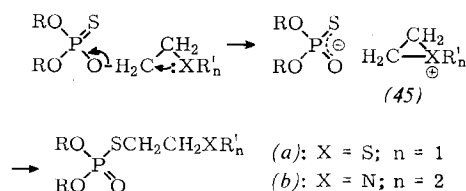


phosphonsäure- β -alkylthioalkylester^[178, 184]. In diesen Fällen löst nicht mehr die Nucleophilie des Thiophosphoryl-Schwefels die Reaktion aus, sondern die durch die Nachbargruppenbeteiligung des β -ständigen nucleophilen Zentrums bewirkte leichte Ablösung eines cyclischen Sulfonium- (45a) bzw. Ammonium-Kations (45b), das in bekannter Weise das verbleibende Thiophosphat-Ion am Schwefel alkyliert.

[184] F. W. Hoffmann, J. W. King u. H. O. Michel, J. Amer. chem. Soc. 83, 706 (1961); M. I. Kabatschuk u. T. A. Medwed, Izvest. Akad. Nauk SSSR, Ser. Chim. 1961, 604.



Das intermediäre Auftreten der Thiiranium-^[177] und Aziridinium-Ionen^[179–181] ist vielfältig belegt worden.

Eingegangen am 6. März 1967 [A 604]

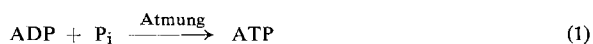
Oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien^[**]

VON G. SCHATZ^[*]

Mitochondrien können aus ADP und anorganischem Phosphat ATP bilden, wobei der Energiebedarf durch die Atmung gedeckt wird. Dieser gekoppelte Prozeß wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. In ausreichend mit Sauerstoff versorgten normalen tierischen Zellen wird auf diese Weise die Hauptmenge an ATP synthetisiert. Der Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung ist unbekannt. Der Ablauf der Gesamtreaktion ist eng an die innere Mitochondrienmembran gebunden. Als erstes läßt sich ein energiereiches Primärprodukt nachweisen, das in noch unbekannter Weise ATP bildet. An der Kopplung von Atmung und ATP-Synthese sind Proteine der inneren Mitochondrienmembran beteiligt, die als „Kopplungsfaktoren“ bezeichnet werden. Der Verlauf der oxidativen Phosphorylierung wird zur Zeit an drei Hypothesen diskutiert: der „chemischen“, der „chemiosmotischen“ und der „Konformationshypothese“. Eine Entscheidung zwischen diesen Hypothesen ist noch nicht möglich.

Einleitung

Atmende Zellen können die bei der Substratoxidation freiwerdende Energie über die Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung zur Synthese von ATP verwenden (Reaktion (1)).



Diese Kopplung zwischen Atmung und ATP-Bildung wurde in zahlreichen Mikroorganismen und höheren Lebewesen nachgewiesen und ist stets an eine Membranstruktur gebunden. In atmenden Bakterien sind die Enzyme der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung in der Zellmembran lokalisiert. In fast allen übrigen Zelltypen hingegen finden sie sich, zusammen mit den Enzymen des Citronensäurecyclus, in charakteristisch geformten cytoplasmatischen Organellen, den Mitochondrien. Die Zahl der Mitochondrien pro Zelle ist beträchtlichen phylogenetischen Variationen unterworfen. Eine Rattenleberzelle ent-

hält beispielsweise mehrere tausend Mitochondrien, während gewisse einzellige Algen nur ein einziges Mitochondrion besitzen.

Der Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung blieb bis heute unbekannt, obwohl sich in den letzten dreieinhalb Jahrzehnten zahlreiche Laboratorien um eine Aufklärung bemüht haben^[1, 2]. Ein Grund hierfür mag sein, daß es bisher nicht gelang, den Prozeß ohne Anwesenheit einer Membranstruktur in flüssiger Phase ablaufen zu lassen.

Diese Tatsache legt den Gedanken nahe, daß die oxidative Phosphorylierung grundsätzlich nur an einer Membran ablaufen kann und sich in dieser Hinsicht von den meisten bisher aufgeklärten biochemischen Reaktionsfolgen unterscheidet. Ein weiteres Hindernis war die unvollkommene Kenntnis des Aufbaus der mitochondrialen Atmungskette. Das in Abbildung 1 wiedergegebene Schema steht zwar mit den meisten der bisher vorliegenden Daten im Einklang, ist jedoch noch nicht in allen Einzelheiten bewiesen und wahrscheinlich unvollständig^[3].

[*] Dr. G. Schatz

Institut für Biochemie der Universität
A-1090 Wien (Österreich), Wasagasse 9

[**] Es werden folgende Abkürzungen verwendet: ADP und ATP: Adenosin-di- und -tri-phosphat; P_i : anorganisches Phosphat; NAD(P)^+ und NAD(P)H : oxidiertes bzw. reduziertes Nicotin-amid-adenindinucleotid(phosphat).

[1] E. Racker: Mechanisms in Bioenergetics. Academic Press, New York 1965.

[2] A. L. Lehninger: The Mitochondrion. Benjamin, New York 1964.

[3] M. E. Pullman u. G. Schatz, Annu. Rev. Biochem. 36, 539 (1967).

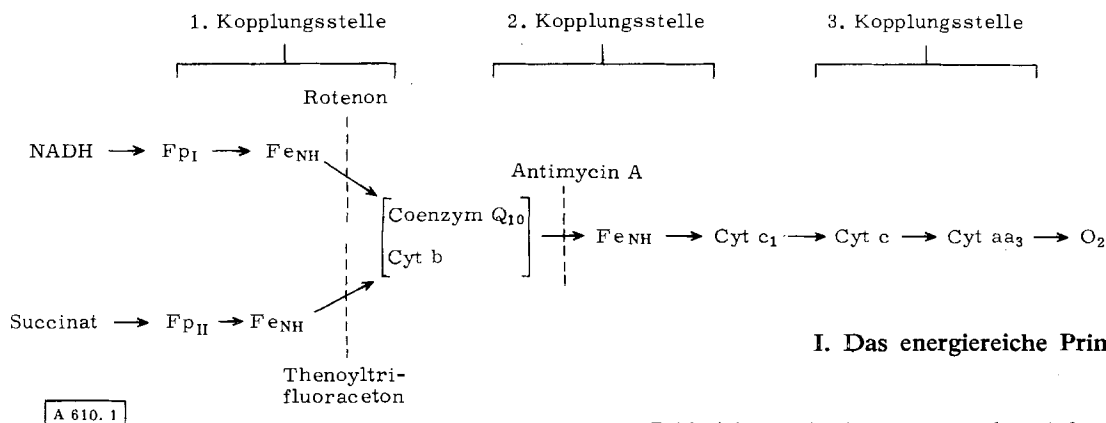


Abb. 1. Aufbau der Atmungskette in Säugetiermitochondrien. Fp_I und Fp_{II} : Flavoprotein der NADH- bzw. Succinatdehydrogenase; Fe_{NH} : Nichtthäm-eisen; Cyt aa_3 , b, c, c_1 : Cytochrome aa_3 , b, c, c_1 ; die Stellung von Cytochrom b relativ zu Coenzym Q_{10} ist nicht mit Sicherheit bekannt. Es ist auch ungeklärt, ob die durch Rotenon [4], Thenoyltrifluoracetone [5] und Antimycin A [6] hemmbaren Komponenten mit bereits bekannten Atmungskettenenzymen identisch oder noch unbekannte Redoxkomponenten sind. In Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* scheint das Segment zwischen NADH und Cytochrom b weder eine Kopplungsstelle [7,8] noch eine durch Rotenon hemmbare Komponente [7,8] oder ein am Elektronentransport beteiligtes Nichtthäm-eisen [9] zu enthalten. Die gestrichelten Linien deuten eine Hemmung des Elektronentransportes an.

Es wird angenommen, daß in Mitochondrien höherer Tiere beim Elektronentransport von NADH zu Sauerstoff maximal drei Moleküle ATP gebildet werden können [1,2]. Die drei „Kopplungsstellen“ (vgl. Abb. 1) konnten aber bisher nicht definierten Redoxreaktionen zugeordnet werden. Schon aus diesem Grund allein ist es noch nicht möglich, alle Schritte der oxidativen Phosphorylierung durch chemische Gleichungen zu beschreiben. Schließlich hat auch der beträchtliche experimentelle Aufwand, mit dem Untersuchungen der oxidativen Phosphorylierung oft verbunden sind, die Entwicklung dieses Gebietes verzögert.

Die vorliegende Übersicht beschränkt sich auf eine Diskussion der an Mitochondrien gewonnenen Ergebnisse. Fast alle wesentlichen Schlußfolgerungen gelten aber auch für Bakterien, da die Kopplung zwischen Atmung und ATP-Synthese in allen bisher untersuchten Fällen einem einheitlichen Prinzip zu gehorchen scheint. Ein ähnliches Prinzip dürfte auch der lichtgekoppelten ATP-Synthese, der Photophosphorylierung (Reaktion (1a))



zugrundeliegen, die für die ATP-Bildung in grünen Pflanzen und zahlreichen autotrophen Bakterien von großer Bedeutung ist. (Zusammenfassende Darstellungen siehe [1-3, 10-13].)

- [4] P. E. Lindahl u. K. Öberg, Exp. Cell Res. 23, 228 (1961).
- [5] A. L. Tappel, Biochem. Pharmacol. 3, 289 (1960).
- [6] H. A. Lardy, D. Johnson u. W. C. McMurray, Arch. Biochem. Biophysics 78, 587 (1958).
- [7] G. Schatz u. E. Racker, Biochem. biophys. Res. Commun. 22, 579 (1966).
- [8] T. Ohnishi, K. Kawaguchi u. B. Hagihara, J. biol. Chemistry 241, 1797 (1966).
- [9] G. Schatz, E. Racker, D. D. Tyler, J. Gonze u. R. W. Estabrook, Biochem. biophys. Res. Commun. 22, 585 (1966).

I. Das energiereiche Primärprodukt

Zahlreiche Beobachtungen sprechen dafür, daß die bei der Atmung in den drei Segmenten der Elektronentransportkette freiwerdende Energie nicht unmittelbar im ATP, sondern zunächst in einer energiereichen Zwischenverbindung oder einem energiereichen „Zustand“ der Mitochondrienmembran gebunden wird. Die Energie dieses noch nicht näher charakterisierten Primärproduktes kann entweder über mehrere unbekannte Energietransportreaktionen zur Anhydridbildung zwischen P_i und ADP verwendet werden (Abb. 2, Reaktionsweg 1) oder direkt, d.h. ohne den Umweg über ATP, den Ablauf endergonischer Reaktionen in Mitochondrien ermöglichen (Abb. 2, Reaktionsweg 2).

