Polarographische Messungen der Atmung bei niedrigen Sauerstoffdrucken

D. HEGNER und H. GLOSSMANN

Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. med. M. FRIMMER)

(Z. Naturforsch. 20 b, 234—244 [1965]; eingegangen am 12. November 1964)

Die von LÜBBERS¹ entwickelte polarographische Meßanordnung wurde für die Registrierung der Atmung an isolierten Zellen und Mitochondrien bei niedrigen O₂-Drucken adaptiert. Bei dieser Versuchsanordnung verbrauchen die atmenden Partikel den im System gelösten Sauerstoff, so daß der P_{O₂} laufend absinkt. Die Geschwindigkeit des O₂-Verbrauches bleibt in einem weiten Bereich konstant und wird erst von einem kritischen O₂-Druck (KD) an vermindert. Als Halbwertdruck (HWD) wird der P_{O₂} bezeichnet, bei dem die Atmung noch 50% des maximalen Umsatzes beträgt.

Bei Herzmuskel-Sarkosomen, Leber-Mitochondrien, Tumorzell-Mitochondrien und Ascites-Tumorzellen bleibt der KD und HWD innerhalb eines bestimmten Bereiches konstant, wenn man im Versuchsansatz die Konzentration der atmenden Partikel steigert. Von einer bestimmten Konzentration bzw. Atmungsgröße an (Grenzmaximalatmung), die temperaturabhängig ist, steigt zuerst der HWD und dann der KD in Abhängigkeit von der Konzentration der atmenden Partikel. Im Bereich jenseits der Grenzmaximalatmung ist die polarographische Meßanordnung nicht mehr zuverlässig, da dort eine zunehmende Aggregation der Partikel stattfindet.

Unterhalb der Grenzmaximalatmung ist der HWD dem Q_{O₂}/mg Protein der atmenden Partikel direkt, dem KD umgekehrt proportional. Der KD nimmt bei steigender Temperatur und damit zunehmender Maximalatmung ab. Berücksichtigt man die Grenzmaximalatmung und damit die Grenze der Zuverlässigkeit der polarographischen Methode, so findet man für 37 °C niedrigere KD's als sie bisher angegeben wurden.

Bei niedrigen P_{O₂} ist $\frac{v_{\max} - v}{v}$ von P_{O₂} abhängig. Bei 22,5 °C ist „r“ dem Q_{O₂}/mg Protein proportional. Integriert man die Michaelis-Funktion für „r“ = verschieden von 1“, so stimmen die errechneten und gemessenen Punkte der Atmungskurven überein, sofern die Grenzmaximalatmung nicht überschritten wird.

Die Atmung von Mitochondrien ist in einem weiten Konzentrationsbereich vom Sauerstoffdruck unabhängig. Sie nimmt erst bei verhältnismäßig niedrigen O₂-Partialdrucken (Kritischer Druck) ab. Die Größe des kritischen O₂-Druckes interessiert im Zusammenhang zahlreicher pathophysiologischer Probleme der Hypoxie und Anoxie. Die Messung kritischer Drucke und sog. Halbwertdrucke* kann auf zweierlei Weise erfolgen:

1. Bei der manometrischen Messung des O₂-Verbrauchs isolierter Zellen oder Mitochondrien wird im Bereich niedriger O₂-Drucke die Diffusion vom Gasraum in die Suspension der atmenden Partikel limitierend. Durch rasche Rotation des Meßgefäßes auf einem Exzenter gelang es WARBURG und KUBOWITZ² sowie BÄNDER und KIESE³ die klassische manometrische Methode so zu modifizieren, daß die Oberfläche der Suspension genügend groß wurde

und die Diffusion zu vernachlässigen war. Die Nachteile des Verfahrens liegen in der Gefahr der Beschädigung der Mitochondrien, in der Aufwendigkeit der Apparatur und in der Unmöglichkeit der Durchführung größerer Meßserien mit einer Mitochondrien-Präparation.

2. Bei der polarographischen Messung des O₂-Verbrauchs veratmen suspendierte Mitochondrien den physikalisch gelösten Sauerstoff des Suspensionsmediums. Die Versuchsanordnung enthält keinen Gasraum. Deswegen entfällt das Problem der Diffusion vom Gasraum zum Suspensionsmedium. Da durch den O₂-Verbrauch die O₂-Spannung der Suspensionsflüssigkeit laufend absinkt, kann in jeweils einem Versuch die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der O₂-Konzentration direkt gemessen werden. Voraussetzung ist dabei, daß die Substratkonzentration genügend hoch ist. Dieses

¹ U. GLEICHMANN u. D. W. LÜBBERS unter technischer Mitwirkung von W. BÜRGER u. W. ESCHWEILER, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 271, 431 [1960].

* O₂-Druck, bei dem Atmung halb so groß ist wie unter Luft.

² O. WARBURG u. F. KUBOWITZ, Biochem. Z. 241, 5 [1929].

³ A. BÄNDER u. M. KIESE, Arch. exp. Path. u. Pharmak. 224, 312 [1955].

Verfahren erlaubt, in kurzer Zeit viele Messungen durchzuführen.

Die Vorteile der polarographischen Meßtechnik wurden von TÖDT⁴ ausführlich diskutiert. Polarographische Messungen wurden bereits 1941 von WINZLER⁵ an Bäckerhefe mit der Hg-Tropfelektrode, 1954 und 1957 von LONGMUIR^{6,7} an Bakterien und Rattenleberzellen mit der Goldelektrode, von CHANCE⁸ und DAVID C. WHITE⁹ mit einer Platin-elektrode durchgeführt.

Die von LÜBBERS und Mitarbb.¹ zur Messung von O₂-Spannungen im Blut entwickelte Ganzglas-Platin-elektrode versetzte uns in die Lage, ohne nennenswerte Schwierigkeiten die Abhängigkeit des O₂-Verbrauchs von der O₂-Konzentration bei Leber-Mitochondrien, Herzmuskel-Sarkomen, Ascites-Tumorzellen und Tumorzell-Mitochondrien unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu messen. Ziel dieser Arbeit war, das für die Messung stationärer, verhältnismäßig hoher O₂-Konzentrationen entwickelte Verfahren für die Registrierung des O₂-Verbrauchs bei extrem niedrigen Drucken zu adaptieren. Bei früheren Untersuchungen¹⁰ war uns aufgefallen, daß die Mitochondrienmenge im Versuchsansatz nicht ohne Einfluß auf die gemessenen Halbwert- und kritischen Drucke der O₂-abhängigen Atmung war, sofern die maximale O₂-Aufnahme einen bestimmten Höchstwert überschritt. Wir haben versucht, dieses Phänomen für die von uns verwendete Meßanordnung zu klären. Da die in der Literatur bereits mitgeteilten Daten von Halbwertdrucken, Kritischen Drucken bei Mitochondrien und Mikroorganismen erheblich voneinander abweichen und auch die Deutung der Befunde uneinheitlich ist, haben wir das Problem erneut bearbeitet.

WARBURG und KUBOWITZ² fanden, daß bei Kugelbakterien die *kritischen Drucke* um so niedriger waren, je kleiner die verwandte Zellmenge oder je größer das verwandte Suspensionsvolumen war. Als Ursache hierfür sahen diese Verfasser die Begrenzung des Gasaustausches zwischen Gasraum und Flüssigkeit an. Bei tieferen Temperaturen waren die kritischen Drucke niedriger, was mit der größeren Löslichkeit des Sauerstoffes erklärt wurde.

