

# Der Einfluß von Atractylosid auf den von Mitochondrien katalysierten $^{18}\text{O}$ -Austausch zwischen Phosphat und Wasser

Von

Günther Kreil

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 6. Dezember 1965)

Es gibt eine Reihe von Substanzen, welche die oxydative Phosphorylierung hemmen, ohne die Elektronenübertragung zwischen den reduzierten Cofermenten und Sauerstoff in entkoppelten Mitochondrien zu beeinflussen. Diese Inhibitoren, deren bestuntersuchter Vertreter das Antibiotikum Oligomycin ist<sup>1, 2</sup>, blockieren die Verwertung der bei der Endoxydation freigesetzten Energie zur Synthese des Adenosintriphosphats. Auch die Teilschritte dieser Synthese, wie z. B. die Austauschreaktionen zwischen anorganischem Phosphat und der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des Adenosintriphosphats ( $P_i$ —ATP-Austausch) und zwischen den Sauerstoffatomen des Phosphats und des Wassers ( $P_i$ — $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch) — Reaktionen, die an sich auch ohne Nettosynthese von ATP ablaufen können — werden gehemmt.

Atractylosid, das toxische Prinzip der Composita *Atractylis gummifera*, wurde von *Bruni et al.*<sup>3</sup> und von *Vignais et al.*<sup>4</sup> als ein Inhibitor der oxydativen Phosphorylierung charakterisiert, der wie Oligomycin die Energieübertragung und nicht den Elektronentransport blockiert. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß Atractylosid nur die Phosphorylierung des exogenen, nicht jedoch die des intramitochondrialen

---

<sup>1</sup> H. A. Lardy, D. Johnson und W. C. McMurray, Arch. Biochem. Biophys. **78**, 587 (1958).

<sup>2</sup> H. A. Lardy, J. L. Connelly und D. Johnson, Biochem. **3**, 1961 (1964).

<sup>3</sup> A. Bruni, A. R. Contessa und S. Luciani, Biochim. Biophys. Acta **60**, 301 (1962).

<sup>4</sup> P. V. Vignais, P. M. Vignais und E. Stanislas, Biochim. Biophys. Acta **60**, 284 (1962).

Adenosintriphosphats unterbindet<sup>5-7</sup>. *Klingenberg* et al.<sup>7, 8</sup> haben die Existenz eines spezifischen Austauschenzym postuliert, das den Transport der Adennucleotide durch die innere Membran der Mitochondrien regelt. Die Wirkung des Atractylosids wird auf eine Hemmung dieses Austauschenzym zurückgeführt, wodurch die *ATP*-Synthese und auch der  $P_i$ —*ATP*-Austausch bis auf einen kleinen, durch die intramitochondrialen Adennucleotide bedingten Restbetrag unterbunden werden. Eine eindeutige Differenzierung der Wirkungsweise des Atractylosids von der des Oligomycins sollte die Untersuchung des  $P_i$ — $H_2O$ -Austausches ermöglichen. Wenn Atractylosid nur den Transport der Adennucleotide hemmt, sollte es keinen Einfluß auf diese Austauschreaktion haben. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß Konzentrationen von Atractylosid, die die gekoppelte Atmung, die Phosphorylierung von exogenem *ADP* und den  $P_i$ —*ATP*-Austausch hemmen, ohne Wirkung auf den  $P_i$ — $H_2O$ -Austausch sind.