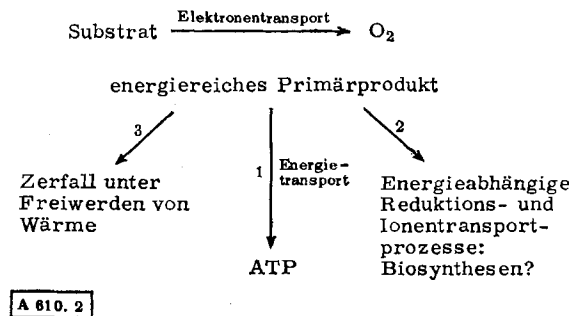


Abb. 2. Schematische Darstellung der Reaktionsmöglichkeiten des energiereichen Primärproduktes der oxidativen Phosphorylierung.

Hinweise auf ein solches Primärprodukt vor der eigentlichen ATP-Synthese ergeben beispielsweise Versuche mit dem Antibiotikum Oligomycin, das in atmenden Mitochondrien die Synthese von ATP blockiert [6, 14], ohne die aktive Akkumulation anorganischer Kationen [15-17] oder die energieabhängige Reduktion von

- [10] D. R. Sanadi, Annu. Rev. Biochem. 34, 21 (1965).
- [11] L. Ernster u. C.-P. Lee, Annu. Rev. Biochem. 33, 729 (1964).
- [12] E. C. Slater in M. Florkin u. E. H. Stotz: Comprehensive Biochemistry. Elsevier, Amsterdam 1966. Bd. 14, S. 327.
- [13] P. D. Boyer in T. P. Singer: Biological Oxidation. Wiley, New York, im Druck.
- [14] F. Hujing u. E. C. Slater, J. Biochemistry (Tokyo) 49, 493 (1961).
- [15] F. D. Vasington u. J. V. Murphy, J. biol. Chemistry 237, 2670 (1962).
- [16] G. P. Brierley, E. Murer u. D. E. Green, Science (Washington) 140, 60 (1963).
- [17] C. S. Rossi, E. Carafoli, Z. Drahota u. A. L. Lehninger in J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello u. E. C. Slater: Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari 1965, BBA Library Bd. 7. Elsevier, Amsterdam 1966, S. 317.

Acetylacetat^[18] oder α -Ketoglutarat^[19] durch Succinat zu beeinträchtigen. Noch eindeutigerer Hinweise lassen sich an submitochondrialen Partikeln gewinnen, die im Gegensatz zu intakten Mitochondrien nur verschwindende Mengen von Adennucleotiden und P_i enthalten. Obwohl diese Partikel somit ohne Zusatz dieser Substanzen nicht in der Lage sind, die bei der Atmung freiwerdende Energie für die ATP-Synthese zu verwerten, können sie dennoch diese Energie zur Abwicklung endergonischer Reduktionen heranziehen^[20,21]. P_i scheint also an der primären Kopplungsreaktion nicht beteiligt zu sein.

Gegen diese Experimente ließe sich einwenden, daß ATP-Synthese und atmungsgekoppelte Reduktions- und Ionentransportprozesse jeweils über ein anderes nicht-phosphoryliertes Zwischenprodukt verlaufen könnten. Diese Möglichkeit kann zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, ist jedoch unwahrscheinlich. Unter geeigneten Bedingungen können nämlich energieabhängige mitochondriale Reaktionen (z.B. der Transport von Ionen^[17,22,23], die rotenon-empfindliche Reduktion von Hexacyanoferrat(III) durch Succinat^[24] sowie die Transhydrogenasereaktion^[25]) mit der ATP-Synthese um die Energie der Atmung konkurrieren. Dies spricht entweder für ein gemeinsames Zwischenprodukt oder für verschiedene Zwischenprodukte, die in enger Wechselwirkung stehen.

Von mehreren Autoren wurde auch die Beteiligung eines nicht-phosphorylierten Zwischenproduktes der oxidativen Phosphorylierung an der mitochondrialen Proteinsynthese^[26,27] sowie an der Aktivierung von Fettsäuren^[27-30] diskutiert; die Beweise für eine ATP-Unabhängigkeit dieser Prozesse sind aber nicht eindeutig. In isolierten Mitochondrien ist nämlich die Geschwindigkeit des Einbaus von Aminosäuren um mindestens vier bis fünf Größenordnungen und die der Fettsäureaktivierung um mindestens zwei Größenordnungen geringer als die Maximalgeschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung^[3,31,32].

Wird in intakten atmenden Mitochondrien sowohl die ATP-Synthese als auch der Ablauf endergonischer Reduktions- und Ionentransportprozesse unterbunden, so tritt eine Hemmung der Substratoxidation ein,

die als Atmungskontrolle bezeichnet wird^[33]. Über die Ursache dieser Hemmung ist nichts Sicheres bekannt, sie ist aber offenbar die Folge einer Anhäufung des Primärproduktes der oxidativen Phosphorylierung. Diese hemmende Rückwirkung auf die Atmungskette ist eine weitere Reaktionsmöglichkeit des energiereichen Primärproduktes.

Das Primärprodukt kann schließlich auch ohne Leistung nutzbringender chemischer Arbeit spontan zerfallen, wobei die ihm äquivalente freie Energie wahrscheinlich als Wärme verloren geht (Abb. 2, Reaktionsweg 3). Eine derartige Verlustreaktion wird in schonend isolierten Mitochondrien kaum beobachtet; sie kann jedoch durch Schädigung der Mitochondrienstruktur oder durch „Entkopplersubstanzen“ wie 2,4-Dinitrophenol^[34], Arsenat^[35] oder 2-(*m*-Chlorphenyl)-hydrazono-malonsäuredinitril^[36] beträchtlich gesteigert werden, wobei unter gleichbleibender oder sogar verstärkter Atmung ATP-Synthese und sonstige energiegekoppelte Reaktionen nachlassen und schließlich völlig unterbleiben.

Die von mehreren Autoren diskutierte Ansicht, die ATP-Synthese könnte an jeder Kopplungsstelle über mehrere nicht-phosphorylierte Zwischenprodukte verlaufen^[11], wird vom Verfasser nicht geteilt, da kein zwingender Grund für ein solches Postulat vorzuliegen scheint.

Obwohl somit die Existenz eines energiereichen Primärproduktes der oxidativen Phosphorylierung weitgehend gesichert ist, können Struktur und Reaktionsweise noch nicht definiert werden. Die Frage nach Natur und Bildungsweise des Primärproduktes ist gleichzeitig eine Frage nach dem Ablauf der oxidativen Phosphorylierung. So wird es auch verständlich, daß sich die Hypothesen über diesen Reaktionsablauf hauptsächlich in der Definition dieses Zwischenproduktes unterscheiden.

II. Hypothesen zum Reaktionsablauf

Derzeit werden vorwiegend drei Hypothesen über den Verlauf der oxidativen Phosphorylierung diskutiert: Die „chemische“, die „chemiosmotische“ und die „Konformationshypothese“. Eine Entscheidung zwischen diesen Hypothesen ist noch nicht möglich. In der folgenden Darstellung wird geprüft, wieweit jede Hypothese den beobachteten Tatsachen genügt und ob es überhaupt möglich erscheint, die Hypothesen experimentell zu beweisen oder zu widerlegen.

Wie bereits erwähnt, scheint der Ablauf der oxidativen Phosphorylierung dem der ebenfalls noch unaufgeklärten Photophosphorylierung sehr ähnlich zu sein^[1,37,37a]. Diese Er-

[18] L. Ernster in N. M. Sissakian u. E. C. Slater: Proc. Fifth Int. Congress Biochemistry, Moskau 1961, Pergamon Press, Oxford IUB 25, Bd. V 1963, S. 115.

[19] J. M. Tager u. E. C. Slater, Biochim. biophysica Acta 77, 227 (1963).

[20] I. Vallin u. H. Löw, Biochim. biophysica Acta 92, 446 (1964).

[21] L. Danielson u. L. Ernster, Biochem. Z. 338, 188 (1963).

[22] B. Chance, J. biol. Chemistry 240, 2729 (1965).

[23] C. S. Rossi u. A. L. Lehninger, J. biol. Chemistry 239, 3971 (1964).

[24] P. C. Hinkle, R. A. Butow u. E. Racker, unveröffentlicht.

[25] C.-P. Lee u. L. Ernster, Biochem. biophysic. Res. Commun. 23, 176 (1966).

[26] J. R. Bronk, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 524 (1963).

[27] D. E. S. Truman u. H. Löw, Exp. Cell Res. 31, 230 (1963).

[28] L. Wojtczak, H. Zaluska u. Z. Drahota, Biochim. biophysica Acta 98, 8 (1965).

[29] D. S. Beattie u. R. E. Basford, J. biol. Chemistry 241, 1412 (1966).

[30] A. B. Falcone u. R. L. Mao, Biochim. biophysica Acta 105, 246 (1965).

[31] W. Colli u. M. E. Pullmann, Cienc. e Cult. (Sao Paulo) 16, 187 (1964).

[32] S. G. Van den Bergh in [17], S. 125.

[33] H. A. Lardy u. H. Wellman, J. biol. Chemistry 195, 215 (1952).

[34] W. F. Loomis u. F. Lipmann, J. biol. Chemistry 173, 807 (1948).

[35] R. K. Crane u. F. Lipmann, J. biol. Chemistry 201, 235 (1953).

[36] P. G. Heytler, Biochemistry 2, 357 (1963).

[37] P. Mitchell, Biol. Rev. Cambridge philos. Soc. 41, 445 (1966).

[37a] A. T. Jagendorf u. E. Uribe, Brookhaven Symposium in Biology 19 (1966), im Druck.

kenntnis hat für die experimentelle Überprüfung der einzelnen Hypothesen deshalb Bedeutung erlangt, weil zahlreiche Versuche mit isolierten Chloroplasten einfacher und eindeutiger durchzuführen sind als mit isolierten Mitochondrien. Hier werden allerdings Experimente mit Chloroplasten nur erwähnt, wenn sie – wie bei der „chemiosmotischen“ Hypothese – zur Diskussion beitragen.