WINZLER⁵ fand bei Bäckerhefe ebenfalls eine Abhängigkeit des kritischen Druckes von der Temperatur (0,6 Torr bei 5 °C, 6 Torr bei 34 °C). Weder die größere Löslichkeit des Sauerstoffes bei niedrigen Temperaturen, noch Diffusion durch das Zellprotoplasma, sondern eine Eigenschaft des O₂-übertragenden Fermentes ist nach WINZLER die Ursache für dieses Phänomen. BÄNDER und KIESE³ konnten aus methodischen Gründen den kritischen O₂-Druck für Rattenleber-Mitochondrien nur näherungsweise bestimmen. LONGMUIR⁶ fand im Gegensatz zu den oben erwähnten Untersuchern einen „wahren kritischen Druck“, d. h. bei einem ganz bestimmten O₂-Druck fiel bei seiner Versuchsanordnung die Geschwindigkeit der Atmung plötzlich ab. Dieser „wahre kritische Druck“ war nach LONGMUIR um so besser meßbar, je größer die Maximalgeschwindigkeit gewählt wurde. LONGMUIR⁶ gab aber für diesen „wahren kritischen Druck“ keinen Zahlenwert an. Er wies lediglich daraufhin, daß er etwa 4–5-mal so groß wie der Halbwertdruck sei.

Ähnliche divergierende Ergebnisse und Deutungen finden sich in der Literatur über den Halbwertdruck. WARBURG und KUBOWITZ fanden bei Kugelbakterien und WINZLER⁵ bei Bäckerhefe eine Abhängigkeit des Halbwertdruckes (HWD) von der Temperatur. Er wurde mit steigender Temperatur größer — verhielt sich also ähnlich dem kritischen Druck. WINZLER wies für Bäckerhefe nach, daß die Diffusion durch das Plasma für die Größe des HWD nicht bestimmend sein kann. Im Gegensatz dazu fand LONGMUIR⁶ eine direkte Proportionalität zwischen HWD und Größe der von ihm untersuchten Organismen*.

Bei größeren Organismen spielt nach LONGMUIR⁶ die Diffusion eine entscheidende Rolle für die Größe des HWD. Das größte von ihm untersuchte Objekt, die Bäckerhefe (Zelldurchmesser etwa 5,5 μ), bildete eine Ausnahme. Bei Hefe wurde merkwürdigerweise nicht der größte HWD ermittelt. 1957 untersuchte LONGMUIR⁷ Rattenleberzellen und fand eine Abhängigkeit des HWD von der Succinatkonzentration und der Temperatur. Die HWD's waren der Maximalgeschwindigkeit direkt proportional. Bei einem Vergleich der HWD's für Rattenleberzellen mit den von BÄNDER und KIESE³ untersuchten Rattenleber-Mitochondrien wies LONGMUIR⁷ daraufhin (ohne Meßwerte anzugeben), daß die Diffusion des Sauerstoffes durch das Protoplasma *kein* limitierender Faktor sei. Aktivierungsenergie und Grundreaktionswärme seien für Zellen und Mitochondrien etwa gleich, während der HWD für Zellen bei vergleichbarer Atmungsgröße etwas höher liege.

⁴ F. TÖDT, Walter Gruyter-Verlag, Berlin 1958.

⁵ R. J. WINZLER, J. cellular comparat. Physiol. 17, 263 [1941].

⁶ I. S. LONGMUIR, Biochem. J. 57, 81 [1954].

⁷ I. S. LONGMUIR, Biochem. J. 65, 378 [1957].

⁸ B. CHANCE, Nature [London] 169, 215 [1952].

⁹ C. DAVID WHITE, J. biol. Chemistry 238, 3757 [1963].

¹⁰ M. FRIMMER, D. HEGNER u. W. WINKELMANN, Klin. Wschr. 41, 715 [1963].

¹¹ B. CHANCE, Federat. Proc. 16, 671 [1957].

¹² W. C. SCHNEIDER u. G. H. HOGEBOOM, A review, Cancer Res., II, I [1951].

¹³ A. L. LEHNINGER u. E. P. KENNEDY, J. biol. Chemistry 123, 753 [1948].

* $K_m = A \times d^x$ (K_m = HWD in Mol/l H₂O, A = Proportionalitätsfaktor, d = Durchmesser des Objektes, x = Konstante).

BÄNDER UND KIESE³ fanden, daß im Bereich von 10 bis 90% der Maximalatmung für Bäckerhefe⁵, für *Micrococcus cand.*² und für die von ihnen selbst untersuchten Rattenleber-Mitochondrien folgende Beziehung gilt:

$$\frac{v}{v_{\max} - v} = \frac{K_{\text{red}}}{K_{\text{ox}}} P_{\text{O}_2}^r r = 1,4. \quad (1)$$

LONGMUIR¹³ integrierte die Michaelis-Funktion (für $r = 1$) und fand bei Bakterien eine gute Übereinstimmung der berechneten Druck-Zeit-Kurven mit den experimentellen Ergebnissen. Für Rattenleberzellen bestätigte er 1957⁷ im Bereich bis 80% bzw. 90%

der Maximalatmung die von BÄNDER UND KIESE³ gefundene Beziehung (1), allerdings mit der Einschränkung, daß oberhalb 80% der Maximalatmung der Exponent „ r “ größer als 1,4 ist. CHANCE^{8,11} hat Halbwertdrucke der O₂-Aufnahme mit der Platinelektrode an einer Schweineherz-Präparation und Keilin-Hartree-Präparation gemessen (Tab. 1). Er weist darauf hin, daß die von LONGMUIR⁶ gefundenen, auffallend niedrigen Halbwertdrucke wahrscheinlich auf Inaktivierung der Präparationen zurückzuführen sind. CHANCE und Mitarb.¹¹ haben den Exponenten „ r “ theoretisch berechnet und finden dafür einen Wert von 1,33. DAVID C. WHITE⁹ konnte zeigen, daß durch Änderung der