Rattenlebermitochondrien wurden nach *Schneider* und *Hogeboom*<sup>9</sup> durch differentielles Zentrifugieren isoliert und in 0,25*m*-Rohrzucker—10*mm*-Tris/Cl<sup>-</sup> (pH 7,4) suspendiert. Das Inkubationsmedium hatte folgende Zusammensetzung: 0,25*m*-Rohrzucker, 10*mm* Tris/Cl<sup>-</sup> (pH 7,4), 6*mm* KCl, 7*mm* MgCl<sub>2</sub>, 10*mm* KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (mit einem <sup>18</sup>O-Gehalt von 0,8% über dem natürlichen Wert) und 8 mg mitochondriales Protein in einem Volumen von 1 ml. Bei den aus der Tabelle ersichtlichen Proben wurden außerdem 0,5 Mikromol *ATP* oder *ADP*, 0,12 Mikromol Atractylosid (in 50proz. Äthanol gelöst) oder 20 Mikrogramm Oligomycin (in 96proz. Äthanol) zugesetzt. Die Proben ohne Inhibitor enthielten eine entsprechende Menge Äthanol. Die Reaktion wurde nach 2 Min. bei 30° C mit 2 ml 0,5*m*-Trichloressigsäure abgestoppt, 10 Mikromole KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (mit natürlichem <sup>18</sup>O-Gehalt) zugesetzt und das denaturierte Protein durch scharfes Zentrifugieren abgetrennt. Aus dem Überstand wurde das Phosphat als MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> isoliert, in 0,1*n*-HCl gelöst, durch Schütteln mit Tierkohle von Nucleotiden befreit und schließlich nach Chromatographie über eine Dowex-50-X8 Säule (H<sup>+</sup>-Form, 5×40 mm) als verd. Phosphorsäure erhalten. Diese Lösung wurde mit verd. KOH auf pH 4,4 eingestellt und eingedampft. Die Umwandlung des KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in CO<sub>2</sub> erfolgte nach der Methode von *Boyer* et al.<sup>10</sup> durch Erhitzen mit Guanidin-

<sup>5</sup> *J. B. Chappell* und *A. R. Crofts*, *Biochemie. J.* **95**, 707 (1965).

<sup>6</sup> *A. Kemp* und *E. C. Slater*, *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 178 (1964).

<sup>7</sup> *H. W. Heldt*, *H. Jacobs* und *M. Klingenberg*, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **18**, 174 (1965).

<sup>8</sup> *E. Pfaff*, *M. Klingenberg* und *H. W. Heldt*, *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 312 (1965).

<sup>9</sup> *W. C. Schneider* und *G. H. Hogeboom*, *J. Biol. Chem.* **183**, 123 (1950).

<sup>10</sup> *P. D. Boyer*, *D. J. Graves*, *C. H. Suelter* und *M. E. Dempsey*, *Analyt. Chem.* **33**, 1906 (1961).

hydrochlorid. Das  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis bestimmte ich an einem Massenspektrometer der Firma Balzers (Type CMS 80). Die Berechnung des  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausches erfolgte in der von Boyer et al.<sup>11</sup> angegebenen Weise; das Ergebnis ist in Mikromolen  $\text{H}_2\text{O}$  ausgedrückt. Alle Werte sind das Resultat von Doppelbestimmungen. Das verwendete Massenspektrometer erlaubt bei kleinen Gasmengen (20–30 Mikromole  $\text{CO}_2$ ) eine Bestimmung des  $^{18}\text{O}$ -Gehalts mit einer Genauigkeit von 1–2%. Nach Umrechnung auf die Zahl der umgesetzten Mikromole  $\text{H}_2\text{O}$  entspricht dies einem Fehler von 3–6%. Die einzelnen Mitochondrienpräparationen und die Wirkung der Inhibitoren wurden am Sauerstoffpolarographen („Oxygraph“ der Firma Gilson Medical Electronics)

Tabelle 1. Einfluß von Atractylosid und Oligomycin auf den  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch von Rattenlebermitochondrien

Probe	Zusatz	Inhibitor	Atom% $^{18}\text{O}$ Überschuß*	$^{18}\text{O}$ -Austausch Mikromol $\text{H}_2\text{O}/\text{Min.}$
Blindwert	—	—	0,804	0,00
1	—	—	0,642	4,50
2	—	Atr.	0,646	4,37
3	—	Ol.	0,788	0,40
4	ADP	—	0,640	4,55
5	ADP	Atr.	0,622	5,13
6	ATP	—	0,624	5,06
7	ATP	Atr.	0,608	5,58
8	ATP	Ol.	0,784	0,51

