

Einfluß von Co^{++} auf Hefemitochondrien

Von

H. Tuppy und W. Sieghart

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien, Österreich

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 11. April 1973)

Effect of Co^{++} on Yeast Mitochondria

Yeast mitochondria passively accumulate Co^{++} . The quantity of Co^{++} taken up (5 to 43 nmoles per mg of mitochondrial protein) rises about linearly with the concentration of Co^{++} in the medium over the concentration range investigated ($1.0 \cdot 10^{-4}$ to $9.1 \cdot 10^{-4}$ molar- Co^{++}). The Co^{++} accumulation causes a small increase in the density of the mitochondria and a change in their electronmicroscopic appearance.

Co^{++} in $3.3 \cdot 10^{-5}$ to $1.2 \cdot 10^{-4}$ molar concentration reversibly stimulates the respiration of intact yeast mitochondria in the presence of α -ketoglutarate. With succinate as the substrate, however, respiratory stimulation by Co^{++} is irreversible. When yeast mitochondria are incubated for a longer period with these amounts of Co^{++} , respiration and oxidative phosphorylation are inhibited and DNP fails to uncouple the respiration of the mitochondria. In the presence of succinate Co^{++} invariably uncouples mitochondrial respiration. The presence of substrate, ADP and phosphate in addition to Co^{++} is obligatory for these effects to occur.

In order to account for these results, at least two sites of action of Co^{++} in yeast mitochondria have to be considered.

Es ist schon lange bekannt, daß Säugetiermitochondrien verschiedene Ionen durch einen energieabhängigen, aktiven Transportprozeß aufnehmen können. So werden vor allem große Mengen an Ca^{++} rasch akkumuliert und mit dem gleichzeitig aufgenommenen Phosphat als unlösliches Salz abgeschieden¹. Bei Rattenlebermitochondrien führt diese massive Aufnahme von Ca^{++} und Phosphat zu einer Änderung der Dichte der Mitochondrien im Saccharosedichtegradienten²; bei einer elektronenmikroskopischen Untersuchung der Mitochondrien erkennt man elektronendichte Granula, die vermutlich vorwiegend aus abgeschiedenem Hydroxylapatit bestehen².

Gleichzeitig mit dem aktiven Transport von Ionen in Mitochondrien tritt eine starke Steigerung der mitochondrialen Atmung auf. *Rossi* und *Lehninger* zeigten³, daß bei geringen Ca^{++} -Konzentrationen eine reversible Stimulierung der Atmung, ähnlich der durch ADP bewirkten⁴, auftritt; diese dauert so lange, als Ca^{++} von den Mitochondrien aufgenommen wird. Es konnte gezeigt werden, daß auch die aktive Aufnahme von anderen Ionen, wie Sr^{++} , Mn^{++} , Ba^{++} und K^+ , in Mitochondrien mit einer Steigerung der Atmung verbunden ist¹.

Untersuchungen von *Carafoli* et al.⁵ haben gezeigt, daß Hefemitochondrien nicht in der Lage sind, Ca^{++} aktiv aufzunehmen; es spricht vieles dafür, daß den Hefemitochondrien ein funktionelles Ca^{++} -spezifisches Transportprotein fehlt. Dieses Fehlen eines solchen Ca^{++} -spezifischen Carriers schließt allerdings Transportvorgänge für andere Ionen nicht aus, wie der Nachweis eines durch Valinomycin induzierten aktiven K^+ -Transportes in Hefemitochondrien zeigt^{5, 6}.

In einer Arbeit von *Lindegren*⁷ wurde angegeben, daß sich Co^{++} spezifisch in den Mitochondrien anreichert, wenn man Hefe auf einem Co^{++} enthaltenden Medium züchtet. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit und auf welche Weise Co^{++} von den Hefemitochondrien aufgenommen wird.