Autor und Methode	Objekt und Substrat	T [°C]	KD [Torr O ₂]	HWD [Torr]	HWD in Mole O ₂ /l H ₂ O	Aktivierungs- energie [cal]
WARBURG u. KUBOWITZ ² (manometrisch)	Microc. candidans (Glucose)	1,0 5,0 10,0	$0,33 \cdot 10^{-2}$ $0,38 \cdot 10^{-1}$ $0,38 \cdot 10^{-1}$	$0,38 \cdot 10^{-2}$ $0,76 \cdot 10^{-2}$ $1,52 \cdot 10^{-2}$	$1,07 \cdot 10^{-8}$ $1,09 \cdot 10^{-8}$ $3,39 \cdot 10^{-8}$	
WINZLER ⁵ (Hg-Tropf- elektrode)	Bäckerhefe (Glucose)	20,0	2,5	0,50	$9,05 \cdot 10^{-7}$	17 250
CHANCE ⁸ (Platinelektrode)	Schweineherz- Präparation	25,0	2,34	1,00	$2 \cdot 10^{-6}$	
LONGMUIR ⁶ polarographisch (Goldelektrode)	Bäckerhefe Schweineherz- Präparation Ox. Herzpräpar.	19,0 17,3 19,8		0,3430 0,0096 0,0130	$6,45 \cdot 10^{-7}$ $1,86 \cdot 10^{-8}$ $2,39 \cdot 10^{-8}$	
BÄNDER u. KIESE ³ (manometrisch)	Rattenleber- Mitochondrien (Succinat)	20,0 37,0	3,0 etwa 10	$0,45 \pm 0,035$ 1,00	$4,20 \cdot 10^{-7}$ $1,43 \cdot 10^{-6}$	17 000
LONGMUIR ⁷ polarographisch (Goldelektrode)	Rattenleber- Zellen (Succinat)	40,0	4–5-mal größer als der HWD	0,26	$4,70 \cdot 10^{-7}$	16 000
CHANCE ¹¹ (Platinelektrode)	Keilin- Hartree- Präparation	25,0		0,5	$1 \cdot 10^{-6}$	
DAVID C. WHITE ⁹ (Platinelektrode)	Haemophilus parainfluencae	30,0	enzymarme Züchtung 69,35 enzymreiche Züchtung 2,83 KD 90%	6,99 1,38		
Eigene Unter- suchung (Platin- elektrode nach GLEICHMANN u. LÜBBERS)	Herzmuskel- Sarkosomen (Ratte) (Succinat)	22,5 30,0 37,0	5,0–5,5 3,0–3,5 2,0–2,5	$2,25 \pm 0,33$ $1,58 \pm 0,30$ $1,17 \pm 0,34$	$0,47 \pm 0,07$ $0,42 \pm 0,08$ $0,50 \pm 0,07$	$8,49 \cdot 10^{-7}$
	Leber- Mitochondrien (Succinat)	22,5	5,0–6,0	$2,58 \pm 0,53$	$0,44 \pm 0,08$	$7,80 \cdot 10^{-7}$
	Ascites-Tumor- Mitochondrien (Succinat)	22,5	6,0–7,0	$3,10 \pm 0,77$	$0,43 \pm 0,04$	$7,62 \cdot 10^{-7}$
	Ascites-Tumor- zellen (Succinat)	22,5	5,0–6,0	$2,18 \pm 0,37$	$0,41 \pm 0,06$	$7,61 \cdot 10^{-7}$

Tab. 1. Zusammenstellung von Messungen kritischer und Halbwertdrucke an verschiedenen Objekten.

Enzymkonzentration (Cytochromoxydase) kritische und Halbwertdruck bei enzymarmen Präparationen höher waren als bei enzymreichen (Tab. 1).

Wir haben die Zell- bzw. die Mitochondrienmenge bei konstanter Temperatur und maximaler Sättigung des Systems mit Succinat variiert und damit die Maximalgeschwindigkeit der O₂-Aufnahme verändert und HWD und KD (kritischer Druck) bestimmt. Außerdem wurde der Exponent „*r*“ der Funktion (1) bestimmt. Die Michaelis-Funktion wurde für die bei Sarkomen, Leber-Mitochondrien, Ascites-Tumorzellen und -Mitochondrien *verschiedenen* Exponenten „*r*“ integriert und die Druck-Zeit-Kurven mit den so errechneten Werten verglichen. Der Exponent „*r*“ war für die verschiedenen atmenden Objekte abhängig von der Maximalatmung (O₂-Aufnahme pro mg Protein). Die Halbwertdrucke nahmen für verschiedene Objekte ebenso wie „*r*“ mit zunehmenden Q_{O₂} zu. Dagegen waren die KD's dem Q_{O₂} umgekehrt proportional und nahmen mit zunehmender Temperatur ab.

Methode

Rattenleber-Mitochondrien wurden in der üblichen Weise nach SCHNEIDER¹², LEHNINGER und KENNEDY¹³ präpariert. Die Mitochondrien wurden zum Schluß 4–5-mal in 0,25-m. Sucroslösung auf der Kühlzentrifuge gewaschen und anschließend in SVT (0,25-m. Sucrose, 0,05-m. TRIS, 0,1 mMol EDTA, pH 7,4) suspendiert.

Sarkosomen wurden aus Herzen von 200–250 g schweren Wistarratten gewonnen. Für eine Präparation wurden 5–6 Tiere durch Entbluten getötet. Die Herzen wurden sofort nach Entnahme in 50 ml einer eiskalten Lösung 1 (0,21-m. Mannit und 0,07-m. Sucrose) eingebracht. Alle Arbeitgänge wurden bei 0 °C durchgeführt. Die Herzen wurden gewogen, mit der Schere zerkleinert und je 6 g Herzmuskel in eine Lösung gegeben, die aus 100 ml Lösung 1, 60 mg Nargase (Subtilisin A, krist. reinst der Fa. Serva) und 2,2 ml TRA-Puffer (0,5-m. pH 7,6) bestand. Nach 45 Min. Einwirkungsdauer des Enzyms wurde im Potter-Homogenisator vorsichtig homogenisiert. Nach weiteren 20 Min. wurden 100 ml Lösung 2 zugegeben (0,21-m. Mannit, 0,07-m. Saccharose und 0,1 mMol EDTA) und erneut homogenisiert. Anschließend wurde 2-mal zentrifugiert (4700 g während 5 Min.). Der Rückstand wurde jeweils verworfen. Der Überstand wurde abgeossen und 7 Min. bei 12300 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 ml 1-proz. Albuminlösung (Serumalbumin vom Rind, reinst, gelöst in Lösung 2) aufgenommen und erneut 7 Min. bei 12300 g zentrifugiert. Der letzte Arbeitgang wurde 4–5-mal wiederholt, bis das Sediment weitgehend frei von Erythrozyten, Hämoglobin und endogenem Substrat war. Zum Schluß wurden die

Sarkosomen in Lösung 1 aufgenommen und im Handhomogenisator vorsichtig aufgewirbelt.

Mitochondrien von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wurden nach dem von HAWTREY und SILK¹⁴ angegebenen Verfahren präpariert, 3-mal gewaschen und in SVT suspendiert.

Die in dieser Weise präparierten Mitochondrien und Sarkomen waren bei mikroskopischer Kontrolle frei von cytoplasmatischem Material. Die O₂-Aufnahme dieser Mitochondrien war ohne Zusatz von Substrat praktisch zu vernachlässigen. In diesen Mitochondrien waren Atmung und Phosphorylierung bis zu 4 Stdn. nach der Präparation noch gut gekoppelt.

Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wurden 10–14 Tage nach der Inokulation entnommen und in Tyrodelösung mit Citratzusatz 4–5-mal auf der Zentrifuge gewaschen (1000 g), anschließend in TRIS-Tyrode-Lösung (pH 7,4) suspendiert. Erythrozyten-Beimengungen wurden durch Sedimentieren entfernt.

In Anlehnung an die Versuche von BÄNDER und KIESE³ wurden die Bedingungen für eine maximale O₂-Aufnahme der Präparationen so gewählt, daß Succinat als Wasserstoffdonator diente. Im Versuchsansatz waren: 0,5 ml 0,024-m. TRIS-Puffer, pH 7,4, 0,25 ml 0,025-m. MgSO₄, 0,5 ml 3,5 · 10⁻⁴-m. Cytochrom c, 0,25 ml 5-proz. Serumalbumin, 0,25 ml 0,64-m. Na-Succinat und Mitochondrien- bzw. Zellsuspensionen. Die Mitochondrien- bzw. Zellmenge wurde so variiert, daß die maximale O₂-Aufnahme (bei Luft sättigung) 0,02 bis 0,55 µl O₂/ml Ansatz/Min. betrug. Es wurde soviel Suspensionsmedium zugegeben, daß die Gesamtmenge des Versuchsansatzes 2,0 bzw. 2,5 ml betrug.

