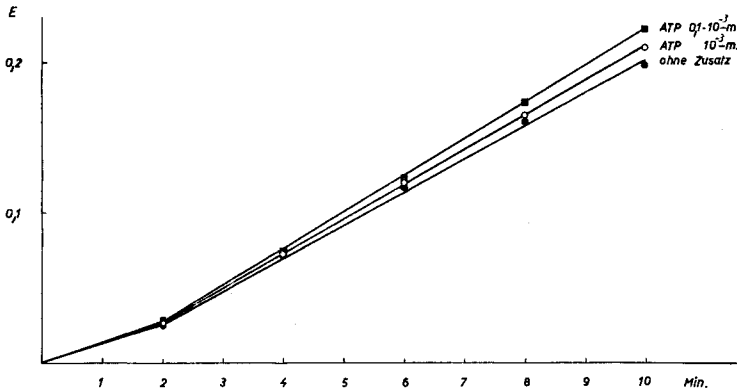


Fig. 11.

Konzentrationsreihe von ATP bei einem Überschuss an Calcium.

Ansätze: Standardkomponenten vgl. Fig. 1.

Variable Komponenten: 0,1 ml CoA (60 γ /ml), 0,1 ml 1-m. Glykokollpuffer pH 9,85 mit NaCl; 0,6 ml 10^{-2} -m. $CaCl_2$. ATP-Zusätze wie in Fig. 10.

Wird dem Enzymsystem kein Calcium zugefügt (Fig. 8), so erhalten wir bei der Zugabe von ATP als Hemmung die Summe von Komplexbildung mit dem im Enzymsystem vorhandenen Calcium und Konkurrenz. ATP 10^{-3} -m. bewirkt eine Aktivitätssenkung von

ungefähr 70%. In gepuffertem Lösung (Fig. 10) ist die Hemmung durch ATP nur durch Konkurrenz bedingt. 10^{-3} -m. ATP ergibt bei pCa 4 eine Senkung der Aktivität um ca. 45%. Gibt man zum Testsystem Calcium im Überschuss (Fig. 11), so tritt keine Hemmung mehr ein. Dies dürfte dadurch bedingt sein, dass ATP nur in seiner freien Form, nicht aber als Calcium-Komplex zu hemmen vermag.

Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass die maximale Hemmung durch 10^{-3} -m. ATP zu $\frac{2}{3}$ auf kompetitiver Verdrängung des CoA durch freies ATP und zu $\frac{1}{3}$ auf Reduktion der Calciumionenkonzentration beruht.

ADP verhält sich in calciumgepuffertem System und ohne Calciumzusatz dem ATP sehr ähnlich. Mit Calcium-Überschuss aber tritt eine noch beträchtliche Hemmung von ca. 30–35% ein. Dies dürfte auf die geringere Calciumbindung von ADP zurückzuführen sein, was zur Folge hat, dass auch bei einem pCa von etwa 2,7 noch viel freies ADP vorhanden ist.

Pyrophosphat ist bei höheren pCa-Werten in seinem Verhalten dem ATP ähnlich; es kann aber infolge Auftretens eines Niederschlages bei niedrigen pCa nicht genauer untersucht werden.

Durch AMP in Konzentrationen bis zu 10^{-3} -m. wird das Enzym-system nicht gehemmt.

Methodischer Teil.

Chemikalien: CoA, ATP, ADP und AMP sind Produkte der Firma *Pabst Laboratories*, Milwaukee, USA. DPN ist ein Präparat der *C. F. Böhringer & Söhne G.m.b.H.*, Mannheim, und Glycolkomplexon kann bei der Firma *J. R. Geigy AG.*, Basel, bezogen werden.

Die Anthranildiessigsäure (ADE) stellten wir nach *Vorländer & Mumme*⁷⁾ her.

Enzyme: Die beiden Enzyme für den optischen Test wurden aus Schweinsherz extrahiert, die α -Ketoglutarat-Oxydase nach *Sanadi & Littlefield*⁸⁾, die Succinyl-CoA-Desacylase nach *Gergely et al.*⁹⁾ mit den Modifikationen von *Von Korff*²⁾. Beide Enzyme sind bei -16° gut haltbar, die Oxydase 2–3 Monate, die Desacylase unbeschränkt.

Optischer Test nach *Von Korff*²⁾: In Abweichung von den Originalvorschriften wird ein Glykokollpuffer vom pH 9,85 verwendet, der im Testsystem zu einem optimalen End-pH von 9,2–9,3 führt. Da ein zu grosser Salzgehalt des Milieus die Reaktion hemmt, wird für die Versuche mit dem Calciumpuffer Anthranildiessigsäure ein Glykokollpuffer ohne NaCl-Zusatz gebraucht. Aus demselben Grunde werden die Metallpufferlösungen (siehe unten) so hergestellt, dass die totale Ionenkonzentration möglichst gering ist.