1. Die chemische Hypothese

Nach der erstmals von Slater formulierten „chemischen“ Hypothese [38] führt eine energieliefernde Redoxreaktion zwischen zwei benachbarten Atmungskettenkomponenten AH_2 und B zu einer energiereichen chemischen Bindung (Symbol \sim) zwischen A und einer Substanz X (Reaktion (2)). Diese nicht-phosphorylierte Zwischenverbindung $A\sim X$, die dem Elektronentransport und der ATP-Synthese gemeinsam ist, reagiert mit P_i zu einem phosphorylierten Zwischenprodukt $X\sim P$, dessen Phosphorylrest schließlich auf ADP übertragen wird (Reaktionen (3) und (4)):



Diese Reaktionen entsprechen der einfachsten Form der „chemischen“ Hypothese. Die unmittelbare Beteiligung von P_i an der Redoxreaktion nach Reaktion (2a)



kann aufgrund der bereits erwähnten Versuche an submitochondrialen Partikeln mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden [20, 21]. Nach der „chemischen“ Hypothese bedeutet „energiereiches Primärprodukt“ in Abbildung 2 eine chemische Substanz mit einer energiereichen chemischen Bindung. Es bleibt offen, ob im Primärprodukt die entsprechende Atmungskettenkomponente in oxidiert (entsprechend Reaktion (2)) oder reduzierter Form vorliegt.

Nach der „chemischen“ Hypothese besteht eine enge Analogie zwischen oxidativer Phosphorylierung und den ATP-bildenden Schritten der seit längerer Zeit aufgeklärten [39–41] Triosephosphat-Dehydrogenase-Reaktion; dies ist eines der stärksten Argumente für die „chemische“ Hypothese.

Die Atmungskontrolle wird damit erklärt, daß die energiereichen Bindungen in $A\sim X$ und $X\sim P$ in intakten Mitochondrien relativ stabil sind. Ohne Zusatz von ADP und P_i würde somit A nach kurzer Zeit als $A\sim X$ vorliegen und für den Elektronentransport ausfallen. Entkopplersubstanzen würden durch chemische Reaktion mit $A\sim X$ dessen energiereiche Bindung lösen.

[38] E. C. Slater, Nature (London) 172, 975 (1953).

[39] E. Racker u. I. Krinsky, J. biol. Chemistry 198, 731 (1952).

[40] J. Harting u. S. F. Velick, J. biol. Chemistry 207, 867 (1954).

[41] P. D. Boyer u. H. L. Segal in W. D. McElroy u. B. Glass: The Mechanism of Enzyme Action. Johns Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 520.

Für eine experimentelle Überprüfung der „chemischen“ Hypothese ergeben sich mehrere Ansatzpunkte. Unter bestimmten Bedingungen – z.B. im Zustand der Atmungskontrolle – müßten energiereiche Formen einzelner Atmungskettenkomponenten (entsprechend $A\sim X$) nachzuweisen sein. Außerdem sollten sich die an den drei Kopplungsstellen der Atmungskette gebildeten energiereichen Primärprodukte voneinander unterscheiden, da X jeweils an eine andere Atmungskettenkomponente gebunden ist. Schließlich wäre auch die Isolierung einer phosphorylierten, von ATP verschiedenen Zwischenverbindung (entsprechend $X\sim P$ in Reaktion (3)) zwar kein Beweis, aber doch eine Stütze der „chemischen“ Hypothese. Keine dieser Voraussagen konnte jedoch bisher verifiziert werden.

Trotz zahlreicher Versuche ist nicht bekannt, ob Atmungskettenkomponenten an der Bildung des energiereichen Primärproduktes direkt beteiligt sind. Die von mehreren Autoren diskutierte Beteiligung von Chinonphosphaten [42, 43] oder $NADH\sim P$ [44] an der oxidativen Phosphorylierung ist unbewiesen und auch unwahrscheinlich. Die Daten über das von Chance et al. als energiereiche Form des Cytochroms b interpretierte Cytochrom b_{555} [45–47] reichen nicht aus, um dieses interessante Pigment als energiereiches Primärprodukt im Sinne der „chemischen“ Hypothese zu identifizieren. Auch die Existenz von kopplungsstellenspezifischen energiereichen Primärprodukten ist noch nicht bewiesen, da sich die drei Kopplungsstellen u.a. in Untersuchungen an submitochondrialen Partikeln gegenüber Hemmstoffen und Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung sowie gegenüber „Kopplungsfaktoren“ (s.u.) weitgehend gleich verhielten [48].

Schließlich konnte trotz beträchtlicher Bemühungen bisher kein phosphoryliertes Zwischenprodukt der oxidativen Phosphorylierung nachgewiesen werden. Das vom Arbeitskreis um Boyer in Mitochondrien entdeckte, proteingebundene Phosphohistidin [49] ist an der oxidativen Phosphorylierung nicht beteiligt [50]. Die Funktion des von Beyer aus Mitochondrien isolierten Phosphoproteins [51] sowie der von Norman et al. beschriebenen, nicht näher definierten Phosphatfraktion [52] ist unbekannt. Es ist auch umstritten [53, 54, 54a], ob das von Perlmut und Wainio als Zwischenprodukt der oxidativen Phosphorylierung vorgeschlagene Phosphomonojodhistidin [55] in Mitochondrien überhaupt vorkommt. Pro-

[42] V. M. Clark, D. W. Hutchinson u. A. Todd, Nature (London) 187, 59 (1960).

[43] M. Vilkas u. E. Lederer, Experientia 18, 546 (1962).

[44] D. E. Griffiths u. R. Chaplain, Biochem. biophys. Res. Commun. 8, 497 (1963).

[45] B. Chance u. B. Schoener, J. biol. Chemistry 241, 4567 (1966).

[46] B. Chance, C.-P. Lee u. B. Schoener, J. biol. Chemistry 241, 4574 (1966).

[47] B. Chance u. B. Schoener, J. biol. Chemistry 241, 4577 (1966).

[48] G. Schatz u. E. Racker, J. biol. Chemistry 241, 1329 (1966).

[49] M. DeLuca, K. E. Ebner, D. E. Hultquist, G. Kreil, J. B. Peter, R. W. Moyer u. P. D. Boyer, Biochem. Z. 338, 512 (1963).

[50] R. A. Mitchell, L. G. Butler u. P. D. Boyer, Biochem. biophys. Res. Commun. 16, 545 (1964).

[51] R. E. Beyer, Biochem. biophys. Res. Commun. 17, 184 (1964).

[52] A. W. Norman, L. L. Bieber, O. Lindberg u. P. D. Boyer, J. biol. Chemistry 240, 2855 (1965).

[53] C. Holloway, R. Bond, I. Knight u. R. Beechey, Biochemistry 6, 19 (1967).

[54] L. E. Perlmut u. W. W. Wainio, Biochemistry 6, 15 (1967).

[54a] C. T. Holloway, R. P. M. Bond, I. G. Knight u. R. B. Beechey, Biochemistry 6, 1615 (1967).

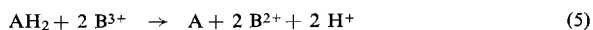
[55] L. E. Perlmut u. W. W. Wainio, Biochemistry 5, 608 (1966).

teingebundenes Serinphosphat^[56,57] oder Lipidphosphate^[52,58] sind als Zwischenprodukte ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Die „chemische“ Hypothese konnte somit trotz erheblicher Anstrengungen bisher nicht bestätigt werden. Wichtigstes Argument gegen sie ist ihr Unvermögen, eine der wesentlichsten Eigenschaften der oxidativen Phosphorylierung zu erklären: Die enge Bindung an eine Membranstruktur. Sie bietet andererseits einer experimentellen Überprüfung mehr Ansatzpunkte als die anderen Hypothesen und hat sich deshalb besonders anregend auf die Forschung ausgewirkt.

2. Die „chemiosmotische“ Hypothese

Nach der von *Mitchell* entwickelten „chemiosmotischen“ Hypothese^[37,59] sind Atmung und ATP-Synthese nicht über eine energiereiche chemische Verbindung gekoppelt, sondern durch einen atmungsabhängigen Protonentransport durch eine „Kopplungsmembran“. Dieser Protonentransport verläuft synchron mit dem Elektronenübergang von einem reduzierten Zweielektronenüberträger AH_2 zu einem oxidierten Einelektronenüberträger B^{3+} , deren aktive Zentren in der Kopplungsmembran asymmetrisch angeordnet sind (vgl. Abb. 3a und Reaktion (5)).



Die Summe der am Transport zweier Protonen beteiligten Ein- und Zweielektronenüberträger wird als „Schleife“ („loop“) bezeichnet (Abb. 3a); eine Schleife entspricht formal einer Kopplungsstelle der „chemischen“ Hypothese.

Die „chemiosmotische“ Hypothese verbietet eine passive Diffusion von Ionen durch die Kopplungsmembran. Bei einer solchen atmungsgekoppelten „Protonenpumpe“ führt deshalb die Ausbildung eines Protonen-Konzentrationsgradienten auch zu einer Trennung elektrischer Ladungen und damit zu einer elektrischen Potentialdifferenz zwischen den beiden Seiten der Kopplungsmembran, d.h. zu einem Membranpotential. Nach der „chemiosmotischen“ Hypothese bedeutet „energiereiches Primärprodukt“ in Abbildung 2 die freie Energie des elektrochemischen Potentials.

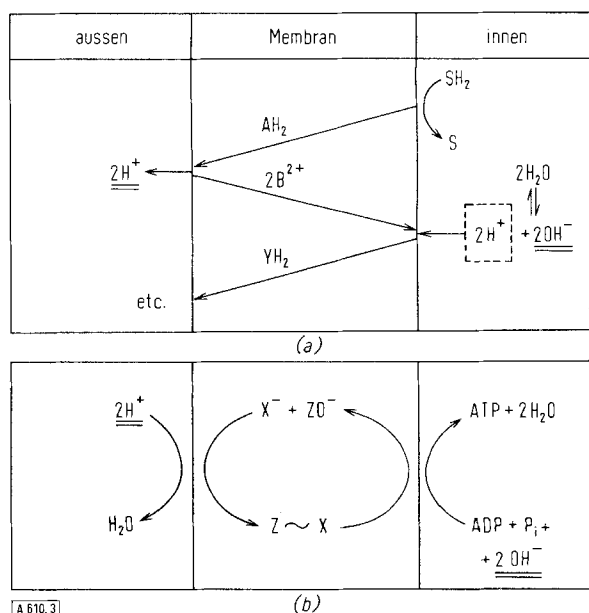
Da es offensichtlich keine völlig ionenundurchlässigen Membranen gibt, ist der relative Beitrag des Konzentrationsgradienten und des Membranpotentials zur Gesamtenergie des elektrochemischen Potentials schwer vorauszusagen. Im Gegensatz zur Anschauung von *Chance* und *Mela*^[60] setzt deshalb der Kopplungsvorgang nach der „chemiosmotischen“ Hypothese

nicht unbedingt eine beträchtliche pH-Differenz senkrecht zur Kopplungsmembran voraus.