Bei einigen Versuchen wurde die Succinatkonzentration auf 0,14-m. verringert. Atmung und Halbwertdrucke waren bei 0,64-m. und 0,14-m. Na-Succinat gleich.

Zur Stabilisierung der Mitochondrien und Zellen verwandten wir reines Rinderserumalbumin. Ungereinigte Albuminpräparate enthalten Spuren von Substraten, die im Versuchsansatz mit Phosphatpuffer *ohne* Succinat eine „endogene“ Atmung vortäuschten. Deshalb verwandten wir TRIS-Puffer und Serumalbumin „reinst“ (Behring-Werke), Cytochrom c (nach Keilin und Hartree, salzfrei) von der Fa. Boehringer.

Die Mitochondrien-Konzentration wurde durch Bestimmung des Proteingehaltes nach der Biuret-Methode ermittelt. Ascitestumorzellen wurden in einer Zählkammer nach Thomas ausgezählt (Zahl der Zellen je mm³ Ansatz). Da das Alter der Mitochondrien die O₂-Aufnahme beeinflusste, wurden frische Mitochondrien nur bis maximal 4 Stdn. nach der Präparation zur Messung verwendet. So konnten pro Präparation 15–20 Einzelmessungen durchgeführt werden. „Alte“ Mitochondrien waren maximal 24 Stdn. alt.

Versuchsordnung

Der O₂-Verbrauch der Ansätze wurde polarographisch mit einer membranbespannten Platinelektrode fortlaufend gemessen. Wir benutzten die von LÜBBERS

¹⁴ A. O. HAWTREY u. M. SILK, Biochem. J. 74, 21 [1960].

und Mitarb.¹ entwickelte stabilisierte Ganzglasplatin-elektrode. Die Platinoberfläche hatte einen Durchmesser von 1,5 und 2,0 mm und wurde mit 12 μ Cellophan und einer 25 μ dicken Teflon-Membran bespannt. Die Prüfung und Eichung der Elektrode erfolgte nach LÜBBERS und Mitarb.¹ angegebenen Verfahren. Mit einem von der Fa. Eschweiler und Co. gebauten Polarographen und einem Philips-Direktschreiber wurde fortlaufend die O₂-Spannung registriert (Papiervorschub: 4 cm und 2 cm/Min.).

Der Versuchsansatz wurde luftblasenfrei in die Meßkammer gefüllt und von der umgebenen Atmosphäre durch Schließen von zwei Glashähnen getrennt. Kleinste Luftbläschen mußten unbedingt entfernt werden, da sonst Sauerstoff aus diesen Gasbläschen in die Meßlösung diffundierte und das Meßergebnis verfälschte.

Im Meßgefäß befand sich ein Magnetrührer (370 U/Min.). Der Abstand des Rührers von der Elektroden spitze mußte möglichst klein gehalten werden. Der Einfluß des Rührens auf die Stabilität der Mitochondrien wurde folgendermaßen geprüft: Die Mitochondrien des Versuchsansatzes verbrauchen allmählich den gesamten gelösten Sauerstoff. Setzt man nach Ablauf des Versuches den Ansatz erneut mit Luftsauerstoff ins Gleichgewicht und wiederholt dann die Messung, so bleibt die Anfangsgeschwindigkeit der O₂-Aufnahme und der HWD bei den Versuchen gleich.

Um die mechanische Schädigung der Mitochondrien möglichst herabzusetzen, wurden die Ansätze unmittelbar vor der Messung mit Stickstoff auf 10–15 Torr O₂ äquilibriert. Die Meßdauer betrug dann selbst bei niedrigen Maximalgeschwindigkeiten nicht mehr als 20 Minuten. Die Temperaturkonstanz während der Messung war durch Eintauchen der Meßkammer in ein thermoreguliertes Wasserbad gewährleistet.

Eichung der Ansätze

Der Versuchsansatz wurde ohne Mitochondrien mit atmosphärischer Luft gesättigt. Im Meßgefäß wurde bei der jeweiligen Versuchstemperatur der Diffusionsgrenzstrom registriert. Dieser der O₂-Spannung proportionale Strom wurde als „Ansatz-Eichwert“ bezeichnet. Alle registrierten Meßwerte wurden auf diese Eichung bezogen, die sich nur unwesentlich (3–5%) von der Eichung mit Wasserdampf gesättigter Luft unterschied. Bei der Berechnung des O₂-Gehaltes wurde der jeweilige Luftdruck und der Wasserdampfdruck berücksichtigt. Beim O₂-Partialdruck der Luft (156 Torr) betrug die Stromstärke bei der Elektrode mit 2 mm ϕ etwa 4,2 μ A und bei der Elektrode mit 1,5 mm ϕ etwa 2,4 μ A. Bei 20-facher Verstärkung entsprach der Vollausschlag des Ampèremeters etwa 8,5 Torr (Elektrode mit 2 mm ϕ). Zur Zeigerberuhigung war in dem Gegenkopplungswiderstand ein Kondensator (2500 pF) eingeschaltet. Kondensatoren mit größerer Kapazität bewirken zwar bessere Zeigerberuhigung, verzögern jedoch die Anzeige des O₂-Diffusionsstromes und können das Meßergebnis verfälschen. (Nach Tödt führen Kondensatoren von 100–1000 μ F zur Verzögerung der Anzeige um Sekunden.)

Fehlerquellen der Methode

1. O₂-Eigenverbrauch der Elektrode

War bei den von uns verwandten Elektroden die Stromstärke bei 156 Torr O₂ 4,2 μ A (ϕ 2 mm, 22,5 °C), so betrug der Eigenverbrauch (Volumen des Analysengefäßes 0,8 ml) im Bereich von 3 Torr 0,0013 Torr/Minute.

2. Verschmutzung der Elektrodenoberfläche und Änderung der Diffusionsschicht

Bei unseren Versuchen bewährte es sich, jeweils nach einigen Messungen von biologischem Material eine Kontrollmessung einzuschalten, während das Meßgefäß mit dest. Wasser gefüllt war. Der Diffusionsgrenzstrom wurde dann über einen Zeitraum von 5 Min. registriert. Während dieser Zeit durfte die Stromstärke nur um einen kleinen Betrag gemäß:

$$i_g = i_{g0} \cdot e^{-\frac{D \cdot q}{\delta \cdot V} \cdot t} \cdot *$$

abnehmen.

Nimmt die Stromstärke stärker ab, so muß entweder der Abstand des Rührers zur Elektrode verkleinert oder die Elektrode erneuert werden.

3. „Paradoxe“ Strom

In seltenen Fällen kann ein schwacher „paradoxe“ Strom fließen, dessen Stromrichtung der des Diffusionsgrenzstromes umgekehrt gerichtet ist. Die Registrierung gelangt dabei unter die O-Linie, wenn der O₂-Partialdruck gleich null ist. Die Elektrode muß dann erneuert werden.