Material und Methoden

Züchtung der Hefe und Isolierung von Hefemitochondrien

Saccharomyces carlsbergensis U2/2a, der Wildtypstamm von *Saccharomyces cerevisiae* D-261 (a/α , P/P, ρ^+ , diploid) und die aus letzterem durch Acriflavinbehandlung erhaltene cytoplasmatische Petite-Mutante D-261-1 (a/α , P/P, ρ^- , diploid) wurden aerob 24—26 Stdn. bei 27 °C gezüchtet. Bei dem Stamm *Saccharomyces carlsbergensis* U2/2a und bei einem Vergleich von Wildtyp- und Petite-Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* enthielt das Nährmedium 2% Difco-Pepton, 1% Difco-Hefeextrakt und 0,8% Glucose. Bei einem Großteil der Versuche wurde nur der Wildtypstamm D-261 untersucht und dabei als Zuchtmedium das von *Balcavage* und *Mattoon*⁸ angegebene „natural medium“ gewählt (2% Difco-Pepton, 1% Difco-Hefeextrakt, 0,1% Glucose, 3% Äthanol).

Bei der Zucht von Hefe in Gegenwart von Co^{++} wurde das von *Lindegren*⁷ angegebene Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet: 300 g Glucose, 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 60 g Difco-Pepton, 40 g Difco-Hefeextrakt, 2,5 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 10 l deionisiertes Wasser. Der Stamm wurde in diesem Medium einmal mit und einmal ohne Co^{++} -Zusatz 51 oder 73 Stdn. aerob bei 27 °C gezüchtet. Die Isolierung von Hefemitochondrien erfolgte bei 0—4 °C auf folgende Weise:

60 g Hefe wurden zweimal mit deionisiertem Wasser und einmal mit Homogenisationsmedium (0,6 Mol Mannit, 0,1 mMol *EDTA*, 4 g Rinderserumalbumin, 0,1 Mol Histidinpuffer, pH 6,8, ad 1 l) gewaschen und in 60 ml Homogenisationsmedium suspendiert. Die Suspension wurde in vier im Kühlschrank vorgekühlten *Merkenschlager*-gefäßen, die mit je 30 ml Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) beschickt worden waren, 15 Sek. mit 2000 upm im *Merkenschlager*-Zelldesintegrator⁹ aufgeschlagen. Die Suspension wurde in ein eisgekühltes Becherglas dekantiert, der Glasperlenrückstand mit insgesamt 90—120 ml Waschmedium (1 l enthielt 0,6 Mol Mannit und 3 g Rinderserumalbumin, pH 6,8) dreimal gewaschen, die Waschflüssigkeit mit der dekantierten Suspension vereinigt und die Mischung einmal bei 1500—2000 $\times g$ in der Christ-UKJ-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und 20 Min. bei 10 000 $\times g$ in der MSE-HS18-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen, das sedimentierte Material in 60 ml Waschmedium suspendiert und nochmals 20 Min. bei 10 000 $\times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde nach Entfernung der auf ihm locker sitzenden Schicht in 30 ml Waschmedium suspendiert. Das bei 1500 $\times g$ innerhalb von 10 Min. abgeschiedene Material wurde verworfen, der Überstand hierauf bei 10 000 $\times g$ 20 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit Waschmedium gespült und sodann in einer Konzentration von 10 mg mitochondriales Protein/ml in Waschmedium suspendiert.

Zur Bereitung sämtlicher Lösungen wurden nur die reinsten Reagentien verwendet. Die gute Qualität der Mitochondrien wurde mit Hilfe eines Sauerstoffpolarographen der Fa. Gilson durch Messung der *RC*- und *ADP/O*-Werte der Mitochondrien nach *Chance* und *Williams*⁴ laufend kontrolliert. Mit der beschriebenen Isolationsmethode wurden *RC*-Werte von 4,2 bis 7,5 bei α -Ketoglutarat und 2,2—3,5 bei Succinat erreicht. Die *ADP/O*-Werte bewegten sich bei α -Ketoglutarat im Bereich von 2,2—2,5 und bei Succinat von 1,4 bis 1,6. Proteinbestimmungen erfolgten nach *Lowry* et al.¹⁰.