Eine völlig ionenundurchlässige Kopplungsmembran würde allerdings auch die Aufnahme ionisierter Substrate und Cofaktoren in das Innere der Mitochondrien verhindern. Die „chemiosmotische“ Hypothese nimmt deshalb zusätzlich an, daß die Kopplungsmembran ionenspezifische Austausch- und Diffusionssysteme enthält, die eine Aufnahme bestimmter Ionen durch Austausch gegen gleichgeladene intramitochondriale Ionen ermöglichen.

Die Bildung von ATP erklärt die Hypothese mit dem Rückfluß von Protonen durch die Kopplungsmembran, wobei die freie Energie des elektrochemischen Potentials über ein membrangebundenes, vektorielles ATPase-System die Wasserabspaltung zwischen P_i und ADP bewirkt. Der für diese ATP-bildende Reaktion vorgeschlagene Mechanismus ist noch unbefriedigend und einer der schwächsten Punkte der Hypothese.

In Abbildung 3 ist der durch eine „Schleife“ bewirkte Transport zweier Protonen durch die Kopplungsmembran (und die gleichzeitige Anreicherung von OH^- auf der Gegenseite) sowie die Rekombination von H^+ und OH^- durch ein vektorielles ATPase-System schematisch wiedergegeben. Die Richtung der Protonenbewegungen wird von der „chemiosmotischen“ Hypothese nicht festgelegt; die aus Abbildung 3 ersichtliche Richtung entspricht den empirischen Befunden an isolierten Rattenlebermitochondrien^[61].



[A 610.3]

Abb. 3. Protonentransport durch eine „Schleife“ (a) und ATP-Synthese (b) nach der „chemiosmotischen“ Hypothese. S und SH_2 : oxidiertes bzw. reduziertes Substrat; AH_2 und YH_2 : reduzierte Zweielektronen (Wasserstoff)-Überträger; B^{2+} : reduzierter Einelektronen-Überträger; X^- und ZO^- : hypothetische, am Energietransport beteiligte funktionelle Gruppen; $Z \sim X$: hypothetisches energiereiches Zwischenprodukt, das am Energietransport, nicht jedoch am Elektronentransport beteiligt ist.

In Abwesenheit von P_i und ATP wäre in atmenden Mitochondrien eine Anhäufung von H^+ und OH^- auf entgegengesetzten Seiten der Kopplungsmembran zu erwarten. Diese Anhäufung könnte in einer Rückreaktion über die atmungsgekoppelte „Protonenpumpe“

[56] S. Sperti, L. A. Pinna, M. Lorini, V. Moret u. N. Siliprandi, *Biochim. biophysica Acta* 93, 284 (1964).

[57] K. Ahmed u. J. D. Judah, *Biochim. biophysica Acta* 71, 295 (1963).

[58] L. L. Bieber u. P. D. Boyer, *J. biol. Chemistry* 241, 5375 (1966).

[59] P. Mitchell, *Nature (London)* 191, 144 (1961).

[60] B. Chance u. L. Mela, *Nature (London)* 212, 372 (1966).

[61] P. Mitchell u. J. Moyle, *Nature (London)* 208, 147 (1965).

den Elektronentransport hemmen und Atmungskontrolle bewirken. Entkopplersubstanzen erhöhen nach der Hypothese die Permeabilität der Kopplungsmembran für Protonen und bewirken damit einen Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials.

Mitchell^[59] sowie Mitchell und Moyle^[61,62] konnten zeigen, daß in Übereinstimmung mit der „chemiosmotischen“ Hypothese sowohl die Oxidation von Substraten als auch die Hydrolyse von ATP eine gleichgerichtete Protonenbewegung (und zwar eine Ejektion von Protonen aus den Mitochondrien) bewirkten. Für jede von einem Elektronenpaar durchlaufene „Schleife“ sowie für jedes hydrolysierte Molekül ATP wurden zwei Protonen aus den Mitochondrien in das Suspensionsmedium gepumpt. Auch die von der „chemiosmotischen“ Hypothese geforderte Ionenundurchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran (als der eigentlichen „Kopplungsmembran“, s.u.) konnte bestätigt werden^[37,63].

Es sei betont, daß der Begriff „Ionenundurchlässigkeit“ lediglich im Sinne einer Schranke gegenüber passiver Diffusion verstanden werden darf. Es können sehr wohl Ionen (z.B. Ca^{2+} , P_i oder Anionen gewisser Dicarbonsäuren) in das Innere der Mitochondrien aufgenommen werden, wobei jedoch nicht passive Diffusion, sondern wahrscheinlich spezifische enzymgesteuerte Transportprozesse wirksam sind, die eine Aufnahme von Kationen und Anionen an die Ausstoßung von H^+ bzw. OH^- koppeln^[63]. Diese Transportsysteme sind zwar noch wenig charakterisiert, scheinen aber den von der „chemiosmotischen“ Hypothese geforderten Austausch-Diffusionssystemen zu entsprechen.

daß die elektrische Leitfähigkeit künstlicher Lipidmembranen durch 2,4-Dinitrophenol um mehr als zwei Größenordnungen gesteigert werden kann^[65]. Beides läßt sich mit der „chemischen“ oder der „Konformationshypothese“ (s.u.) nur schwer erklären.

Unter dem Vorbehalt vergleichbarer Verhältnisse können auch die an unbelichteten Chloroplastensuspensionen erhaltenen Versuchsergebnisse als Argument für die „chemiosmotische“ Hypothese gewertet werden. Jagendorf et al.^[66,66a] beobachteten bei einer plötzlichen pH-Erhöhung des Suspensionsmediums eine Synthese von ATP, die durch Entkoppler der Photophosphorylierung blockiert wurde. Kontrollexperimente deuteten darauf hin, daß diese ATP-Synthese auf die Induzierung eines elektrochemischen Potentials entlang der Granamembranen im Sinne der „chemiosmotischen“ Hypothese und nicht auf einen pH-induzierten Elektronentransport oder unbekannte, in den Chloroplasten bereits vorgebildete Zwischenprodukte der Photophosphorylierung zurückzuführen war.

Analoge Versuche zum Nachweis einer pH-induzierten ATP-Synthese in isolierten Mitochondrien blieben zunächst ergebnislos^[37,67,68]. Zwar berichteten dann Reid et al.^[69], daß suspendierte Rattenlebermitochondrien bei einer plötzlichen pH-Erniedrigung des Suspensionsmediums $^{32}\text{P}_i$ in ATP einbauen können; das Ausmaß des Einbaus war aber so gering, daß die Entstehung von AT^{32}P über eventuell vorgebildete Zwischenprodukte der oxidativen Phosphorylierung oder über schwer kontrollierbare Austausch- und Elektronentransportreaktionen nicht ausgeschlossen werden kann.

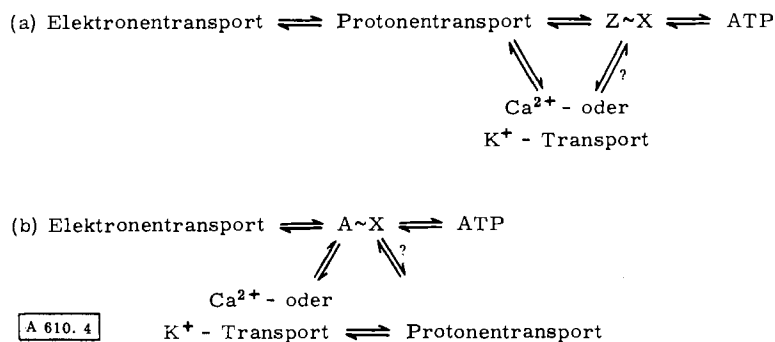


Abb. 4. Wechselbeziehungen zwischen Elektronentransport, ATP-Synthese und Ionentransport nach der „chemiosmotischen“ (a) und der „chemischen“ (b) Hypothese.

Eine besonders starke Stütze für diese Hypothese lieferten Untersuchungen über die Wirkung von Entkopplersubstanzen, da chemisch so verschiedenartige Entkoppler wie 2,4-Dinitrophenol, 2-(*m*-Chlorphenyl)-hydrazono-malonsäuredinitril und Dicumarol die Protonendurchlässigkeit der Mitochondrienmembran stark erhöhten^[37,64,64a]. Bielawski et al. zeigten überdies,

Das auf den ersten Blick eindrucksvolle experimentelle Material ist indessen noch kein Beweis für die „chemiosmotische“ Hypothese. Nach neueren Untersuchungen scheinen nämlich die an isolierten Mitochondrien beobachteten Protonenbewegungen^[61,62] nicht Reaktionen von „Schleifen“ und vektoriellen ATPase-

[62] P. Mitchell u. J. Moyle, *Nature* (London) 208, 1205 (1965).

[63] J. B. Chappell u. K. Haarhoff in: *The Biochemistry of Mitochondria*, Proc. Third Meeting Fed. European Biochem. Societies, Warschau 1966, im Druck.

[64] J. B. Chappell u. A. R. Crofts, *Biochem. J.* 95, 393 (1965).

[64a] P. Mitchell u. J. Moyle, *Biochem. J.* 104, 588 (1967).

[65] J. Bielawski, T. E. Thompson u. A. L. Lehninger, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 24, 948 (1966).

[66] G. Hind u. A. T. Jagendorf, *J. biol. Chemistry* 240, 3195 (1965).

[66a] A. T. Jagendorf u. E. Uribe, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 55, 170 (1966).

[67] E. C. Slater, persönliche Mitteilung.

[68] R. E. McCarty u. G. Schatz, unveröffentlichte Versuche.

[69] R. A. Reid, J. Moyle u. P. Mitchell, *Nature* (London) 212, 257 (1966).

Systemen im Sinne der „chemiosmotischen“ Hypothese (Abb. 4a), sondern Folgereaktionen eines atungsgekoppelten Transportes von Ca^{2+} oder K^+ aus dem Suspensionsmedium in die Mitochondrien zu sein [63, 70, 71]. Damit kann aber der von Mitchell und Moyle beobachtete atungs- und ATP-gekoppelte Protonentransport auch von der „chemischen“ Hypothese, wie in Abbildung 4b angedeutet, verhältnismäßig zwanglos erklärt werden.