\* Der natürliche  $^{18}\text{O}$ -Gehalt des Phosphats (0,205 %) wurde bereits subtrahiert.

durch Bestimmung der Atmungskontrolle bzw. der Atmungshemmung geprüft. In einigen Fällen wurde auch der  $P_i$ - $\text{ATP}$ -Austausch bestimmt. Dies erfolgte durch Zusatz von trägerfreiem  $^{32}\text{P}$ -Phosphat (ca. 1 Mikrocurie pro Probe) zur Inkubationsmischung und nachfolgende Messung der Radioaktivität im  $\text{ATP}$  an einem aliquoten Anteil. In Übereinstimmung mit den Resultaten anderer Autoren wird dieser Austausch durch Atractylosid auf den in Abwesenheit von exogenem  $\text{ATP}$  gemessenen Wert reduziert.

Die Ergebnisse über den Einfluß von Atractylosid auf den von Rattenlebermitochondrien katalysierten  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch sind in Tab. 1 zusammengefaßt. In Abwesenheit von Adeninnucleotiden im Inkubationsmedium wurde eine leichte Hemmung beobachtet, die bei vier Experimenten zwischen 2 und 12% lag. Im Gegensatz dazu zeigt Oligomycin eine drastische, mehr als 90proz. Hemmung des  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausches.

<sup>11</sup> P. D. Boyer, W. W. Luchsinger und A. B. Falcone, J. Biol. Chem. **223**, 405 (1956).

In Gegenwart kleiner Mengen von Adeninnucleotiden bewirkt Atractylosid sogar eine schwache Stimulierung und der gemessene Austausch war bis zu 20% höher als der der Kontrollwerte ohne Inhibitor. Dabei muß noch berücksichtigt werden, daß bei Abwesenheit von Atractylosid  $^{18}\text{O}$ -markiertes Phosphat durch Phosphorylierung bzw. durch  $P_i$ - $\text{ATP}$ -Austausch in den Nucleotidpool transferiert wird. Wenn man diesen Verlust an  $^{18}\text{O}$ -Phosphat in Rechnung stellt, dann liegt bei den Proben 4 und 6 der tatsächliche  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch näherungsweise 10 bzw. 15% unter den in der Tabelle angegebenen Werten. Die Differenz im gemessenen  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch zwischen den Proben mit und jenen ohne Atractylosid vergrößert sich durch diese Korrektur. Es dürfte sich also um eine signifikante Erhöhung handeln, deren Ursache jedoch unbekannt ist.

Atractylosid repräsentiert somit einen neuen Typ von Inhibitor, der durch das Fehlen einer hemmenden Wirkung auf den  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch leicht von den anderen Inhibitoren der gekoppelten Atmung unterschieden werden kann. Die am  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch beteiligten Einzelreaktionen sind ebenso unbekannt wie der Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung selbst. Es gibt jedoch gute Hinweise, daß sämtliche Teilschritte der oxydativen Phosphorylierung einschließlich der Synthese des intramitochondrialen Adenosintriphosphats ungehemmt ablaufen müssen, um maximalen  $P_i$ - $\text{H}_2\text{O}$ -Austausch zu ermöglichen<sup>12</sup>. Das Fehlen einer signifikanten Hemmung dieser Austauschreaktion durch Atractylosid bestätigt auf unabhängigem Wege die von *Klingenberg et al.*<sup>7, 8</sup> entwickelten Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus dieses Inhibitors.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden am Mineralogischen Institut der Universität Wien unter der freundlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. *A. Preisinger* und Herrn Dr. *W. Kaltenecker* durchgeführt. Herrn Dr. *G. Saueremann* danke ich für die Überlassung von Atractylosid.

<sup>12</sup> *C. Cooper*, *Biochem. J.* **4**, 335 (1965).