Untersuchung der Aufnahme von $^{60}\text{Co}^{++}$ in Hefemitochondrien

Zur Messung der Aufnahme von $^{60}\text{Co}^{++}$ in Hefemitochondrien wurden jeweils vier identische Meßproben, die 0,1 ml Mitochondrien-suspension und 2 ml Inkubationsmedium (s. Tab. 1) enthielten, sowie vier Vergleichsproben (0,1 ml einer Lösung, die 0,6 Mol Mannit und 0,3% Rinderserumalbumin im Liter enthielt und 2 ml Inkubationsmedium) hergestellt und 30 Min. bei 27 °C inkubiert.

Hierauf wurde abzentrifugiert und die Radioaktivität eines bekannten Volumens des Überstandes bestimmt. Das Mitochondriensediment

Tabelle 1. *Abhängigkeit der $^{60}\text{Co}^{++}$ -Aufnahme in Hefemitochondrien von verschiedenen $^{60}\text{Co}^{++}$ -Konzentrationen*

A. Ergebnisse aus dem Überstand:

Co ⁺⁺ -Menge in 2 ml Inkubationsmedium*	spezifische Aktivität counts/ μMol	eingesetzte counts	gemessene counts im Überstand	aufgenommene counts (Diff. von Spalte 3 + 4)	aufgenommene Co ⁺⁺ -Menge pro mg Protein
0,22 $\mu\text{Mole Co}^{++}$	1 170 000	259 500	254 000	5 500	5 nMole
0,75 $\mu\text{Mole Co}^{++}$	1 170 000	876 300	843 700	32 600	28 nMole
1,91 $\mu\text{Mole Co}^{++}$	109 000	208 500	203 800	4 700	43 nMole

B. Ergebnisse aus dem Pellet:

Co ⁺⁺ -Menge in 2 ml Inkubationsmedium*	spezifische Aktivität counts/ μMol	eingesetzte counts	gemessene counts im Pellet	aufgenommene counts im Pellet**	aufgenommene Co ⁺⁺ -Menge pro mg Protein
0,22 $\mu\text{Mole Co}^{++}$	1 170 000	259 500	12 000	4 200	4 nMole
0,75 $\mu\text{Mole Co}^{++}$	1 170 000	876 300	36 000	28 200	24 nMole
1,91 $\mu\text{Mole Co}^{++}$	109 000	208 500	12 800	5 000	46 nMole

* Das Inkubationsmedium enthielt pro Liter 0,6 Mol Mannit, 10 mMol Phosphatpuffer (pH 6,5), 10 mMol Ketoglutarat, 0,121 mMol ADP und die in der Tabelle angegebenen Co⁺⁺-Mengen. In 0,1 ml zugesetzter Mitochondriensuspension befand sich 1 mg mitochondriales Protein.

** Von den counts in Spalte 4 wurde der Background von 7 800 counts abgezogen.

wurde einmal mit einer Lösung, die 0,6 Mol Mannit und 10 mMole Tris-SO_4 (pH 6,8) im Liter enthielt, oberflächlich abgespült, dann nach Trockenwischen der Wand des Zentrifugenglases in Wasser resuspendiert und in bekannten Volumina zur radioaktiven Messung gebracht.

Untersuchungen der Mitochondrien im Dichtegradienten

0,5 ml Mitochondriensuspension (etwa 10 mg mitochondr. Protein/ml) wurde mit 10 ml des jeweiligen Inkubationsmediums vermischt, 30 Min. bei 27 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Hierauf wurden die in 0,6 molarem-Mannit/10 mmolarem- Tris-SO_4 (pH 6,8) resuspendierten Mitochondrien auf einen Saccharosedichtegradienten (20—70% Saccharose, 10 mMole- Tris-SO_4 , pH 6,8, pro l) gelegt und 3 Std. in der Beckman-L2 65B-Zentrifuge mit 25 000 rpm zentrifugiert. Die Mitochondrienbanden wurden mit einer gebogenen Kanüle und einer Injektionsspritze abgehoben, und ihre Dichte mit einem Mikropyknometer der Fa. Haack gemessen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hefemitochondrien