Ergebnisse

1. Abhängigkeit der maximalen O₂-Aufnahme von der Mitochondrien- bzw. Zellkonzentration (Abb. 1)

Die Maximalgeschwindigkeit der O₂-Aufnahme war bei allen untersuchten Objekten (22,5 °C) der Mitochondrien- bzw. Zellkonzentration proportional. Sie war bezogen auf mg Protein bei Herzmuskel-Sarkomen am größten und bei Ascites-Tumor-Mitochondrien am kleinsten.

2. Die Atmung

Sie war von etwa 156 Torr bis 6 Torr O₂ bei 22,5 °C unabhängig vom O₂-Druck. Für 30 °C und 37 °C gilt der Bereich der PO₂-unabhängigen

* D = Diffusionskoeffizient für O₂ in cm²/Sek., q = Elektrodenoberfläche in cm², δ = O₂-Diffusionsschicht in cm, V = Volumen des Analysengefäßes in cm (Näheres s. Tödt).

Abb. 1. Abhängigkeit der Maximalatmung von der Mitochondrien- und Zellkonzentration bei 22,5 °C. ○ = Herzmuskel-Sarkosomen, □ = Rattenleber-Mitochondrien, × = Ascites-Tumor-Mitochondrien, ● = Ascites-Tumorzellen.

Atmung vom PO₂ unter Luft bis 3 bzw. 2 Torr (innerhalb dieses Bereiches entspricht die Atmung einer Reaktion 0. Ordnung). Von 4 bis 6 Torr (22,5 °C) nimmt die Geschwindigkeit bei allen untersuchten Objekten zunächst schneller ab, als es der Funktion (1) mit dem Exponenten „r“ entsprechen würde. Hier gilt ein Exponent „s“ der größer als „r“ ist (Abb. 3). Zwischen 4 und 6 Torr (22,5 °C) liegt der kritische Druck (KD). Dieser war an unseren registrierten Kurven um so genauer zu bestimmen, je geringer die Maximalgeschwindigkeit der O₂-Aufnahme, d. h. je niedriger die Mitochondrien- bzw. Zellkonzentration pro ml Ansatz war. Bei hohen Maximalgeschwindigkeiten der Atmung konnten wir den KD nur näherungsweise bestimmen. Wir ermittelten daher für verschiedene Maximalgeschwindigkeiten der O₂-Aufnahme am gleichen Objekt den genaueren bestimmbaren KD 90 Prozent*. Die gefundenen Werte sind für die verschiedenen Objekte in Tab. 1 aufgeführt und stellen Mittelwerte aus jeweils 80 Messungen dar.

Dieser KD 90% war von der Mitochondrien- bzw. Zellkonzentration bis zu einer Maximalatmung von 0,50 μl O₂/ml/Min. bei gleicher Temperatur unabhängig, wenn die Ergebnisse einer Mitochondrien- bzw. Zellart miteinander verglichen wurden. Er war jedoch für die untersuchten atmenden Objekte mit verschiedenen QO₂ nicht gleich (22,5 °C).

Für Herzmuskelsarkosomen (mit der größten O₂-Aufnahme/mg Protein) war der KD 90% am niedrigsten, während er bei niedriger O₂-Aufnahme pro mg

Protein (also bei Rattenleber-Mitochondrien und Ascites-Tumor-Mitochondrien) am größten war. Es bestand also eine umgekehrte Proportionalität zwischen KD 90% und der maximalen O₂-Aufnahme/mg Mitochondrien-Protein.

3. Abhängigkeit des HWD von der Maximalgeschwindigkeit

Die HWD's wurden durch Anlegen von Tangenten an die registrierten Kurven bestimmt und zur Maximalgeschwindigkeit in Beziehung gesetzt (Abb. 2). Mit zunehmender Maximalgeschwindigkeit (d. h. mit zunehmender Zell- oder Mitochondrienmenge) bleiben die HWD's zunächst konstant, steigen aber bei einer für die jeweiligen Objekte verschiedenen „Grenzkonzentration“ von Mitochon-

Abb. 2. Abhängigkeit der Halbwertsdrucke von der Maximalatmung. ● = Ascites-Tumorzellen, ○ = Herzmuskel-Sarkosomen, □ = Rattenleber-Mitochondrien, × = Ascitestumor-Mitochondrien. Für jedes Objekt ist die Mittelwertkurve von ca. 80 Meßpunkten eingetragen. Auf der Abszisse ist die jeweilige Grenzmaximalatmung durch Pfeile eingezeichnet.

drien bzw. Zellen, die einer bestimmten „Grenzmaximalatmung“ entspricht, an. Diese „Grenzmaximalatmung“ betrug für Tumorzellen 0,06 μl O₂/ml/Min., für Herzmuskel-Sarkosomen 0,16 μl O₂/ml/Min., für Leber- und Ascites-Tumor-Mitochondrien 0,11 μl O₂/ml/Min. (Diese Werte haben wir für 22,5 °C gemessen. Mit zunehmender Temperatur wurde die Grenzmaximalatmung vergrößert.) Der HWD erreichte bei den höchsten untersuchten Maximalgeschwindigkeiten von 0,55 μl O₂/ml/Min. einen Grenzwert von 1,2 bis 1,3 Torr. Der Tab. 1 liegen die Mittelwerte der HWD's von Geschwindigkeiten von 0,02 μl O₂/ml/Min. bis zur jeweiligen „Grenzmaximalgeschwindigkeit“ zugrunde. Diese Halbwertsdrucke waren um so niedriger, je kleiner die Maximalatmung der untersuchten Objekte war.

* Als KD 90% haben wir den Druck bezeichnet, bei dem die Geschwindigkeit des O₂-Verbrauches 90% der unter Luft gemessen war.

4. Bestimmung des Exponenten „r“ für 22,5 °C [nach Gl. (1)]

Es wurden nur solche Druck-Zeit-Kurven für die Berechnung verwendet, deren Maximalgeschwindigkeit *unter* der „Grenzmaximalatmung“ lagen, d. h. deren HWD mit zunehmender Zellkonzentration nicht erhöht wurde (Abb. 2). Für jede Druck-Zeit-Kurve wurde für 15 verschiedene Drücke zwischen 0 und 6,5 Torr O₂ durch Anlegen von Tangenten an die registrierten Meßkurven die Geschwindigkeit „v“ gemessen*.

Trägt man $\log \frac{v}{v_{\max} - v}$ gegen $\log P_{O_2}$ auf (Abb. 3), so liegen die ermittelten Werte auf Geraden, deren Neigung „r“ ist. „r“ ist für Sarkosomen, Rattenleber-Mitochondrien, Ascites-Tumor-Mitochondrien und -zellen verschieden groß (Tab. 2). Zwischen 4 und 6 Torr gilt ein Exponent „s“, der wesentlich größer ist als „r“. „s“ war vom Alter der Mitochondrien abhängig. Bei ganz frischen Mitochondrien mit noch gekoppelter Phosphorylierung war „s“ größer und der KD niedriger als bei gealterten Mitochondrien. (Der Exponent „r“ wird mit zunehmender Temperatur größer.)