Selbst die pH-induzierte ATP-Synthese in Chloroplasten [66a] könnte nach Abbildung 4b durch die „chemische“ Hypothese verstanden werden, wenn eine plötzliche Veränderung der Protonenaktivität im Suspensionsmedium in einer Rückreaktion die Bildung von $\text{A} \sim \text{X}$ und damit von ATP bewirkt. Das Konzept der „Schleife“ ist mit der Struktur der Atmungskette überdies nur schwer vereinbar, da beispielsweise das Segment zwischen Cytochrom c und Cytochrom aa_3 wohl Energiekopplung, jedoch keinen Zweielektronenüberträger enthält. Nach Slater [71a] ist die „chemiosmotische“ Hypothese auch aus thermodynamischen Gründen unhaltbar, da die zur ATP-Synthese erforderliche freie Energie den Energiegehalt der von Mitchell [37] geforderten Ionengradienten übersteigen dürfte. Dieser Einwand ist jedoch nicht zwingend, da die zur ATP-Synthese in Mitochondrienmembranen nötige Energie sowie die thermodynamischen Besonderheiten extrem kleiner Volumina, wie der submitochondrialer Partikel, nicht mit Sicherheit bekannt sind [71–71e].

Die bisher publizierten Experimente und Überlegungen können die „chemiosmotische“ Hypothese weder beweisen noch widerlegen. Eine klare Widerlegung wäre z.B. die Identifizierung einer dem Elektronen- und Energietransport gemeinsamen Zwischenverbindung oder der Nachweis, daß sämtliche Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung auch in einem löslichen System ablaufen können. Die Wirkung von Entkopplern, die enge Bindung der oxidativen Phosphorylierung an eine Membranstruktur und die pH-induzierte ATP-Synthese lassen sich aber mit der „chemiosmotischen“ Hypothese zwangloser erklären als mit der „chemischen“ oder der „Konformationshypothese“.

3. Die „Konformations“-Hypothese

Die Parallelen zwischen der von Mitochondrien und von Myosin katalysierten ATPase-Reaktion veranlaßten Boyer zu der Annahme, die beim Elektronentransport freiwerdende Energie könnte zunächst als energiereiche Konformation eines Proteins „eingefangen“ und damit im Prinzip an die ATP-Synthese ge-

koppelt werden [13, 72]. Als mögliche Zwischenreaktion bei der ATP-Bildung diskutierte Boyer eine durch die Konformationsänderung induzierte Bildung einer intramolekularen, energiereichen $\text{S} \sim \text{Acyl}$ -Bindung (Abb. 5).

Diese Formulierung läßt wie die „chemische“ Hypothese eine Analogie zu der von Triosephosphat-Dehydrogenase katalysierten ATP-Synthese erkennen, bei

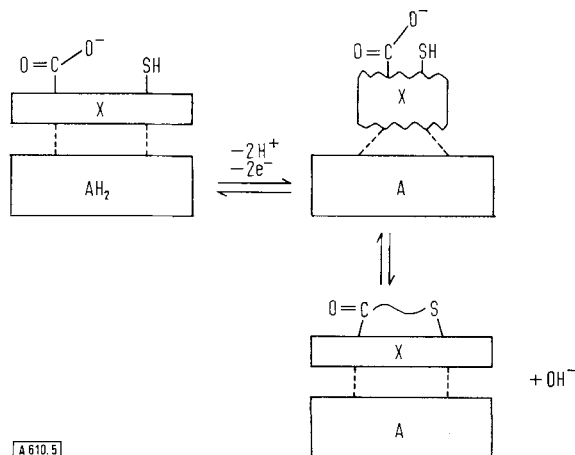


Abb. 5. Die primäre Kopplungsreaktion nach der „Konformations“-Hypothese. A und AH_2 : oxidiertes bzw. reduziertes Atmungskettenenzym; X: hypothetisches Kopplungsprotein, das mit A entweder identisch ist oder in enger Wechselwirkung steht.

der die intermediäre Bildung einer $\text{S} \sim \text{Acyl}$ -Bindung gesichert ist [39–41]. Die entkoppelnde Wirkung von 2,4-Dinitrophenol wird durch eine Spaltung der $\text{S} \sim \text{Acyl}$ -Bindung unter Bildung einer spontan hydrolysierenden Gruppierung $2,4(\text{NO}_2)_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-O-Acyl}$ erklärt.

Es wird offen gelassen, ob der Kopplungsvorgang als Konformationsänderung eines Atmungskettenenzyms oder eines am Elektronentransport nicht direkt beteiligten Proteins zu verstehen ist. Im ersten Falle wäre die „Konformations“-Hypothese lediglich eine detaillierte Variante der „chemischen“ Hypothese. Im zweiten Falle verzichtete die „Konformations“-Hypothese auf ein dem Elektronen- und Energietransport gemeinsames Zwischenprodukt und unterschiede sich damit von der „chemischen“ Hypothese. Es wäre dann sogar denkbar, daß jede Atmungskette nur eine einzige Kopplungsstelle enthielte und die in den drei Segmenten der Atmungskette freiwerdende Energie jeweils zur Deformation des gleichen Proteinmoleküls (z.B. eines „kontraktilen Proteins“ der inneren Mitochondrienmembran) verwendet würde. Dies setzt allerdings noch weitgehend unbewiesene Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen der Mitochondrienmembran voraus [72].

Die „Konformationshypothese“ kann die enge Bindung zwischen oxidativer Phosphorylierung und einer Membranstruktur einleuchtend erklären und ist mit der mehrfach beobachteten Beeinflussung der Mitochondrienstruktur durch die Reaktionen der Energie-

[70] B. Chance u. L. Mela, Nature (London) 212, 369 (1966).

[71] R. S. Cockrell, E. J. Harris u. B. C. Pressman, Biochemistry 5, 2326 (1966).

[71a] E. C. Slater, Europ. J. Biochemistry 1, 317 (1967).

[71b] H. Baum, Nature (London) 214, 1326 (1967).

[71c] P. Mitchell, Nature (London) 214, 1327 (1967).

[71d] B. Chance, Nature (London) 214, 399 (1967).

[71e] P. Mitchell, Nature (London) 214, 400 (1967).

[72] P. D. Boyer in T. E. King, H. S. Mason u. M. Morrison: Oxidases and Related Redox Systems. Wiley, New York 1965, S. 994.

kopplung [2,73] sowie der großen Ähnlichkeit der drei Kopplungsstellen vereinbar. Andererseits vermag sie ebensowenig wie die „chemische“ Hypothese die Mannigfaltigkeit der als Entkoppler wirkenden Substanzen zu deuten. Die Hypothese bietet zur Zeit einer experimentellen Überprüfung wenig Ansatzpunkte.

III. Kopplungsfaktoren

Als Kopplungsfaktor wird ein aus Mitochondrien stammendes Protein bezeichnet, das bei Zusatz zu geeigneten mitochondrialen Partikeln deren Fähigkeit zur oxidativen Phosphorylierung erhöht. Es liegt nahe, eine solche Stimulierung als eine Beschleunigung der Energietransportkette zu interpretieren (Abb. 2, Reaktionsweg 1) und den untersuchten Kopplungsfaktor somit als ein spezifisch am Energietransport beteiligtes Enzym zu betrachten. Untersuchungen über den Kopplungsfaktor 1 (F_1) sprechen zwar für eine derartige Wirkungsweise, doch konnte ein eindeutiger Beweis für diese Annahme bisher für keinen der bekannten Kopplungsfaktoren erbracht werden. In den meisten Fällen ist es lediglich möglich, einen trivialen Effekt – z.B. eine Bindung natürlich vorkommender Entkopplersubstanzen [74] – mehr oder minder auszuschließen.

Seit der ersten Isolierung von Kopplungsfaktoren aus Rinderherzmitochondrien [75, 76] sind zahlreiche Berichte über Isolierung und Charakterisierung derartiger Faktoren erschienen, die ein ziemlich verwirrendes Bild ergeben [3, 10, 11]. Testpartikel und Reinheit der Kopplungsproteine unterscheiden sich so sehr, daß die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen nur in vereinzelten Fällen verglichen werden können.

Untersuchungen im Laboratorium von Racker führten zur Identifizierung und wenigstens teilweisen Reinigung von drei Kopplungsfaktoren (Faktor 1 bis 3, abgekürzt F_1 bis F_3) [77–80]. Die Wirkung eines vierten, dem Strukturprotein von Richardson et al. [81] ähnlichen Faktors F_4 [82] dürfte nach neueren Untersuchungen [80] zumindest zum Teil auf an Strukturprotein gebundenes F_2 und F_3 zurückgehen. Andreoli et al. [83]

und Lam et al. [84, 84a] isolierten zwei weitere Kopplungsfaktoren (FA und FB). Obwohl ein sorgfältiger Vergleich mit F_1 , F_2 oder F_3 noch aussteht, ist nach den publizierten Daten zu vermuten, daß wenigstens ein Teil der Wirkung von FA auf F_1 zurückgeht, das in diesen Präparaten entweder als Modifikationsprodukt (s.u.) oder als Komplex mit dem F_1 -Hemmstoff [85] vorliegt. Der von Beyer beschriebene Kopplungsfaktor [86], ATP-Synthetase II, ist hingegen mit F_1 nicht identisch [87]; seine Beziehung zu den übrigen Kopplungsfaktoren ist noch unklar.

Alle bisher erwähnten Kopplungsfaktoren wurden aus Rinderherzmitochondrien isoliert. Wadkins und Lehninger beschrieben einen Kopplungsfaktor aus Rattenlebermitochondrien, der eine ADP–ATP-Austauschreaktion katalysierte [88] und sich damit von F_1 unterschied. Die Wirksamkeit dieses Proteins als Kopplungsfaktor konnten Groot und Van den Bergh indessen nicht bestätigen [88a]. Eine genauere Charakterisierung der von Linnane [76] und Hommes [89] beschriebenen Kopplungsfaktoren steht noch aus.

Die noch vor wenigen Jahren postulierte Spezifität einzelner Kopplungsfaktoren für bestimmte Kopplungsstellen [90–92] muß heute ernstlich bezweifelt werden. Berichte über derartige Faktoren dürften zum Großteil auf unzureichende Methoden zur Messung der einzelnen Kopplungsstellen zurückgehen, da bis vor kurzem lediglich die Aktivität der dritten Kopplungsstelle (vgl. Abb. 1) unabhängig von der anderer Kopplungsstellen gemessen werden konnte [93]. Durch eine neue Methode zur selektiven Messung der ersten Kopplungsstelle in submitochondrialen Partikeln [48] kann man jetzt aber die Wirkung jedes Faktors auf zwei getrennte Kopplungsstellen feststellen. Derartige Untersuchungen ergaben, daß F_1 , F_2 und F_3 alle drei Kopplungsstellen beeinflussen [48, 79, 80]. Hinweise auf einen spezifischen Kopplungsfaktor für die erste Kopplungsstelle [91] konnten nicht bestätigt werden [95]; Berichte über die Existenz eines für die dritte Kopplungsstelle spezifischen Faktors [90, 92] haben sich als unreal erwiesen [94].