0,5 ml Mitochondriensuspension wurde mit 10 ml einer Lösung, die pro Liter 0,6 Mol Mannit, 10 mMol Phosphatpuffer (pH 6,5), 10 mMol Ketoglutar säure, 0,121 mMol ADP, 1 mMol CoCl_2 enthielt, und zum Vergleich mit demselben Medium ohne Co^{++} 30 Min. bei 27 °C inkubiert, dann abzentrifugiert und in 0,6 molarem Mannit/10 mmolarem Tris-SO_4 (pH 6,5) mit 1% Glutaraldehyd fixiert. Nach 30 Min. bei 0 °C wurde abzentrifugiert, mit einer Lösung aus 0,6 Mol Mannit/1 mMol EDTA pro l gewaschen, dann mit 1 ml OsO_4 -Veronalacetat-Lösung überschichtet und am Vortex kurz geschüttelt. Nach 2 Std. Stehen bei 4 °C wurde abzentrifugiert, mit Aceton entwässert und das Sediment in Epikoteharz eingebettet. Hierauf wurden Dünnschnitte der Präparation angefertigt und diese dann im Elektronenmikroskop untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Wenn man Hefemitochondrien des Stammes D-261 in 10 ml eines Mediums, das in 1 l 0,6 Mol Mannit, 10 mMol Phosphatpuffer (pH 6,5), 10 mMol Ketoglutarat oder Succinat, 0,121 mMol ADP und 1 mMol Co^{++} enthält, inkubiert und die wiedergewonnenen Mitochondrien durch einen Saccharosedichtegradienten zentrifugiert, so stellt man eine nicht sehr starke, aber deutliche Dichteänderung der Mitochondrien fest. Zeigen Mitochondrien, die in demselben Medium ohne Co^{++} inkubiert wurden, eine Dichte von etwa 1,18 g/cm³, so verschiebt sich der Schwerpunkt der Mitochondrienbande in Anwesenheit von Co^{++} auf 1,20 g/cm³. Ver-

wendet man niedrigere Co^{++} -Konzentrationen, so ist die beobachtete Dichteänderung geringer; bei Co^{++} -Konzentrationen, die 1 mMol/l überschreiten, erleiden die Mitochondrien eine Agglutination und sinken im Gradienten zu Boden. Dieselbe Dichteänderung wie mit 1 mMol Co^{++} /l in dem oben beschriebenen Medium erhält man aber auch, wenn in diesem Medium zusätzlich noch 50 μMol DNP pro l enthalten sind oder 15 μl methanol. Antimycin A-Lösung (1 mg/ml) zugesetzt werden. Diese Konzentrationen an 2,4-Dinitrophenol und Antimycin A sind geeignet, die mitochondriale Atmung zu entkoppeln bzw. völlig zu inhibieren. Auch in einem Medium, das pro Liter nur 0,6 Mol Mannit, 10 mMol *Tris*- SO_4 , pH 6,8, und 1 mMol CoCl_2 enthält, tritt die Dichteänderung der Mitochondrien in derselben Stärke auf. Diese Befunde zeigen, daß die Dichteänderung der Mitochondrien in Gegenwart von Co^{++} sicherlich nicht durch einen atmungsabhängigen Prozeß zustande kommen. Dieser Schluß wird auch durch die Tatsache, daß Petite-Mitochondrien ebenfalls mit Co^{++} eine Dichteänderung zeigen, bestätigt. Wenn diese Dichteänderung auf eine Co^{++} -Aufnahme zurückzuführen ist, kann es sich also nur um einen passiven, atmungsunabhängigen Prozeß handeln. Um feststellen zu können, ob und in welcher Menge Co^{++} von Hefemitochondrien aufgenommen wird, wurden Untersuchungen mit $^{60}\text{Co}^{++}$ durchgeführt.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, werden von 1,91 μMolen CoCl_2 , welche in einem Gesamtvolumen von 2,1 ml enthalten waren, nur 43 nMole Co^{++} /mg mitochondr. Protein von den Mitochondrien aufgenommen. Die aufgenommene Co^{++} -Menge ändert sich auch nicht signifikant in Gegenwart von DNP (Verminderung um 7%) und Antimycin A (Steigerung um 14%) in Konzentrationen, die die Atmung der Mitochondrien völlig entkoppeln bzw. inhibieren. Diese Befunde bestätigen die schon vorher geäußerte Vermutung, daß die Aufnahme von Co^{++} ein atmungsunabhängiger Prozeß ist. Wenn die eingesetzte Co^{++} -Konzentration variiert wurde, stellte sich heraus, daß sich die aufgenommene Co^{++} -Menge in dem untersuchten Konzentrationsbereich proportional zur Co^{++} -Konzentration im Medium ändert (Tab. 1). Da auch die Abwesenheit von Phosphat im Inkubationsmedium weder einen Einfluß auf die aufgenommene Co^{++} -Menge noch auf die durch Co^{++} bewirkte Dichteänderung hat, kann man mit Sicherheit die Bildung einer nennenswerten Menge an $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$ als Ursache für die Dichteänderung der Mitochondrien ausschließen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hefemitochondrien, die mit Co^{++} inkubiert worden waren, zeigten tatsächlich keine elektronendichten Granula. Die Mitochondrien waren vielmehr geschwollen und zeigten große elektronendurchlässige Bezirke; die mitochondriale Matrix, die man bei den ohne Co^{++} inkubierten Vergleichsmitochondrien deutlich