In das Diagramm (Abb. 3) sind die aus den Arbeiten von WARBURG² und WINZLER⁵ entnommenen Werte zum Vergleich eingetragen. Für denjenigen Teil der Kurve, in dem der Exponent „r“ gilt, haben wir die Michaelis-Funktion integriert.

$$\frac{v_{\max} - v}{v} P_{O_2}^r = \frac{K_r}{K_0} \quad \frac{K_r}{K_0} = K_m \quad r = 1,4 \quad (1)$$

durch Auflösen nach v ergibt sich

$$v = \frac{v_{\max} \cdot P_{O_2}^r}{K_m + P_{O_2}^r} \quad \frac{dP_{O_2}}{dt} = -v$$

(mit wachsender Zeit nimmt der Druck ab)

$$\begin{aligned} \frac{dt}{dP_{O_2}} &= \left[\frac{K_m}{v_{\max}} \cdot P_{O_2}^{-r} + \frac{1}{v_{\max}} \right] \\ \int_{t_0}^{t_1} dt &= - \int_{P_0}^{P_1} \left[\frac{K_m}{v_{\max}} \cdot P_{O_2}^{-r} + \frac{1}{v_{\max}} \right] dP_{O_2} \\ \int_0^t dt &= \frac{1}{v_{\max}} \int_{P_0}^{P_0} [K_m \cdot P_{O_2}^{-r} + 1] dP \\ t &= \frac{1}{v_{\max}} \left[(P_1^{1-r} - P_0^{1-r}) \frac{K_m}{1-r} + (P_0 - P) \right] \quad (2) \end{aligned}$$

* „v“ wurde für jeden Druck und jede Kurve 3-mal bestimmt und gemittelt. Es wurden für jedes untersuchte Objekt etwa 10 Kurven ausgewertet.

Abb. 3. Bestimmung des Exponenten „r“ für a) *Micrococcus candidans*, 10 °C², b) Bäckerhefe, 34,3 °C⁵, c) Ascites-Tumor-Mitochondrien, 22,5 °C, d) Herzmuskel-Sarkosomen, 22,5 °C. Für Herzmuskel-Sarkosomen und Tumorzell-Mitochondrien gilt „r“ bis 93% der Maximalatmung. Für die Funktion a ist der O₂-Druck in mm Brodie angegeben.

K_r = Geschwindigkeitskonstante der Reduktion des O₂-übertragenden Fermentes, K_0 = Geschwindigkeitskonstante der Oxydation des O₂-übertragenden Fermentes, v = Geschwindigkeit der O₂-Aufnahme bei O₂-Druck P_{O_0} , $v_{\max}$ = Geschwindigkeit der O₂-Aufnahme unter Luft, t = Zeit in Minuten, P_0 = Partialdruck von O₂ zur Zeit t_0 , P = Partialdruck von O₂ zur Zeit t .

In Tab. 3 ist die mathematische Deutung der O₂-Aufnahme für verschiedene atmende Partikel zusammengestellt.

Die durchgezogenen Linien der Kurven in Abb. 4 sind nach Originalregistrierung des O₂-Verbrauches von Herzmuskel-Sarkosomen in Abhängigkeit vom O₂-Druck gezeichnet. Die eingetragenen Punkte wurden nach Gl. (2) berechnet. Für Kurve a stimmen die errechneten Werte gut mit dem Verlauf der Atmung überein. Das war der Fall, wenn wir eine Maximalgeschwindigkeit wählten, die unter der ermittelten Grenzmaximalatmung des HWD lag (0,02 bis 0,16 µl/ml/Min. 22,5 °C). Steigerten wir die Maximalgeschwindigkeit durch Erhöhung der Sarkosomen-Konzentration über die für unser Meßsystem

Objekt	maximaler O ₂ -Verbrauch pro mg E/2 ml Ansatz [μl]	Exponent „r“	Exponent „r“ gilt bis % der Maximalatmung	Temperatur [°C]
Bäckerhefe ⁵		1,10	55	34,2
<i>Microc. candidans</i> ²		1,10	55	10,0
Ascites-Tumorzellen		1,32	93	22,5
<i>Clorella</i> ¹⁹		1,40	—	20,0
Leber-Mitochondrien ³		1,40	—	—
theoretisch berechnet ¹¹		1,33	—	—
Ascites-Tumor-Mitochondrien	0,185	1,07	93	22,5
Leber-Mitochondrien	0,240	1,23	93	22,5
Herzmuskel-Sarkomen	0,300	1,40	93	22,5

Tab. 2. Die Größe des Exponenten „r“ der Funktion (1) für verschiedene atmende Partikel.

angegebene Grenzmaximalatmung (Kurve b), so waren die Bedingungen für die Gl. (2) nicht mehr erfüllt. Gleichzeitig steigt dann, wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, der HWD an. Die errechneten Punkte lagen dann unter der registrierten Atmungskurve. Das Gleiche galt auch für Leber- und Ascites-Tumor-Mitochondrien. Der KD 90% ist hingegen bei beiden Kurven gleich groß. Er änderte sich erst bei Maximalgeschwindigkeiten über 0,5 μl/ml/Minute.

5. Die Aktivierungsenergie für die O₂-Aufnahme wurde für Herzmuskelsarkosomen nach der Ar-

henius-Gleichung berechnet. Der log v (Atmungsgeschwindigkeit) für verschiedene Temperaturen wurde gegen 1/T aufgetragen. Aus der Neigung der Geraden wurde eine Aktivierungsenergie von 16 440 cal berechnet.

Diskussion

1. Bemerkungen zur Methode

Als limitierender Faktor muß bei unseren Versuchen die Erhöhung der Halbwertdrucke und auch

Autor	Mathematische Deutung
O. WARBURG u. F. KUBOWITZ ² (Bäckerhefe)	$\frac{n}{(1-n)P_{O_2}} = \frac{B}{Z'}$ *
I. S. LONGMUIR ⁶ (Bakterien)	$t = \frac{S_0 - S}{K'} + \frac{K_m}{K} \times \ln \frac{S_0}{S}$ **
BÄNDER u. M. KIESE ³ (Rattenleber-Mitochondrien)	$\frac{v}{v_{\max} - v} = \frac{K_{\text{red}}}{K_{\text{ox}}} \cdot P_{O_2}^r \quad r = 1,4$
I. S. LONGMUIR ⁷ (Rattenleberzellen)	wie BÄNDER u. KIESE ³ ***
Eigene Untersuchungen (Herzmuskel-Sarkomen, Rattenleber-Mitochondrien, Ascites-Tumorzell-Mitochondrien, Ascites-Tumorzellen)	$t = \frac{1}{v_{\max}} \left[\frac{K_m}{1-r} \cdot (P_0^{1-r} P_0^{1-r}) + (P_0 - P) \right]$ ****

Tab. 3. Mathematische Deutung des Verlaufes der Atmung (im Bereich des KD) in Abhängigkeit vom P_{O₂}.