Bei den meisten aus Mitochondrien isolierten Kopplungsfaktoren handelt es sich um noch ziemlich in-

[73] A. L. Lehninger in M. Kasha u. B. Pullman: Horizons in Biochemistry. Academic Press, New York 1962, S. 421.

[74] M. E. Pullman u. E. Racker, Science (Washington) 123, 1105 (1956).

[75] M. E. Pullman, H. S. Penefsky u. E. Racker, Arch. Biochem. Biophysics 76, 227 (1958).

[76] A. W. Linnane, Biochim. biophysica Acta 30, 221 (1958).

[77] M. E. Pullman, H. S. Penefsky u. E. Racker, J. biol. Chemistry 235, 3322 (1960).

[78] H. S. Penefsky, M. E. Pullman, A. Datta u. E. Racker, J. biol. Chemistry 235, 3330 (1960).

[79] J. M. Fessenden u. E. Racker, J. biol. Chemistry 241, 2483 (1966).

[80] J. M. Fessenden, M. A. Dannenberg u. E. Racker, Biochem. biophysic. Res. Commun. 25, 54 (1966).

[81] S. H. Richardson, H. O. Hultin u. S. Fleischer, Arch. Biochem. Biophysics 105, 254 (1964).

[82] T. E. Conover, R. L. Prairie u. E. Racker, J. biol. Chemistry 238, 2831 (1963).

[83] T. E. Andreoli, K.-W. Lam u. D. R. Sanadi, J. biol. Chemistry 240, 2644 (1965).

[84] K.-W. Lam, J. B. Warshaw u. D. R. Sanadi, Federat. Proc. 25, 529 (1966).

[84a] K.-W. Lam, J. B. Warshaw u. D. R. Sanadi, Arch. Biochem. Biophysics 119, 477 (1967).

[85] M. E. Pullman u. G. C. Monroy, J. biol. Chemistry 238, 3762 (1963).

[86] R. E. Beyer, Biochem. biophysic. Res. Commun. 16, 460 (1964).

[87] R. E. Beyer u. G. Schatz, unveröffentlichte Versuche.

[88] C. L. Wadkins u. A. L. Lehninger, Federat. Proc. 22, 1092 (1962).

[88a] G. S. P. Groot u. S. G. Van den Bergh, Biochim. biophysica Acta, im Druck.

[89] F. A. Hommes, Biochim. biophysica Acta 71, 595 (1963).

[90] D. E. Green, R. E. Beyer, M. Hansen, A. L. Smith u. G. Webster, Federat. Proc. 22, 1460 (1963).

[91] A. L. Smith u. M. Hansen, Biochem. biophysic. Res. Commun. 8, 136 (1962).

[92] G. Webster, J. biol. Chemistry 240, 1365 (1965).

[93] E. E. Jacobs, Biochem. biophysic. Res. Commun. 3, 536 (1960).

[94] D. E. Green, persönliche Mitteilung.

homogene Proteinfraktionen, deren genauere Wirkungsweise unbekannt ist. Eingehende Untersuchungen liegen nur über den Kopplungsfaktor F_1 vor, der kurz besprochen werden soll.

F_1 wurde 1958 von Pullman et al.^[75] aus Rinderherz-mitochondrien durch Schütteln mit Glasperlen solubilisiert, als mitochondriale ATPase charakterisiert^[77] und bis zur Homogenität in der Ultrazentrifuge gereinigt^[77]. Nach Penefsky und Warner^[96] ist F_1 ein kompaktes symmetrisches Molekül vom Molekulargewicht 284000, das aus etwa zehn Untereinheiten vom Molekulargewicht 26000 besteht. F_1 scheint in der Mitochondrienmembran als undissoziiertes Molekül vorzuliegen. Bei Inaktivierung der ATPase-Aktivität isolierter Mitochondrien durch energiereiche Elektronen ergibt sich nämlich nach der Treffertheorie ein Molekulargewicht zwischen 260000 und 290000^[96a]. Nach negativer Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure können einzelne F_1 -Moleküle im Elektronenmikroskop als annähernd kugelförmige Gebilde mit einem Durchmesser von 80 bis 85 Å sichtbar gemacht werden^[97]. Nach Zusatz des gereinigten Proteins zu geeigneten submitochondrialen Partikeln mit geringer Phosphorylierungskapazität nimmt diese stark zu, wobei die Atmungsgeschwindigkeit nicht signifikant beeinflusst wird^[78]. Solubilisiertes F_1 katalysiert eine durch Oligomycin nicht hemmbare ATPase-Reaktion und wird bei 0 °C, nicht aber bei Zimmertemperatur, rasch denaturiert^[77,96].

Da andererseits die ATPase-Aktivität des membran- gebundenen F_1 durch Oligomycin stark gehemmt^[14,15] und durch Kälteeinwirkung nicht verringert wird, ist die Loslösung des Enzyms von der Mitochondrienmembran von bemerkenswerten Änderungen seiner Eigenschaften begleitet. Eine Untersuchung dieses als „Allotopie“ bezeichneten Phänomens^[97a] führte zur Isolierung einer partikulären Mitochondrienkomponente (F_0), die lösliches F_1 spezifisch binden konnte und es dabei in eine kältestabile und durch Oligomycin hemmbare Form zurückverwandelte^[98,99]. F_0 erwies sich als eine relativ rohe Membranfraktion, die zwar frei von F_1 war, jedoch noch Phospholipide sowie die Komponenten der gesamten Atmungskette enthielt^[98,99]. Bei weiterer Reinigung wurde ein cytochrom- und phospholipidarmes Produkt erhalten (CF_0), das aber noch das charakteristische Bindungsvermögen für F_1 besaß^[100].

Die Wirkung von F_0 auf lösliches F_1 scheint mehr als eine bloße Adsorption von F_1 an eine strukturierte Matrix zu sein. Nach unveröffentlichten Untersuchungen^[101] wird nämlich F_1 , das an Mitochondrien der

„petite“-Mutante von *Saccharomyces cerevisiae* gebunden ist, durch Oligomycin nicht gehemmt und durch Kälteeinwirkung rasch inaktiviert. Das mit diesen atmungsdefekten und weitgehend nicht-funktionellen Mitochondrien assoziierte F_1 entspricht also in gewisser Hinsicht dem löslichen Enzym und unterscheidet sich damit von F_1 , das an die atmenden Mitochondrien des Wildtyps gebunden ist^[102]. Gereinigtes F_1 aus der Mutante besitzt die gleichen enzymatischen und immunologischen Eigenschaften und das gleiche Molekulargewicht wie gereinigtes Wildtyp- F_1 und kann, ebenso wie dieses, durch Komplexbildung mit Rinderherz- F_0 in eine kältestabile und durch Oligomycin hemmbare Form übergeführt werden. Dies spricht dafür, daß die „petite“-Mutation^[103] in *S. cerevisiae* nicht F_1 selbst, sondern eine F_0 -artige Komponente der Hefemitochondrien modifiziert. Der F_0 -Mangel der mutanten Mitochondrien ist offenbar keine direkte Folge ihrer defekten Atmung, da anaerob gezüchtete Zellen des Wildtyps „Promitochondrien“ enthalten, die trotz fehlender Atmung kältestabiles und durch Oligomycin hemmbares membrangebundenes F_1 enthalten^[101, 103a].

Da F_1 eine ATPase-Reaktion katalysiert^[77] und mit ADP Komplexe bildet^[104], wurde vermutet, daß F_1 in Mitochondrien den letzten, ATP-bildenden Schritt der Energietransportkette katalysiert^[1, 77]. Lee und Ernster warfen die Frage nach der Wirkungsweise von F_1 – und von Kopplungsfaktoren überhaupt – aber erneut auf, nachdem sie beobachteten, daß sich die oxidative Phosphorylierung in submitochondrialen Partikeln mit geringer Phosphorylierungskapazität durch Zusatz kleiner Oligomycinmengen ($< 0,4 \mu\text{g}$ pro mg Mitochondrienprotein) erheblich steigern ließ. Höherer Zusatz von Oligomycin ($> 0,4 \mu\text{g}$ pro mg) hemmte dagegen die oxidative Phosphorylierung. Da sich die stimulierende Wirkung von Oligomycin (das in Säugetieren nicht vorkommt) offensichtlich nicht über eine direkte Beteiligung an den Reaktionen des Energietransportes erklären ließ, nahmen Lee und Ernster an, daß die Beschleunigung der ATP-Synthese durch Oligomycin indirekt, und zwar über eine Hemmung der „Verlustreaktion“ (Abb. 2, Reaktionsweg 3) erfolgte, die in submitochondrialen Partikeln mit den Reaktionen des Energietransportes um das energiereiche Primärprodukt erfolgreich konkurriert. Diese Deutung der phosphorylierungsfördernden Wirkung von Oligomycin wurde von Fessenden und Racker^[79] und von Lam et al.^[104a] erhärtet.

Lee und Ernster versuchten auch die stimulierende Wirkung der Kopplungsfaktoren durch einen derartigen indirekten Effekt zu erklären^[105]. Die von ihnen

[95] G. Schatz u. E. Racker, unveröffentlichte Versuche.

[96] H. S. Penefsky u. R. C. Warner, J. biol. Chemistry 240, 4694 (1965).

[96a] Y. Kagawa, Biochim. biophysica Acta 131, 586 (1967).

[97] Y. Kagawa u. E. Racker, J. biol. Chemistry 241, 2475 (1966).

[97a] E. Racker, Federat. Proc., im Druck.

[98] E. Racker, Biochem. biophysic. Res. Commun. 10, 435 (1963).

[99] Y. Kagawa u. E. Racker, J. biol. Chemistry 241, 2461 (1966).

[100] Y. Kagawa u. E. Racker, J. biol. Chemistry 241, 2467 (1966).

[101] G. Schatz, unveröffentlichte Versuche.

[102] G. Schatz, H. S. Penefsky u. E. Racker, J. biol. Chemistry 242, 2552 (1967).

[103] B. Ephrussi u. H. Hottinger, Cold Spring Harbor Sympos. quant. Biol. 16, 75 (1951).

[103a] G. Schatz, Biochim. biophysica Acta 96, 342 (1965).

[104] H. Zalkin, M. E. Pullman u. E. Racker, J. biol. Chemistry 240, 4011 (1965).

[104a] K.-W. Lam, J. B. Warshaw u. D. R. Sanadi, Arch. Biochem. Biophysics 117, 594 (1966).