sehen konnte, war zum Teil verschwunden oder gänzlich an den Rand der Mitochondrien gerückt. Da bekannt ist, daß geschwollene Mitochondrien mit zerrissener äußerer Membran eine erhöhte Dichte aufweisen¹¹, läßt sich auf diese Weise die Dichteänderung der Mitochondrien in Gegenwart von Co^{++} erklären.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß durch die Isolierung der Mitochondrien ihre Fähigkeit Co^{++} zu akkumulieren verringert wurde, wurde der Stamm D-261 51 und 73 Stdn. in Gegenwart von Co^{++} gezüchtet. Nach 51 Stdn. Zucht des Hefestammes in Gegenwart von Co^{++}

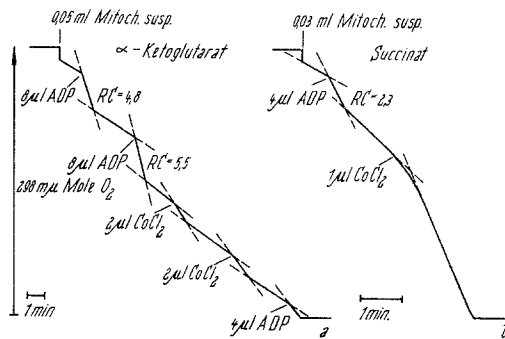


Abb. 1. Einfluß von Co^{++} auf die Atmung von Hefemitochondrien; (A) mit Ketoglutarat, (B) mit Succinat als Substrat. Atmungsmedium: 0,6 Mole Mannit, 10 mMole Phosphatpuffer, pH 6,5, 10 mMole Substrat pro l. Zusätze: 10 mg/ml ADP, 0,1 molares CoCl_2 , 10 mg mitoch. Protein pro ml. Das Volumen der Meßzelle betrug 1,52 ml, die Meßtemperatur war 27 °C

zeigten die Mitochondrien keinerlei Schädigung der oxidativen Phosphorylierung, dagegen waren sie nach 73 Stdn. Zucht in Gegenwart von Co^{++} deutlich geschädigt, wie man an den geringen RC -Werten erkennen konnte. Die Dichte solcher Mitochondrien war wohl etwas größer als die von Vergleichsmitochondrien, nicht jedoch gegenüber derjenigen in vitro mit Co^{++} behandelten Mitochondrien erhöht. Sie ließ sich auch durch Inkubation in einem Co^{++} enthaltenden Medium nicht mehr wesentlich erhöhen.

Der in dieser Arbeit beschriebene Effekt von Co^{++} auf die Dichte und Morphologie von Hefemitochondrien ist nicht auf den untersuchten Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* beschränkt, sondern ließ sich auf ähnliche Art auch bei *Saccharomyces carlsbergensis* U2/2a beobachten.