* B = Geschwindigkeitskonstante der Oxydation des Fe, Z' = Geschwindigkeitskonstante der Reduktion des Fe, n = A/A₀, A = V (Geschwindigkeit der Atmung bei P_{O₂}); A₀ = v_{max} (Geschwindigkeit der Atmung unter Luft). Setzt man in die Formel von WARBURG u. KUBOWITZ ² für n = v/v_{max} ein, so erhält man durch Umformung $\frac{v}{(v_{\max} - v)P_{O_2}} = \frac{B}{Z'}$ die Funktion von BÄNDER u. KIESE, die sich von der WARBURGSCHEN ² durch P_{O₂}^{1,4} unterscheidet. ** Nach LONGMUIR ⁶ folgt die Atmung von Bakterien dieser Formel, erhalten durch Integration der Michaelis-Funktion für den Exponenten 1 für P_{O₂}. *** Bestätigt für einen bestimmten Bereich die von BÄNDER u. KIESE ³ gefundene Funktion mit dem Exponenten r = 1,4 für Rattenleberzellen. **** Die Druckzeitkurven der Atmung folgen in einem bestimmten Bereich der angegebenen Funktion. Erhalten durch Integration der Michaelis-Funktion für den Exponenten r = ≠ von 1*. * ≠ = verschieden.

Abb. 4. a) Originalkurve der Atmung von Herzmuskel-Sarkosomen in Abhängigkeit vom O_2 -Druck — durchgezogene Linie. Die Punkte sind errechnete Werte nach Gl. (2) ($v_{\max} = 0,083 \mu l O_2/ml/Min.$, $T = 22,5^\circ C$). b) Originalmeßkurve für eine Maximalgeschwindigkeit oberhalb der „Grenzmaximalatmung“. Die errechneten Punkte liegen hier nicht mehr auf der Meßkurve ($v_{\max} = 0,26 \mu l O_2/ml/Min.$, $T = 22,5^\circ C$). Die Punkte sind nach Gl. (2) mit $r = (1,4)$ und $s = 2,0$ errechnet.

der Kritischen Drucke bei gleichen Objekten oberhalb einer Grenzmaximalatmung angesehen werden.

Nach der Beziehung $i_g = i_{g0} \cdot e^{-\frac{D \cdot q \cdot t}{\delta \cdot V}}$ ist der Dif-

fusionsgrenzstrom (i_g) bei möglichst schneller und konstanter Rührung und damit konstant bleibender Diffusionsschicht (δ) der O_2 -Konzentration im Ansatz proportional. Es ist jedoch zu beachten, daß in der Diffusionsgrenzschicht selbst O_2 -verbrauchende Vorgänge stattfinden. Nach WINKELMANN¹⁵ können dann noch Änderungen der O_2 -Spannung, deren Halbwertszeiten nicht unter der Größe von einigen Sek. liegen, hinreichend genau gemessen werden. Für unsere Ergebnisse erhebt sich nun die Frage, warum der HWD und auch der KD 90% oberhalb einer Grenzmaximalatmung mit steigender Mitochondrien-Konzentration bzw. Maximalatmung zunimmt. Folgende Ursachen könnten für dieses Verhalten verantwortlich gemacht werden:

a) Beimischungen von Hämoglobin bzw. Myoglobin könnten durch Freisetzung des gebundenen Sauerstoffes bei abnehmendem O_2 -Druck in der Meßlösung für diesen Störeffekt verantwortlich gemacht werden. Dagegen sprechen jedoch die folgenden Argumente:

Ascites-Tumor-Mitochondrien können frei von Hämoglobin präpariert werden¹⁶. Trotzdem ergab sich auch hier eine Abhängigkeit des HWD und KD 90 Prozent. Bei Hämoglobinzusatz zu den Versuchsansätzen kamen Meßkurven zustande, die mit unseren nicht vergleichbar waren. Aus theoretischen Überlegungen geht hervor, daß sich bei steigender Hämoglobin-Konzentration im Versuchsansatz zuerst der KD 90% und erst in zweiter Linie der HWD ändern müßte. In unseren Versuchen wurde jedoch bei steigender Mitochondrien-Konzentration (bzw. Maximalatmung) zuerst der HWD beeinflusst.

b) Sowohl WARBURG, MEYERHOF und SCHULZ¹⁶, ELLIOTT und HENRY¹⁷ als auch WINZLER⁵, weisen darauf hin, daß ihre Messungen nur dann als reell anzusehen sind, wenn bei zunehmender Verdünnung der atmenden Partikel, nicht aber wie KEMPNER¹⁸ ausführt, durch Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit das Verhältnis $v/v_{\max}$ unverändert bleibt. Da bei unseren polarographischen Messungen kein Gasraum über dem Suspensionsmedium ist, kann die Diffusion vom Gasraum in das Medium ausgeschlossen werden. Die von uns gemessene Grenzmaximalatmung könnte nur im Verhalten der atmenden Partikel selbst zu erklären sein. In Anlehnung an die von MEYERHOF¹⁶ gegebene Beziehung $R' = \sqrt{\frac{6 \cdot c_0 \cdot D}{A}}$ kann die Diffusion nicht zum limitierenden Faktor werden, wenn R' wesentlich größer ist als R . Geht man von der Annahme aus, daß mit zunehmender Konzentration der Partikel auch ihre Aggregation zunimmt, so kann man berechnen, daß der HWD mit zunehmender Konzentration der Mitochondrien eher beeinflusst wird, als der KD 90 Prozent. Dafür könnte die Zunahme des Diffusionsgefälles von der Oberfläche zum Mittelpunkt der aggregierten atmenden Partikel verantwortlich gemacht werden. Diesen theoretischen Überlegungen entsprachen unsere experimentellen Ergebnisse.

2. Der kritische Sauerstoffdruck (KD)

Der KD und auch der KD 90% war für verschiedene Objekte bis zu $0,5 \mu l O_2/ml/Min.$ (Grenzmaximalatmung des KD 90%) dem Q_{O_2}/mg Protein umgekehrt proportional. Für dieses Verhalten gibt es

¹⁵ D. WINKELMANN, Ber. Bunsenges. physik. Chem. **59**, 895 [1955].

¹⁶ B. CHANCE u. B. HESS, J. biol. Chemistry **234**, 2404 [1959].

¹⁷ K. A. C. ELLIOTT and M. HENRY, J. biol. Chemistry **163**, 351 [1946].

¹⁸ W. KEMPNER, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **VII**, 269 [1939].

folgende Erklärung: CHANCE¹¹ konnte durch theoretische Berechnungen und Experimente zeigen, daß die terminale Oxydase bereits teilweise reduziert sein kann, ohne daß die Atmungsgeschwindigkeit, gemessen an der Fumaratproduktion bzw. der O₂-Aufnahme, verändert ist. Der Reduktionsgrad blieb mit abnehmendem O₂-Druck konstant, solange die Atmungsgeschwindigkeit maximal war. Vom KD an nahm die Atmung ab und näherte sich dem Nullwert. Erst wenn die Atmung den KD erreicht hatte, wurde die terminale Oxydase sehr schnell reduziert. Eine Erklärung für diese plötzliche Reduktion der Oxydase ohne übereinstimmende Änderung der Atmung wäre das Vorhandensein eines Überschusses an terminaler Oxydase in der Atemkette der Säuger¹¹. Nur so kann sich ihr Redox-Grad erheblich ändern, ohne daß gleichzeitig eine meßbare Änderung der Atmung erfolgt. Dieser „cushioning effect“ (Polstereffekt) kann eine Erklärung dafür sein, daß je nach der Größe des Überschusses an terminaler Oxydase bei atmenden Partikeln, verschiedene kritische Drucke gemessen werden. CHANCE¹¹ weist auf die variable Affinität der Atemkette zum Sauerstoff bei verschiedenem metabolischen Status der Mitochondrien hin. Je mehr aktivierte Enzyme der Atemkette bei den verschiedenen atmenden Partikeln verfügbar sind und je größer der Überschuß an terminaler Oxydase ist, um so größer ist der Q_{O₂}/mg Protein und der „cushioning effect“. Um so niedriger wird dann der O₂-Druck, bei dem die Atmung von der Maximalatmung abweicht. Eine Abnahme des KD mit zunehmender Q_{O₂} fand DAVID C. WHITE⁹ auch durch Messung der Atmung an enzymarm und enzymreich gezüchteten Kulturen von *B. haemophilus parainfluenzae*. Wenn wir durch Erhöhung der Temperatur den Umsatz steigerten, nahm der KD ab.