[105] C.-P. Lee u. L. Ernster, Biochem. biophysic. Res. Commun. 18, 523 (1965).

verwendeten submitochondrialen Partikel enthielten jedoch noch beträchtliche Mengen an endogenem F_1 [79], was diese Argumentation, zumindest hinsichtlich F_1 , zweifelhaft erscheinen ließ. Sie setzte nämlich voraus, daß Oligomycin die oxidative Phosphorylierung auch in völlig F_1 -freien Partikeln stimulieren würde. Diese Annahme konnte eindeutig widerlegt werden. Racker und Horstman [106] gewannen nicht-phosphorylierende Partikel mit außerordentlich geringem F_1 -Gehalt. Durch Zusatz von F_1 und F_3 ließ sich in diesen Partikeln eine deutliche atmungsgekoppelte ATP-Synthese induzieren, während Oligomycin allein unwirksam blieb. Erst in Gegenwart suboptimaler F_1 -Mengen (und eines Überschusses an F_3) wurde die ATP-Synthese durch Oligomycin wieder stimuliert. Analoge Versuche von Lam et al. an FA-armen Rinderherzpartikeln ergaben, daß auch FA an der Stimulierung durch Oligomycin beteiligt ist [104a]. Überdies fanden Fessenden und Racker [79], daß der Effekt geringer Oligomycinmengen an F_1 -haltigen Partikeln durch ein spezifisches Antiserum gegen gereinigtes Rinderherz- F_1 völlig blockiert wurde. Daraus folgte deutlich die grundlegend verschiedene stimulierende Wirkung von F_1 und Oligomycin; außerdem wird die Annahme nahegelegt, daß die Beschleunigung der ATP-Synthese durch F_1 zumindest zum Teil auf einer enzymatischen Beschleunigung eines Teilschrittes der Energietransportkette beruht.

Die Wirkung von F_1 als Kopplungsfaktor kann indes durch eine Enzymfunktion allein nicht völlig erklärt werden [102]. Aus normalen Hefemitochondrien isoliertes F_1 stimulierte die oxidative Phosphorylierung in Rinderherzpartikeln die an F_1 verarmt, aber nicht völlig F_1 -frei waren. Diese Stimulierung durch das Hefeenzym erforderte die Gegenwart von enzymatisch aktivem Rinderherz- F_1 in den Testpartikeln und blieb bestehen, wenn die enzymatische Aktivität des an die Rinderherzpartikel gebundenen Hefe-enzymes durch ein spezifisches Antiserum fast völlig gehemmt wurde. Hefe- F_1 stimuliert also wahrscheinlich die oxidative Phosphorylierung in Rinderherzpartikeln nicht über eine direkte, d.h. enzymatische Beteiligung an der Energietransportkette, sondern – ähnlich wie Oligomycin – indirekt über eine Hemmung der konkurrierenden Verlustreaktion.

Aus diesen Versuchen ließ sich weiter schließen, daß ein solcher nichtenzymatischer Effekt auch an der koppelnden Wirkung von Rinderherz- F_1 beteiligt sein dürfte, da die enzymatischen und physikalischen Eigenschaften von Hefe- und Rinderherz- F_1 fast völlig übereinstimmen [102]. Dieser nicht-enzymatische F_1 -Effekt könnte als eine durch F_1 induzierte Strukturänderung der Mitochondrienmembran interpretiert werden; F_1 würde dabei nicht als Katalysator, sondern als Membrankomponente fungieren, die auf noch unbekannte Weise einen spontanen Zerfall des energiereichen Primärproduktes verhindert. Während sich jedoch bei der Bindung von Rinderherz- F_1 an Rinderherzpartikel enzymatischer und „struktureller“ Effekt überlagern,

scheint bei der Wechselwirkung zwischen Hefe- F_1 und Rinderherzpartikeln nur der „strukturelle“ Effekt zu wirken. Ein direkter Nachweis des „strukturellen“ F_1 -Effektes steht noch aus. Nach der „chemiosmotischen“ Hypothese wäre jedoch zu erwarten, daß Zusatz von F_1 zu F_1 -freien Rinderherzpartikeln deren Protonendurchlässigkeit verringert.

Eine derartige strukturelle Funktion könnte auch erklären, weshalb F_1 nach ATPase-Messungen an Rinderherzpartikeln [106] mindestens 10 % des Partikelproteins ausmacht. Bisher war es unerklärlich, warum eine rein katalytisch wirkende Komponente der Energietransportkette in derart großen Mengen vorhanden sein sollte.

Für einen nicht-katalytischen Effekt spricht auch der Nachweis einer stimulierenden Wirkung von F_1 auf die atmungsgekoppelte, energieabhängige Transhydrogenasereaktion (Abb. 2, Reaktionsweg 2). Dieser Effekt von F_1 wurde, im Gegensatz zu seiner stimulierenden Wirkung auf die atmungsgekoppelte ATP-Synthese, durch ein gegen F_1 gerichtetes Antiserum nicht verringert [107].

Besonders elegant lassen sich die beiden Effekte des Rinderherz- F_1 durch die Behandlung des Proteins mit Dicyclohexylcarbodiimid unterscheiden. Das chemisch modifizierte Produkt ist enzymatisch inaktiv, aber als Kopplungsfaktor genau so wirksam wie das Enzym aus Hefe [108].

Die vorausgegangenen Abschnitte zeigen, daß die Kenntnis des Aufbaus der Mitochondrienmembran für ein Verständnis der oxidativen Phosphorylierung offenbar unerlässlich ist. Die in diesem Zusammenhang aktuellen Fragen sollen deshalb abschließend kurz besprochen werden.

IV. Die Struktur der inneren Mitochondrienmembran

Mitochondrien sind aus zwei Membransystemen – einer inneren und einer äußeren Mitochondrienmembran – aufgebaut. Es ist heute erwiesen, daß sich die beiden Membranen durch ihre Feinstruktur [109–111], ihre chemische Zusammensetzung [112, 113] und ihren Enzymgehalt [112–116] unterscheiden. Die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung sind aus-

[107] J. M. Fessenden u. E. Racker, unveröffentlichte Versuche, erwähnt in [102].

[108] H. S. Penefsky, unveröffentlichte Versuche, erwähnt in [102].

[109] D. F. Parsons, J. Cell Biol. 16, 620 (1963).

[110] W. Stoerkenius, J. Cell Biol. 17, 443 (1963).

[111] H. Fernández-Morán, Circulation (New York) 26, 1039 (1962).

[112] D. F. Parsons, G. R. Williams u. B. Chance, Ann. New York Acad. Sci. 137, 643 (1966).

[113] D. F. Parsons, G. R. Williams, W. Thompson, D. Wilson u. B. Chance in S. Papa, J. M. Tager, E. Quagliariello u. E. C. Slater: Proc. Round-Table Discussion on Mitochondrial Structure and Compartmentation. Bari 1966. Adriatica Editrice, im Druck.

[114] G. Sottocasa, B. Kuylenstierna, L. Ernster u. A. Bergstrand, J. Cell Biol. 32, 415 (1967).

[115] C. Schnaitman, V. Erwin u. J. W. Greenawald, J. Cell Biol., 32, 719 (1967).

[116] D. E. Green, E. Bachmann, D. W. Allmann u. J. F. Perdue, Arch. Biochem. Biophysics 115, 172 (1966).

[106] E. Racker u. L. Horstman, J. biol. Chemistry 242, 2547 (1967).

schließlich in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert [112, 117].

Elektronenoptische Untersuchungen an isolierten, negativ kontrastierten Mitochondrien ergaben, daß die innere Mitochondrienmembran – im Gegensatz zur äußeren – von dicht und regelmäßig angeordneten Kügelchen („knobs“) mit ungefähr 80–90 Å Durchmesser besetzt ist, die durch zylindrische Stiele („stalks“) mit dem Membrankontinuum verbunden sind [108–111, 118, 119]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Smith* [118] und *Fernández-Morán* et al. [119] deuten an, daß auch dieses Kontinuum aus annähernd globulären Basiseinheiten („base-pieces“) mit einem ungefähren Durchmesser von 90 Å aufgebaut ist (vgl. Abb. 6).

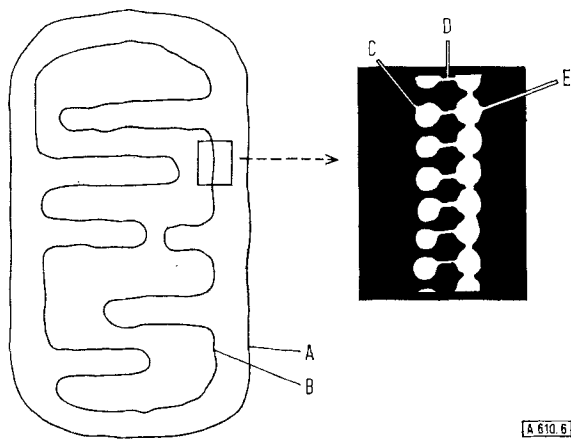


Abb. 6. Schematische Darstellung eines positiv kontrastierten Mitochondrions (links) und der Feinstruktur der negativ kontrastierten inneren Mitochondrienmembran (rechts). A: äußere, B: innere Membran; C: Kügelchen (knob); D: Stiel; E: Basiseinheit.

Die Hypothese, jeder „knob“ entspräche einer vollständigen Elektronentransportkette [120, 121], erwies sich als unhaltbar [2, 109, 118, 122], da das Mindestmolekulargewicht einer Elektronentransportkette ($1,2 \times 10^6$, vgl. [123]) eine Kugel mit 170 Å Durchmesser erfordert und folglich mit den Abmessungen der membrangebundenen „knobs“ unvereinbar ist. *Fernández-Morán* et al. [119] schlugen daraufhin vor, jeder „knob“ enthielte lediglich einen Teil der Atmungskette, und zwar Cytochrom-Oxidase. Auch diese Möglichkeit wurde widerlegt, als eine Behandlung mitochondrialer Partikel mit Ultraschall [124, 125] oder Trypsin und Harnstoff [117] zwar einen Verlust der membrangebundenen „knobs“, jedoch keine Verringerung des Cytochromgehalts oder der Elektronentransportaktivität bewirkte.

[117] E. Racker, D. D. Tyler, R. W. Estabrook, T. E. Conover, D. F. Parsons u. B. Chance in [72], S. 1077.

[118] D. S. Smith, J. Cell Biol. 19, 115 (1963).

[119] H. Fernández-Morán, T. Oda, P. V. Blair u. D. E. Green, J. Cell. Biol. 22, 63 (1964).

[120] D. E. Green in N. M. Sissakian: Proc. Fifth Int. Congress of Biochem., Moskau 1961, IUB 25, Bd IX. Pergamon Press, Oxford 1963, S. 9.