Das von den Mitochondrien aufgenommene Co^{++} beeinflusst jedoch nicht nur Dichte und Gestalt dieser Organellen, sondern auch — je nach verwendetem Substrat verschieden — die mitochondriale Atmung und oxidative Phosphorylierung. Bei Mitochondrien, denen Phosphat,

α -Ketoglutarat und ADP zugesetzt worden sind, bewirkt $3,3 \cdot 10^{-5}$ bis $1,25 \cdot 10^{-4}$ molares Co^{++} eine vorübergehende und bei mehrmaliger Zugabe wiederholbare Beschleunigung der Atmung (Abb. 1 A). Wenn hingegen das Substrat α -Ketoglutarat durch Succinat ersetzt worden ist, löst Co^{++} (im Konzentrationsbereich von $3,3 \cdot 10^{-5}$ bis $1,25 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) eine starke, irreversible Atmungsbeschleunigung aus (Abb. 1 B). Diese Entkopplung der Atmung kann durch DNP nicht weiter verstärkt, wohl aber durch $5,6 \cdot 10^{-6}$ molares Antimycin A oder durch 10 mmolares Malonat, einen Inhibitor der Succinatdehydrogenase, verhindert werden.

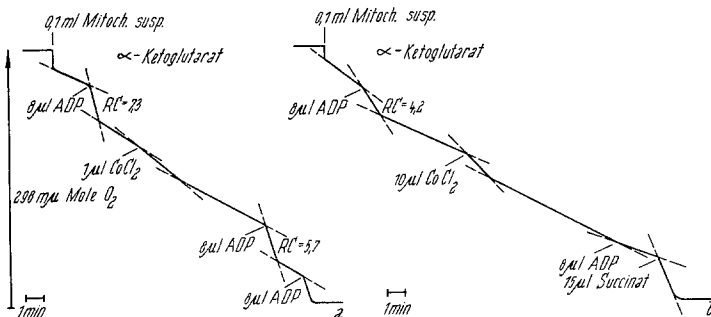


Abb. 2. Inhibition der oxidativen Phosphorylierung durch Co^{++} . Die Bestandteile des Atmungsmediums, die Konzentrationen der Zusätze und die Meßbedingungen waren wie bei Abb. 1 beschrieben. Substrat war 10 mmolares Ketoglutarat. Während der Messung wurde Succinat als 1 molare Lösung zugesetzt

Der Effekt dürfte also über die Atmungskette zustande kommen und nicht etwa Ausdruck einer durch Co^{++} ausgelösten unspezifischen Oxidation sein. Zu einer derartigen Beschleunigung der Atmung in Gegenwart von Succinat als Substrat gibt es Parallelen in der Literatur. *Balcavage* und *Mattoon* fanden, daß bei Hefemitochondrien die Succinat-oxidation bei Entzug von Phosphat entkoppelt ist; sie schlossen daraus, daß Phosphat bei der Oxidation von Succinat als Kopplungsfaktor wirkt. In einer anderen Arbeit berichten *Balcavage* et al.¹², daß das Antibiotikum Filipin bei Hefemitochondrien mit Succinat als Substrat ebenfalls eine Entkopplung der Atmung bewirkt; sie äußerten die Vermutung, daß Filipin die Permeabilität für Phosphat und dadurch die Phosphatkonzentration in den Mitochondrien verringert. Auf Grund des Phosphatmangels in den Mitochondrien sollte sich eine Entkopplung der Succinat-oxidation ergeben. Es ist durchaus denkbar, daß Co^{++} die Phosphatkonzentration in den Mitochondrien zumindestens lokal verringert, indem es mit Phosphat ein schwer lösliches Salz bildet.

Die Wirkung des Co^{++} auf die Atmung der Mitochondrien mit Keto-glutarat als Substrat ist dagegen vielfältiger. Geringe Co^{++} -Konzentrationen ($3,3 \cdot 10^{-5}$ bis $1,25 \cdot 10^{-4}$ Mole Co^{++} pro l) verursachen die oben bereits erwähnte reversible Beschleunigung der Atmung und eine nur