Wenn die Mitochondrien verschiedener Organe einen von der Enzymaktivität und vom metabolischen Status abhängigen KD haben, so könnten unsere Messungen zu der Erklärung beitragen, daß unter zunehmendem O₂-Mangel des Organismus physiologische Funktionen in einer bestimmten vom KD abhängigen Reihenfolge ausfallen.

3. Der Halbwerttdruck HWD („K_m“)

Die Vermutung von WARBURG^{2, 19}, daß bei Zellen der HWD um so kleiner ist, je kleiner ihr O₂-Verbrauch ist, trifft nach unseren Messungen auch für Mitochondrien zu. Mit abnehmenden Q_{O₂} wird der

HWD kleiner und ist bei Tumor-Mitochondrien am niedrigsten. Diese Abhängigkeit gilt nur für einen Vergleich der Halbwerttdrucke an verschiedenen Objekten bis zur „Grenzmaximalatmung“ des HWD. Auf eine Abhängigkeit der Halbwerttdrucke vom Q_{O₂} weisen auch MEYERHOF und SCHULZ¹⁶ hin, die den O₂-Verbrauch von *Bakt. azotobakt. chroococcum* durch Alterung der Kultur variierten und manometrisch gemessen haben. Daß eine solche Abhängigkeit des HWD möglich ist, konnten CHANCE, HIGGINS, HOLMERS und BARR¹¹ durch theoretische Berechnungen mit Hilfe eines Analogrechners zeigen. Die Untersucher haben in einer angenommenen Folge von 3 Enzymen die Abhängigkeit des HWD („K_m“) von der Konzentration des mittleren Enzyms berechnet. Danach hat die Erhöhung der Enzymkonzentration bei gleichbleibend hoher Substratkonzentration eine Zunahme des HWD („K_m“) zur Folge. Nach diesen theoretischen Berechnungen kann die Zunahme der HWD's bei unseren Untersuchungen mit steigendem Q_{O₂}/mg Protein bei den einzelnen Objekten durch verschiedene Enzymkonzentrationen und deren Verhältnis innerhalb der Sequenz der Atemkette zueinander bedingt sein. Diese Ergebnisse an Mitochondrien stehen allerdings im Gegensatz zu denen, die DAVID C. WHITE⁹ bei Bakterien gefunden hat. Dieser Autor fand mit zunehmenden Q_{O₂} eine Abnahme der HWD's.

Ein Vergleich der kritischen- und Halbwerttdrucke von intakten Tumorzellen und Tumorzell-Mitochondrien zeigt, daß sowohl der KD als auch der HWD für intakte Zellen und isolierte Mitochondrien etwa gleich ist. Daß der Diffusionsweg des Sauerstoffs durch das Zellplasma weder den KD noch den HWD erhöht, konnte WINZLER⁵ für Bäckerhefe mit Hilfe der CO-Hemmung ausschließen. Ebenso fand LONGMUIR⁷, daß KD und HWD für Rattenleberzellen und Mitochondrien etwa gleich sind. Diese Verhältnisse scheinen auf Bakterien nicht übertragbar zu sein. LONGMUIR⁶ fand bei Bakterien mit zunehmendem Zelldurchmesser eine Zunahme der Halbwerttdrucke und führte diese auf die Diffusion von Sauerstoff durch das Plasma zurück.

4. Der Exponent „r“ der Funktion (1) vgl. S. 240

Unsere Messungen zeigen, daß der von BÄNDER und KIESE³ für Rattenleber-Mitochondrien gefundene Exponent der Funktion (1) nicht allgemein zutrifft. Der Exponent „r“ war bei unseren Versu-

chen vom Q_{O_2} und von der Temperatur der verschiedenen untersuchten Objekte abhängig. Wir haben in das Diagramm (Abb. 3) die von WARBURG² und WINZLER⁵ gemessenen Werte zum Vergleich eingetragen. Auch bei den Ergebnissen dieser Autoren war der Exponent für einige atmende Objekte verschieden von 1,4. Nur bei *Chlorella*¹⁹ ergab sich ebenso wie bei Herzmuskelsarkosomen (22,5 °C) ein Exponent von 1,4. Für Bakterien folgte die Funktion den Exponenten 1⁶. Für Warmblüterzellen und Mitochondrien konnten wir niemals einen Exponenten von 1 finden. Wir haben aus diesem Grunde die Michaelis-Funktion für einen Exponenten „ r “ = verschieden von 1 integriert. Setzt man in die so erhaltene Formel (2) die gefundenen Meßwerte ein, so liegen die errechneten Punkte in guter Näherung auf den registrierten Meßkurven, sofern die Grenzmaximalatmung nicht überschritten wird (Abb. 4). LONGMUIR⁷ fand bei Rattenleberzellen ebenfalls einen Exponenten von 1,4. Aus Abb. 3 und Tab. 2 geht hervor, daß der Bereich, in dem „ r “ gilt, bei den einzelnen untersuchten Objekten verschieden ist. Dieses Verhalten ist vielleicht dadurch

zu erklären, daß bei niedrigen O₂-Drucken außer dem Succinoxidase-System noch eine andere Komponente limitierend ist.

Wie kann man sich das Zustandekommen des für eine chemische Reaktion ungewöhnlichen Exponenten „ r “ und dessen Abhängigkeit vom Q_{O_2} erklären? Die mathematische Theorie der Reaktion der Cytochromoxydase mit O₂ zeigt, daß die Reaktion in bezug auf Sauerstoff 1. Ordnung sein kann²⁰. Die Reduktion des O₂ erfolgt schrittweise über freie Radikale. Die chemischen Vorgänge an der terminalen Oxydase und die der anderen Enzyme der Atemkette lassen sich durch nichtlineare Differentialgleichungen beschreiben. CHANCE, HOLMES, HIGGINS und BARR¹¹ haben diese Gleichungen mit Hilfe des Analogrechners gelöst und geben einen berechneten Exponenten „ r “ = 1,33 an. (Den gleichen Exponenten haben wir bei Versuchen mit Ascitestumorzellen bei 22,5 °C gefunden.) „ K_m “ bzw. der HWD sind nach den theoretischen Berechnungen von CHANCE¹¹ von dem Verhältnis der Enzymkonzentrationen abhängig. Es ist daher anzunehmen, daß auch „ r “ eine solche Abhängigkeit zeigt.

¹⁹ O. WARBURG u. G. KRIPPAHL, G. Thieme-Verlag Stuttgart, S. 427, 1962.

²⁰ E. KING u. CHUAN PU LEE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 37, 243 [1960].