Ein Versuchsansatz ohne besondere Zusätze enthält folgende Komponenten:

0,1 ml 0,1-m. Cystein-HCl pH 7	0,1–0,2 ml CoA (60 γ /ml)
0,1 ml 0,2-m. α -Ketoglutarat pH 7	0,1 ml 1-m. Glykokollpuffer pH 9,85 (mit NaCl)
0,05 ml Oxydase	Wasser ad 2,9 ml
0,05 ml Desacylase	

Nach 5 Min. Inkubation bei 30° wird die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml einer 0,5-proz. DPN-Lösung ausgelöst und die Zunahme der Absorption im Photometer Marke *Eppendorf* bei 365 μ (Hg-Filter) gemessen.

⁷⁾ *D. Vorländer & E. Mumme*, Ber. deutsch. chem. Ges. **33**, 3182 (1900).

⁸⁾ *D. R. Sanadi, J. W. Littlefield & R. M. Bock*, J. biol. Chemistry **197**, 851 (1952).

⁹⁾ *J. Gergely, P. Hele & C. V. Ramakrishnan*, J. biol. Chemistry **198**, 323 (1952).

Metallpuffer: $\text{Na}_3\text{ADE } 10^{-2}\text{-m}$ wird durch Neutralisation von $\text{ADE } 10^{-2}\text{-m}$ mit 0,5-n, CO_2 -freier NaOH erhalten. Die Herstellung von NaCaADE erfolgt folgendermassen: 1 mMol freie ADE wird mit 1 mMol $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (in Form einer konzentrierten, carbonatfreien und mit Komplexon eingestellten Lösung) versetzt und in Lösung gebracht. Dann werden 2 ml 0,5-n. NaOH beigelegt und das Gemisch mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Das pH dieser Lösung beträgt ungefähr 7.

Durch Mischung verschiedener Mengen Na_3ADE und NaCaADE erhält man Lösungen von bestimmtem pCa, das sich nach folgender Formel berechnen lässt:

$$10^{-\text{pCa}} = (\text{Ca}^{++}) = \frac{\varepsilon(\text{Ca})}{\varepsilon(\text{Z}) - \varepsilon(\text{Ca})} \cdot \frac{1}{K_{\text{CaZ}}}.$$

$\varepsilon(\text{Ca})$ entspricht der molaren Totalkonzentration des Calciums, $\varepsilon(\text{Z})$ der molaren Totalkonzentration der Anthranilidiessigsäure im Versuchsmilieu; K_{CaZ} ist die Komplexbildungskonstante und beträgt $10^{5,06}$.

Ionenstärke des Versuchsmilieus: 0,11.

Versuchstemperatur: $20^\circ \pm 2^\circ$.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung von verschiedenen Komplexbildnern (Komplexon, Glycolkomplexon, ATP, ADP u. a.) und von zweiwertigen Kationen (in erster Linie Calcium und Magnesium) auf das Enzymsystem der α -Ketoglutarat-Oxydation nach *Von Korff*²⁾ untersucht. Die Aminopolycarbonsäuren Komplexon und Glycolkomplexon hemmen die Reaktion schon in der Konzentration von 10^{-4}-m . vollständig. Ein nachträglicher Zusatz von Calcium im Überschuss führt in beiden Fällen zu einer totalen Reaktivierung, während Magnesium nur im Falle der Komplexonhemmung partiell wirksam ist. Bei Berücksichtigung der Komplexbildungskonstanten kann gefolgert werden, dass Magnesium nur indirekt durch Verdrängung des Calciums aus dem Calcium-Komplexon wirksam ist.

ATP hemmt das Enzymsystem ebenfalls; die Hemmung ist bei gleicher Konzentration etwa zehnmal geringer als mit Komplexon. Vergleichende Versuche mit ATP, ADP und Citrat und zusätzliche Versuche in calciumgepuffertem System bei $\text{pCa} = 4$ ergeben, dass die ATP-Hemmung zusammengesetzter Natur ist. Sie kommt einerseits durch den Entzug des Calciums infolge Komplexbildung, andererseits durch kompetitive Verdrängung des CoA vom Enzym zustande.

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

Ein Teil der Versuche wurde von Frl. *I. Leupin* ausgeführt. Wir möchten ihr für ihre Mitarbeit freundlichst danken.

Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Zürich.