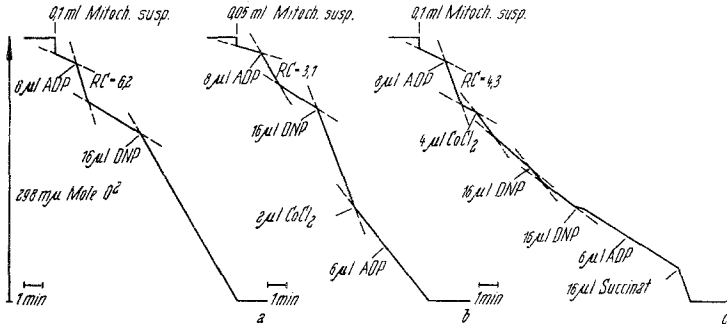


Abb. 3. Inhibition der durch DNP entkoppelten mitochondrialen Atmung durch Co^{++} . Die Bestandteile des Atmungsmediums, die Konzentrationen der Zusätze und die Meßbedingungen waren wie bei Abb. 2 beschrieben. 2,4-Dinitrophenol wurde als 5 mmolare Lösung zugesetzt

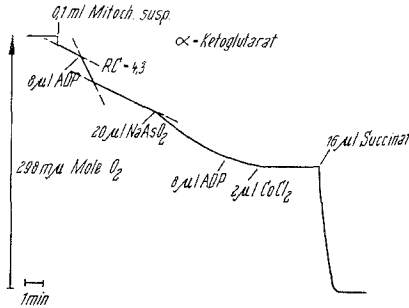


Abb. 4. Einfluß von Arsenit auf den Co^{++} -Effekt. Die Bestandteile des Atmungsmediums, die Konzentrationen der Zusätze und die Meßbedingungen waren wie bei Abb. 2 beschrieben. NaAsO_2 wurde als 0,1 molare Lösung zugesetzt

schwache Verringerung des RC -Wertes der Mitochondrien bei unmittelbar anschließendem Zusatz von ADP (Abb. 2 A). Nach längerdauernder Einwirkung von geringen Co^{++} -Konzentrationen auf die Mitochondrien kommt es hingegen zu einer starken Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und Atmung. Setzt man den Mitochondrien eine größere Co^{++} -Konzentration ($5 \cdot 10^{-4}$ bis $1,25 \cdot 10^{-3}$ Mole pro l) zu, so läßt sich zunächst eine stärkere reversible Atmungsstimulierung, in der Folge jedoch eine völlige Inhibition der oxidativen Phosphorylierung und eine

progressive Inhibition der Atmung beobachten (Abb. 2 B). Die reversible Stimulierung der Atmung durch Co^{++} in Gegenwart von Ketoglutarat ist an die gleichzeitige Anwesenheit von Phosphat und ADP gebunden. In Abwesenheit von Phosphat oder ADP treten höchstens ganz kurze Stimulierungen der Sauerstoffaufnahme auf, die sofort in eine Atmungsinhibition übergehen. So wie bei Succinat wird auch bei α -Ketoglutarat als Substrat der Co^{++} -Effekt durch den Atmungsinhibitor Antimycin A inhibiert; dagegen ist 50 $\mu\text{molares}$ 2,4-Dinitrophenol nicht mehr in der Lage, nach Co^{++} -Zusatz die Atmung der Mitochondrien zu entkoppeln (Abb. 3 C). Wie in Abb. 3 B zu sehen ist, hebt Co^{++} die entkoppelnde Wirkung des DNP auf, wenn Ketoglutarat das Substrat ist. In Abwesenheit von ADP genügen dazu geringere Co^{++} -Konzentrationen als in seiner Anwesenheit.

10 mmolares Malonat, das den Co^{++} -Effekt auf die Succinatoxidation inhibiert, hat bei Ketoglutarat kaum einen Einfluß auf die reversible Stimulierung der Atmung durch Co^{++} . Dagegen läßt sich dieser Effekt durch 1,3 mmolares Arsenit, das die Ketoglutaratdehydrogenase hemmt, verhindern. Wie man aus der Abb. 4 erkennt, veranlaßt aber ein Zusatz von Succinat zu den durch Arsenit gehemmten, mit Ketoglutarat inkubierten Mitochondrien eine starke Beschleunigung der mitochondrialen Atmung.