[121] P. V. Blair, T. Oda, D. E. Green u. H. Fernández-Morán, Biochemistry 2, 756 (1963).

[122] B. Chance, R. W. Estabrook u. C.-P. Lee, Science (Washington) 140, 379 (1963).

[123] A. L. Lehninger, C. L. Wadkins, C. Cooper, T. M. Devlin u. J. L. Gamble, jr., Science (Washington) 128, 450 (1958).

[124] B. Chance, D. F. Parsons u. G. R. Williams, Science (Washington) 143, 136 (1964).

[125] J. T. Stasny u. F. L. Crane, J. Cell Biol. 22, 49 (1964).

Racker et al. identifizierten die „knobs“ schließlich als Kopplungsfaktor F_1 (d.h. mitochondriale ATPase). Eine schrittweise Einwirkung von Trypsin und Harnstoff auf submitochondriale Partikel ergab mit einem bevorzugten Abbau der „knobs“ auch den Verlust der ATPase-Aktivität [97, 117]. Die einzelnen Moleküle hochgereinigter, negativ kontrastierter F_1 -Präparate aus Rinderherz [97] und Hefe [102] konnten von „knobs“ nicht unterschieden werden. Schließlich war es möglich, gereinigtes Rinderherz- F_1 an F_1 -freie Mitochondrienmembranen (F_0) zu binden und damit sowohl die ATPase-Aktivität der Membranen als auch die membrangebundenen „knobs“ wiederherzustellen [97, 117].

Eine Beteiligung der membrangebundenen „knobs“ am Elektronentransport kann nunmehr mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Frage, wo und in welcher Weise die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist, kann indessen noch nicht beantwortet werden. *Green* und *Tzagoloff* [126] vermuten, daß jede „Basiseinheit“ ein Segment der Elektronentransportkette repräsentiert, und der Elektronenübergang zwischen den einzelnen „Basiseinheiten“ durch „mobile“ Redoxkomponenten wie Cytochrom c oder Coenzym Q vermittelt wird. Diese Annahme steht nicht im Einklang mit experimentellen Befunden von *Kagawa* und *Racker* [97], die durch Zusatz von Phospholipid zu einem Komplex zwischen F_1 und CF_0 (s.o.) Vesikelbildung erzielen konnten. Diese Vesikel hatten zahlreiche membrangebundene „knobs“ und waren morphologisch von atmenden, submitochondrialen Rinderherzpartikeln nicht zu unterscheiden, obwohl sie praktisch frei von Cytochromen und Flavinen waren.

Über die chemische und enzymatische Natur des „Stiels“ ist nichts bekannt. Auch Lokalisierung und Funktion des von *Criddle* et al. [127] aus Rinderherzmitochondrien isolierten „Strukturproteins“ sind noch ungeklärt. Diese bei pH = 7 unlösliche Proteinfraction enthält keine prosthetischen Gruppen, bildet jedoch mit Myoglobin, Cytochrom b, Cytochrom aa_3 sowie mit Phospholipiden wasserlösliche Komplexe [81, 127, 128]. *Criddle* et al. [127] vermuteten deshalb, daß dieses Protein als Grundgerüst der mitochondrialen Atmungskette fungiert und die korrekte Anordnung der Atmungskomponenten ermöglicht. Es ergaben sich auch Hinweise, daß Strukturprotein bei der oxidativen Phosphorylierung [99], der Steuerung des Citronensäurezyklus [128a] und der extrachromosomalen Kontrolle der Mitochondrienfunktion [129] eine Rolle spielt.

Quantitative Untersuchungen der Komplexbildung mit Myoglobin und Cytochrom c sowie Endgruppenbestimmungen sprechen für eine Homogenität des

[126] D. E. Green u. A. Tzagoloff, Arch. Biochem. Biophysics 116, 293 (1966).

[127] R. S. Criddle, R. M. Bock, D. E. Green u. H. Tisdale, Biochemistry 1, 827 (1962).

[128] R. S. Criddle, R. M. Bock, D. E. Green u. H. Tisdale, Biochem. biophys. Res. Commun. 5, 75 (1961).

[128a] K. D. Munkres u. D. O. Woodward, Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 55, 1217 (1966).

[129] D. O. Woodward u. K. D. Munkres, Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 55, 872 (1966).

Strukturproteins^[130-130b]. Bei Elektrophorese in Acrylamid-Gelen zeigt es jedoch zahlreiche Banden^[131-133a]. Die erheblichen Diskrepanzen zwischen in verschiedenen Laboratorien ermittelten Aminosäureanalysen von Rinderherz-Strukturprotein^[127, 129, 134] sprechen ebenfalls gegen eine Homogenität. Nach *Kopaczyk et al.*^[135] scheint das Strukturprotein auch nicht, wie ursprünglich vermutet, das Grundgerüst der mitochondrialen Atmungskette zu sein; es könnte beispielsweise von einzelnen Segmenten („Komplexen“) der Atmungskette (vgl.^[136]) ohne Verlust der Elektronentransportaktivität abgetrennt werden. Diese Versuche sind indessen keineswegs eindeutig, da die völlige Entfernung des Strukturproteins nicht bewiesen wurde. *Woodward* und *Munkres*^[137] bezweifeln andererseits die Existenz eines für die innere Mitochondrienmembran spezifischen Strukturproteins, da sie „Strukturprotein“ nicht nur aus Mitochondrien, sondern auch aus Kernen, Mikrosomen und sogar einem hochtourig zentrifugierten Homogenatüberstand isolieren konnten. Dem steht jedoch gegenüber, daß nach Versuchen an Hefezellen lediglich Strukturprotein aus Mitochondrien, nicht aber aus anderen Zellfraktionen, mit ATP Komplexe bildet, die durch das Glykosid Atractylosid wieder spaltbar sind^[137a]. Über die Existenz, die Spezifität und die Funktion eines „Strukturproteins“ der inneren Mitochondrienmembran kann somit noch kein abschließendes Urteil gefällt werden. Da elektrophoretische Untersuchungen an Strukturproteinfraktionen wegen deren Schwerlöslichkeit und Tendenz zur Komplexbildung noch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind, ist nach Ansicht des Verfassers auch die Frage der Homogenität noch offen.

Berichte über die Isolierung von „kontraktilen Protein“ aus Mitochondrien^[136, 138, 139] haben sich da-

gegen eindeutig als unzutreffend erwiesen. Die publizierten Experimente konnten nicht reproduziert werden^[140] und wurden in einem Fall auf die Isolierung einer Verunreinigung der untersuchten Mitochondrienfraktionen zurückgeführt^[141]. Dadurch ist allerdings die Beteiligung eines noch unbekannten „kontraktilen Proteins“ an energiegekoppelten Volumenänderungen der Mitochondrien^[73] oder an der oxidativen Phosphorylierung (etwa im Sinne der Konformationshypothese) keineswegs ausgeschlossen.

Ausblick

Das Problem der oxidativen Phosphorylierung scheint phänomenologisch hinreichend abgegrenzt zu sein, d.h. die meisten Reaktionsmöglichkeiten des energiereichen Primärproduktes sind entweder bekannt oder lassen sich voraussehen.

Die Forschung über oxidative Phosphorylierung wendet sich in steigendem Maße strukturellen Aspekten zu, wobei sich die stetige Vervollkommnung der elektronenoptischen Methoden sowie die Neufassung der „chemiosmotischen“ Hypothese als starke Impulse erweisen. Aussichtsreiche Entwicklungen versprechen in diesem Zusammenhang Experimente mit künstlichen Lipidmembranen, deren Eigenschaften oft erstaunliche Parallelen zu denen biologischer Membranen aufweisen. Wenn sich einzelne gereinigte Kopplungsfaktoren an solche künstliche Membranen binden ließen, könnte der Einfluß dieser Bindung auf die katalytischen Eigenschaften der Proteine und auf die elektrische Leitfähigkeit der Membran oder ein Membranpotential studiert werden. Die bisher nur indirekt erfaßte strukturelle Funktion von Kopplungsfaktoren könnte in solchen Systemen direkt bewiesen werden. Das Fernziel solcher Versuche wäre schließlich die Rekonstruktion der Energietransportkette und der inneren Mitochondrienmembran.

Zahlreiche in dieser Abhandlung vorgebrachte Ansichten sind das Ergebnis ausführlicher Diskussionen mit Dr. M. E. Pullman und Dr. P. C. Hinkle, denen ich an dieser Stelle danken möchte. Die kritische Durchsicht des Manuskriptes besorgten in dankenswerter Weise Prof. H. Tuppy, Prof. E. Racker sowie meine Kollegen vom Institut für Biochemie, Wien. Ein großer Teil der in dieser Übersicht erwähnten eigenen Arbeiten wurde durch ein Fulbright-Reisestipendium ermöglicht.

Eingegangen am 24. April 1967, ergänzt am 20. Oktober 1967 [A 610]

[130] R. S. Criddle, D. L. Edwards u. T. G. Petersen, *Biochemistry* 5, 578 (1966).

[130a] D. L. Edwards u. R. S. Criddle, *Biochemistry* 5, 588 (1966).

[130b] D. L. Edwards u. R. S. Criddle, *Biochemistry* 5, 583 (1966).

[131] D. Haldar, K. Freeman u. T. S. Work, *Nature (London)* 211, 9 (1966).

[132] A. Tzagoloff, persönliche Mitteilung.

[133] H. Tuppy u. P. Swetly, persönliche Mitteilung.

[133a] C. W. Cotman u. H. R. Mahler, *Arch. Biochem. Biophysics* 120, 384 (1967).

[134] T. Katoh u. S. Sanukida, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 21, 373 (1965).

[135] K. Kopaczyk, J. Perdue u. D. E. Green, *Arch. Biochem. Biophysics* 115, 215 (1966).

[136] D. E. Green, D. C. Wharton, A. Tzagoloff, J. S. Rieske u. G. P. Brierley in [72], S. 1032.

[137] D. O. Woodward u. K. D. Munkres, persönliche Mitteilung.

[137a] H. Tuppy u. P. Swetly, *Biochim. biophysica Acta*, im Druck.

[138] T. Ohnishi u. T. Ohnishi, *J. Biochemistry (Tokyo)* 51, 380 (1962).

[139] S. A. Neifakh u. T. B. Kazakova, *Nature (London)* 197, 1106 (1963).

[140] P. V. Vignais, P. M. Vignais, C. S. Rossi u. A. L. Lehninger, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 11, 307 (1963).

[141] T. E. Conover u. M. Bárány, *Biochim. biophysica Acta* 127, 235 (1966).