Diese Befunde sprechen dafür, daß der Einfluß von Co^{++} auf die Oxidation von Ketoglutarat zwar auch mit Hilfe der Atmungskette, aber doch auf andere Weise als der Effekt von Co^{++} auf die Oxidation von Succinat zustande kommen muß. Die Tatsache, daß Co^{++} nicht mit allen Substraten eine reversible Stimulierung der Atmung bewirkt, zeigt, daß diese Wirkung nicht durch einen direkten Einfluß des Co^{++} auf die Atmungskette oder die mitochondriale ATP-ase zustande kommen kann. Dieser Effekt ist auch nicht auf eine katalytische Wirkung des Co^{++} zurückzuführen, da eine solche eine ständige Beschleunigung der Atmung zur Folge hätte.

Am besten lassen sich die Versuchsergebnisse durch eine Gleichgewichtsreaktion des Co^{++} mit einem Zwischenprodukt des Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes unter Oxidation zu Co^{+++} und gleichzeitigem Sauerstoffverbrauch erklären. So wäre es zum Beispiel denkbar, daß Co^{++} in einer reversiblen Reaktion von Succinyliponsäurethioester komplex gebunden und durch die Atmungskette unter Sauerstoffverbrauch zu einem Co^{+++} -Komplex oxidiert wird. Nach Einstellung sämtlicher an dieser Reaktion beteiligter Gleichgewichte käme der zusätzliche Sauerstoffverbrauch zum Stillstand und ginge die Atmung wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Mit Hilfe dieser Hypothese lassen sich alle hier beschriebenen Effekte von Co^{++} auf Hefemitochondrien in Gegenwart von Ketoglutarat als Substrat erklären¹³.

Der hier beschriebene Einfluß des Co^{++} auf die mitochondriale Atmung wurde hauptsächlich bei *Saccharomyces cerevisiae* D-261 untersucht. Doch verhält sich der von D-261 gänzlich verschiedene *Saccharomyces carlsbergensis* Stamm U2/2a gegenüber Co^{++} auf sehr ähnliche Weise. Es ist daher anzunehmen, daß solche Effekte zumindestens für Hefen allgemeinere Gültigkeit haben.

Wir sind Herrn Prof. Dr. *E. Broda* für die Überlassung des γ -Spektrometers und von $^{60}\text{CoCl}_2$, Herrn Prof. Dr. *L. Stockinger* für elektronenmikroskopische Aufnahmen und Frau Dr. *U. Wintersberger* für den von ihr zur Verfügung gestellten *Saccharomyces carlsbergensis* Stamm U2/2a aufrichtig verbunden. Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für großzügige Unterstützung (Projekt Nr. 1210).

Literatur

- ¹ *A. L. Lehninger, E. Carafoli und C. S. Rossi*, Adv. Enzymol. **29**, 259 (1967).
- ² *J. W. Greenawalt, C. S. Rossi und A. L. Lehninger*, J. Cell Biol. **23**, 21 (1964).
- ³ *C. S. Rossi und A. L. Lehninger*, J. Biol. Chem. **239**, 3971 (1964).
- ⁴ *B. Chance und G. R. Williams*, J. Biol. Chem. **217**, 383 (1955).
- ⁵ *E. Carafoli, W. X. Balcavage, A. L. Lehninger und J. R. Mattoon*, Biochim. Biophys. Acta **205**, 18 (1970).
- ⁶ *V. I. Golubkov, T. B. Kazakova und V. G. Leontev*, Biokhimya **34**, 944 (1969).
- ⁷ *C. C. Lindegren und P. M. Be Miller*, Canad. J. Genet. Cytol. **11**, 987 (1969).
- ⁸ *W. X. Balcavage und J. R. Mattoon*, Biochim. Biophys. Acta **153**, 521 (1968).
- ⁹ *M. Merckenschlager, K. Schlossmann und W. Kurz*, Biochem. Z. **329**, 332 (1951).
- ¹⁰ *O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. R. Farr und R. J. Randall*, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- ¹¹ *R. Wattiaux, S. Wattiaux-De Coninck und M. F. Ronveau-Dupal*, Europ. J. Biochem. **22**, 31 (1971).
- ¹² *W. X. Balcavage, M. Beale, B. Chasen und J. R. Mattoon*, Biochim. Biophys. Acta **162**, 525 (1968).
- ¹³ *W. Sieghart*, Dissertation an der phil. Fakultät der Univ. Wien (1972).